

**Tesis Doctoral**

**DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO Y MOLECULAR  
DE LOS SÍNDROMES DE PRADER-WILLI Y ANGELMAN**

**David Poyatos Andújar**

**Directoras**

**Dra. M<sup>a</sup> Dolors Coll Sandiumenge**

**Dra. Miriam Guitart Feliubadalo**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología**

**Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)**

**UDIAT**  
Centre Diagnòstic



Fundació  
**Parc Taulí**  
Institut Universitari UAB



Corporació  
**Parc Taulí**



A mis Padres  
y hermanos

La Dra. *M<sup>a</sup> Dolors Coll Sandiumenge* del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona y la Dra. *Miriam Guitart Feliubadalo* Jefe del Departamento de Genética e Inmunología de la UDIAT-Laboratorio, Corporación Sanitaria Parc Taulí de Sabadell- Fundación Parc Taulí-UAB.

#### CERTIFICAN

Que *David Poyatos Andújar* ha realizado bajo su dirección el trabajo *Diagnóstico citogenético y molecular de los síndromes de Prader-Willi y Angelman* para obtener el título de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona y en el UDIAT-Laboratorio de la Corporación Sanitaria Parc Taulí.

Bellaterra, Octubre 2004

Dra. M<sup>a</sup> Dolors Coll

Dra. Miriam Guitart

David Poyatos

## **Agradecimientos:**

La realización y culminación del proyecto que ha llevado a esta Tesis es fruto del esfuerzo y dedicación de muchas personas a las que estoy eternamente agradecido. Principalmente quiero dar las gracias a mis directoras de tesis, M<sup>a</sup> Dolors Coll y Miriam Guitart, por la confianza depositada y ofrecerme la oportunidad de participar en este proyecto. En 1991 las Dras. M<sup>a</sup> Dolors Coll y Miriam Guitart constituyeron uno de los grupos pioneros en España para el diagnóstico de los síndromes de Prader-Willi y Angelman. Desde entonces no ha cesado su interés por descifrar la base genética de estos síndromes. En 1996 reciben del Ministerio de Sanidad y Consumo la subvención para el proyecto Diagnóstico clínico y molecular de los síndromes de Prader-Willi y Angelman (FIS96/0940). Con mi incorporación en este año se lleva a cabo este proyecto desarrollando la detección quimioluminiscente, no empleada hasta el momento, en el análisis de metilación para el diagnóstico de SPW/SA. Fruto de la experiencia adquirida en el estudio de estos síndromes se reconoce a la Corporación Sanitaria Parc Taulí como centro de referencia a nivel estatal. Numerosos pacientes son diagnosticados en estos años y su seguimiento por los médicos especialistas de la Unidad de atención a personas con trastornos cognitivos-conductuales de base genética (CONGE) del Hospital de Sabadell, establece un lazo de unión y continua colaboración con la Asociación Síndrome de Prader-Willi y la Asociación Síndrome de Angelman (ASA). Nuevos proyectos siguen desarrollándose en la actualidad. Toda esta actividad es posible gracias a la visión integradora y coordinación de M<sup>a</sup> Dolors y Miriam, dos mujeres que han dedicado buena parte de su vida profesional al estudio de estos síndromes.

A Antonio y Carmen, los mejores padres que puede tener un hijo, por vuestra inagotable energía y cariño que me ofrecéis en todo momento, por el constante esfuerzo y entrega a vuestros hijos, por los ánimos, y por todas esas pequeñas cosas que han permitido que alcance mis objetivos. A Antonio Miguel, por tus consejos y lógica de las cosas, una excelente persona de quien me siento orgulloso de ser hermano y que tanto me ayuda. Gracias a ti y a Araceli por traernos esa hija tan maravillosa. A Erika, por tus detalles y preocupación por las cosas, por tu simpatía y generosidad. A M<sup>a</sup> del Mar, la pequeña de la casa, por tu brillantez y entusiasmo, la armonía de la familia. A mis tíos Conchi, Luis, Isabel y Encarna Andújar por vuestra acogida y calor, que han hecho más llevadero el estar lejos de casa, compartiendo el valor de una gran familia.

A Judith Jane que me inicio en el conocimiento de las técnicas de diagnóstico molecular del SPW/SA. A Tomas Escudero que me orientó y enseñó la técnica de FISH. A Carles y Emma que siempre tenían respuesta y buenos consejos para mis dudas con la PCR y los geles de electroforesis. A Cristina Camprubí con quien compartía mis inquietudes en la puesta a punto del análisis de metilación y llevábamos adelante con dedicación e ilusión la misión de que este proyecto llegase a buen puerto. Y en general a todos los machacas del Departamento de

Biología Celular de la UAB MarK, Marc, Elena, Paqui, Lidia, Joan, Esther y Aurora, vivero en el cual los veteranos transmitían su experiencia y sabiduría a los benjamines que llegábamos llenos de ilusión y con ganas de aprender. Los años de machaca están pensados para formarte como investigador y desarrollar una actividad creativa, pero no es fácil. Lo primero que aprendes es a espabilarte por tu cuenta y a reconocer el valor de las personas que te rodean. En este siento fui afortunado, y pude disfrutar de la compañía de personas de gran brillantez investigadora y calidad humana. Pasé momentos difíciles, de alegría y de tristeza, momentos de ilusión y decepción, trabajé duro, pero lo que no olvidaré es que en todo este tiempo me sentí arropado por vosotros y eso me daba fuerzas para continuar. A todos gracias por estos años de convivencia que han dejado una impronta imborrable en mi recuerdo.

A la Dra. Elisabet Gabau por su incalculable aportación como Pediatra y Genetista Clínico, realizando un trabajo formidable y siendo una de las personas que mejor conocen estas patologías. Al Dr. Ramón Nosas endocrinólogo pediátrico, a la Dra. Isabel Lorente y al Dr. Joseph Artigas neuropediatras, a la Dra. Carmen Brun psicóloga logopeda, excelentes especialista en el reconocimiento y seguimiento de los pacientes y grandes asesores para las familias.

Al personal del Departamento de Genética e Inmunología del UDIAT-Laboratorio de la Corporación Sanitaria Parc Taulí por su calidad profesional y humana. Y en especial a M<sup>a</sup> Carmen Domínguez y Montse Vendrell quienes merecen todos los méritos del estudio citogenético, a David Gomez y Eulalia por su colaboración y aportación en el estudio de microsatélites que Loli Jiménez realizaba con sus manos divinas. A las personas que realizando sus proyectos en el Departamento de Genética han participado en la consecución de este trabajo, Neus, Chema, Sergio y alumnos de prácticas de empresas.

Al esfuerzo y dedicación de Mariano Riestra y M<sup>a</sup> Elena Escalante miembros de la Asociación Española para el Síndrome de Prader-Willi (AESPW), a Rosa Muñoz, María Subirá y Anna Ripoll de la Asociación Catalana para el Síndrome de Prader-Willi (ACSPW), a Remedios Cervera, Rosa Blancafort y Anna Capdevila de la Asociación Síndrome de Angelman (ASA) y a todas las personas y familias que las forman por su colaboración y momentos tan entrañables que hemos vivido juntos.

A Ángeles Twose por su apoyo y confianza en los momentos difíciles. A todos los compañeros/as del Departamento de Citogenética del Laboratorio de Análisis Dr. Echevarne, Nina, Angels, Neus, Natalia, Aurora, Sergio, Carles, Joan, Cristina, Agata, Raquel, Nuria, Silvia, Carlota, Isabel, Mireia, Gemma, Susana, Mari, Transit e Isa y a los que en algún momento hemos trabajado juntos Elisabet, Cristina, Pilar, Sandra, Susana, Mar, Adrián y Patricia, con quienes he compartido los altibajos del día a día y han tenido que soportar mis cambios de ánimo. Gracias por vuestra amistad.

Al Dr. Horsthemke del Instituto de Medicina Genética de la Universidad de Essen por proporcionarnos las sondas PW71B y KB17.

Al Dr. Gibert del Departamento de Microbiología de la UAB por su colaboración en la amplificación de los plásmidos que integraban las secuencias que usaríamos como sondas en el análisis de metilación.

A la Red temática GIRMOGEN (G03/098) para el Estudio cooperativo en Retraso Mental de origen genético.

Índice

1. Introducción .....	1
1.1. Antecedentes de los síndromes de Prader-Willi y Angelman.....	1
1.2. Características clínicas del síndrome de Prader-Willi .....	3
1.2.1. Prenatal .....	3
1.2.2. Neonatal.....	4
1.2.3. Infancia.....	4
1.2.4. Adolescentes y adultos .....	5
1.3. Características clínicas del Síndrome de Angelman .....	8
1.3.1. Prenatal .....	8
1.3.2. Neonatal.....	9
1.3.3. Infancia.....	9
1.3.4. Adolescentes y adultos .....	11
1.4. Base genética .....	12
1.4.1. Región 15q11-q13.....	12
1.4.1.1. Mecanismos de producción de reorganizaciones cromosómicas.....	14
1.4.1.1.1. Deleción .....	14
1.4.1.1.2. Duplicación .....	15
1.4.1.1.3. Cromosoma inv dup(15).....	17
1.4.2. Mapa genético .....	19
1.4.2.1. Genes Síndrome de Prader-Willi .....	19
1.4.2.2. Genes Síndrome de Angelman.....	26
1.4.2.3. Otros genes .....	28
1.4.3. Impronta genómica .....	30
1.4.3.1. Modelo de cambio de impronta en 15q11-q13 .....	32
1.5. Etiología de los síndromes de Prader-Willi y Angelman.....	36
1.5.1. Deleción 15q11-q13 .....	36
1.5.2. Disomía uniparental.....	37
1.5.3. Defecto de impronta.....	39
1.5.4. Reorganizaciones cromosómicas .....	42
1.5.5. Mutaciones intragénicas.....	42
1.5.6. Etiología desconocida.....	42
1.6. Técnicas de diagnóstico .....	43
1.6.1. Análisis citogenético de alta resolución con técnica de bandas G .....	43
1.6.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	44
1.6.3. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica .....	44

1.6.4.	Análisis de microsatélites .....	45
1.6.5.	Análisis de expresión del gen SNRPN mediante RT-PCR.....	45
1.6.6.	Análisis de metilación .....	45
1.6.7.	Análisis de la región del centro de impronta.....	48
1.7.	Consejo genético .....	50
1.8.	Objetivos.....	53
<b>2.</b>	<b>Material y métodos .....</b>	<b>55</b>
2.1	Sujetos de estudio .....	57
2.1.1	Criterios de diagnóstico de los síndromes de Prader-Willi y Angelman .....	57
2.2.	Material de laboratorio .....	64
2.2.1.	Material fungible .....	64
2.2.2.	Material inventariable .....	65
2.2.3.	Productos.....	66
2.2.4.	Soluciones.....	68
2.3.	Metodología .....	73
2.3.1.	Análisis citogenético .....	73
2.3.2.	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	75
2.3.2.1.	Protocolo de hibridación para sondas ONCOR .....	75
2.3.2.2.	Protocolo de hibridación para sondas Vysis .....	76
2.3.2.3.	Interpretación de los resultados .....	77
2.3.3.	Extracción de ADN.....	77
2.3.4.	Análisis de microsatélites .....	78
2.3.4.1.	Condiciones de amplificación.....	79
2.3.4.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	80
2.3.4.3.	Tinción con nitrato de plata.....	81
2.3.4.4.	Interpretación de los microsatélites .....	82
2.3.5.	Análisis de metilación .....	82
2.3.5.1.	Obtención de la sonda.....	84
2.3.5.1.1.	Transformación con $ClCa_2$ .....	85
2.3.5.1.2.	Amplificación por PCR.....	86
2.3.5.2.	Marcado de la sonda por <i>Random primed</i> .....	87
2.3.5.3.	Southern blot.....	89
2.3.5.3.1.	Digestión enzimática.....	89
2.3.5.3.2.	Electroforesis .....	90
2.3.5.3.3.	Transferencia.....	91
2.3.5.3.4.	Hibridación.....	92
2.3.5.3.5.	Detección quimioluminiscente.....	93
2.3.5.4.	Interpretación del análisis de metilación .....	94

2.3.5.5. Rehibridación .....	94
------------------------------	----

### 3. Resultados ..... 95

3.1. Síndrome de Prader-Willi.....	97
3.1.1. Análisis citogenético .....	97
3.1.2. Estudio mediante hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	97
3.1.3. Análisis de microsatélites .....	98
3.1.4. Análisis de metilación .....	100
3.1.5. Valoración genética global .....	103
3.1.6. Valoración clínica .....	108
3.1.7. Relación genotipo-fenotipo .....	113
3.1.7.1. Pacientes con deleción .....	114
3.1.7.2. Pacientes con disomía uniparental .....	115
3.1.7.3. Pacientes con defecto de impronta.....	116
3.2. Síndrome de Angelman .....	117
3.2.1. Análisis citogenético .....	117
3.2.2. Estudio mediante hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	118
3.2.3. Análisis de microsatélites .....	119
3.2.4. Análisis de metilación .....	122
3.2.5. Valoración genética global .....	124
3.2.6. Valoración clínica .....	129
3.2.7. Relación genotipo-fenotipo .....	134
3.2.7.1. Pacientes con deleción .....	135
3.2.7.2. Pacientes con disomía uniparental paterna.....	135
3.2.7.3. Pacientes con estudio molecular normal .....	136

### 4. Discusión .....137

4.1. Técnicas de diagnóstico molecular.....	139
4.1.1. Análisis citogenético .....	139
4.1.1.1. Valoración técnica.....	140
4.1.2. Análisis mediante FISH .....	140
4.1.2.1. Valoración de las sondas .....	140
4.1.2.2. Mosaicismo de la deleción 15q11-q13 .....	141
4.1.3. Análisis de microsatélites .....	142
4.1.3.1. Familias SPW .....	142
4.1.3.2. Familias SA.....	142
4.1.3.3. Relación DUPmat vs. DUPpat .....	143
4.1.3.4. Valoración de la técnica.....	143
4.1.4. Análisis de metilación .....	144
4.1.4.1. Aspectos metodológicos .....	144

4.1.4.2.	Valoración de la técnica de Southern blot y detección quimioluminiscente....	145
4.1.4.3.	Valoración del análisis de metilación .....	145
4.2.	Consejo genético en el SPW .....	147
4.3.	Alteraciones genéticas en la población SPW .....	148
4.4.	Correlación genotipo-fenotipo en el SPW .....	149
4.4.1.	Pacientes con delección 15q11-q13.....	149
4.4.2.	Pacientes con disomía uniparental .....	150
4.4.3.	Pacientes con defecto de impronta .....	150
4.4.4.	Pacientes SPW sin etiología determinada.....	151
4.4.5.	Pacientes con sospecha clínica con estudio molecular normal.....	151
4.4.6.	Valoración clínica global .....	152
4.5.	Importancia del diagnóstico clínico .....	154
4.6.	Alteraciones genéticas en la población SA.....	156
4.7.	Correlación genotipo-fenotipo en el SA.....	157
4.7.1.	Pacientes con delección 15q11-q13.....	157
4.7.2.	Pacientes con disomía uniparental .....	158
4.7.3.	Pacientes SA sin etiología determinada .....	159
4.7.4.	Pacientes con sospecha clínica con estudio molecular normal.....	160
4.7.5.	Valoración clínica global .....	161
4.8.	Protocolo de diagnóstico molecular para SPW/SA.....	162
5.	Conclusiones .....	165
6.	Bibliografía.....	169

## 1. Introducción

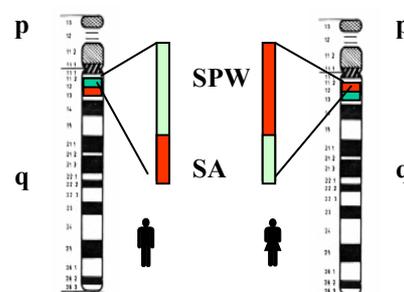


### 1.1. Antecedentes de los síndromes de Prader-Willi y Angelman

El conocimiento del Síndrome de Prader-Willi (SPW) y del Síndrome de Angelman (SA) ha experimentado en los últimos años un progreso espectacular. Debemos tener en cuenta que el SPW fue descrito clínicamente por primera vez por el Dr. Prader *et al.* en 1956 cuyo fenotipo es obesidad, baja estatura, retraso mental moderado e hipotonía neonatal y el SA por el Dr. Angelman *et al.* en 1965, como enfermedad neurológica con retraso mental profundo, convulsiones, ausencia de habla, risa inapropiada y ataxia. En 1981 fue cuando se tuvieron las primeras evidencias citogenéticas que asociaron el SPW con la deleción intersticial 15q11-q13 (Ledbetter *et al.*, 1981) en el cromosoma 15 de origen paterno (Butler and Palmer, 1983) y la misma deleción (Magenis *et al.*, 1987), pero en el cromosoma 15 materno con el SA (Knoll *et al.*, 1989a; Magenis *et al.*, 1990). A partir de estas observaciones se dedujo que los genes responsables del SPW sólo son activos en el cromosoma

15 de origen paterno y están próximos a los genes responsables del SA, que solo son activos en el cromosoma 15 materno (Fig. 1.1.1). Esta situación, donde la misma alteración cromosómica en 15q11-q13 pero diferente origen parental sea responsable de dos síndromes totalmente diferentes llevó a proponer que la impronta podría tener algún papel en su causa (Reik *et al.*, 1987; Knoll *et al.*, 1989b). Esta suposición se confirmó mediante análisis molecular de microsatélites en pacientes SPW con disomía uniparental materna (DUPmat), solo habían heredado dos cromosomas 15 de la madre (Nicholls *et al.*, 1989a). En pacientes SA también se observó la DUP, pero en este caso era paterna (Malcolm *et al.*, 1991; Nicholls *et al.*, 1992). A estos dos síndromes se los considera como las primeras enfermedades genéticas humanas asociadas con la impronta. La impronta es un mecanismo epigenético de control de la expresión génica, por el cual un alelo de un gen es activo solamente en uno de los homólogos, y permite explicar la etiología del SPW y SA. Así, el SPW se manifiesta por la pérdida o falta de expresión de genes paternos, que no pueden ser complementados por los alelos silenciados en el cromosoma materno. La situación inversa se da en el SA.

El diagnóstico del SPW/SA mediante técnicas citogenéticas convencionales permite observar al microscopio óptico la deleción y otras alteraciones cromosómicas que afectan al cromosoma 15. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones debidas sobre todo al pequeño tamaño de la deleción  $\sim 4$  Mb y al polimorfismo centromérico que dificultan la interpretación (Knoll *et al.*, 1993; Delach *et al.*, 1994). La utilización de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas de ADN marcadas con fluorocromos ha solventado estos problemas al



**Figura 1.1.1.** Los genes en la región SPW se expresan solo en el cromosoma 15 paterno (verde). En el cromosoma materno están silenciados (rojo).

detectar pequeñas deleciones no observadas al microscopio óptico. Hoy día, la FISH es la técnica recomendada para diagnosticar la deleción 15q11-q13 en SPW/SA, representando la alteración más frecuente en estos síndromes, observada en el 70% de los pacientes. Las DUP observadas en el 20% y el 5% de los pacientes con SPW y SA respectivamente (Nicholls and Knepper, 2001), se detectan con el estudio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de marcadores moleculares polimórficos. La PCR permite determinar la procedencia de cada cromosoma 15, informando si se han heredado los dos cromosomas 15 de un solo progenitor. Con estas técnicas se pueden diagnosticar entre el 80-90% de los pacientes SPW/SA. El resto, pacientes sin deleción ni DUP, pueden ocurrir por fallo en el mecanismo de la impronta. Para valorar a estos pacientes con defecto de impronta (DI), se desarrolló una técnica basada en una característica de la impronta, la metilación del ADN (Dittrich *et al.*, 1992). Normalmente los genes metilados no se expresan, como ocurre con los genes SPW en el cromosoma materno. Con el análisis de metilación se detecta un patrón de metilación uniparental en 15q11-q13 que permite discriminar si el paciente presenta el SPW o SA, pero no determina su etiología (Glenn *et al.*, 1993a; Reis *et al.*, 1994). Entre los pacientes con DI se pudo observar que algunos habían heredado pequeñas microdeleciones (Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1994). Se identificó una secuencia llamada centro de impronta (CI) que actúa como elemento de control de la expresión de los genes dentro de un dominio de 2 Mb (Buiting *et al.*, 1995). Estos hallazgos llevaron a la utilización del análisis de metilación como técnica de *screening* para el diagnóstico de SPW/SA (Gillissen-Kaesbach *et al.*, 1995; van den Ouweland *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1996; Beuten *et al.*, 1996).

La identificación de genes y secuencias dentro de la región 15q11-q13 ha establecido que el SPW es un síndrome de genes contiguos, donde la mutación de un solo gen no es suficiente para causar la patología. A diferencia de lo que sucede en el SPW, en el SA podría ser solo un gen el responsable. De momento se ha demostrado que la falta de expresión materna del gen UBE3A es suficiente para explicar el SA, pero hay un 10-15% de pacientes con etiología desconocida (Malzac *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999). En estos pacientes el gen UBE3A parece no estar mutado, lo que hace pensar que pueda haber otros genes implicados. La identificación del gen ATP10C (Meguro *et al.*, 2001; Herzing *et al.*, 2001), próximo al gen UBE3A, deja abierta la posibilidad de que sean varios genes los implicados en el SA.

## 1.2. Características clínicas del síndrome de Prader-Willi

El SPW es un defecto de nacimiento con base genética que ocurre de forma esporádica. La incidencia al nacimiento se estima de uno cada 15.000 a 22.000 recién nacidos con una prevalencia en la población de 1:52.000 (Cassidy *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 2002). Afecta a múltiples sistemas y la mayoría de las manifestaciones están relacionadas con una disfunción hipotalámica. Las principales características clínicas son: obesidad, estatura baja, criptorquidismo, hipotonía neonatal, retraso en el desarrollo, retraso mental moderado, alteraciones de comportamiento y apariencia facial característica. Sin embargo, su diagnóstico no siempre es fácil debido a que muchos de sus rasgos pueden ser poco específicos y otros cambian con la edad, sobretodo a partir de los tres años (Cassidy, 1984). Puede ocurrir que no sea diagnosticado a edades muy tempranas, o por el contrario, que adolescentes o adultos con retraso mental y obesidad sean diagnosticados erróneamente de SPW (Holm *et al.*, 1993). Por ello se han desarrollado dos protocolos con los criterios de diagnóstico clínico, uno para edades inferiores a tres años y otro a partir de esta edad (Holm *et al.*, 1993). Haciendo un seguimiento de los períodos de crecimiento se puede ver que rasgos empiezan a manifestarse y cuales son más significativos para el diagnóstico (Tabla 1.2.1).

**Tabla 1.2.1.** Principales síntomas del SPW en función del período de crecimiento

Período	Síntomas
Prenatal	Movimiento fetal disminuido
Neonatal	Hipotonía severa Problemas de alimentación Hipogonadismo
Infancia	Desarrollo mental y motor retrasado Hipotonía Apetito incrementado Pies y manos pequeños Facies característica
Adolescencia- edad adulta	Obesidad Hipogonitalismo/criptorquidismo Retraso de la pubertad

### 1.2.1. Prenatal

El período prenatal se caracteriza por una actividad fetal reducida, probablemente causado por la hipotonía. El feto es demasiado débil para moverse por sí mismo y contribuye poco en el parto, por lo que puede presentarse de nalgas, siendo necesario practicar una cesárea. Esto hace que el porcentaje de asfixia sea ocho veces mayor que en la población normal (Wharton and Bresnan, 1989). El embarazo frecuentemente no llega a término, y en un alto porcentaje los niños son prematuros.

### **1.2.2. Neonatal**

El recién nacido presenta como rasgos más característicos una hipotonía severa, problemas de alimentación, hiporeflexia, llanto débil, rasgos craneofaciales característicos y evidencia clínica de hipogenitalismo (Stephenson, 1992; Miller *et al.*, 1999). El peso medio al nacimiento es normal, de unos 2.8 Kg. Durante los 3-4 primeros meses de vida requieren de alimentación asistida debido a una disminución en los reflejos de succión. La ganancia de peso es lenta y no parecen estar hambrientos. La hipotonía puede estar implicada en la reducción de la función pulmonar e incrementa la susceptibilidad a infecciones (Hakonarson *et al.*, 1995). La hipotonía va mejorando gradualmente y los estudios electrofisiológicos neuromusculares y biopsias musculares son normales o no específicos (Cassidy and Schwartz, 1998).

Los rasgos faciales que los caracterizan son: circunferencia craneal y longitud de la fontanela disminuidas, diámetro bifrontal estrecho, anomalías gingivales moderadas, paladar arqueado, orejas anguladas, mandíbula triangular, ojos en forma de almendra, boca triangular con labio superior delgado y alteraciones visuales como el estrabismo.

El hipogonadismo al nacimiento es más evidente en el niño con criptorquidia con un pene y escroto hipoplásicos y en niñas con labios hipoplásicos (Stephenson, 1980).

### **1.2.3. Infancia**

Durante la edad infantil se observa una desaceleración del crecimiento lineal en la mayoría de los pacientes (Butler and Meaney, 1987), posiblemente asociados con problemas de alimentación. Estos mejoran a los seis meses desembocando a los 12-18 meses en un apetito incontrolado. Un defecto hipotalámico en el control de la saciedad es responsable de que coman en exceso y de forma insaciable (Zipf and Berntson, 1987; Holland *et al.*, 1993). Esta situación puede desarrollar una obesidad generalizada debido a que el requerimiento calórico y la actividad física en los pacientes SPW están disminuidos. Se ha observado que la proporción de masa grasa respecto a la masa corporal es alta. Experimentos en animales han mostrado que neuronas oxitocinas parvocelulares del núcleo paraventricular hipotalámico son cruciales en el control de la ingesta (Leibowitz *et al.*, 1981). Se piensa que estas neuronas tendrían un papel fisiológico en la saciedad y podrían ser la base del hambre insaciable y la obesidad (Swaab *et al.*, 1995). Se ha observado que el volumen de neuronas que expresan oxitocina es un 54% menor en pacientes SPW, y se ha sugerido que la administración de oxitocina podría frenar el apetito (Swaab, 1997). Por ello, se recomienda un control estricto de la dieta y vigilarlos constantemente.

A partir del primer año de vida comienza a manifestarse retraso en el desarrollo psicomotor. En promedio se sientan a los 12 meses, gatean a los 16 meses y no andan hasta los 24 meses. A partir de los 39 meses empiezan a hablar, siendo capaces de pronunciar unas 10 palabras, el habla es hipernasal debido a problemas de articulación (Branson, 1981).

A partir de los 3-4 años manifiestan trastornos de conducta que incluyen, rabietas, depresiones, actos de violencia súbitos, carácter manipulador y alteraciones del sueño. Su

coeficiente de inteligencia se encuentra en la zona límite, siendo en la mayoría de los casos leve (IQ: 60-70) (Curfs and Fryns, 1992). Un 30% tienen coeficiente *borderline* (IQ 70-80) y muestran dificultades de aprendizaje (Dykens *et al.*, 1992).

Los niños suelen ser bajos y presentan acromia. Tienen manos y pies pequeños, que se correlacionan con la talla pero no con la edad, aunque en los primeros años de vida el tamaño de las manos y pies es normal (Chitayat *et al.*, 1989; Hudgins and Cassidy, 1991). El rostro se caracteriza por, diámetro bifrontal estrecho, ojos almendrados, estrabismo, mejilla llena y actividad mímica disminuida debido a la hipotonía muscular. Frecuentemente presentan saliva viscosa que se acumula en la comisura bucal y en los dientes. Un 50% de los pacientes presentan la piel y el pelo más claros que el resto de miembros de la familia. Esta hipopigmentación es debida a la reducción en la síntesis de melanina (King *et al.*, 1993).

#### **1.2.4. Adolescentes y adultos**

Como características morfológicas destacan: obesidad, talla baja, habilidad motora pobre, hambre insaciable y conservan los rasgos faciales de la infancia. Se ponen de manifiesto los problemas conductuales del adolescente, presentando inmadurez de carácter, con problemas educacionales y dificultades escolares.

Hay problemas evidentes en el desarrollo sexual. Mientras que el pelo púbico y axilar puede desarrollarse temprano y normalmente, el resto del desarrollo está retardado y usualmente es incompleto. Los varones adultos presentan micropene y criptorquidia, ocasionalmente pueden cambiar tanto la voz como algunos rasgos físicos. Las mujeres pueden desarrollar pecho a la edad normal, la menarquia se puede dar entre los 10 y 28 años y va seguida de menstruaciones irregulares (Greenswag, 1987), generalmente suelen presentar amenorrea o oligomenorrea. La adrenarquia puede ocurrir a una edad temprana, mientras que la maduración gonadal es retrasada o incompleta. Suelen ser estériles, aunque se han descrito mujeres SPW que han dado a luz un niño normal (Akcfeldt *et al.*, 1999) y un niño con SA (Schulze *et al.*, 2001).

El hipogonadismo tiene un origen hipotalámico. Parece que un mal funcionamiento de las neuronas productoras de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) pueda ser responsable de una disminución en el nivel de hormonas sexuales. La producción anormal de LHRH puede ser debido bien a la ausencia de las neuronas productoras, a una baja producción de hormona o a una forma anómala de hormona. Las glándulas pituitaria y gonadal son normales pero están poco estimuladas. Este defecto del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas afecta al desarrollo sexual, no descienden los testículos, los órganos sexuales son pequeños, disminuye el comportamiento sexual y el crecimiento es insuficiente durante la pubertad (Angulo *et al.*, 1991). En varones los niveles de testosterona en suero son bajos y en las mujeres lo son los de estradiol, LH y la hormona foliculo estimulante, aunque también pueden ser normales (Swaab, 1997). En cortes histológicos de testículos se han observado tubulos seminíferos inmaduros debido al hipogonadotropismo. En autopsias de ovarios se han encontrado glándulas pequeñas

sin desarrollo folicular (Muller, 1997). El tratamiento con hormonas pituitarias y gonadales puede mejorar las características sexuales secundarias.

La esperanza de vida era de unos 25 a 30 años, siendo la obesidad la principal causa de morbilidad y mortalidad (Laurance *et al.*, 1981). El exceso de peso conlleva problemas cardiovasculares, diabetes mellitus no insulino dependiente, hipertensión, tromboflebitis, edema crónico de pierna, así como apnea durante el sueño. Si se evita la obesidad desde muy temprana edad con una dieta equilibrada baja en calorías (1000-1200 Kcal/día), con ejercicio regular y con un control de la accesibilidad a la comida, la longevidad puede ser normal (Greenswag, 1987).

A diferencia de la edad infantil, los adultos son más pequeños que el resto de la familia. Se observa estatura baja a partir de los 15 años, siendo la media de 155 cm en los varones y de 148 cm en las hembras (Butler and Meaney, 1987). La talla baja es debida probablemente a la deficiencia en la hormona del crecimiento (GH) por una disfunción hipotalámica que implica una producción disminuida de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) por el núcleo arcuato (Ciofi *et al.*, 1990). La administración de GH incrementa la altura y la masa corporal, asimismo, reduce el porcentaje de grasa corporal e incrementa el área muscular (Lindgren *et al.*, 1997). También tiene un beneficio fisiológico y de comportamiento, pero este se revierte cuando cesa el tratamiento. En un estudio en 29 pacientes SPW de edad comprendida entre 3-12 años, se observaron mejoras tras seis meses de tratamiento, estaban más atentos, tenían un temperamento más estable y mejoraban la relación social. Pero tras finalizar el tratamiento con la hormona GH comenzaron a estar menos felices, más aburridos, menos activos y tenían trastornos de comportamiento (Lindgren *et al.*, 1997).

La hipotonía mejora gradualmente, permaneciendo los adultos medianamente hipotónicos con tono muscular disminuido. Se postula que la hipotonía es un posible factor de riesgo que contribuye al estrabismo, escoliosis e infecciones respiratorias (Butler *et al.*, 2002). La deformidad del pecho asociada a escoliosis puede progresar por la presencia de obesidad, aunque no parece que incremente los problemas respiratorios. Los casos de escoliosis severa pueden requerir una intervención antes de los 10 años. En algunos pacientes se ha observado hipotermia que puede ser debida a un defecto en la regulación de la temperatura por disfunción hipotalámica, aunque no es un rasgo común en los pacientes SPW. Los pacientes tienden a ser relativamente insensibles al dolor y presentan dificultades para vomitar. Algunas de estas alteraciones pueden representar la disfunción del sistema nervioso autónomo (DiMario *et al.*, 1994). Las habilidades de discriminación visual motora son mejores que las habilidades de procesamiento auditorio verbales.

Desde una edad temprana presentan trastornos del temperamento, terquedad, comportamiento controlador-manipulador, características obsesivas-compulsivas y dificultad en el cambio de rutina. Reducir la ingesta de alimentos conlleva serios problemas de comportamiento y psicológicos, generando situaciones intolerables en el hogar (Curfs *et al.*, 1991). Es común su conducta de mentirosos, ladrones y agresivos. Un 5-10% son psicopáticos,

con un componente depresivo (Clarke, 1998). Su calidad de vida de adulto se ve interferida por estos problemas de comportamiento y psiquiátricos. En un estudio comparativo de pacientes con una población control con retraso mental se observó que los SPW presentaban una mayor alteración del comportamiento y eran más antisociales que la población control (Einfeld *et al.*, 1999). En este estudio se usó el *Developmental Behaviour Checklist*, que sirve para valorar el rango de alteraciones de comportamiento y emocionales en chicos y adolescentes con discapacidad intelectual. Dentro del grupo de SPW, los de más edad y más retraso mental severo, presentan mayores alteraciones.

Los problemas de sueño y la somnolencia diurna son comunes. Pueden ser debidos a una disfunción del hipotálamo posterior o a anomalías estructurales (Clift *et al.*, 1994; Swaab, 1997). Se ha observado ciclos de sueño REM anormales y fragmentados, con múltiples periodos breves REM (Kaplan *et al.*, 1991). La obesidad podría ser la causa de la apnea durante el sueño. Por otra parte, la somnolencia podría explicarse por una alteración de las funciones circadianas (Rubin and Cassidy, 1988), así como estar relacionada con el exceso de peso y la falta de actividad (Butler *et al.*, 2002).

### 1.3. Características clínicas del Síndrome de Angelman

El SA es una enfermedad genética con afectación neurológica. La prevalencia se estima entre 1/10.000-1/20.000 (Petersen *et al.*, 1995) siendo muchos casos esporádicos, aunque la ocurrencia familiar no es rara. Se caracteriza por retraso mental y motor, ausencia de habla, convulsiones, ataxia, hiperactividad, microcefalia y risa inapropiada (Angelman, 1965). Se les llamo *happy puppet* o marionetas felices, pero este termino no se usa hoy día. Algunos de los síntomas comienzan a ser aparentes entre 1-4 años de edad, por lo que es usual no reconocer el SA al nacimiento o durante el periodo perinatal (Williams *et al.*, 1995). También resulta difícil confirmar el diagnóstico en adultos con retraso mental, muchos han sido institucionalizados antes de ser diagnosticados (Buntinx *et al.*, 1995). Los problemas observados en los adultos difieren significativamente de aquellos observados en los más jóvenes (Clayton-Smith, 2001). Otras enfermedades clínicas pueden mimetizar los rasgos clínicos del SA, como el Síndrome de Rett,  $\alpha$  talasemia ligada al retraso mental (ATR-X) o el autismo (Williams *et al.*, 2001).

La edad de diagnóstico más común es entre los tres y siete años, cuando las características de comportamiento y rasgos clínicos son más evidentes (Williams *et al.*, 1995). Los pacientes presentan un cuadro clínico distinto a diferentes edades (Tabla 1.3.1).

**Tabla 1.3.1.** Principales características clínicas del SA en diferentes etapas del desarrollo

Período	Características clínicas
Prenatal	Historia prenatal y nacimiento normal
Neonatal	Problemas de alimentación Alteración del sueño
Infancia	Retraso mental severo Retraso del desarrollo evidente entre los 6-12 meses de edad, no hay pérdida de habilidades Hablan menos de seis palabras Convulsiones Hipotonía truncal con hipertonia de las extremidades Risa inapropiada
Adolescencia y edad adulta	Pubertad retrasada Salud buena Menor alteración del sueño

#### 1.3.1. Prenatal

Los movimientos fetales y el volumen de líquido amniótico son normales. No se observan malformaciones. Solamente el peso al nacer parece que sea ligeramente inferior en unos 200g respecto a otros hermanos (Clayton-Smith, 1993).

### 1.3.2. Neonatal

Los parámetros antropomórficos son normales. El peso medio al nacimiento es de 3,2 Kg. [2,5-4,2], longitud de 48,8cm [46-52] y el perímetro craneal de 34,6cm [32-37,5] (Buntinx *et al.*, 1995). Es un período inespecífico en el que se puede destacar problemas en la alimentación. Estos problemas, observados en un 72% de los pacientes, son debidos a dificultades en la succión y regurgitación, conduciendo a la pérdida de peso y estancamiento del crecimiento. Algunos bebés no pueden ser amamantados y se les alimenta con biberón. El reflujo gastroesofágico es severo en un 40%. La aspiración de la leche puede conducir a dificultades respiratorias. Presentan llanto débil. A las 4-6 semanas comienzan a sonreír y de forma muy frecuente, sin asociarse a un estímulo. Sobre las 10 semanas es fácil provocar la sonrisa. El 90% de los pacientes presentan alteración del sueño, que puede aparecer a partir de los primeros meses de vida y persistir durante muchos años.

### 1.3.3. Infancia

El retraso motor es obvio a los nueve meses. A los 12 meses muestran una deceleración del crecimiento craneal que puede representar una relativa o absoluta microcefalia que suele encontrarse en el 34-85% de los casos. A los tres años muchos pacientes tienen una circunferencia craneal menor del percentil 25, frecuentemente acompañada de occipital plano. La boca es grande y amplia con dientes separados. El labio superior usualmente es delgado. Un 30-50% presentan protusión de la lengua. El babeo es un problema persistente. La barbilla es puntiaguda y hay prognatismo mandibular. Los ojos están hundidos y frecuentemente son azules. Un 40% presenta estrabismo. Comienzan a sentarse a los 12 meses [6 meses-3 años] y gatean entre los 18-22 meses. Caminan a los cuatro años [18 meses-7 años], pero algunos no lo consiguen. Presentan escoliosis severa e hipertonidad de sus miembros.

La hiperactividad es un rasgo consistente en el comportamiento. Se describe como hipermotórica con cortos espasmos de atención. En un examen neurológico es frecuente encontrar hipotonía truncal con hipertonía de las extremidades, reflejos vivos, nerviosismo, movimientos espasmódicos y temblores asociados (Fryberg *et al.*, 1991). Andan con las piernas rígidas, amplían la base de sustentación y flexionan los brazos hacia arriba. Tienen poco equilibrio y un temblor que se agudiza con el movimiento. Los movimientos voluntarios son frecuentemente irregulares, variando de ligeras sacudidas a movimientos incoordinados que aumentan con la excitación, impidiéndoles caminar, comer y buscar objetos. El movimiento constante puede ocasionarles abrasiones o contusiones accidentales. También agarran, pellizcan y muerden lo cual puede estar realzado por la actividad hipermotórica, la cual decrece con la edad.

El retraso mental se considera profundo. La mayoría no consiguen las mínimas habilidades de autonomía personal. El desarrollo mental se ve dificultado por el déficit de atención, la hiperactividad y por la falta de habla y de control motor. A su vez la falta de habla no es debida solamente al retraso mental, sino también a dispraxia oral, al déficit en la

interacción social y de atención (Penner *et al.*, 1993). Las habilidades de lenguaje receptivo son superiores al lenguaje expresivo. La mayoría de los pacientes hablan con menos de seis palabras reconocibles, siendo lo normal de una a tres, pero muchas veces sin sentido comunicativo. Sin embargo, sí son capaces de comunicarse por, gestos, señales, dibujos, etc. Parece que el nivel comprensivo está algo más preservado. Tienen buena memoria para los rostros de la gente y las direcciones. La interacción social está impedida debido a que los instantes de atención son cortos. No son capaces de mantener la atención o de alternar su atención entre un objeto y otra persona. Sin embargo, su atención puede ser lo suficiente como para aprender lenguaje por signos y técnicas de comunicación (Penner *et al.*, 1993).

Un 90% presentan convulsiones epilépticas que pueden ser severas y requerir medicación con anticonvulsionantes (Zori *et al.*, 1992). Pueden empezar entre el nacimiento y los seis años pero lo común es entre los 18-24 meses. La primera convulsión es precipitada por una enfermedad febril o por la dentición (Laan *et al.*, 1997). La epilepsia suele ser polimorfa y es difícil de reconocer si hay temblores, movimientos hipercinéticos de las extremidades o déficit de atención. Presenten o no crisis epilépticas, los resultados del electroencefalograma frecuentemente son alterados, sugiriendo una atípica convulsión motora menor o un severo problema orgánico del cerebro. Algunos individuos muestran mejoras en sus convulsiones cesando completamente a los 10 años (Connerton-Moyer *et al.*, 1997). Un estudio ha observado que el 92% de los adultos continúan teniendo convulsiones epilépticas, las cuales tienen un papel importante en sus vidas diarias, presentando ausencias atípicas, mioclonias o la combinación de ambas (Laan *et al.*, 1997). Los antiepilépticos más efectivos son el valproato en combinación con clonacepan u otras benzodiazepinas (Minassian *et al.*, 1998). La necesidad de dormir se reduce a una media de 5-6 horas por la noche. Este comportamiento mejora con terapias como la melatonina a dosis bajas y la introducción de rutinas. Con la edad aumenta la necesidad de dormir y algunos duermen más de lo usual.

No se sabe porque es tan frecuente la risa en los SA (70%). De hecho tampoco se sabe como ocurre la risa. Parece ser un evento motor expresivo, muchas reacciones a estímulos van acompañados de risa. Es fácil provocarles la risa y ésta suele ser inapropiada. Aunque parece que experimentan una variedad de emociones, predomina la apariencia feliz. Varios tipos de comportamientos o expresiones faciales los caracterizan personalmente. Les gusta el agua y les fascinan los espejos, reflejos y plásticos. Sus juguetes preferidos son un balón, muñecos musicales y aquellos muy ruidosos (Clayton-Smith, 1993). Suelen llevarse a la boca todo lo que tienen. Sus juegos exploratorios suelen ser por manipulación oral y masticando.

#### **1.3.4. Adolescentes y adultos**

La pubertad puede retrasarse de uno a tres años, pero ocurre la maduración sexual y se desarrollan las características sexuales secundarias. La menstruación generalmente es regular. Durante este periodo pueden ganar peso, sobretodo las mujeres, posiblemente por la inmovilidad, falta de ejercicio y el buen apetito, pero no son obesos, ni desarrollan obesidad como en el SPW. La altura media es más baja que la media en individuos normales, entre los 144-177cm. Los rasgos faciales tienden a cambiar debido a la elongación del rostro.

La salud es buena y la esperanza de vida es normal, aunque son frecuentes las infecciones en el tracto respiratorio superior y otitis media. Se ha descrito un paciente con 76 años (Bjerre *et al.*, 1984). La hiperactividad puede disminuir con la edad, además tienden a calmarse y muestran menos alteraciones del sueño que puede incrementar la ganancia de peso (Clayton-Smith, 1993; Buntinx *et al.*, 1995). Las habilidades de comunicación mejoran en parte porque mejora su capacidad de concentración, pero se pierden fácilmente si no son constantemente reforzadas. Aprenden a ir al servicio por el día, algunos incluso por la noche (Laan *et al.*, 1996). La ataxia es menos obvia porque son menos activos, los pacientes que tienen una ataxia severa pueden perder su capacidad de caminar si no mantienen la ambulación. La escoliosis puede desarrollarse en adolescentes siendo problemática en adultos que no caminan. Se puede tratar con tirantes que impidan la progresión y en los casos más severos puede ser necesaria una corrección quirúrgica.

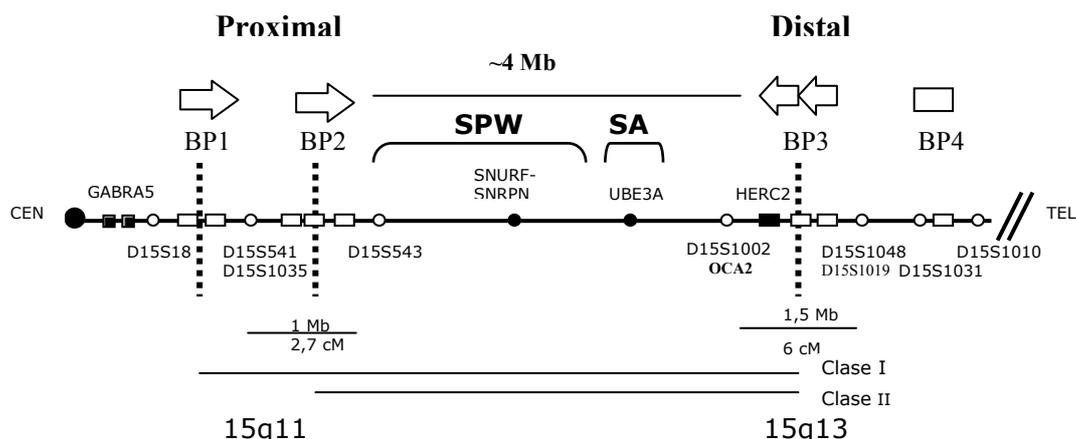
#### 1.4. Base genética

Comprender la base molecular de los síndromes SPW/SA no está siendo una tarea fácil debido a la complejidad estructural de la región 15q11-q13 y a su regulación por la impronta. Numerosos grupos de investigación han centrado su esfuerzo en caracterizar la estructura de esta región, localizando genes y secuencias reguladoras. Se han propuesto mecanismos que puedan explicar el control de la expresión génica y su regulación por la impronta, así como aquellos procesos que puedan alterar esta expresión y ser patológicos.

##### 1.4.1. Región 15q11-q13

En la región 15q11-q13 se ha observado una gran variedad de reorganizaciones cromosómicas recurrentes como deleciones, duplicaciones invertidas, translocaciones equilibradas y desequilibradas, y otras menos frecuentes como duplicaciones y triplicaciones. La causa de esta inestabilidad es debida a secuencias repetidas dentro de esta región. De hecho las regiones pericentroméricas, localizadas adyacentes a los  $\alpha$  satélites de los centrómeros, contienen secuencias duplicadas parálogas de otras regiones cromosómicas (Eichler, 1998). Esto se observa en la región pericentromérica del cromosoma 15 que contiene copias parciales de los segmentos V y D de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH D e IgH V, 14q32.3) (Tomlinson *et al.*, 1994), pseudogenes de neurofibromatosis tipo 1 (NF1, 17q11.2) (Kehrer-Sawatzki *et al.*, 1997), pseudogenes de la subunidad  $\alpha 5$  del receptor GABA (GABRA5, 15q12) (Ritchie *et al.*, 1998), así como múltiples copias de MN7 y secuencias procedentes de la duplicación parcial del gen HERC2 (15q13) (Buiting *et al.*, 1992; Ji *et al.*, 1999). Se sugiere que estas duplicaciones cerca de regiones pericentroméricas, pueden proporcionar un mecanismo para la recombinación homóloga desigual entre ellas y generar inestabilidad genómica (Christian *et al.*, 1999).

En la región 15q11-q13 se han podido caracterizar tres puntos calientes de rotura, llamados *breakpoints* 1-3 (BP1-BP3) y en 15q24 dos más (BP4 y BP5) (Fig. 1.4.1) que están implicados en la mayoría de las reorganizaciones cromosómicas observadas en esta región (Christian *et al.*, 1999; Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Gimelli *et al.*, 2003). Estos puntos de rotura están formados por *low copy repeats* (LCRs) o duplicones de 50-200 kb, algunos de ellos derivados de duplicaciones del gen ancestral HERC2 (Amos-Landgraf *et al.*, 1999). La estructura de estos LCRs es compleja, se estima que haya de 10 a 12 copias de estas secuencias localizadas entre 15q11 y 15q13, una copia en 15q24 y por lo menos dos copias adicionales de alta homología en 16p11.2 (Buiting *et al.*, 1992; Buiting *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 1999). Además, se han identificado otros duplicones procedentes del gen MYLE, del gen de la ribonucleasa específica poli(A) (PARN) (Buiting *et al.*, 1998), copias de *golgin like protein* y SH3P18, localizadas en 15q26.1, 15q24 y 15q13, respectivamente y adyacentes a duplicones HERC2 (Pujana *et al.*, 2002). No se sabe si otros genes pueden estar localizados dentro de estos segmentos duplicados o si hay secuencias únicas dispersas dentro o adyacentes a estos segmentos.



**Figura 1.4.1.** Mapa del cromosoma 15 mostrando la posición de los puntos de rotura de las deleciones en SPW/SA (línea de puntos), genes y marcadores (círculos), HERC2 y secuencias relacionadas (rectángulos) y duplicación GABRA5 (cuadrados negros). La orientación de los LCR en BP1, BP2 y BP3 se representa por flechas

Los puntos de rotura proximales implicados en las deleciones son BP1, adyacente al marcador D15S18, y BP2 localizado entre los marcadores D15S541 y D15S543 (Christian *et al.*, 1995). Estos puntos caracterizan las deleciones de clase I que ocurren con una frecuencia del 40% y las de clase II con una frecuencia del 60 % (Ungaro *et al.*, 2001). El punto de rotura distal en la mayoría de las deleciones (95%) es BP3 y se localiza entre los marcadores D15S1002 y D15S1048 (Amos-Landgraf *et al.*, 1999). Presenta dos copias de orientación directa en tandem (BP3A y BP3B) y con orientación invertida respecto a BP2 (Christian *et al.*, 1999). Solo en casos inusuales de largas deleciones el punto de rotura distal ha tenido lugar en BP4, localizado entre los marcadores D15S1031 y D15S1010. BP4 también ha estado implicado en muchas inv dup(15) largas, así como en algunos casos de duplicaciones y triplicaciones (Long *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1998).

La distancia física entre los microsatélites marcadores que flanquean a BP2, D15S543 y D15S541-D15S1035, y los que flanquean a BP3, D15S1002 y D15S1048-D15S1019, han sido estimadas por YAC *conting* de ~1Mb y 1.5 Mb respectivamente. La distancia genética entre los marcadores proximales es de 2.7 cM y entre los marcadores distales es de 6 cM (Robinson *et al.*, 1993d; Christian *et al.*, 1995). Esta diferencia entre la larga distancia genética y la reducida distancia física sugiere la posibilidad de un incremento de la recombinación entre estos marcadores (Amos-Landgraf *et al.*, 1999).

El alineamiento incorrecto de las cromátides hermanas o de los cromosomas homólogos en los LCRs de la región 15q11-q13 puede conducir a intercambios intra o intercromosómicos desiguales que explicarían el origen de las distintas reorganizaciones cromosómicas descritas en esta región (Carrozzo *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1998).

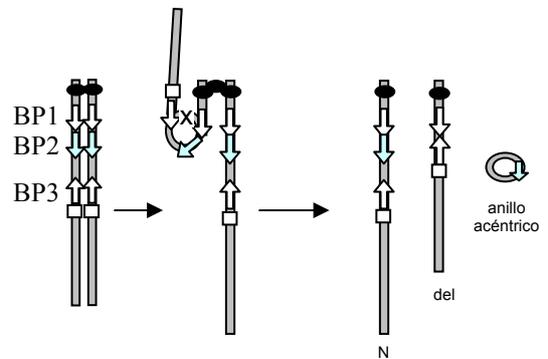
**1.4.1.1. Mecanismos de producción de reorganizaciones cromosómicas**

La presencia de segmentos duplicados dentro de la región 15q proximal proporciona un mecanismo para la recombinación homóloga. Algunos de los LCRs son transcripcionalmente activos y pueden facilitar el proceso (Amos-Landgraf *et al.*, 1999). Pero en ocasiones, un alineamiento incorrecto de estas secuencias puede conducir a un intercambio meiótico desigual. El resultado dependerá del tamaño, la homología, la orientación y la disposición relativa de estos LCRs, junto con el tipo de intercambios que puedan ocurrir entre ellos (inter o intracromosómicos) (Carrozzo *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1998). Estas reorganizaciones pueden tener efectos fenotípicos en base a cambios en la dosis génica de los genes implicados.

**1.4.1.1.1. Deleción**

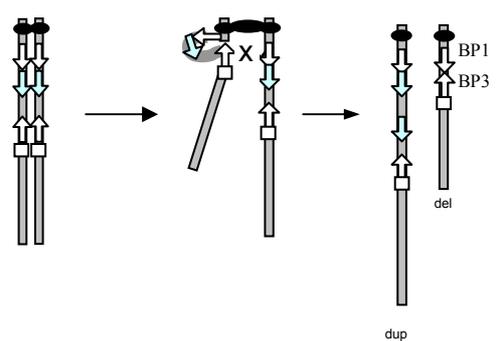
La pérdida de la región 15q11-q13 observada en el 70% de los pacientes con SPW/SA puede ocurrir por un intercambio desigual entre los LCRs en los puntos de rotura BP1-BP3 o BP2-BP3. Hay tres mecanismos:

1. Intercambio intracromosómico dentro de una misma cromátide (Fig. 1.4.2). En este proceso se establece una estructura intermedia en forma de *loop* al enfrentarse LCRs de BP1 y BP3, seguido de la escisión o deleción de este *loop*. El resultado final es una cromátide normal y una cromátide que ha perdido un fragmento que quedara en forma de anillo (Robinson *et al.*, 1998; Carrozzo *et al.*, 1997).



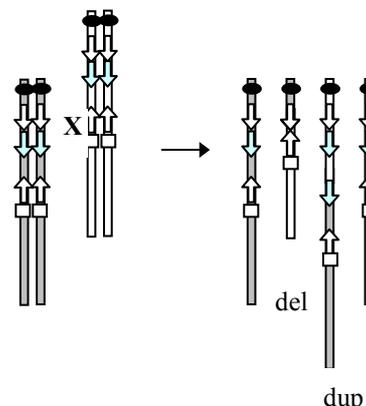
**Figura 1.4.2.** Mecanismo de producción de deleción intracromátide entre los puntos BP1 y BP3

2. Intercambio intracromosómico entre cromátides hermanas (Fig. 1.4.3). El desplazamiento de una de las cromátides enfrenta LCRs homólogos de la otra cromátide, que al intercambiarse generan dos productos recíprocos, deleción y duplicación. Se sugiere que las deleciones en el SPW ocurren de este modo al observar que los marcadores flanqueantes a los puntos de rotura de la deleción no presentan recombinación (Robinson *et al.*, 1998).



**Figura 1.4.3.** Mecanismo de producción de deleción/duplicación intracromosómica entre cromátides hermanas

3. Intercambio intercromosómico entre cromosomas homólogos (Fig. 1.4.4). Resultaría del alineamiento incorrecto entre los LCRs de los cromosomas homólogos. El entrecruzamiento genera dos productos recíprocos, deleción y duplicación, pero en este caso con recombinación de los marcadores flanqueantes. Se sugiere que las deleciones en el SA ocurren por este mecanismo al observarse pacientes con recombinación de los marcadores flanqueantes a los puntos de rotura de la deleción, lo que asociaría el proceso de recombinación con la deleción (Robinson *et al.*, 1998; Christian *et al.*, 1999).



**Figura 1.4.4.** Mecanismo de producción de deleción/duplicación intercromosómica

Aunque los mecanismos descritos parecen los más probables, no son suficientes para explicar todos los casos. El número de casos informativos es bajo (4/6 SPW y 3/3 SA) por lo que no es posible determinar si la relación entre eventos intra e intercromosómicos son significativamente diferentes en las deleciones SPW vs. SA (Robinson *et al.*, 1998).

#### 1.4.1.1.2. Duplicación

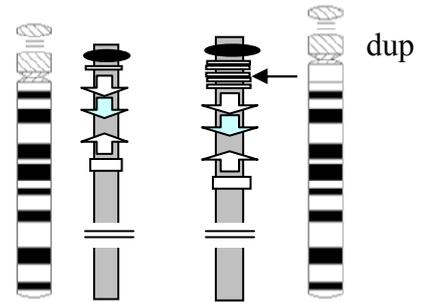
La frecuencia de las duplicaciones en 15q proximal en estudios citogenéticos rutinarios es de 1/600 en sangre y 1/2000 en muestras prenatales (Browne *et al.*, 1997). Puede explicarse por un alineamiento incorrecto de LCRs entre cromátidas hermanas en un intercambio intracromosómico (Fig. 1.4.3) o entre cromosomas homólogos en un intercambio intercromosómico (Fig. 1.4.4) (Christian *et al.*, 1999). La triplicación puede explicarse por recombinación ilegítima entre una inv dup(15) conteniendo la región SPW/SA y un cromosoma 15 (Schinzel *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1998). En muchos de los casos se ha observado heterocigosidad materna de los genes duplicados, indicando que en las duplicaciones y triplicaciones están implicados dos cromosomas maternos diferentes (Robinson *et al.*, 1998).

La comparación entre los puntos de rotura proximal y distal de deleciones y duplicaciones indica que las duplicaciones maternas de esta región no son el producto recíproco de las deleciones. Los puntos de rotura de las duplicaciones son más variables que los puntos de rotura de las deleciones, incluyen a D15S24 y son más teloméricos, implicando tanto a BP3 como a BP4 (Robinson *et al.*, 1998; Repetto *et al.*, 1998). También se han observado triplicaciones 15q proximal de origen materno implicando a BP4 (Long *et al.*, 1998).

Con estudios moleculares pueden establecerse tres grupos de duplicación proximal 15q con diferentes consecuencias fenotípicas en base a la implicación o no de la región SPW/SA y su origen parental (Browne *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1997):

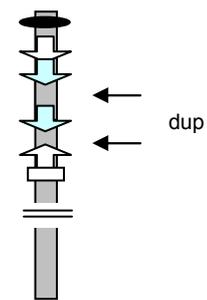
1. Duplicación 15q proximal no implicando a la región SPW/SA.

Estos casos tienen un fenotipo normal y son heredadas de progenitores fenotípicamente normales, por lo que se interpretan como variantes eucromáticas que pueden ser transmitidas a través de las familias sin efecto clínico o reproductivo (Jalal *et al.*, 1994; Browne *et al.*, 1997). Algunas de estas dup(15) son realmente variantes centroméricas del 15  $\alpha$  satélite que pueden diferenciarse con la sonda D15Z1 (Riordan and Dawson, 1998). Otras, sin embargo, resultan del incremento en el número de copias por duplicación directa de varios pseudogenes (NF1, IgHD/V, GABRA5 y BCL8A) mapados entre el centrómero y BP1 (Fig.1.4.5). Mediante análisis de FISH se ha determinado el número de copias de estos duplicones observando que presentan una distribución polimórfica. Individuos con un cariotipo normal presentan de una a cuatro copias, mientras que el número de copias incrementa de ocho a 20 en individuos con duplicación 15q proximal visible citogenéticamente. En el análisis de pacientes SPW o SA con deleción de clase I, que se extiende de BP1 a BP3, se observa señal para estos duplicones en ambos homólogos 15. Para detectar estas duplicaciones proximales se recomienda el análisis de FISH con la sonda P1-4 del pseudogen NF1 (Ritchie *et al.*, 1998; Fantes *et al.*, 2002).



**Figura 1.4.5.** Duplicación 15q proximal por amplificación de pseudogenes

2. Duplicación 15q proximal implicando a la región SPW/SA de origen materno. La gran mayoría de las duplicaciones que incluyen la región SPW/SA (Fig. 1.4.6) son de origen materno y presentan un fenotipo alterado con autismo, retraso en el desarrollo, retraso mental, dificultades de aprendizaje y ausencia de rasgos dismórficos, pero ningún rasgo de SPW o SA. El fenotipo se considera moderado respecto a pacientes que presentan varias copias de esta región como inv dup(15) o triplicación 15q proximal, representarían tetrasomías para esta región, sugiriendo un efecto de dosis de los genes implicados (Robinson *et al.*, 1993b; Leana-Cox *et al.*, 1994). Madres portadoras de una duplicación 15q proximal conteniendo la región SPW/SA en su cromosoma paterno son fenotípicamente normales.

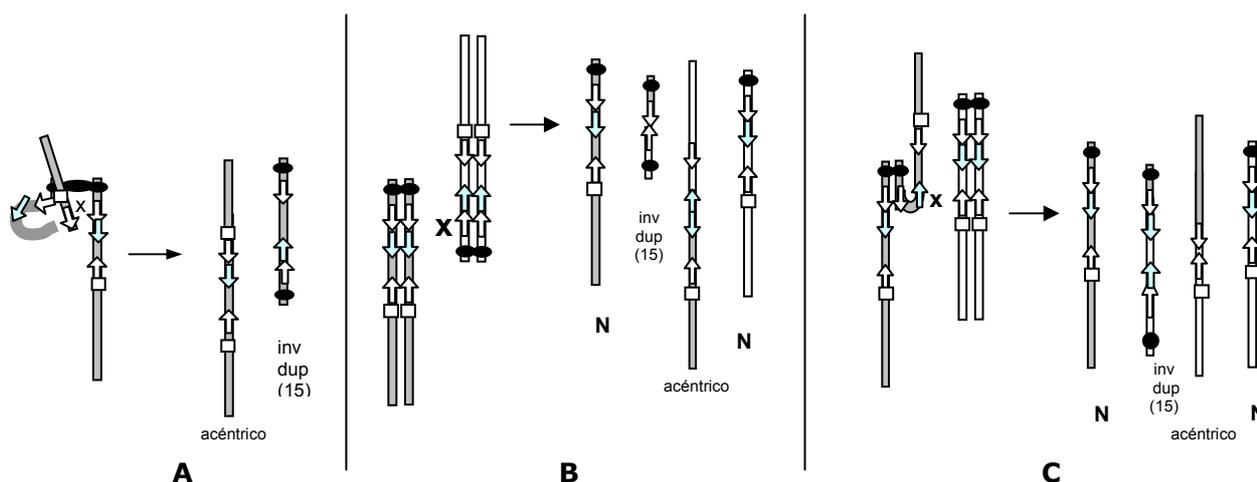


**Figura 1.4.6.** Duplicación 15q proximal incluyendo la región SPW/SA

3. Duplicación 15q proximal implicando a la región SPW/SA de origen paterno. Las duplicaciones de origen paterno son poco frecuentes y posiblemente no tengan efecto fenotípico. Se ha demostrado su presencia en individuos fenotípicamente normales, lo que ha sugerido que una copia adicional de la región SPW/SA de origen paterno puede no tener efectos adversos (Browne *et al.*, 1997). Solo se ha descrito un paciente con duplicación intersticial *de novo* 15q de origen paterno con retraso en el desarrollo. Puede que este fenotipo no sea debido a la duplicación y constituya un caso de retraso en el desarrollo no específico (Mohandas *et al.*, 1999). Se requieren más estudios para confirmar si la duplicación 15q paterna está asociada a algún fenotipo.

#### 1.4.1.1.3. Cromosoma inv dup(15)

El mecanismo de formación de las inv dup(15) puede ser por recombinación entre repeticiones invertidas a través de un intercambio intracromosómico (Fig. 1.4.7A), por un intercambio intercromosómico (Fig. 1.4.7B) o a través de un intercambio tipo U entre homólogos implicando a BP3 o BP4 (Fig. 1.4.7C).



**Figura 1.4.7.** Mecanismos de formación de una inv dup(15). A) Mecanismo intracromosómico, B) Mecanismo intercromosómico, C) Intercambio tipo U

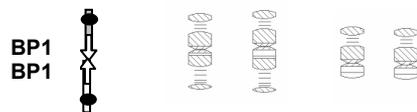
Aunque los mecanismos propuestos para la delección y la inv dup(15) son diferentes, se sugiere que algunas de las causas pueden estar relacionadas debido a que algunos de los puntos de rotura son similares y a que hay pacientes que presentan inv dup(15) además de delección (Spinner *et al.*, 1995; Bettio *et al.*, 1997) o duplicación (Abeliovich *et al.*, 1995).

Las inv dup(15) son cromosomas marcadores morfológicamente heterogéneos, que están constituidos por el brazo corto del cromosoma 15 y secuencias proximales 15q que pueden o no incluir la región 15q11-q13. La mayoría son dicéntricos, con una área de eucromatina entre ellos, pero en algunos casos puede inactivarse uno de los centrómeros, apareciendo como un acrocéntrico. La inv dup(15) es el cromosoma marcador más frecuente representando casi el 50% de los marcadores. La frecuencia estimada para los cromosomas marcadores es del 0.07%

en individuos normales y del 0.3% en individuos con retraso mental, presentándose la inv dup(15) en el 0.02% o 1/5000 recién nacidos (Webb, 1994; Blennow *et al.*, 1994). En pacientes SPW se ha observado la inv dup(15) en una alta frecuencia (1/40) respecto a la población normal (1/1000) (Ledbetter *et al.*, 1982; Sachs *et al.*, 1987), mientras que son muy raros entre los SA (Kaplan *et al.*, 1987).

El fenotipo de las personas portadoras de una inv dup(15), bien sea *de novo*, heredada o en mosaico, puede variar considerablemente, de un fenotipo normal a retraso mental severo, con poca o ninguna dismorfología (Webb, 1994; Crolla *et al.*, 1995). La severidad clínica parece estar relacionada con la dosis génica mas que con el tamaño físico (Robinson *et al.*, 1991). En los casos de mosaicismo se puede esperar un fenotipo menos severo. Un mosaicismo entre el 27-70%, con una media del 53%, se ha observado en personas normales o ligeramente afectadas, mientras que un mosaicismo del 52-82%, con una media del 74%, se ha observado en personas severamente afectadas. Se ha hecho una clasificación de las duplicaciones invertidas por el tamaño, en base a la cantidad de eucromatina y heterocromatina, que correlaciona con el fenotipo (Leana-Cox *et al.*, 1994; Webb, 1994).

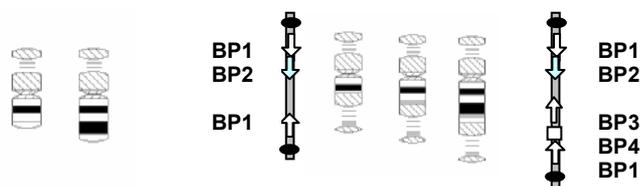
1. inv dup (15) pequeñas que no incluyen la región SPW/SA. Son cromosomas marcadores pequeños con un centrómero, a veces con dos, siendo prácticamente heterocromatina y de aspecto metacéntrico (Fig. 1.4.8). Presentan un punto de rotura en 15q11 que corresponde con los puntos de rotura proximales BP1-BP2 de las deleciones SPW/SA (Cheng *et al.*, 1994). Pueden ser *de novo* o familiares. Están asociados con individuos fenotípicamente normales. En los casos de pacientes SPW o SA que presentan estas inv dup(15) pequeñas, se ha demostrado que el fenotipo observado es debido a DUP 15 o a deleción 15q11-q13 y no a la presencia de la inv dup(15) (Robinson *et al.*, 1993b; Spinner *et al.*, 1995; Bettio *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2002). En casi todos los casos estudiados, la inv dup(15) es de origen materno.



**Figura 1.4.8.** Cromosoma inv dup(15)

2. inv dup(15) largas que incluyen la región SPW/SA. Son cromosomas marcadores que presentan dos centrómeros, cromatina entre ellos y de aspecto submetacéntrico o acrocéntrico (Fig. 1.4.9). Tienden a ser de dos tamaños, unos con el punto de rotura distal 15q13 dentro de BP3 entre los marcadores D15S12 y D15S24, y otras con el punto de rotura 15q14 en BP4 entre los marcadores D15S1031 y D15S1010 cerca de D15S144 y otros loci, pero no se han encontrado diferencias fenotípicas entre ellas. La mayoría son *de novo* y de origen materno.

Están asociadas con retraso mental y del desarrollo, convulsiones, rasgos parecidos al autismo y rasgos dismórficos (Cook *et al.*, 1997; Wandstrat *et al.*, 1998).



**Figura 1.4.9.** Cromosoma inv dup(15) grande

### 1.4.2. Mapa genético

Caracterizar las alteraciones responsables de los síndromes SPW y SA ha permitido definir una región cromosómica en la cual se localizan los genes implicados en la manifestación de estos síndromes. Quiénes son estos genes y cómo funcionan no se sabe completamente debido a la complejidad de esta región que presenta múltiples secuencias repetidas o LCRs que dificultan el clonado y secuenciación. En la Figura 1.4.10 se representa de forma aproximada, no está a escala, el mapa de la región 15q11-q13 con los principales genes y secuencias identificadas, así como algunos de los marcadores polimórficos utilizados en estudios de microsatélites y de recombinación (Lee and Wevrick, 2000; de los Santos *et al.*, 2000; Cavaille *et al.*, 2000; Farber *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001). La secuenciación del proyecto genoma humano ha recolocado algunas secuencias y genes como es el caso de los genes NDN y MAGEL2, ahora en orden inverso, cen-MAGEL2-NDN-Tel (Runte *et al.*, 2001).

#### 1.4.2.1. Genes Síndrome de Prader-Willi

Se sugiere que el SPW es un síndrome de genes contiguos, al no encontrarse mutaciones puntuales en un solo gen que lo origine, siendo necesaria la pérdida de expresión de varios genes para que se manifieste el síndrome. El número y la identidad de los genes que contribuyen no está definido. Se piensa que puede haber por lo menos 12 transcritos de expresión paterna dentro de la región crítica del SPW. Siete son secuencias recientemente identificados: WI-15897, WI-15028, WI-13791, stSG12920, stSG3346, sts-N21972 y A005C48 (Lee and Wevrick, 2000) y cinco ya se conocían: ZNF127, NDN, MAGEL2, SNURF-SNRPN y IPW. De estos cinco genes se conocen sus ortólogos en la región cromosómica 7C de ratón y presentan el mismo status de impronta. En el extremo 5' del locus SNURF-SNRPN se localiza el CI que controla la expresión de estos genes (Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995). Además, dentro de intrones del locus SNURF-SNRPN se han identificado un grupo de ARNs pequeños nucleolares (snoARNs) que pueden ser importantes en el fenotipo del SPW (Cavaille *et al.*, 2000; de los Santos *et al.*, 2000).

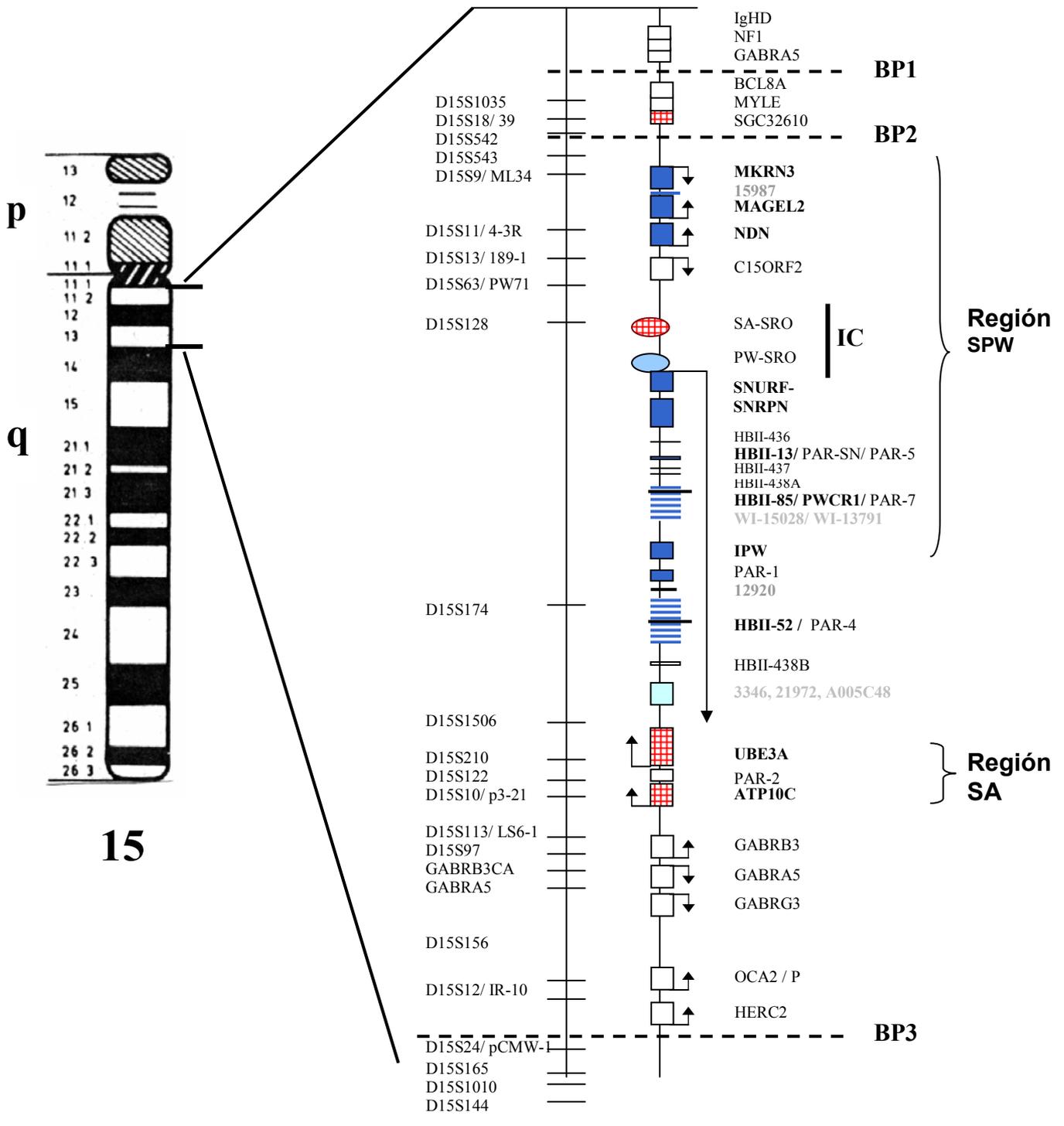


Figura 1.4.10. Mapa de la región 15q11-q13

**ZNF127/ZNF127AS (MKRN3)**

En el locus D15S9 se encuentran dos genes solapantes, ZNF127 y ZNF127AS, localizados dentro del dominio regulado por la impronta que afecta a los pacientes con SPW (Driscoll *et al.*, 1992; Jong *et al.*, 1993).

ZNF127 es un pequeño gen sin intrones que sintetiza un transcrito de 3 kb y codifica una proteína de 507 aas con un dominio en dedo de zinc en anillo (*RING* ( $C_3HC_4$ ) *zinc-finger motif*) y múltiples motivos en dedo de zinc  $C_3H$ . Estos dominios predicen que ZNF127 puede funcionar como una ribonucleoproteína y mediar la unión con ARNs (Jong *et al.*, 1999a). ZNF127 presenta una expresión tejido específica desde el alelo paterno solo en cerebro y en células germinales. Se especula que la actividad transcripcional pre y post meiotica de ZNF127 en la línea germinal masculina podría contribuir a fijar la impronta gamética paterna en este locus al impedir su metilación, en oocitos si hay metilación (Jong *et al.*, 1999a). ZNF127 podría ser candidato para las alteraciones de comportamiento, obesidad, hipogonadismo y esterilidad en el SPW.

La estructura completa de ZNF127AS no está determinada todavía, podría codificar una proteína o un ARN regulador. La secuencia codificante y la isla CpG de ZNF127 solapan con ZNF127AS, el cual es transcrito desde la cadena antisentido con un tamaño de transcrito y patrón de expresión diferente (Jong *et al.*, 1999b). ZNF127AS se expresa débilmente durante el desarrollo fetal y a un nivel mucho más bajo en regiones del cerebro adulto, pero no ha sido estudiado en el embrión temprano. El tipo de reorganización que presentan estos dos genes sugiere una expresión mutuamente excluyente como se ha observado en diferentes tipos celulares durante el desarrollo (Cattanach *et al.*, 1997). Esta misma organización se ha observado en otros genes con impronta, lo cual podría jugar un papel en la regulación de los procesos de la impronta.

**MAGEL2 (NDNL1)**

Gen sin intrones localizado a 41kb de NDN dentro de la región crítica del SPW (Boccaccio *et al.*, 1999). Se expresa solo a partir del alelo paterno en cerebro con una fuerte expresión en el hipotálamo y en fibroblastos (Lee *et al.*, 2000). Transcribe un ARNm de 4.5 kb con elementos ricos en AU en 3' que lo hacen inestable y difícil de detectar con *Northern blot* debido a su rápida degradación, estos elementos son característicos de proto-oncogenes y factores de transcripción nuclear. MAGEL2 codifica una proteína de 500 aas cuyo extremo C-terminal muestra alta homología con las proteínas MAGE, Necdin y APR-1.

Presenta altos niveles de expresión en los últimos estadios del desarrollo embrionario. Se sugiere que la pérdida de MAGEL2 puede ser crítica en las anomalías en el desarrollo del cerebro y en los rasgos dismórficos individuales, mientras que la pérdida de Necdin puede ser importante en la presentación neonatal del SPW (Lee *et al.*, 2000).

## **NDN**

Gen sin intrones localizado en la región SPW entre los genes ZNF127 y SNRPN y un pseudogen en 12q21 (Jay *et al.*, 1997). Es un gen candidato al SPW por su falta de expresión en el cerebro de pacientes SPW. NDN se expresa solo desde el alelo paterno y de forma ubicua, salvo en leucocitos de sangre periférica. Su ortólogo de ratón *Ndn*, solo se expresa en cerebro (Watrin *et al.*, 1997).

En ratón, la proteína nuclear *neccin* es un factor neuronal derivado de células *stem cell* diferenciadas que se expresa en todas las neuronas postmitóticas diferenciadas del SNC desde el comienzo de la diferenciación neuronal hasta adulto (Aizawa *et al.*, 1992). Se sugiere que está implicada en detener permanentemente el crecimiento celular de neuronas postmitóticas durante el desarrollo del sistema nervioso a través de interacciones con factores de transcripción E2F1, E1A y p53 que regulan el ciclo celular (MacDonald and Wevrick, 1997).

La ausencia de *Necdin* en humanos podría ser responsable de anomalías en el desarrollo del cerebro y contribuir en el retraso del desarrollo en individuos afectados de SPW (MacDonald and Wevrick, 1997). La ausencia de *Necdin* en el hipotálamo, observada en ratones deficientes en *neccin*, correlaciona bien con el fenotipo SPW causado por defecto hipotalámico. En estos ratones se observa la reducción de neuronas que producen oxitocina y LHRH, hormonas que están relacionadas con la saciedad y el hipogonadismo (Sutcliffe *et al.*, 1997a; Muscatelli *et al.*, 2000).

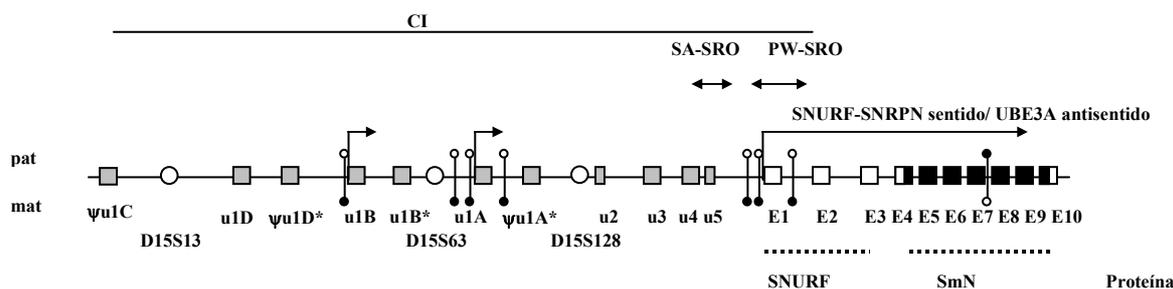
## **Locus SNURF-SNRPN**

Es uno de los locus más complejos del genoma humano. Codifica una unidad de transcripción SNURF-SNRPN sentido/UBE3A antisentido de por lo menos 148 exones que se extiende más de 460 kb (Runte *et al.*, 2001). Este locus alberga (Fig. 1.4.4.2): 1) en 5' por lo menos dos sitios de inicio de la transcripción alternativos y múltiples exones no traducidos de función desconocida; 2) el CI; 3) los 10 primeros exones que transcriben un ARNm bicistrónico de 1.4 kb, codificando los exones 1-3 a la proteína SNURF y los exones 4-10 la proteína SmN; 4) múltiples copias de genes ARNsno denominadas HBII-436, HBII-13, HBII-437, HBII-438 A, HBII-85, HBII-52 y HBII-438 B en las regiones intrónicas de este largo transcrito; y 5) el sitio de inicio para el transcrito UBE3A antisentido.

### **a) Centro de impronta (CI)**

Forma parte del locus SNURF-SNRPN extendiéndose unas 100 kb por delante del exón 1 en dirección 5' hasta el marcador D15S13 (Fig. 1.4.11). Son varios los exones (*u1D*, *u1B*, *u1B\**, *u1A*, *u2*, *u3*, *u4* y *u5*) y pseudoexones ( $\psi$ *u1C*,  $\psi$ *u1D\** y  $\psi$ *u1A\**) identificados en esta región 5' resultado de procesos de duplicación (Farber *et al.*, 1999). El papel de estos exones parece ser el de codificar transcritos alternativos del locus SNURF-SNRPN que no codifican proteína (transcritos BD) (Dittrich *et al.*, 1996b). Solo se expresan desde el cromosoma paterno (no metilado) a partir de los exones *u1B* y *u1A*, sitios de inicio de la transcripción alternativos al

exón 1. Se han identificado principalmente en cerebro, corazón, testículos y ovarios, siendo mucho menos abundantes que el ARNm SNURF-SNRPN.



**Figura 1.4.11.** Estructura del centro de impronta. Los cuadros grises son exones y pseudoexones de CI. Los cuadros blancos son exones que codifican a la proteína SNURF. Los cuadros negros son exones que codifican a la proteína SmN. mat: cromosoma materno. pat: cromosoma paterno. Las flechas indican sitios de inicio de la transcripción. Las barras son islas CpG, metiladas con esfera negra y no metiladas con esfera blanca. D15S13, D15S63 y D15S128 son marcadores moleculares (Farber *et al.*, 1999)

La función de CI es controlar la impronta de genes dentro de un dominio de 1.5-2 Mb (Buiting *et al.*, 1995). Presenta una estructura bipartita, formada por SA-SRO y PW-SRO (*Smallest Region of deletion Overlap*). SA-SRO es una secuencia de 880 pb que se extiende por delante del exón u5 localizada a 35 kb centromérico del locus SNURF-SNRPN (Buiting *et al.*, 1999). Presenta una conformación de cromatina activa en el alelo materno, es sensible a DNasaI y está empaquetado con histonas acetiladas H4 e histonas metiladas H3(K4). SA-SRO induce una represión alelo específica sobre PW-SRO en el alelo materno, impidiendo la activación regional de los genes en este alelo (Perk *et al.*, 2002). PW-SRO es una región de unos 4.3 kb que incluye la isla CpG y el exón 1 del locus SNURF-SNRPN, también llamado *imprint-switch initiation site* o *SIS* (Dittrich *et al.*, 1996b; Ohta *et al.*, 1999). PW-SRO está metilado y empaquetado en una conformación de cromatina inactiva en el alelo materno.

#### **b) SNURF** (*SNRPN upstream reading frame*)

Gen de expresión paterna codificado por los tres primeros exones del locus SNURF-SNRPN representando un ORF adicional. Codifica una proteína básica de 71 aas, de 11 kD, de localización nuclear evolutivamente conservada (Sun *et al.*, 1996). Presenta un motivo de localización nuclear (KRRR) y en el extremo C-terminal posee un dominio Arg-Gly-Gly (RGG) característico de las ubiquitinas, aunque este dominio también se encuentra en proteínas que unen ARN. La naturaleza básica de esta proteína, rica en argininas, sugiere que puede interactuar con ARNs.

SNURF es el único gen codificador dentro de la región mínima reguladora de la impronta, lo cual implica una relación intrínseca entre el mecanismo regulador de la impronta y el gen (Gray *et al.*, 1999). Se piensa que la pérdida de SNURF puede conducir al fenotipo de problemas en la alimentación neonatal.

**c) SNRPN** (*Small Nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*)

Gen de expresión paterna localizado en 15q12 con un pseudogen en 6pter-p21, SNRPNP1 (Ozcelik *et al.*, 1992). Fue el primer gen candidato del SPW al localizarse en la región delecionada crítica para este síndrome, pero no es el principal determinante (Glenn *et al.*, 1993b; Reed and Leff, 1994; Schulze *et al.*, 1996). Pertenece a la familia de genes que codifican proteínas que se hallan en el *spliceosome* e implicadas en el *splicing* del pre-ARNm. Codifica la proteína SmN de 240 aas y 29 kD localizada predominantemente en neuronas centrales del cerebro, sugiriendo que está implicada en el *splicing* tejido específico de ARNm (Huntriss *et al.*, 1994). SmN junto con otras proteínas no tejido específicas como SmB/B', D, D', E, F, y G se asocian y forman parte del *spliceosome*.

La falta de expresión de SmN puede conducir a deficiencias en el procesamiento de ARNm en algunas neuronas. Este déficit ocasionaría un funcionamiento celular anormal o una reducida supervivencia de estas neuronas, siendo responsable de las anomalías en el comportamiento, el retraso mental y de crecimiento. Parece que en estas neuronas los niveles de producción de SmB/B', altamente homólogas con SmN, son insuficientes para compensar la falta de SmN, esencialmente en el cerebro fetal, en adulto SmB/B' se expresa en todos los tejidos menos en el cerebro. Como en ratón la falta de expresión de *Snrpn* es letal, se ha sugerido que en humanos la expresión SmB/B' puede ser suficiente para mantener algún nivel de procesamiento de ARNm o que el alelo materno relaje su impronta (Reed and Leff, 1994; Huntriss *et al.*, 1994).

**d) ARNsno** (*small nucleolar RNA*)

Dentro de la unidad de transcripción SNURF-SNRPN sentido/UBE3A antisentido se han identificado numerosas copias de ARNsno (Fig. 1.4.10). Algunos ARNsno como HBII-13, HBII-85 y HBII-52 tienen un ARN diana (Cavaille *et al.*, 2000; de los Santos *et al.*, 2000), pero otros como HBII-436, HBII-437, HBII-438A y HBII-438B pueden no ser funcionales (Runte *et al.*, 2001). Se especula que los transcritos previamente descritos PAR-4, PAR-7, PAR-SN y PAR-5 (Sutcliffe *et al.*, 1994; Ning *et al.*, 1996) pueden ser derivados de productos precursores del procesamiento de los ARNsno HBII-13, HBII-85 y HBII-52 (Cavaille *et al.*, 2000). Las secuencias que los flanquean, PWCR1 e IPW, no están conservadas filogenéticamente y no tienen potencial de codificar proteína, considerándose los genes hospedadores (Filipowicz, 2000).

Los ARNsno son ARNs pequeños y estables que forman parte de ribonucleoproteínas (snoRNPs) que se localizan en el nucleolo. Participan en la biogénesis de los ribosomas, procesando el pre-ARN ribosómico (pre-ARNr) en sus distintas clases (18S, 5.8S y 28S) y modificando post transcripcionalmente nucleótidos del ARNr a través de metilación de ribosas y formación de pseudouridinas (Tollervey and Kiss, 1997). También pueden funcionar como modificadores post transcripcionales de otros ARNs, así como formar parte de proteínas asociadas con las telomerasas (Mitchell *et al.*, 2000). La mayoría de los ARNsno se localizan dentro de intrones de genes *housekeeping* y se obtienen tras el procesamiento del pre-ARNm.

HBII-13, HBII-85 y HBII-52 son C/D *box* que realizan la metilación de ribosas de ARNr al presentar elementos de secuencia conservada complementarias a estos ARNs.

**HBII-13.** Presenta una sola copia dentro del intron 12, solapando con PAR-SN y PAR-5 (Fig. 1.4.10).

**HBII-85.** Es un ARNsno C/D *box* de 140 nt localizado dentro del gen hospedador PWCR1 (Prader-Willi chromosome region 1) (de los Santos *et al.*, 2000).

PWCR1 se expresa en todas las regiones del cerebro y no se detecta su expresión en pacientes con SPW. A partir de PWCR1 se sintetizan dos transcritos, uno poliadenilado de 1.2 kb y otro de 140 nt que corresponde con HBII-85. No se sabe si estos transcritos son independientes o derivados del transcrito del exón 20 de SNURF-SNRPN (Nicholls & Knepper, 2001). Se han descrito 27 copias de PWCR1 de diferentes tamaños, algunas sin HBII-85, ocupando en conjunto 55 kb. Parte de la copia 1 contiene una secuencia idéntica al transcrito PAR-7 (Fig. 1.4.12) (Cavaille *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001).

Ratones con delección paterna de Snurf a Ube3A, que incluye a MB-13, MB-85 y MB-52, presentan retraso en el crecimiento, hipotonía, y un 80% de letalidad (Tsai *et al.*, 1999). Es posible que la falta de los ARNsno HBII-85 causen anomalías en la modificación de ARNsno y esto contribuya a la disfunción hipotalámica y al retraso en el desarrollo en los pacientes con SPW (de los Santos *et al.*, 2000). Se ha descrito una paciente con translocación recíproca equilibrada *de novo* t(X;15)(q28;q12) y un fenotipo SPW atípico (Wirth *et al.*, 2001). El punto de rotura se localiza 70 a 80 kb distal de SNURF-SNRPN y afecta a la expresión de HBII-85, IPW y PAR-1. Se sugiere que la región crítica mínima del SPW es de 121 Kb dentro del locus SNURF-SNRPN y estaría representada por PWCR1/HBII-85 y HBII-438A, cuya pérdida sería responsable de la mayoría o de todo el fenotipo del SPW (Gallagher *et al.*, 2002).

**IPW** (*Imprinted in Prader-Willi*). Localizado a unos 150 Kb distal del gen SNRPN y a 250 kb del gen UBE3A (Wevrick *et al.*, 1994). Esta flanqueado por los ARNsno HBII-85 y HBII-52, pero no se sabe si HBII-52 está codificado por un intrón de IPW (Cavaille *et al.*, 2000).

**HBII-52.** Es un ARNsno C/D *box* que forma parte de una unidad de 1.9 kb repetida en tandem 47 veces extendiéndose unas 99 kb. Parte de la copia 23 es idéntica en secuencia al transcrito previamente identificado PAR-4 (Fig. 1.4.10). HBII-52 y su homólogo en ratón MBII-52 presentan una región con 18 nt filogenéticamente conservada complementaria al ARNm del receptor de la serotonina 5-HT<sub>2C</sub>, señalando un papel potencial en el procesado de este ARNm (Cavaille *et al.*, 2000).

Ratones con delección de Ipw a Ube3a no causan el fenotipo SPW, de modo que la región crítica puede extenderse entre SNRPN e IPW (Nicholls *et al.*, 1999). Se ha observado una microdelección de 570 Kb entre IPW y UBE3A, intervalo en el que se localiza HBII-52,

responsable de causar el SA cuando se hereda maternalmente, pero no tiene efecto fenotípico cuando se hereda del padre. Por lo que se sugiere que HBII-52 no está implicado en la etiología SPW (Burger *et al.*, 2002; Wirth *et al.*, 2001).

#### **e) UBE3A antisense**

Aunque el papel de este transcrito antisentido no se conoce, podría controlar la expresión diferencial del gen UBE3A en el cerebro (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain and Brannan, 2001). En dirección 3' se han identificado múltiples exones que no codifican proteína y de función desconocida, pero no se sabe exactamente donde acaba este transcrito antisentido, se especula que puede extenderse más allá del exón 148 hasta el locus ATP10C y estar asociado a la regulación de la impronta de este gen (Runte *et al.*, 2001). Hasta el momento se ha identificado un fragmento de UBE3A antisentido de 20 kb sin intrones y de expresión paterna que inicia su transcripción en CI (Rougeulle *et al.*, 1998; Runte *et al.*, 2001).

#### **1.4.2.2. Genes Síndrome de Angelman**

La región crítica del SA puede localizarse entre los marcadores D15S174 y D15S12. En esta región se han identificado dos genes, UBE3A y ATP10C (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997; Meguro *et al.*, 2001; Herzing *et al.*, 2001). Se había sugerido que el SA podría estar causado por un solo gen, siendo UBE3A el principal gen candidato, ya que su falta de expresión es suficiente para causar el fenotipo de SA. No obstante, como los pacientes con deleción 15q11-q13 están más afectados que los que no la presentan (Rougeulle *et al.*, 1998), se ha sugerido que puedan haber otros genes. Por ejemplo, el transcrito representado por el EST SGC32610, localizado próximo a BP2 y con expresión materna preferencial en linfoblastos, podría modificar el fenotipo SA a través de su falta de expresión en casos de deleción 15q11-q13 y casos con DI (Lee and Wevrick, 2000). Por otra parte el gen ATP10C también podría estar implicado en el fenotipo SA.

#### **UBE3A**

Fue mapado en la región crítica del SA en 1994, pero no fue considerado gen candidato al SA al no presentar impronta (Nakao *et al.*, 1994). Posteriormente se encontraron mutaciones en UBE3A en pacientes con el fenotipo típico del SA (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997) y se demostró que UBE3A presenta expresión tejido específica en el cerebro desde el alelo materno (Rougeulle *et al.*, 1997; Vu and Hoffman, 1997) mientras que en linfocitos y fibroblastos presenta expresión bialélica (Nakao *et al.*, 1994). La ausencia funcional del alelo materno de UBE3A es suficiente para causar el SA.

El gen UBE3A consta de 16 exones que se extienden 120 Kb, 10 exones codifican el principal ORF y seis o más, que no codifican, pueden contribuir a isoformas alternativas (Kishino *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1997). Los exones 9-16 codifican el extremo C-terminal que posee la actividad biológica E6-AP ligasa. UBE3A se expresa en dirección telómero centrómero

generando transcritos de diferente tamaño como sugiere la presencia de sitios de poliadenilación alternativos (Sutcliffe *et al.*, 1997b). Se han encontrado dos pseudogenes, UBE3AP1 y UBE3AP2, en los cromosomas 2 y 21 respectivamente (Kishino and Wagstaff, 1998).

La proteína que codifica el gen UBE3A, E6-AP, fue inicialmente identificada por su habilidad para ubiquitinar a p53 en la presencia de la oncoproteína E6 de papilomavirus humano (Huibregtse *et al.*, 1991), participando en la degradación de proteínas mediada por ubiquitina (Ciechanover and Schwartz, 1994). E6-AP se considera una ubiquitin protein ligasa E3, que tiene la capacidad de reconocer sustratos específicos y catalizar la transferencia de ubiquitina a estos sustratos diana (Scheffner *et al.*, 1995). Presenta un dominio hect (*homologous to E6-AP C-terminal domain*) de 350 aas en el extremo C-terminal que caracteriza a la familia de proteínas E3. Este dominio tiene un residuo de cisteína que sirve para unir ubiquitina a través de un enlace tioester. E6-AP interacciona y acepta ubiquitinas de enzimas E2. Luego, transfiere estas ubiquitinas a proteínas diana que serán degradadas como p53 que participa en la apoptosis, HHR23A que participa en la reparación del ADN (Kumar *et al.*, 1999), MCM-7 que participa en la replicación y la propia E6-AP entre otras proteínas (Kao *et al.*, 2000). Además de transferir ubiquitinas, E6-AP puede servir como un coactivador transcripcional de receptores de hormonas esteroideas (Nawaz *et al.*, 1999).

Durante la diferenciación neuronal inducida por factores de crecimiento hay un incremento en los niveles de enzimas implicados en la vía proteolítica mediada por ubiquitina (Smith-Thomas *et al.*, 1996; Maufroid *et al.*, 1996). Esto sugiere que E6-AP está implicada en el procesamiento post-transcripcional de proteínas precursoras de ciertos tejidos nerviosos, especialmente aquellas requeridas para dirigir al axón y la ramificación sináptica. El fenotipo SA sugiere que E6-AP es indispensable durante el desarrollo fetal del cerebro.

El retraso mental, las convulsiones y la ataxia pueden estar directamente relacionadas con la deficiencia de la expresión materna de UBE3A en el hipocampo y el cerebelo como se ha observado en ratón, siendo el fenotipo SA consecuencia de la ausencia de UBE3A durante el desarrollo del cerebro (Albrecht *et al.*, 1997). Ratones SA, deficientes en Ube3a presentan disfunción motora, convulsiones inducibles, defectos en el aprendizaje contextual y en la memoria (Jiang *et al.*, 1998). En ratones SA también se ha observado un incremento en la abundancia citoplasmática de p53 en las células de Purkinje y en algunas neuronas del hipocampo, lo cual sugiere que E6-AP regula la abundancia de p53 directamente *in vivo* a través de la ubiquitinización. Sin embargo, todavía no se conoce el mecanismo por el cual se alcanza la impronta tejida específica ni el camino por el cual la deficiencia de UBE3A conduce a las manifestaciones neurológicas del SA (Miura *et al.*, 2002).

### **ATP10C**

Gen de expresión materna localizado dentro de la región crítica del SA a 200 kb de UBE3A (Herzing *et al.*, 2001; Meguro *et al.*, 2001). Consta de 21 exones que codifican una proteína de 1499 aas. Representa un nuevo miembro de la subfamilia de ATPasas tipo T, que

puede estar implicada en el transporte de fosfolípidos y mantenimiento de la integridad de la membrana celular (Halleck *et al.*, 1998), por lo que puede ser crítico en la señalización celular en el SNC. ATP10C puede contribuir en la severidad del SA (Herzing *et al.*, 2001).

### **SCG32610**

Secuencia de expresión materna en linfoblastos. Se requieren más estudios para confirmar que presenta impronta materna (Lee and Wevrick, 2000).

#### **1.4.2.3. Otros genes**

Además de los genes en la región crítica SPW/SA se han descrito otros genes en la región 15q11-q13 que indirectamente podrían modificar el fenotipo final.

#### **C15orf2** (*Chromosome 15 open reading frame 2*)

Gen de copia única y sin intrones, localizado entre MAGEL2 y SNURF-SNRPN, a 67 kb y 300 kb, respectivamente. Tiene un tamaño 7.5 kb con un ORF de 3.5 kb que predice una proteína de 1156 aas de función desconocida. Presenta una isla CpG metilada en todos los tejidos excepto células germinales y en 3' presenta una señal de poliadenilación atípica contenida en un *long terminal repeat* de 579 pb (LTR10C). C15orf2 es un gen específico testicular de expresión bialélica, que solo se encuentra en primates, no hay ortólogo en ratón. Aunque no presenta impronta, podría presentarla en los estadios iniciales de la espermatogénesis. En este caso podría contribuir a la infertilidad en los varones SPW. Se especula que C15orf2 tendría su función en la espermatogénesis y su defecto contribuiría en la infertilidad masculina (Farber *et al.*, 2000).

#### **Receptores GABA-A: GABRB3, GABRA5 y GABRG3**

Tres genes para subunidades del receptor GABA-A se localizan en 15q11-q13. El receptor GABA-A es un canal de cloro modulado por benzodiazepinas formado por cinco subunidades. Cada subunidad consta de una región extracelular variable, cuatro dominios transmembrana y una región citoplasmática entre los dominios tres y cuatro (Glatt *et al.*, 1997). A este receptor se une el neurotransmisor GABA, principal inhibidor del SNC de mamíferos.

El gen GABRB3 está formado por nueve exones que se extienden 250 kb siendo uno de los intrones de 150 kb y codifica la subunidad  $\beta 3$  del receptor GABA-A (Wagstaff *et al.*, 1991a). Aunque GABRB3 no se considera un gen candidato del SA sí se sugiere que su delección podría explicar parcialmente el déficit neurológico en pacientes SA debido a la reducción de receptores GABRB3, que modificaría el fenotipo ocasionando temblores, convulsiones, espasmos, EEG anormal y otros rasgos típicos SA (DeLorey *et al.*, 1998; Holopainen *et al.*, 2001). En familias autistas se ha estudiado la transmisión del marcador polimórfico 155CA-2 de GABRB3, encontrándose asociación entre el autismo y la segregación de este marcador, sugiriendo que variantes genéticas del receptor GABA en 15q11-q13 pueden jugar un papel en el autismo

(Buxbaum *et al.*, 2002). También se ha sugerido que una disminución en la inhibición GABAérgica contribuya en el insomnio, estando la subunidad  $\beta 3$  implicada en procesos del sueño (Buhr *et al.*, 2002).

A diferencia de GABRB3, posiblemente GABRA5 y GABRG3 no contribuyan al fenotipo SA (Culiat *et al.*, 1994). El gen GABRA5 se localiza telomérico a GABRB3 y codifica a la subunidad  $\alpha 5$ . Consta de 11 exones que se extienden 86 kb (Glatt *et al.*, 1997). Se han identificado duplicaciones parciales de GABRA5 en la región pericentromérica 15q, observándose variación en el número de copias en diferentes individuos, indicando que la duplicación forma parte de una repetición. Individuos con un cariotipo normal presentan de una a cuatro copias en cada cromosoma 15, mientras que se han encontrado de ocho a 20 copias en individuos con una elongación detectable citogenéticamente en la región 15q proximal. Esta región variable de 1 Mb contiene otras dos duplicaciones no procesadas de los genes IgHD/V y NF1 (Ritchie *et al.*, 1998).

El gen GABRG3 codifica para la subunidad  $\gamma 3$  (Russek and Farb, 1994).

### **P/OCA2 (albinismo oculocutáneo tipo II)**

Gen recesivo localizado en 15q12, responsable del albinismo. Tiene un tamaño de unas 250 kb y está formado por 25 exones. Codifica una proteína integral de membrana de 838 aas con 12 dominios transmembrana, que funciona como transportador de tiroxina en los melanosomas. Su mutación es frecuente en la población africana con una gran morbilidad, siendo responsable de cáncer de piel y problemas visuales con secuelas importantes. La prevalencia del albinismo oculocutáneo de tipo II entre los pacientes con SPW y SA puede ser del 1%, que es la frecuencia esperada para los portadores de OCA2 teniendo en cuenta que la frecuencia de esta enfermedad es de 1 de 36.000 en la población Caucásica (Rinchik *et al.*, 1993).

### **HERC2**

Se localiza en 15q13 próximo al gen OCA2. Tiene un tamaño de 250 kb y está formado por 93 exones. Sintetiza un transcrito de 15286 pb que codifica una proteína de 4834 aas y 528 kDa altamente conservada (Ji *et al.*, 1999). HERC2 junto con HERC1 (p532) y HERC3 forman una familia génica que ha evolucionado por duplicación, fusión génica y divergencia (Nadeau *et al.*, 1997). A partir de HERC2 han evolucionado por duplicación parcial y transposición una serie de secuencias relacionadas constituyendo una subfamilia (HERC2P1-P7) con copias dispersas en 15q11 y 16p11.2, que representan pseudogenes transcripcionalmente activos pero incompletos (Ji *et al.*, 1999). Estas secuencias forman parte de los LCRs identificados en los puntos de rotura que generan la inestabilidad cromosómica en la región 15q11-q13 (Christian *et al.*, 1998; Amos-Landgraf *et al.*, 1999).

La estructura de la proteína HERC2 sugiere que puede funcionar como factor intercambiador de nucleótidos de guanina implicado en el tráfico vesicular (Ji *et al.*, 1999), como

una E3 ubiquitin ligasa implicada en el tráfico y degradación de proteínas (Hochstrasser *et al.*, 1995) o mediar interacciones específicas proteína-proteína (Ponting *et al.*, 1996).

Estudios en ratón demuestran que mutaciones de *Herc2* conducen a las anomalías fenotípicas del síndrome *juvenile development and fertility* (*jdf2*) que se manifiesta con degeneración neuromuscular progresiva, esperanza de vida corta, defectos en espermatozoides e inmadurez en el ovario causando esterilidad o fertilidad reducida, así como otras anomalías en el desarrollo y letalidad juvenil (Ji *et al.*, 1999). Estas observaciones implicadas en defectos en la vía secretora en espermatozoides y sistema nervioso son consistentes con el papel propuesto para HERC2 en el tráfico vesicular.

### **1.4.3. Impronta genómica**

Los organismos diploides tienen dos copias del material genético, una heredada del padre y otra de la madre. Normalmente los genes se expresan por igual desde ambos cromosomas, pero para algunos genes la expresión de los dos alelos es diferente. Esto está causado por la impronta genómica, proceso por el cual uno de los alelos está silenciado y solo se expresa el otro alelo (Reik *et al.*, 1987). Los alelos que se inactivan no son los mismos en el padre que en la madre, lo que constituye una expresión diferencial según el sexo. Esta situación determinada por la impronta representa un mecanismo epigenético de control de la expresión génica a través de modificaciones covalentes en el ADN, modificaciones en la estructura de la cromatina y tiempo de replicación de uno de los alelos. La existencia de la impronta obliga a la coexistencia de ambas dotaciones genómicas, paterna y materna, para el normal desarrollo embrionario, puesto que embriones androgenéticos y partenogenéticos fallan en su desarrollo normal generando molas hidatidiformes y teratomas ováricos respectivamente.

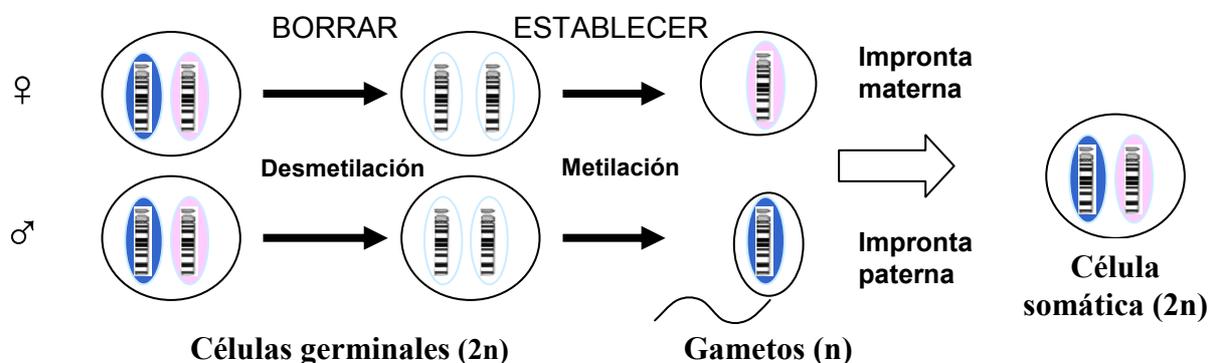
La impronta es un proceso reversible que se inicia en la línea germinal durante la gametogénesis y se establece antes de la fusión pronuclear cuando los dos genomas están separados. La impronta confiere una marca epigenética que determina su origen y permite a las células somáticas distinguir a los dos alelos parentales (Hall, 1990). Aunque aún no se conoce completamente como la impronta controla la expresión génica, se sugiere que la metilación del ADN puede ser la principal marca sexo específica que determina la expresión diferencial. Prueba de ello es que la adición de grupos metilo en la citosina de dinucleótidos CpG es una modificación covalente heredable, generalmente asociada con el silencio transcripcional. La mayoría de los genes con impronta dentro de la región 15q11-q13 presentan regiones de metilación diferencial ricas en islas CpG. La metilación de estas regiones, mayoritariamente en el alelo materno, puede bloquear la expresión del gen directamente al interferir en la unión de factores de transcripción activadores al promotor, o bien indirectamente al reclutar factores que inducen la represión a través de establecer un estado de cromatina más condensado (Kass *et al.*, 1997). Puede que la metilación por sí sola no es suficiente para regular la expresión de genes con impronta (Latham *et al.*, 1994). Nuevos estudios revelan la asociación entre la metilación del ADN y la deacetilación de histonas en el silencio transcripcional (Jones *et al.*,

1998). Se ha observado que las islas CpG no metiladas del alelo paterno activo del locus SNURF-SNRPN están asociadas con histonas acetiladas, mientras que las islas metiladas del alelo materno inactivo están asociadas con histonas hipoacetiladas (Saitoh and Wada, 2000).

Otro mecanismo por el cual la impronta puede silenciar un gen es mediante la expresión de un ARN antisentido. Parece que esta es la estrategia para silenciar los alelos paternos, como es el caso del alelo paterno del gen UBE3A, que está silenciado de forma indirecta por UBE3A antisentido en el cerebro (Rougeulle *et al.*, 1998). De modo que estos procesos de metilación y antisentido cooperan para mantener silenciados genes con impronta en las células somáticas.

#### Fases de la impronta

I) Borrado de la impronta: En cada nueva generación las células germinales primordiales borran la impronta previa por desmetilación completándose en el estadio embrionario de 12-13 días (Fig. 1.4.13). En la línea germinal masculina se borra la impronta materna que presenta el cromosoma 15 heredado de la madre, y en la línea germinal femenina se borra la impronta paterna heredada del padre. No se sabe si este proceso es activo, de momento no se han encontrado genes para demetilasas, o pasivo, siendo la propia replicación la que contribuye en la eliminación de la metilación. En este segundo proceso podrían colaborar factores que interfieran con la actividad de la enzima ADN metiltransferasa de mantenimiento (DNMT1), impidiendo la metilación de sitios CpG hemimetilados tras la replicación del ADN (Bestor *et al.*, 1993; Wolffe *et al.*, 1999).



**Figura 1.4.13.** Mecanismo de la impronta. En las células germinales se borra la impronta del sexo opuesto y se establece la impronta que corresponde con el sexo de la línea germinal. Los espermatozoides presentaran impronta paterna (azul) y los oocitos impronta materna (rosa)

II) Establecimiento: Después de la desmetilación, se inicia la metilación *de novo* en estadios fetales tardíos y continúa después del nacimiento. Los oocitos están detenidos en meiosis y la metilación ocurre durante su crecimiento (Obata *et al.*, 1998), mientras que la metilación ocurre antes de la meiosis durante la espermatogénesis (Davis *et al.*, 2000). Se piensa que la metilación *de novo* se lleva a cabo por la enzima DNMT1. Esta enzima tendría la capacidad de realizar tanto la metilación *de novo* como la metilación de mantenimiento (Yoder *et*

*al.*, 1997). DNMT1 está asociada con la horquilla de replicación y tiene preferencia por el ADN hemimetilado, pero no se sabe que reconoce para metilar *de novo* diferencialmente. Posiblemente sean secuencias específicas de ADN, las cuales pueden incluso influir en la conformación de la cromatina, o bien la propia conformación de la cromatina, donde la heterocromatina local conduciría la metilación de secuencias ricas en CpG próximas (Engemann, 2000). Otra explicación se encuentra en la replicación asincrónica durante la fase S del ciclo celular. Es posible que esta diferencia en el tiempo de replicación resulte en una diferente accesibilidad al ADN de la maquinaria de metilación *de novo* o de mantenimiento (Simon *et al.*, 1999).

III) Mantenimiento: Aunque la metilación puede ser mantenida simplemente por Dnmt1, ocurre una nueva desmetilación después de la fertilización y una nueva metilación *de novo* después de la implantación, ambos procesos son resistidos por las regiones de metilación diferencial al presentar una estructura de cromatina que los protege. La impronta establecida en la línea germinal y mantenida posteriormente en el embrión será reconocida por la maquinaria de la transcripción resultando en una expresión monoalélica.

#### **1.4.3.1. Modelo de cambio de impronta en 15q11-q13**

En 1996 Ditttrich *et al.* propusieron un modelo para explicar el cambio de la impronta durante la gametogénesis, *model for imprint switching*, basados en datos genéticos de mapeo y análisis de mutación en familias SPW-SA con error en el cambio de la impronta. Este modelo explica cómo funciona CI y el efecto de las mutaciones de CI sobre el dominio improntado en 15q11-q13. Según este modelo, CI consiste en un *imprantor* y un *imprint switch initiation site* o *SIS*, ahora SA-SRO y PW-SRO respectivamente (Yang *et al.*, 1998) y requiere de un factor *trans-acting* específico de las células de la línea germinal femenina. Los sucesos que tienen lugar en cada línea germinal son distintos (Fig. 1.4.14).

#### Línea germinal femenina

Se produce el cambio de impronta paterna a materna del cromosoma 15 de origen paterno. Primero se borra la impronta paterna por desmetilación y desplazamiento de histonas. En presencia de la secuencia SA-SRO (antes *imprantor*) y el factor *trans-acting* específico femenino se establece la impronta materna. SA-SRO no está metilada y presenta una estructura de cromatina descondensada que permite la unión de factores *trans-acting*. El papel de SA-SRO, en colaboración con el factor *trans-acting*, parece ser el de sintetizar transcritos BD impidiendo la expresión del locus SNURF-SNRPN solamente desde el cromosoma paterno. Estos transcritos BD posiblemente inducen cambios en la estructura de la cromatina que permiten la metilación y propagación bidireccional de una conformación parecida a la heterocromatina. Esta conformación silencia los genes SPW y activa la expresión de UBE3A. Alternativamente a la función de los transcritos codificados a partir de SA-SRO, un elemento regulador todavía desconocido dentro de esta región podría interferir con PW-SRO (Farber *et al.*, 1999).

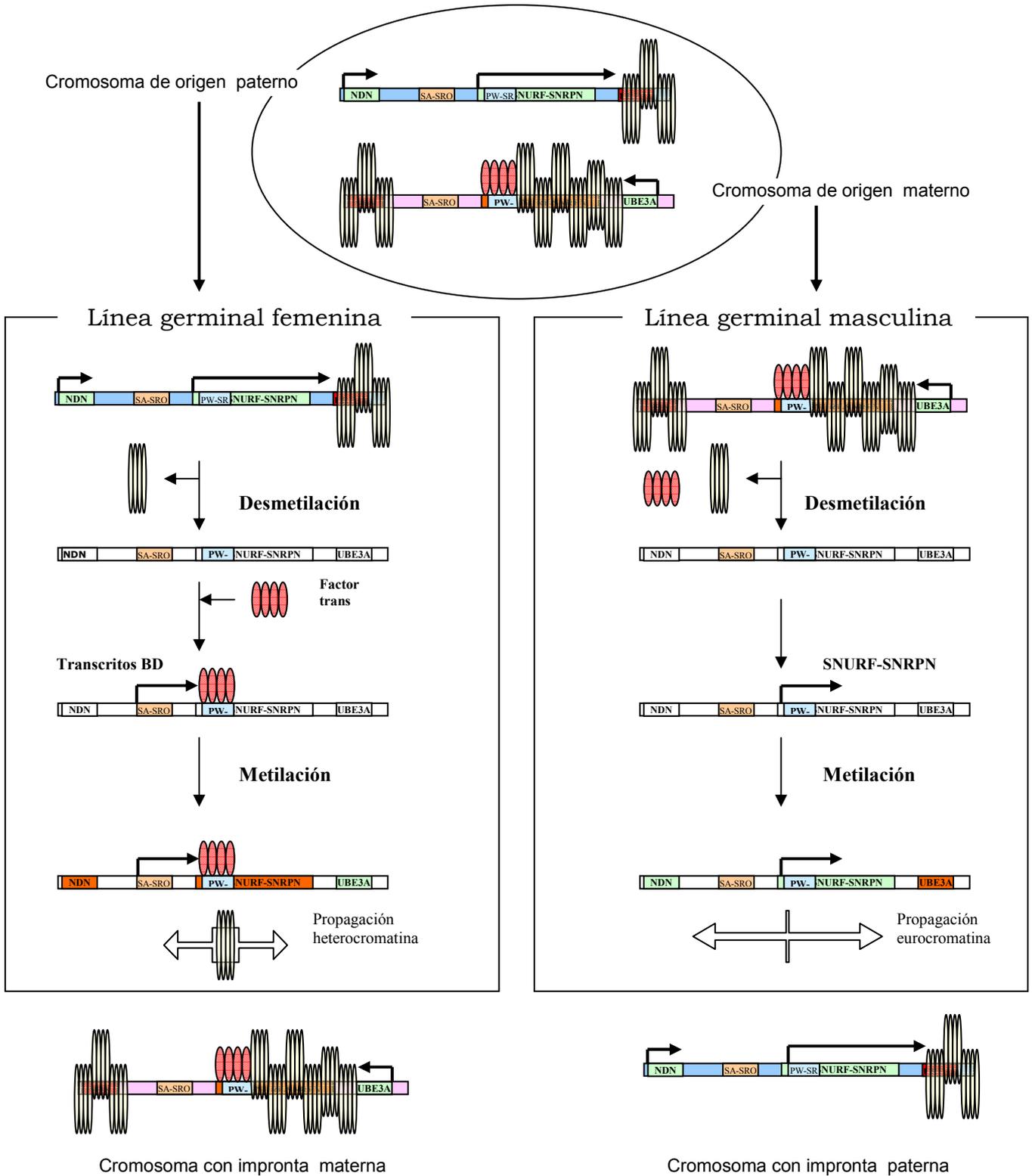
### Línea germinal masculina

El cambio de impronta materna a paterna se lleva a cabo en el cromosoma 15 de origen materno. En la ausencia del factor *trans-acting* específico femenino se pierde la impronta materna por desmetilación y al desprenderse proteínas silenciadoras como histonas unidas al promotor del locus SNURF-SNRPN. La impronta paterna se establece por defecto, solo requiere en *cis* la presencia de la secuencia PW-SRO (antes *SIS*) (Yang *et al.*, 1998), posiblemente por su papel en el inicio o mantenimiento de la transcripción del locus SNURF-SNRPN (Brannan and Bartolomei, 1999). El hecho de que pueda transcribir el locus SNURF-SNRPN es suficiente para desencadenar el inicio de la impronta paterna (Ohta *et al.*, 1999). Esta transcripción permite que los genes SPW queden sin metilar y empaquetados en una conformación en eucromatina. Es posible que PW-SRO represente un centro de nucleación para el ensamblaje y desensamblaje de la cromatina.

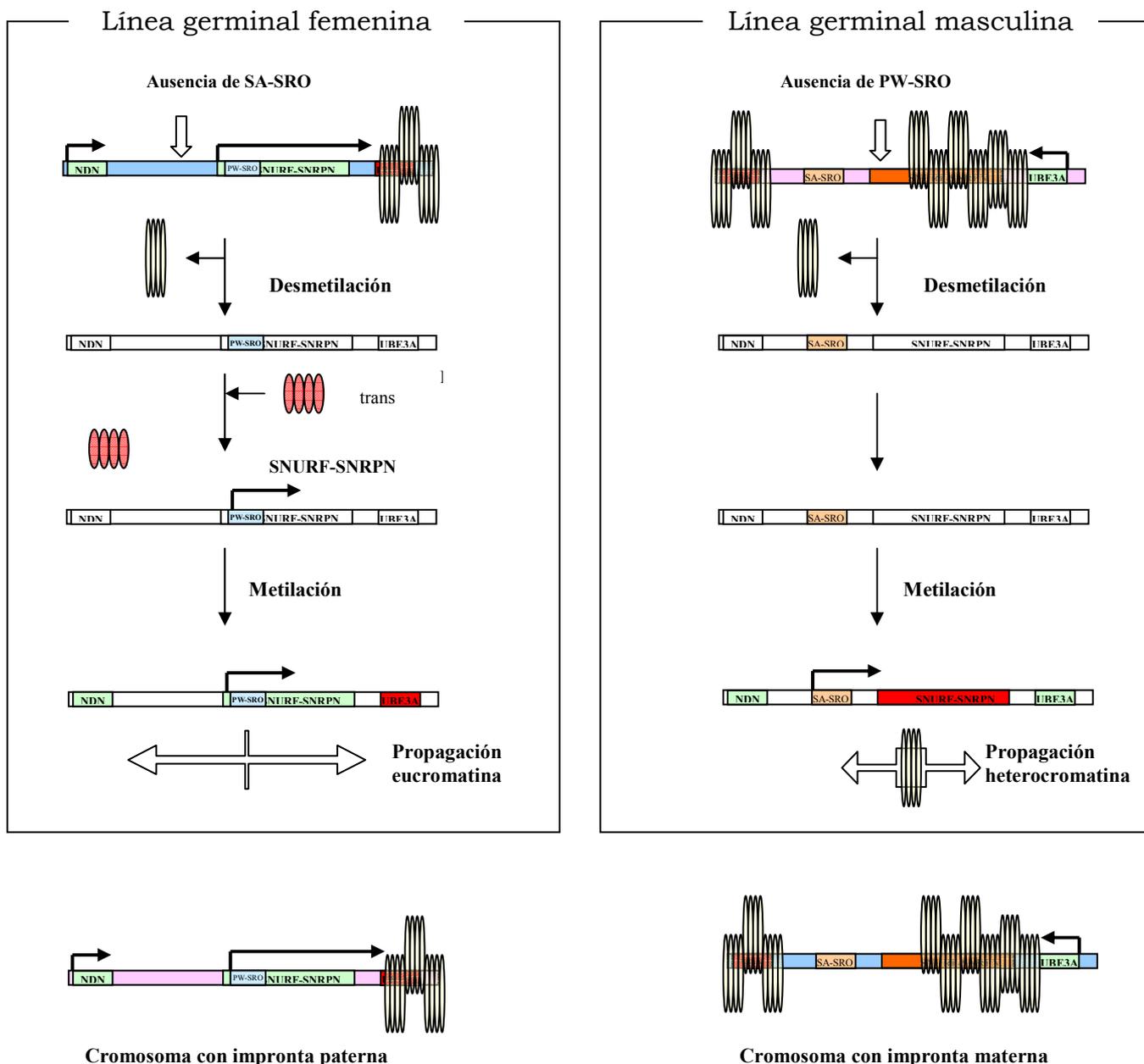
Este modelo también explica porque las microdeleciones observadas en familias SPW y SA bloquean el cambio de impronta (Fig. 1.4.15).

En las familias SA el cambio de impronta paterna a materna está bloqueado por mutación o ausencia de la secuencia SA-SRO. El cromosoma borrado adquiere una impronta paterna por defecto y es transmitido un cromosoma materno con impronta paterna causando el SA. La mutación en SA-SRO puede bloquear el cambio paterno a materno, pero no el cambio materno a paterno.

En las familias SPW, el cambio de impronta materna a paterna está bloqueado por mutación o ausencia de la secuencia PW-SRO. Aunque se borra la impronta materna ésta se establece de nuevo durante o después de la fertilización por propagación de una conformación de heterocromatina que silencia los genes SPW. La línea germinal masculina transmite un cromosoma 15 con impronta materna. Se ha demostrado que PW-SRO no solamente es requerido para el establecimiento de la impronta paterna, sino también para su mantenimiento postzigótico (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001). En los pacientes SPW sin microdeleción en CI el defecto de impronta podría resultar de un fallo en el borrado de la impronta materna durante la espermatogénesis por razones desconocidas (Buiting *et al.*, 2003).



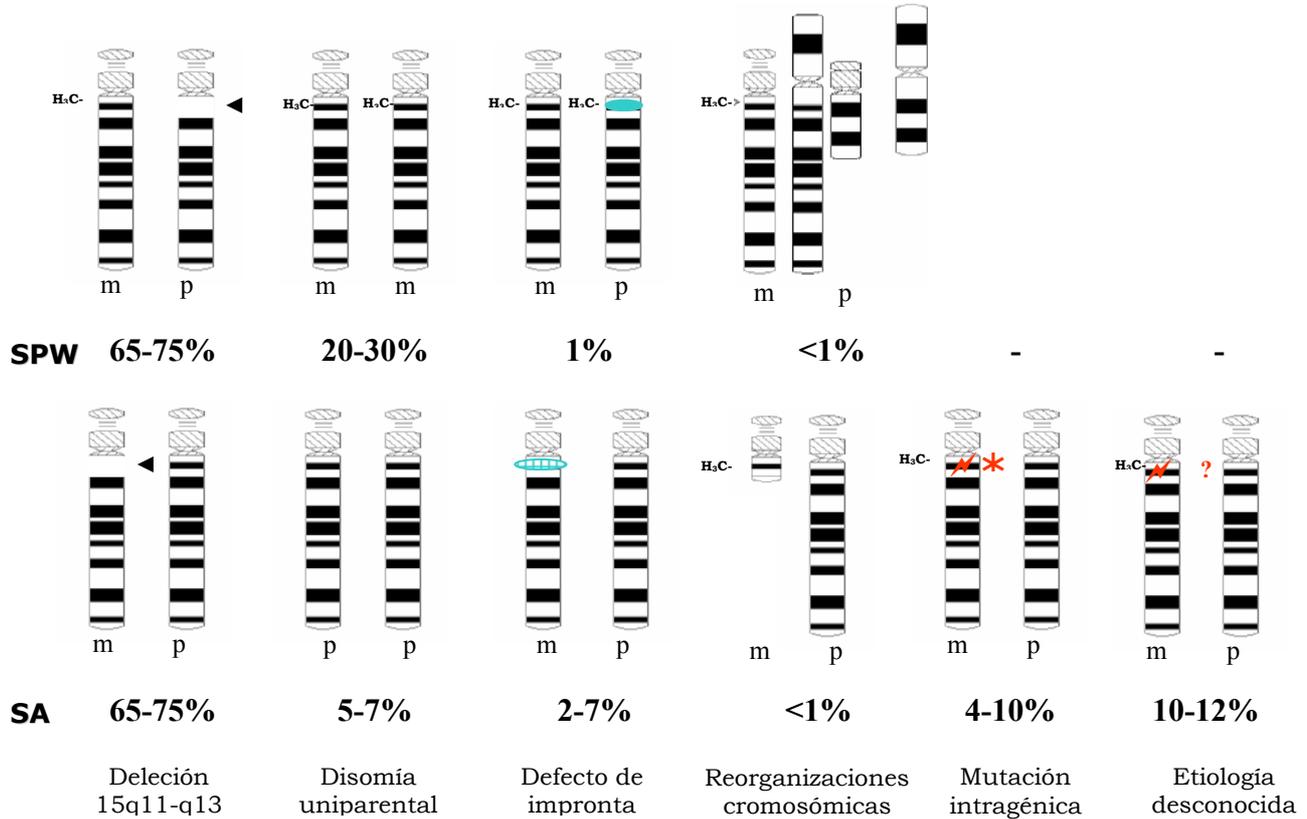
**Figura 1.4.14.** Cambio de impronta. A) Línea germinal femenina. Se borra la impronta paterna del cromosoma de origen paterno y se establece la impronta materna. B) Línea germinal masculina. Se borra la impronta materna del cromosoma de origen materno y se establece la impronta paterna. SA-SRO: regula cambio de impronta paterna a materna; PWSRO: sitio de inicio de cambio de impronta; NDN y SNURF-SNRPN: genes SPW de expresión paterna; UBE3A: gen SA de expresión materna; Verde: alelo activo; Rojo: alelo inactivo. Flecha: sentido de la transcripción; Esferas rojas: Factor *trans*; Cilindros: histonas



**Figura 1.4.15.** Cambio de impronta en caso de DI por microdelección de CI. A) Línea germinal femenina. Se borra la impronta paterna del cromosoma de origen paterno pero en la ausencia de SA-SRO no se puede unir el factor *trans*. Al quedar libre el promotor del locus SNURF-SNRPN, transcribe y se establece la impronta paterna. Cromosoma materno con impronta paterna. B) Línea germinal masculina. Se borra la impronta materna del cromosoma de origen materno. En la ausencia de PWSRO no se puede establecer ni mantener la impronta paterna. No hay transcripción del locus SNURF-SNRPN y se establece la impronta materna. Cromosoma paterno con impronta materna. SA-SRO: regula cambio de impronta paterna a materna; PWSRO: sitio de inicio de cambio de impronta; NDN y SNURF-SNRPN: genes SPW de expresión paterna; UBE3A: gen SA de expresión materna; Verde: alelo activo; Rojo: alelo inactivo. Flecha: sentido de la transcripción. Esferas rojas: Factor *trans*; Cilindros: histonas

**1.5. Etiología de los síndromes de Prader-Willi y Angelman**

Las alteraciones que originan el SPW tienen como causa común la pérdida o inactivación de genes paternos en la región q11-q13 del cromosoma 15, mientras que el SA ocurre por pérdida o inactivación de genes maternos en esta misma región. El tipo de alteraciones descritas hasta el momento y la frecuencia hallada entre los pacientes se describen y representan en la figura 1.5.1 (Nicholls and Knepper, 2001; Lossie *et al.*, 2001).



**Figura 1.5.1.** Tipos de alteraciones genéticas en el SPW y SA

**1.5.1. Deleción 15q11-q13**

Consiste en la pérdida de un fragmento cromosómico de ~4Mb de la región q11-q13 del cromosoma 15. La deleción paterna de esta región implica la pérdida de genes activos de expresión paterna, estos mismos genes están silenciados en el cromosoma materno por la impronta, de modo que no hay ningún alelo activo de estos genes que pueda realizar las funciones para la que están programados, causando el SPW. Esta misma deleción pero en el cromosoma materno implica la pérdida de genes activos de expresión materna, la ausencia de estos genes, principalmente el gen UBE3A, causa el SA.

La mayoría de las deleciones tienen un tamaño similar y presentan unos puntos de rotura bien determinados (ver Región 15q11-q13, Pág.12).

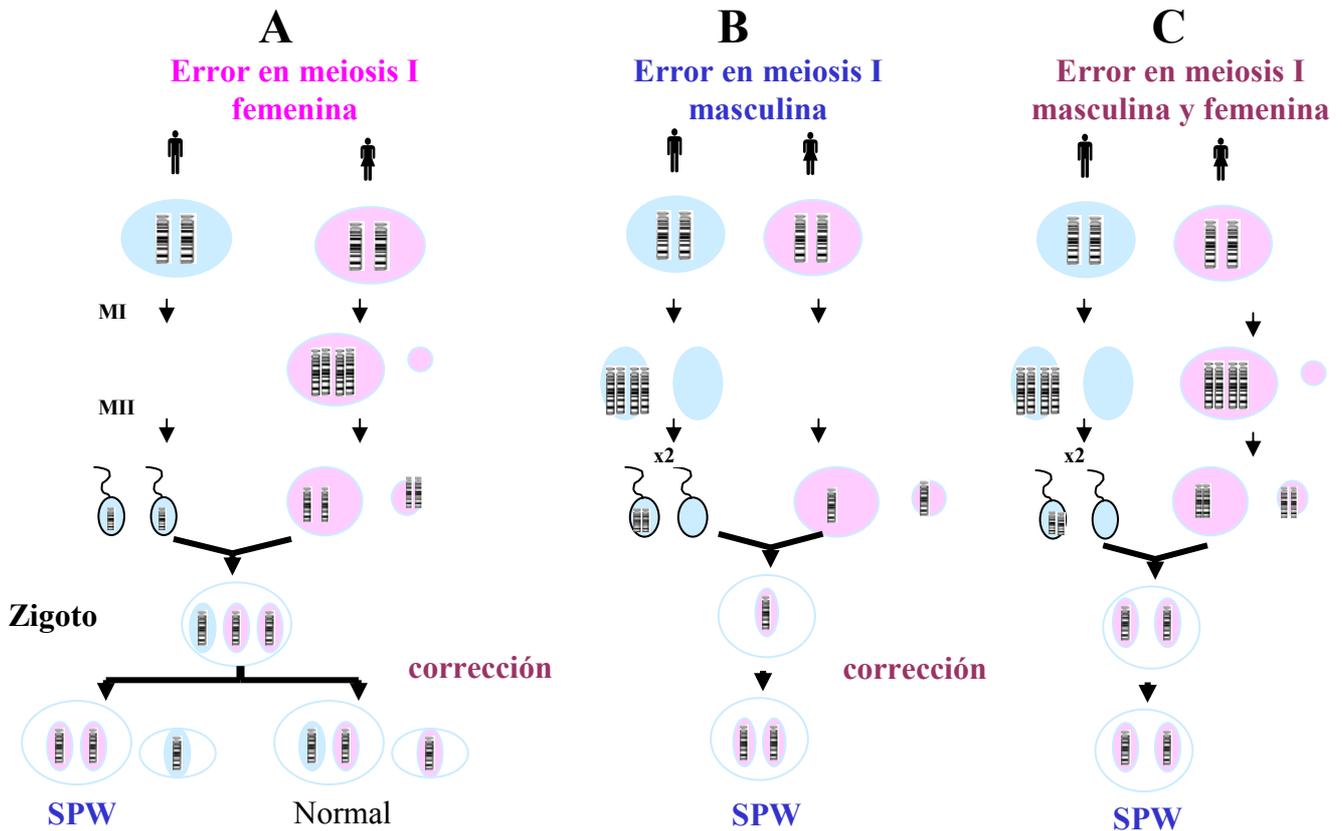
### 1.5.2. Disomía uniparental

La disomía uniparental (DUP) se produce cuando los dos cromosomas son heredados de un mismo progenitor (Engel, 1980). Se habla de heterodisomía cuando se reciben los dos homólogos, e isodisomía cuando se reciben dos copias de un mismo homólogo.

#### Disomía uniparental materna del cromosoma 15 (DUP-15mat)

Ocurre en un 20-30% de pacientes SPW y esta asociada con la edad materna avanzada (Robinson *et al.*, 1993a; Nicholls and Knepper, 2001). Los mecanismos propuestos que pueden causar DUP-15mat son:

- A. Corrección de una trisomía. Ocurre en la mayoría de los casos y causa heterodisomía materna. Resulta de una no-disyunción en meiosis I generando un oocito disómico con dos cromosomas 15. Su fecundación por un espermatozoide normal produce un cigoto con trisomía 15. La trisomía 15 es letal para el embrión, pero en algunas ocasiones puede ocurrir su corrección por no-disyunción mitótica. Si se produce la pérdida del cromosoma 15 de origen paterno, ocurre en un tercio de los casos, se manifestará el SPW por DUP-15mat, mientras que si se produce la pérdida de uno de los cromosomas 15 maternos resultará un embrión normal (Purvis-Smith *et al.*, 1992) (Fig. 1.5.2A).
- B. Corrección de una monosomía. Un error de no-disyunción en la 1ª división meiótica masculina puede producir un espermatozoide nulisómico (le falta el cromosoma 15). La fecundación de un oocito normal por este espermatozoide produce un cigoto monosómico, que solo tiene un cromosoma 15 materno. Este cigoto no es viable, pero la duplicación mitótica de este cromosoma puede teóricamente corregir la línea celular causando DUP-15mat (Fig. 1.5.2B).
- C. Complementación gamética. Es el menos frecuente y resultaría de la no-disyunción simultánea del cromosoma 15 en ambos progenitores. La fecundación de un oocito disómico por un espermatozoide nulisómico formaría un cigoto con dos cromosomas 15 maternos, desarrollándose un feto con SPW por DUP-15mat. Se ha sugerido que en estos casos podría ser significativo un efecto de la edad paterna (Robinson *et al.*, 1993a) (Fig. 1.5.2C).

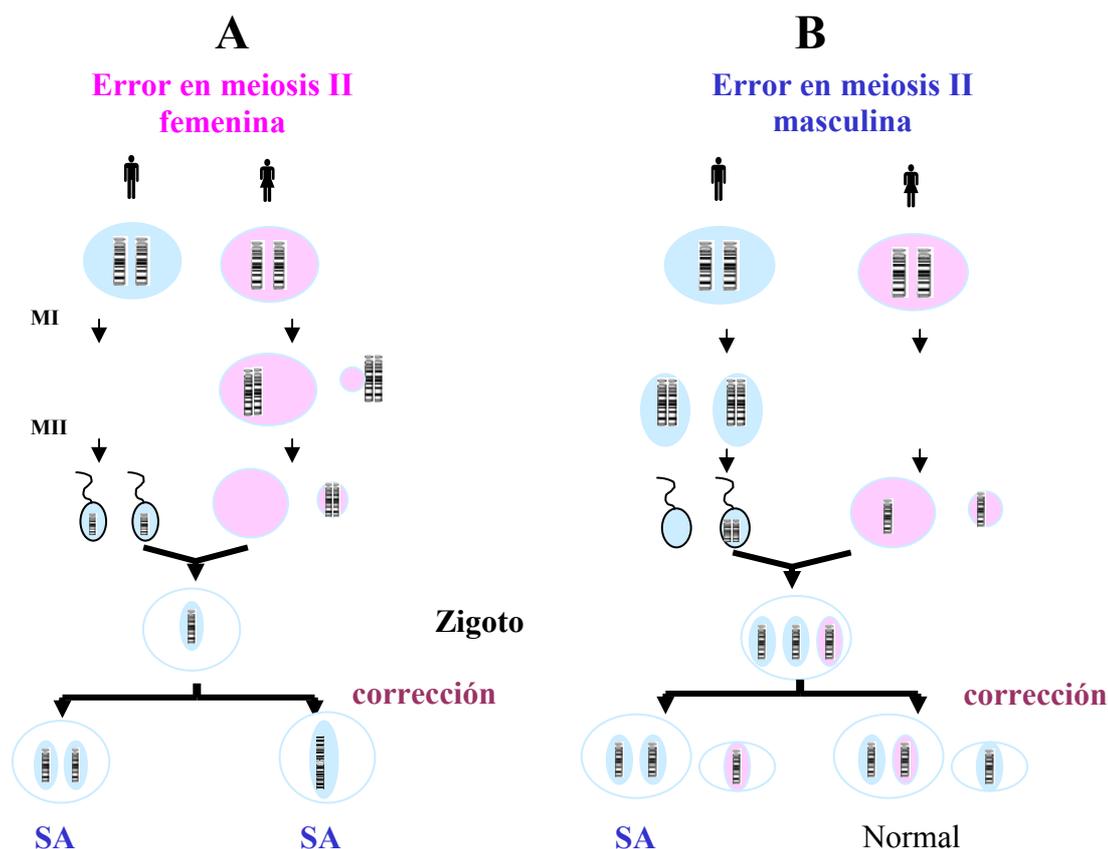


**Fig. 1.5.2.** Mecanismos genéticos responsables de la DUP-15mat en el SPW. A. Corrección de una trisomía. B. Corrección de una monosomía. C. Complementación gamética

Disomía uniparental paterna del cromosoma 15 (DUP-15pat)

Ocurre en menos de un 5-7% de los pacientes SA y está asociada con la edad materna avanzada (Robinson *et al.*, 1993a; Lossie *et al.*, 2001). La menor frecuencia de las DUP-15pat respecto a las DUP-15mat es debido a la rara ocurrencia de no-disyunción meiótica en los gametos masculinos (Niccolaides and Petersen, 1998). Pueden ocurrir por uno de los siguientes mecanismos:

- A. Corrección de una monosomía. Ocurre en la mayoría de los casos y causa isodisomías completas. Un error en la meiosis II femenina puede generar un oocito nulisómico. La fecundación de este oocito por un espermatozoide normal da lugar a un cigoto monosómico con un cromosoma 15 paterno. Este cigoto no es viable, pero la duplicación mitótica de este cromosoma 15 paterno o la formación de un isocromosoma pueden corregir la monosomía y desarrollar un feto con SA por DUP15-pat (Robinson *et al.*, 1993a; Mutirangura *et al.*, 1993a) (Fig.1.5.3A).
- B. Corrección de una trisomía 15. Es menos frecuente. Un error de no-disyunción en la 2ª división meiótica masculina puede generar un espermatozoide disómico. Si este espermatozoide fecunda un oocito normal se produce un cigoto con trisomía 15 no viable. Su corrección por no-disyunción mitótica puede conducir al SA por DUP-15pat si se pierde el cromosoma 15 materno (Fig.1.5.3B).



**Fig. 1.5.3.** Mecanismos genéticos responsables de la DUP-15pat en el SA.

A. Corrección de una monosomía 15. B. Corrección de una trisomía 15

### 1.5.3. Defecto de impronta

El defecto de impronta (DI) resulta de un fallo en el cambio de impronta en la línea germinal (Dittrich *et al.*, 1996b). Este fallo puede ser por microdelección de CI, o bien, por otros mecanismos que no implican la microdelección de CI.

#### Defecto de impronta en pacientes SPW

Se caracteriza por tener dos cromosomas 15 de origen biparental con un patrón de metilación materno en ambos, por lo que no se expresará ninguno de los alelos paternos que normalmente se expresan. Estos pacientes reciben de su padre un cromosoma 15 con impronta materna (Buiting *et al.*, 2003). El DI puede producirse por dos mecanismos:

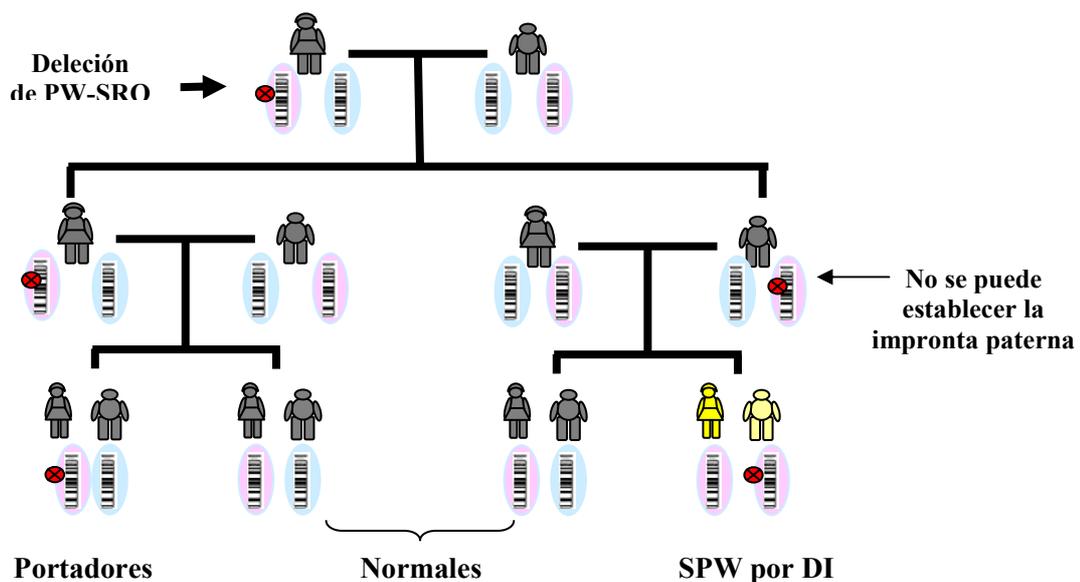
a) Defecto de impronta por microdelección de CI:

Un 15-20% de los casos con DI están causados por una microdelección de 7.5 a 200 kb que afecta a la secuencia PW-SRO (Buiting *et al.*, 2000). En la ausencia de PW-SRO se establece la impronta materna (ver Impronta g, Pág.30). La delección de CI puede ser *de novo* en el padre, el cual será portador de la mutación en su cromosoma materno. Se ha observado que en la mayoría de los casos la mutación ocurre en la abuela paterna y nunca en el abuelo paterno (Buiting *et al.*, 1998). La mutación es transmitida silenciosamente a través de mujeres en

sucesivas generaciones, pero cuando pasa por la línea germinal masculina, la mutación impide el establecimiento de la impronta paterna y en la siguiente generación se manifiesta el SPW (Fig. 1.5.4) (Dittrich *et al.*, 1996b).

b) Defecto de impronta por otros mecanismos:

Representan un 80% de los pacientes con DI. Son casos esporádicos en los que no se ha detectado deleción de CI ni mutación en la secuencia PW-SRO (Ohta *et al.*, 1999; Buiting *et al.*, 1998). La impronta materna incorrecta en estos pacientes siempre es heredada de la abuela paterna, lo que sugiere que la impronta materna no fue borrada en la línea germinal del padre, en lugar de establecida de nuevo.



**Figura 1.5.4.** Transmisión del DI en familias SPW. La mutación ocurre en la línea germinal de la abuela. El hijo no puede establecer la impronta paterna y transmite un cromosoma con impronta materna a su descendencia. Cromosoma paterno: azul; Cromosoma materno: rosa; DI por deleción de PW-SRO: esfera roja

#### Defecto de impronta en pacientes SA

Se ha observado en un 2-7% de los pacientes SA, resulta de un fallo en el cambio de impronta en la línea germinal femenina (Buiting *et al.*, 2001; Lossie *et al.*, 2001). Se caracterizan por tener dos cromosomas 15 de origen biparental con un patrón de metilación paterno en ambos. Reciben de su madre un cromosoma 15 con impronta paterna. Puede producirse por dos mecanismos:

a) Defecto de impronta por microdeleción de CI:

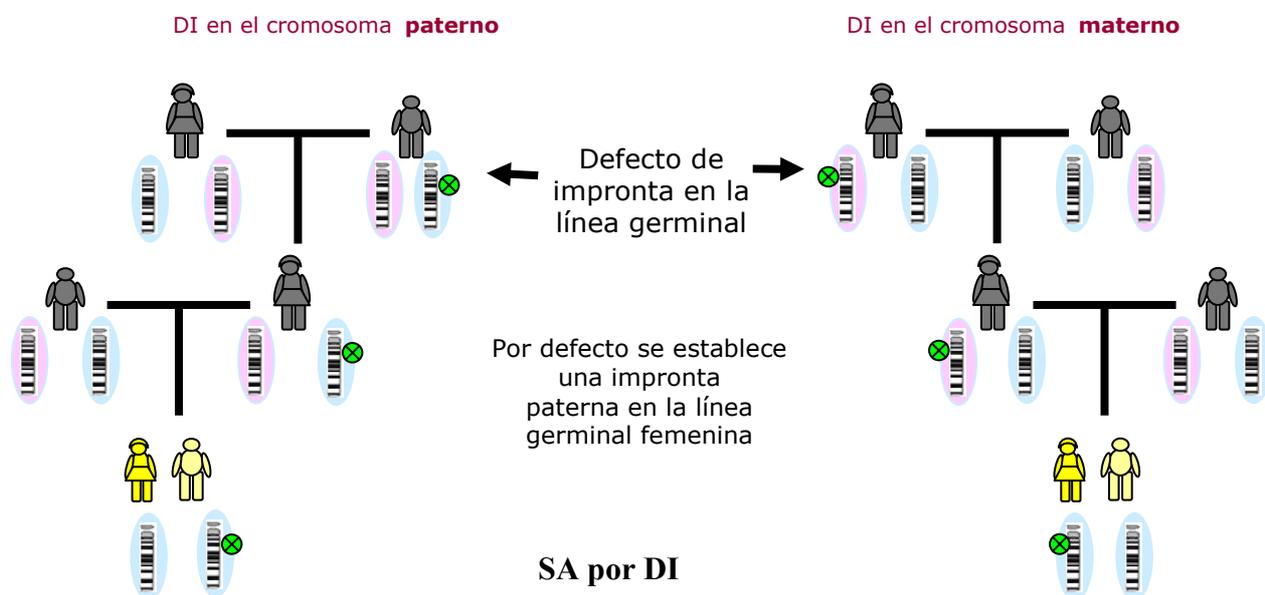
Un 50% de los pacientes con DI presentan una microdeleción de 5.5 a 80 kb afectando a la secuencia SA-SRO. En la ausencia de SA-SRO el cromosoma 15 adquiere una impronta paterna por defecto (ver Impronta g, Pág. 30). La deleción puede ser *de novo* en la madre, consecuencia de mosaicismo germinal femenino (Saitoh *et al.*, 1997) o haber ocurrido en el

abuelo materno y transmitido silenciosamente a través de la línea paterna (Buiting *et al.*, 1998).

b) Defecto de impronta por otros mecanismos:

Son casos esporádicos en los que no se ha observado delección ni ninguna mutación que altere la secuencia de SA-SRO. Al analizar el origen del cromosoma 15 con la impronta paterna incorrecta se ha observado que este puede proceder no solo del abuelo materno, sería lo esperado, sino también de la abuela materna (Fig. 1.5.5). Esto sugiere que el defecto de impronta ocurre después de borrarse la impronta y en lugar de establecerse la impronta materna se establece por defecto la impronta paterna en la línea germinal femenina o postzigóticamente (Burger *et al.*, 1997; Buiting *et al.*, 1998).

Recientemente se ha sugerido que la mayoría de los defectos de impronta son epimutaciones que ocurren espontáneamente sin alterar la secuencia de ADN (Buiting *et al.*, 2003).



**Figura 1.5.5.** Transmisión del DI en familias SA. La mutación ocurre en la línea germinal del abuelo o abuela materna. En ambos casos, la mutación de SA-SRO impide establecer la impronta materna en la línea germinal de sus hijas y por defecto se establece la impronta paterna, siendo estas las que transmiten el SA a su descendencia. Cromosoma paterno: azul; Cromosoma materno: rosa; DI por delección de SA-SRO: esfera verde

#### **1.5.4. Reorganizaciones cromosómicas**

Son poco frecuentes, <1%. Las más comunes son las translocaciones. Causan el SPW o SA cuando el punto de rotura tiene lugar dentro de la región 15q11-q13 al interrumpir la secuencia de un gen o causar delección, o por DUP cuando está presente toda la región 15q11-q13, normalmente isocromosomas 15.

#### **1.5.5. Mutaciones intragénicas**

Un 4-10% de los pacientes con SA presentan mutación en el gen UBE3A (Malzac *et al.*, 1998; Lossie *et al.*, 2001). La mutación puede ocurrir *de novo* en el 14-23% o ser heredada en el alelo materno, en el 75-80% (Malzac *et al.*, 1998; Fung *et al.*, 1998). En los casos familiares la mutación en el alelo paterno no tiene efecto fenotípico (Lossie *et al.*, 2001). Las mutaciones suelen afectar a los exones 9 y 16 principalmente, que constituyen al dominio *hect* y generan una proteína truncada. Ocurren por dos mecanismos principalmente: error de replicación por deslizamiento en secuencias repetitivas o por transición C→T, que generan mutaciones del tipo *frameshift*, *nonsense*, *missense*, inserción o delección de un aminoácido, alteración del *splicing* o crean un codon stop. En el análisis de los exones en dirección 5' no se han encontrado mutaciones (Malzac *et al.*, 1998, Fang *et al.*, 1999). El análisis mutacional del gen UBE3A presenta algunas dificultades debido a la presencia de por lo menos dos pseudogenes (Kishino and Wagstaff, 1998).

#### **1.5.6. Etiología desconocida**

Un 10-12% de los pacientes SA presentan etiología desconocida. Estos pacientes pueden tener afectada la expresión del gen UBE3A de forma indirecta, bien porque afecte a genes en otro cromosoma que regulen la expresión materna de UBE3A o por eventos epigenéticos que silencien la expresión de UBE3A (Fang *et al.*, 1999). Se ha sugerido que mutaciones en las secuencias antisentido y sentido de UBE3A podrían ser también las responsables del SA (Rougeulle *et al.*, 1998). La reciente identificación del gen ATP10C en la región crítica del SA abre la posibilidad de que algunos de estos pacientes presenten este gen mutado (Meguro *et al.*, 2001; Herzing *et al.*, 2001).

## 1.6. Técnicas de diagnóstico

La heterogeneidad genética del SPW y SA requiere del uso de varias técnicas para conocer la etiología. El análisis citogenético permite ver cambios de megabases en deleciones y duplicaciones, así como reorganizaciones, pero se requieren métodos de análisis molecular para detectar cambios más pequeños.

### 1.6.1. Análisis citogenético de alta resolución con técnica de bandas G

El análisis citogenético con técnicas de bandas G de alta resolución (500-850 bandas) permitió observar la presencia de una deleción intersticial 15q11-q13 en pacientes SPW (Ledbetter *et al.*, 1981). Observando los polimorfismos citogenéticos del cromosoma 15, como la variación de los NOR, el tamaño de los brazos cortos y la fluorescencia de los centrómeros se pudo determinar que la deleción ocurría en el cromosoma 15 de origen paterno (Butler and Palmer, 1983). Posteriormente, pudo demostrarse, en pacientes SA, la presencia de una deleción aparentemente similar a la observada en los pacientes SPW (Magenis *et al.*, 1987), pero localizada en el cromosoma 15 de origen materno (Donlon, 1988; Knoll *et al.*, 1989a; Magenis *et al.*, 1990). Esta coincidencia, en síndromes completamente diferentes, sugería no obstante que la deleción no podía ser idéntica, por lo que se comparó el tamaño de la deleción y las bandas implicadas. Se observó que la banda proximal q11.2 estaba delecionada en ambos síndromes, la región delecionada variaba en tamaño, y en general, la deleción en pacientes SA era más larga (Magenis *et al.*, 1990). Estos datos hacían lógica la explicación de que las diferencias fenotípicas eran debidas a diferentes genes, localizados muy próximos. Además, el diferente origen parental evidenciaba que la región 15q11-q13 podía estar regulada por la impronta.

Con el análisis del cariotipo, además de las deleciones, se pudieron observar otras anomalías en el cromosoma 15 menos frecuentes como translocaciones, duplicaciones, cromosomas marcadores, etc. No obstante, a pesar de esta heterogeneidad citogenética, entre los pacientes SPW había un 37% que presentaba un cariotipo aparentemente normal (Butler, 1990). Hay que tener presente que la determinación citogenética de la deleción 15q11-q13 no es fácil debido al tamaño de la deleción, 3-5 Mb dentro del límite de resolución microscópica, y a la naturaleza heteromorfa de la banda 15q11. Estos factores hacen que el diagnóstico citogenético de la deleción por sí solo no sea suficiente para diagnosticar el SPW/SA ya que puede resultar un falso positivo o un falso negativo, siendo necesarios estudios moleculares para confirmar la presencia o ausencia de la deleción citogenética (Hamabe *et al.*, 1991a).

### **1.6.2. Hibridación *in situ* fluorescente**

La utilización de la FISH con sondas cósmido y cromosomas artificiales de levaduras permitió definir la región crítica SPW/SA y ordenar los marcadores dentro de la región, siendo de centrómero a telómero: IR39, ML34, IR4-3R (D15S11), PW71, TD189-1 (D15S13), LS6-1, TD3-21 (D15S10), GABRB3, IR10-1 y CMW1 (Kuwano *et al.*, 1992).

El análisis mediante FISH de pacientes SPW y SA con deleción citogenética mostró que en la mayoría de los pacientes faltaban los marcadores entre ML34 y TD3-21, indicando que la deleción es relativamente homogénea. No obstante, se observó un paciente SA con deleción submicroscópica de los marcadores LS6-1 a GABRB3, delimitando la región crítica del SA a esta región (Hamabe *et al.*, 1991b; Kuwano *et al.*, 1992). Para el SPW, la región crítica se localizó entre IR39 y TD189-1 al observar en un paciente SPW con translocación 9;15 desequilibrada la ausencia de estos marcadores pero no de GABRB3 ni IR10-1 (Wagstaff *et al.*, 1991b).

El diagnóstico de la deleción mediante el análisis de FISH se realizó inicialmente con la sonda para el locus D15S11 en el estudio de pacientes SPW y la sonda GABRB3 en pacientes SA (Kuwano *et al.*, 1992). Posteriormente, se utilizaron sondas más específicas, la sonda de la región del gen SNRPN para el SPW (Oczelick *et al.*, 1992) y la sonda de la región D15S10 para el SA (Reis *et al.*, 1993).

### **1.6.3. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica**

El análisis molecular del ADN dio paso a una nueva etapa que permitió caracterizar el origen de las deleciones responsables del SPW/SA y resolver la heterogeneidad citogenética observada. Así, el análisis molecular de la región 15q proximal se inició tras aislar varios clones de una librería enriquecida con cromosomas inv dup(15) (Donlon *et al.*, 1986). Posteriormente se obtuvieron otros clones o marcadores de líneas celulares híbridas (Tasset *et al.*, 1988) y por microdissección de la región 15q11-q13 (Buiting *et al.*, 1990).

Caracterizar deleciones y duplicaciones responsables de SPW y SA, muchas de ellas no visibles al microscopio óptico, así como determinar el número de copias de los alelos, pudo llevarse a cabo con el estudio de RFLPs y el análisis densitométrico (Tantravahi *et al.*, 1989; Nicholls *et al.*, 1989b). Estos análisis empleaban sondas de ADN marcadas con <sup>32</sup>P en *Southern blot* cuantitativos y cualitativos. No obstante, el número de marcadores polimórficos informativos con el que se contaba era reducido. Cinco de los RFLPs más informativos, pIR10-1, pIR4-3R, p189-1, p34 y p3-21, se utilizaron en el estudio de dos familias SPW diagnosticadas con deleción citogenética y en dos individuos con retraso mental portadores de cromosomas inv dup(15). La segregación de los alelos detectó una deleción *de novo* de origen paterno en los dos pacientes SPW y de origen materno en los cromosomas inv dup(15) (Nicholls *et al.*, 1989b). Estos mismos RFLPs se utilizaron en el análisis de cuatro pacientes SA con deleción citogenética, observándose que la deleción era de origen materno (Knoll *et al.*, 1989b). De estos trabajos se sugirió que el estudio del ADN permitiría detectar no solamente el origen parental de las deleciones sino también el tamaño de las mismas.

El análisis de RFLPs puso de manifiesto que la mayoría de los pacientes SPW que no presentan delección tienen DUPmat o HBP (Robinson *et al.*, 1991), mientras que la mayoría de los pacientes SA sin delección presentan HBP, siendo pocos los pacientes con DUPpat (Knoll *et al.*, 1991; Malcolm *et al.*, 1991).

#### **1.6.4. Análisis de microsatélites**

Los microsatélites o STR (*Short Tandem Repeat*) son secuencias cortas de 1-6 pb repetidas en tandem que pueden variar en longitud (100-300 pb). Este polimorfismo permite diferenciar los alelos de cada uno de los cromosomas homólogos en función de su tamaño creando un patrón que es específico para cada individuo y hace posible trazar la transmisión de un cromosoma a los descendientes en función de los alelos heredados. La identificación de STR dentro de la región crítica del SPW/SA permitió caracterizar las DUP en el SPW y SA al observar si los dos cromosomas 15 que presenta un paciente proceden de un solo progenitor y determinar el origen parental de las delecciones con una mayor eficacia que los RFLPs (Mutirangura *et al.*, 1992; Mutirangura *et al.*, 1993a). Los STR presentan un polimorfismo superior al de los RFLPs ( $> 0.7$ ), por lo que representan un marcador ideal al ser multialélicos y basarse su análisis en la técnica de la PCR.

Los primeros microsatélites utilizados en el diagnóstico del SPW/SA fueron los CA-repeats D15S11, D15S113 y GABRB3, aislados de los YACs A156E1, A229A2 y B25E9. En la población general se observan de 6 a 11 alelos y tienen una heterocigosidad del 73-83%. Hoy día se dispone de una amplia batería de marcadores a lo largo del cromosoma 15.

#### **1.6.5. Análisis de expresión del gen SNRPN mediante RT-PCR**

El estudio de la expresión del gen SNRPN mediante RT-PCR es una prueba rápida para el diagnóstico molecular del SPW (Wevrick and Francke, 1996). Se basa en el hecho de que el gen SNRPN solo se expresa en el cromosoma paterno, por lo que no se expresará en pacientes con SPW. Aunque es una prueba sencilla y rápida, no es muy utilizada actualmente.

#### **1.6.6. Análisis de metilación**

Las técnicas descritas hasta ahora permiten diagnosticar la mayoría de pacientes SPW/SA con delección o DUP. En algunos casos con evidencias clínicas de SPW o SA los análisis de RFLPs y microsatélites resultaban no informativos o mostraban herencia biparental. Para caracterizar a estos pacientes, que luego pudo verse que eran pacientes con defecto de impronta, fue muy útil el desarrollo del análisis de metilación en islas CpG. Los genes con impronta se caracterizan por presentar islas CpG metiladas en uno de los alelos. Basados en esta diferencia de metilación dependiente del origen parental se desarrollaron los siguientes análisis de metilación:

a) *Southern blot*

El análisis de metilación se inició mediante *Southern blot* en base a la propiedad de las enzimas de restricción sensibles a metilación que no cortan secuencias que contienen uno o más sitios CpG metilados. Así, tras la digestión del ADN con estas enzimas se obtienen fragmentos de diferente tamaño en función de si el alelo está o no metilado, observándose un patrón de metilación diferencial (Driscoll *et al.*, 1992). Dentro de la región 15q11-q13 se han identificado varios sitios con metilación diferencial para enzimas de restricción sensibles a metilación (Tabla 1.6.1). Un individuo normal presenta dos bandas, una derivada del cromosoma materno metilado y otra de menor tamaño derivada del cromosoma paterno no metilado. En el estudio de pacientes SPW y SA con deleción o DUP se mostró que los pacientes SPW solo presentaban el alelo materno, mientras que los pacientes SA solo presentaban el alelo paterno. De modo que la alteración del patrón de metilación, detectado con este análisis, permitía confirmar el SPW o el SA aunque no daba información de la etiología (Glenn *et al.*, 1993b; Buiting *et al.*, 1994; Sutcliffe *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 1994).

**Tabla 1.6.1.** Regiones estudiadas con el análisis de metilación mediante *Southern blot* con un patrón de metilación diferencial.

Locus	Sonda	Enzimas	Fragmentos	Referencias
ZNF127 (D15S9)	ML34/DN34	HindIII+HpaII	6.0 kb (mat) 2.8 kb (pat)	Driscoll <i>et al.</i> 1992
D15S63	PW71B	HindIII+HpaII	6.4 kb (mat) 4.4 kb (pat)	Dittrich <i>et al.</i> 1992
SNRPN	hN4HS	HindIII+HpaII	6.0 kb (cont) 3.0 kb (mat)	Ozcelik <i>et al.</i> 1992
SNRPN intron 5	SmN exones 2-8	HindIII+HpaII	6.0 kb (cont) 3.0 kb (mat)	Glenn <i>et al.</i> 1993
SNRPN exon 1 (antes -1 o $\alpha$ )	KB17 (pX4.2)	XbaI + NotI	4.2 kb (mat) 0.9 kb (pat)	Sutcliffe <i>et al.</i> 1994
Entre PW71B y SNRPN	Y48.5	SacI + HpaII	2.5 kb (pat) 1.0 kb (mat)	Buiting <i>et al.</i> 1995
SNRPN exon 1 (antes -1 o $\alpha$ )	KB17 (0.6NE)	BglII + HpaII	2 kb (mat) 0.9 kb (pat)	Glenn <i>et al.</i> 1996
D15S63	PW71B	BglII + CfoI	8.0 kb (mat) 6.4 kb (pat)	Dittrich <i>et al.</i> 1996a

El primer sitio donde se encontró un patrón de metilación diferencial fue en el locus D15S9 (Driscoll *et al.*, 1992). Sin embargo, este locus no siempre se pierde en pacientes SPW con deleción, no recomendándose para el diagnóstico (Buiting *et al.*, 1992).

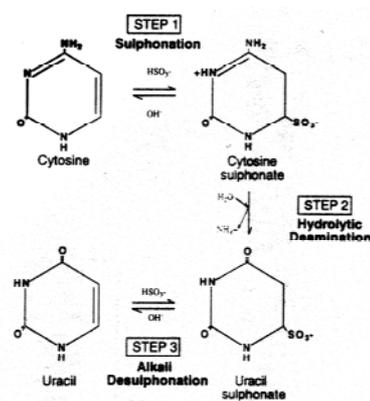
En el locus D15S63, localizado a 130 kb del gen SNRPN, se observó que presentaba un sitio de restricción HpaII y otro CfoI metilados en el cromosoma materno pero no metilados en el paterno (Dittrich *et al.*, 1992; Dittrich *et al.*, 1993; Dittrich *et al.*, 1996a). Esta metilación diferencial puede valorarse tras digerir ADN genómico con una de estas enzimas más un enzima que corta en sitios flanqueantes (HindIII o BglII) e hibridando con la sonda PW71B.

En el intrón 5 (ahora intrón 7) del gen SNRPN hay un sitio HpaII metilado siempre en el cromosoma paterno y no metilado en el 50% de los cromosomas maternos (Glenn *et al.*, 1993). Empleando un ADNc de los exones 2-8 del gen SNRPN como sonda puede diferenciarse los pacientes SA (ausencia de la banda de 3 kb) de los pacientes SPW y controles (presencia de la banda de 3 kb), pero no puede diferenciar entre estos dos últimos.

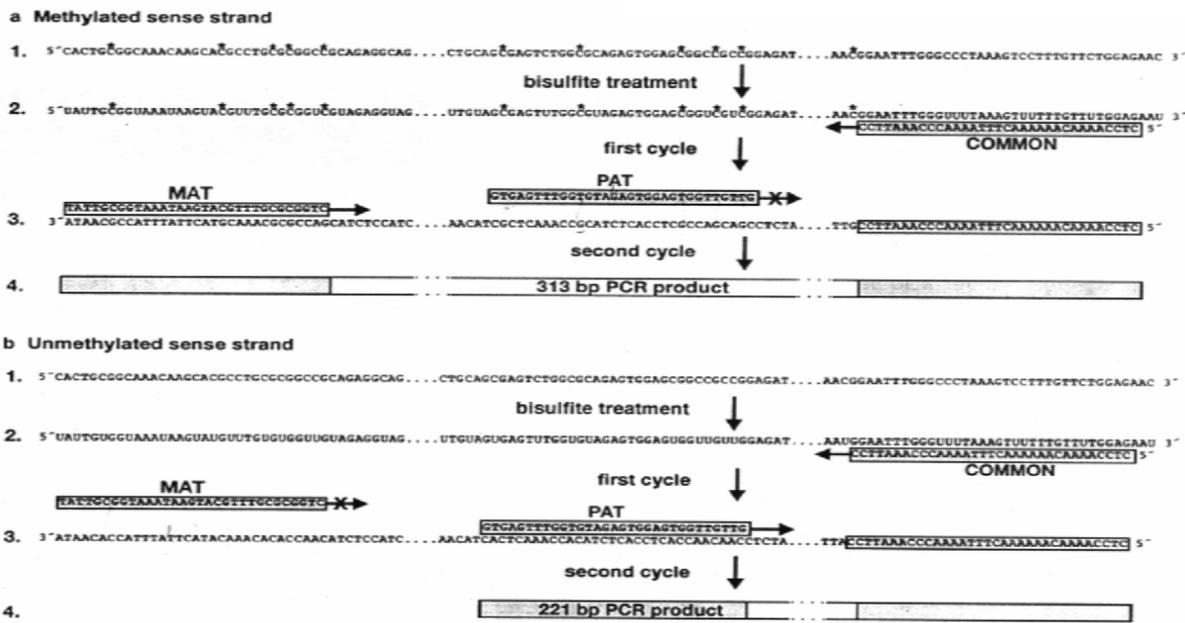
En la isla CpG del exón 1 del gen SNRPN (previamente llamado exón -1 o  $\alpha$ ) se identificó un sitio sensible a NotI con metilación diferencial, está metilado en el cromosoma materno y no metilado en el paterno (Sutcliffe *et al.*, 1994; Glenn *et al.*, 1996). El análisis de metilación de esta región con la sonda KB17 detecta un fragmento metilado de 4.2 kb de origen materno y un fragmento de 0.9 kb de origen paterno cuando se digiere junto con la enzima XbaI.

#### b) MS-PCR (*Methylation-specific PCR*)

En el año 1997 Zeschigk y colaboradores describen un nuevo análisis de metilación para el diagnóstico de pacientes SPW/SA mediante MS-PCR, que es el método más sensible para detectar el estado de metilación de todos los sitios CpG (Herman, 1996). Se basa en el tratamiento del ADN con bisulfito sódico y posterior amplificación mediante PCR con *primers* específicos diseñados para distinguir el ADN metilado del no metilado en el ADN modificado. El bisulfito sódico convierte en uracilo (U) las citosinas (C) no metiladas a través de una reacción de sulfonación, mientras que las C metiladas no son modificadas (Fig 1.6.1). Con este tratamiento las C metiladas se aparean con guaninas (G) mientras que las C no metiladas, ahora U, se aparean con adeninas (A). Diseñando *primers* específicos para estas nuevas secuencias se puede diferenciar el alelo materno metilado del alelo paterno no metilado alrededor del exón 1 del gen SNRPN (Fig. 1.6.2) (Zeschigk *et al.*, 1997). Otras secuencias del gen SNRPN también son estudiadas mediante MS-PCR (Kubota *et al.*, 1997; Kosaki *et al.*, 1997).



**Figura 1.6.1.** Esquema de la reacción del bisulfito



**Figura 1.6.2.** Esquema de la técnica de MS-PCR. a) cadena metilada (alelo materno) y b) cadena no metilada (alelo paterno). **1.** Secuencia 5'-3' del exón 1 del gen SNRPN antes del tratamiento con bisulfito, las citosinas metiladas están marcadas con un asterisco. **2.** La PCR se realiza empleando tres primers a la vez: MAT, específico para el alelo materno, PAT, específico para el alelo paterno, y COMMON, común para ambos alelos. En el primer ciclo COMMON se une a un sitio idéntico en ambas moléculas de ADN. **3.** Pero dirige la síntesis de dos cadenas diferentes por la no complementariedad "←X→". **4.** En el segundo ciclo MAT y PAT sintetizan un fragmento de 313 pb y 221 pb, respectivamente (Zeschnik *et al.*, 1997)

**1.6.7. Análisis de la región del centro de impronta**

Se sospechaba que en los pacientes con DI una secuencia entre D15S63 y SNRPN podría ser responsable de este defecto, por lo que se realizó la búsqueda de reorganizaciones estructurales y mutaciones dentro de esta región. Para ello se construyó un mapa de restricción con la enzima EcoRI y se analizó mediante *Southern blot* cuantitativo con una sucesión de fagos subclonados del YAC 457B4 (Buiting *et al.*, 1995). En este estudio se encontraron deleciones de 5.5 a 80 kb en familias SA y deleciones de 45 a 200 kb en familias SPW. Estas deleciones entre D15S63 y SNRPN afectaban a las secuencias SA-SRO y PW-SRO. En cada caso se realizó un análisis de los puntos de rotura de la deleción con diferentes combinaciones de enzimas mediante *Southern blot* o análisis de PCR. En los pacientes SA las deleciones afectaban a la secuencia SA-SRO situada 35 Kb centromérica del exón 1 del gen SNRPN, mientras que en pacientes SPW las deleciones afectaban a la secuencia PW-SRO que incluye al exón 1 (Saitoh *et al.*, 1996; Buiting *et al.*, 1998; Ohta *et al.*, 1999).

Aún así, en la mayor parte de pacientes SPW/SA con DI no se observaba la deleción de CI. Este grupo de pacientes fue estudiado mediante análisis de heteroduplex y secuenciación de los exones del CI (Buiting *et al.*, 1998). Sin embargo, no se observó ningún punto de mutación en los elementos CI conocidos. Estos pacientes, 13 SPW y 17 SA, eran casos esporádicos y

algunos tenían el mismo haplotipo que sus hermanos normales, por lo que el defecto de impronta podría ser epigenético y estar causado por fallo en el mantenimiento o en el establecimiento de la impronta en la línea germinal (Burger *et al.*, 1997; Buiting *et al.*, 1998).

La identificación de un polimorfismo de restricción para la enzima HpaII sensible a metilación y su isoesquizomero MspI no sensible a metilación en el intron 1 del gen SNRPN permitió determinar la procedencia del cromosoma con la impronta incorrecta en los abuelos (Saitoh *et al.*, 1997; Buiting *et al.*, 1998). Este polimorfismo está sujeto a una metilación específica de origen parental, de modo que HpaII solo puede determinar al alelo paterno, mientras que MspI puede ser usado para determinar ambos alelos. Esta característica permite, al digerir el ADN con la combinación de enzimas BglII+HpaII y BglII+MspI e hibridando con la sonda KB17, determinar el origen del cromosoma con una impronta incorrecta en el progenitor. Este análisis permite determinar que en los pacientes SPW, el cromosoma paterno con una impronta materna deriva siempre de la abuela paterna, mientras que en los pacientes SA, el cromosoma materno con la impronta paterna puede ser heredado en algunos casos del abuelo materno y en otros de la abuela materna. Recientemente se ha sugerido que la mayoría de los defectos de impronta son epimutaciones que ocurren espontáneamente en la ausencia de cambios en la secuencia de ADN (Buiting *et al.*, 2003).

### **1.7. Consejo genético**

El consejo genético aporta información a la familia del posible riesgo de tener un hijo afecto de SPW o SA en futuros embarazos valorando los antecedentes familiares. La recurrencia familiar en el SPW es rara, pero en el SA se han encontrado casos familiares estimándose que la incidencia pueda ser del 7% (Chan *et al.*, 1993; Saitoh *et al.*, 1994). Esta diferencia se explica porque el SA puede estar causado por un solo gen mientras que el SPW son varios genes (Ozcelik *et al.*, 1992).

#### Delección 15q11-q13

Aproximadamente un 70% de los individuos con SPW-SA presentan delección. En la mayoría ocurre de forma esporádica, considerándose la recurrencia de una delección 15q11-q13 extremadamente rara. Así, si en la familia hay un individuo afecto con delección, el riesgo teórico de tener otro hijo afecto es bajo, <1% (Hendrickson *et al.*, 1991). En el SA solamente se han descrito dos casos de recurrencia materna por delección, uno por delección entre D15S113 y GABRB3 en dos hermanos (Saitoh *et al.*, 1992) y otro por delección entre D15S524 y D15S12 debido a mosaicismo de la delección en la línea germinal materna (Kokkonen and Leisti, 2000). Otros casos de recurrencia en el SA han sido por reorganizaciones cromosómicas que producen la delección, como una translocación 6;15 en dos primos (Smeets *et al.*, 1992), una translocación críptica (Burke *et al.*, 1996) o una inversión (Webb *et al.*, 1993). El diagnóstico prenatal se puede realizar mediante FISH en biopsia corial o en líquido amniótico para descartar la delección en el feto.

#### Disomía uniparental

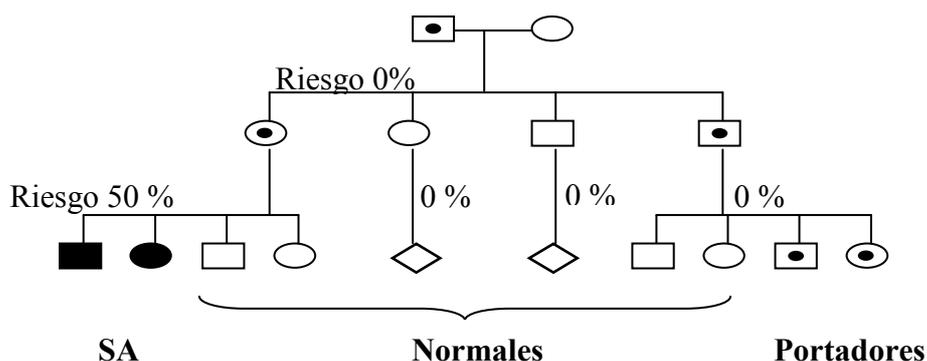
La DUP se presenta en el 20-25% de los pacientes con SPW y en < 5% en pacientes con SA. Si en la familia hay un individuo afecto con disomía uniparental, el riesgo de recurrencia es bajo, <1%. No se han encontrado familias con más de un hijo afecto.

El diagnóstico prenatal se realizará para investigar la DUP en los siguientes casos de riesgo: padres portadores de translocaciones Robertsonianas 15/15, detección de trisomía 15 o mosaicismo de trisomía 15 en vellosidades coriales, detección de translocaciones Robertsonianas 15 *de novo* o presencia de un cromosoma marcador extra (Ledbetter *et al.*, 1995). Se realizará el análisis de microsatélites con marcadores polimórficos en los padres. De este modo se investiga el origen de los cromosomas 15 del feto y se establece o descarta la DUP. También se puede realizar el análisis de metilación que excluye además la posibilidad de una delección o un DI.

#### Defecto de impronta

Si en la familia hay un individuo con DI por delección del CI el riesgo de recurrencia es del 50% si uno de los progenitores es portador de la delección. Este riesgo puede variar en caso de mosaicismo (<50%), y dependerá de la relación entre células mutadas y células normales. Si la mutación es *de novo*, no incrementa el riesgo de recurrencia (Saitoh *et al.*, 1996; Burguer *et al.*, 1997). En familias SPW la transmisión materna de la delección del CI no tiene riesgo en su

descendencia, serán portadores silenciosos de la mutación, pero los hijos de estas madres tendrán un riesgo del 50% en su descendencia. En las familias SA sucede lo mismo pero para la transmisión paterna (Fig. 1.7.1). En estas situaciones se ofrecerá un diagnóstico prenatal en líquido amniótico basado en la detección directa de la microdelección de CI (Saitoh *et al.*, 1996) o bien un análisis de metilación del exón 1 del gen SNRPN con la sonda KB17. No se recomienda el test con la sonda PW71 (locus D15S63) porque este locus está hipometilado en tejidos extraembrionarios (Dittrich *et al.*, 1993; Kubota *et al.*, 1996).



**Figura 1.7.1.** Riesgo de recurrencia del SA en familias con DI. La mutación ocurre en la línea germinal de la primera generación. El 50% de su descendencia será portadora de la mutación. Las hijas portadoras en la segunda generación tienen un riesgo del 50% de que su descendencia manifieste el SA

En familias sin deleción en el CI se espera que tengan un bajo riesgo de recurrencia, pero como se desconoce la causa, estas familias tienen un riesgo dentro del rango de 0%-50%. Se ha observado en familias SA, que la herencia de un cromosoma con impronta incorrecta desde la abuela materna representa un indicador de bajo riesgo de recurrencia, ya que en todos los casos de hermanos afectos estudiados fue el cromosoma del abuelo materno el que tenía la impronta incorrecta. Sin embargo, no puede excluirse completamente un riesgo de recurrencia al no conocerse la causa de la impronta incorrecta en estos pacientes SPW y SA. Un diagnóstico prenatal seguro en estas familias puede basarse solo en el análisis de metilación porque hermanos afectos y no afectos tendrán el mismo haplotipo (Buiting *et al.*, 1998).

### Mutación intragénica

Las mutaciones en el gen UBE3A responsables del SA pueden ser *de novo* (14-23%) o heredadas de la madre (75-83%) (Malzac *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999). Se considera una mutación autosómica dominante con expresión fenotípica dependiente de la impronta. Este modo de herencia conduce a un alto riesgo de recurrencia (50%) para madres portadoras.

En los casos esporádicos el riesgo de recurrencia, estimado empíricamente, es alto tanto para las madres con un hijo afecto como para otras mujeres de la familia con el mismo haplotipo en el cromosoma 15. Son casos *de novo* en los que no se puede excluir mosaicismo germinal. Establecer un riesgo de recurrencia adecuado en caso de mosaicismo resulta difícil, pero este se puede considerar alto (Moncla *et al.*, 1999).

### Anomalías cromosómicas

La incidencia de anomalías cromosómicas en el SPW es menor del 4% (Butler, 1990). En un estudio de 19 pacientes SPW con anomalías cromosómicas solamente uno fue heredado, sugiriendo que la mayoría son *de novo* durante la gametogénesis, por lo que el riesgo de recurrencia esperado es bajo (Rivera *et al.*, 1990).

En el SA la incidencia de anomalías cromosómicas estructurales es menor de 1-2% (Chan *et al.*, 1993). Sin embargo, la frecuencia de heredar una anomalía es mayor que la observada en el SPW (Stalker and Williams, 1998).

La alteración más frecuente es la translocación de 15q13-qter con el telómero de otros cromosomas autosómicos. Estas reorganizaciones pueden causar el SPW/SA por delección o DUP, resultado de una segregación meiótica anormal. En los casos donde se haya observado translocación *de novo* o heredada que afecte al cromosoma 15 o bien un cromosoma 15 marcador puede ser aconsejable realizar estudio de FISH y/o microsatélites por si estuviera asociado a delección o DUP. El riesgo estimado dependerá de la naturaleza de la translocación. El estudio de los padres es conveniente para asegurar que la alteración es *de novo*. No obstante siempre hay la posibilidad teórica de mosaicismo gonadal, siendo el riesgo de recurrencia para mosaicismo críptico en caso de delección menor del 0,5% (Gardner, 1996).

### Resultado genético normal

Un 10-12 % de los pacientes SA presenta un estudio molecular normal. En estos casos el diagnóstico es esencialmente clínico por lo que el riesgo de recurrencia presenta un amplio rango. Analizando el haplotipo de la región 15q11-q13 se puede establecer una forma familiar de SA si la madre presenta el mismo haplotipo que el hijo afecto y diferente de otros hijos. En esta situación no se puede excluir un riesgo del 50%. En las familias donde solo hay un hijo, no se puede analizar el haplotipo y se considera un riesgo teórico del 50%.

## 1.8. Objetivos

### Objetivo principal

Establecer un protocolo de diagnóstico citogenético y molecular en los pacientes con sospecha clínica de los síndromes de Prader-Willi y Angelman para confirmar la clínica del paciente y determinar la etiología.

### Objetivos concretos

- ❑ Puesta a punto de las técnicas de FISH para valorar la presencia de microdeleciones en 15q11-q13 mediante sondas específicas de secuencia única.
- ❑ Puesta a punto del análisis de microsatélites para determinar el origen parental de los alelos y confirmar el tipo de herencia mono o bialélica con marcadores polimórficos incluidos en la región 15q11-q13, desde D15S11 hasta GABRB3.
- ❑ Puesta a punto del análisis de metilación con detección quimioluminiscente mediante las sondas PW71B (locus D15S63) y KB17 (exón 1 del gen SNRPN) para determinar si el patrón de metilación es compatible con el síndrome de Prader-Willi o de Angelman.
- ❑ Proponer un algoritmo de diagnóstico de laboratorio.
- ❑ Establecer una correlación genotipo fenotipo.
- ❑ Ofrecer un consejo genético adecuado a los familiares.
- ❑ Desarrollar una base de datos clínicos y genéticos de los pacientes.



## **2. Material y métodos**



## 2.1 Sujetos de estudio

En el periodo comprendido entre 1992-2000 se han estudiado un total de 298 pacientes, 151 con sospecha de SPW y 147 con sospecha de SA, de edades comprendidas entre 2 meses y 33 años. Se han realizado ocho diagnósticos prenatales, seis para descartar el SPW y dos el SA. Los pacientes proceden de diferentes hospitales del territorio español: Hospital Sant Joan de Deu, Hospital Clínic, Hospital Vall D'Hebron, Hospital Germans Trias de Badalona, Hospital de Granollers, Hospital de Terrassa, Hospital de Figueras, Corporación Parc Tauli de Sabadell, Complejo Hospitalario Infanta Cristina de Badajoz, Hospital de Mendaró de Bilbao, Hospital Xeral de Vigo, Hospital Materno Infantil de Málaga, Hospital Virgen de las Nieves de Granada y Hospital Son Dureta de Mallorca.

Los médicos pediatras especialistas en neurología, neonatología y endocrinología, de cada uno de estos centros registraron las características clínicas en un protocolo que recoge los criterios de clasificación. Se enviaron 3-5 ml de sangre con heparina para el establecimiento de un cultivo celular y 10-15 ml de sangre con EDTA-K<sub>3</sub> de los pacientes y de los padres para la extracción de ADN. Algunos de estos pacientes han sido visitados posteriormente por la Unidad de Trastornos Cognitivos de Base Genética (CONGE) de la Corporación Sanitaria Parc Taulí.

### 2.1.1 Criterios de diagnóstico de los síndromes de Prader-Willi y Angelman

Para la valoración y diagnóstico del SPW se han empleado los criterios descritos por Holm *et al*, (1993) que proporcionan una medida cuantitativa de los síntomas. De los rasgos recogidos, ocho son considerados como criterios mayores y se puntúan con un punto, y once como criterios menores y se puntúan con medio punto. Debido a las diferencias existentes con la edad se han utilizado dos protocolos (0-36 meses y 3 años-adulto). Para menores de tres años, solo seis puntos son requeridos para el diagnóstico, de los cuales cuatro deben pertenecer a los criterios mayores. Para pacientes mayores de tres años, la puntuación debe de ser de ocho, de los cuales cinco o más deben pertenecer a los criterios mayores.

Para la valoración y diagnóstico del SA se han empleado los criterios descritos por Williams *et al*, (1995). Se han utilizado dos protocolos, uno corto en el que se recogen 14 criterios y uno ampliado con 27 criterios agrupados en función de su frecuencia relativa: consistentes, cuando están presentes en el 100% de los pacientes, frecuentes en más del 80% y asociados entre el 20-80%. A diferencia del SPW, no hay una puntuación para el diagnóstico, siendo la presencia de todos los criterios consistentes y frecuentes el requerido para el diagnóstico. En nuestra serie se asignará un punto a cada criterio y se considerará como valor de diagnóstico la presencia de la mitad más dos de los criterios.

Las características clínicas de cada paciente han sido recogidas en los protocolos clínicos siguientes:

**CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA EL SÍNDROME DE PRADER-WILLI**

Nombre:

Fecha de nacimiento:

Edad:

Fecha de exploración:

Dirección:

Teléfono:

Procedencia:

Dr.:

Hospital:

Teléfono:

Fax:

Impresión:

Síndrome de Prader-Willi ( )

Síndrome de Prader-Willi atípico ( )

Inseguro ( )

Puntuación:

0 – 36 meses ( )

Puntuación total: \_\_\_\_\_

Criterios mayores: \_\_\_\_\_

3 años – adulto ( )

Puntuación total: \_\_\_\_\_

Criterios mayores: \_\_\_\_\_

## Edad de 0 a 36 meses

### CRITERIOS MAYORES:

1. Hipotonía central neonatal e infantil, succión pobre, mejoría gradual con la edad.....	Si	No	Moderado
2. Problemas de alimentación que necesita técnicas alimentarias especiales.....	Si	No	Moderado
3. Poco aumento ponderal.....	Si	No	Moderado
4. Facies característica.....	Si	No	Moderado
- dolicocefalia			
- ojos almendrados			
- cara estrecha			
- boca pequeña			
- comisuras bucales hacia abajo			
5. Hipoplasia genital:			
Mujer: hipoplasia labios menores y/o clítoris .....	Si	No	Moderado
Hombre: criptorquidismo, hipoplasia del escroto, pene y testes pequeños (<P5).....	Si	No	Moderado
6. Retraso global del desarrollo.....	Si	No	Moderado
7. Excesivo o rápido aumento de peso en relación peso / talla después de los 12 meses.....	Si	No	Moderado
8. Alteración en 15q11-q13: deleción, disomía materna, u otra anomalía de la región Prader-Willi .....	Si	No	

### CRITERIOS MENORES:

1. Llanto débil < 6 meses.....	Si	No	Moderado
2. Movimientos fetales disminuidos.....	Si	No	Moderado
3. Hipopigmentación piel y cabello rubio comparado con la familia.....	Si	No	Moderado
4. Manos pequeñas (<25%) y/o pies pequeños (<10%) por la estatura.....	Si	No	Moderado
5. Manos estrechas y lado ulnar estrecho.....	Si	No	Moderado
6. Anomalías oculares (esotropía, miopía).....	Si	No	Moderado
7. Estudio neuromuscular normal.....	Si	No	Moderado

---

### PUNTUACIÓN:

Los criterios mayores del uno al ocho se puntúan con un punto cada uno. Anomalías en la región SPW/SA con dos puntos. Los criterios menores con ½ punto cada uno. Seis puntos son necesarios para el diagnóstico.

### 3 años - adulto

#### CRITERIOS MAYORES:

- |  |    |    |          |
|--|----|----|----------|
| 1. Hipotonía central neonatal e infantil, succión pobre, mejoría gradual con la edad.....  | Si | No | Moderado |
| 2. Historia de problemas de alimentación y poca ganancia de peso en la infancia.....   | Si | No | Moderado |
| 3. Obesidad de comienzo entre 1-6 años .....   | Si | No | Moderado |
| 4. Facies característica.....  | Si | No | Moderado |
| - diámetro bifrontal estrecho  |    |    |          |
| - labio superior delgado   |    |    |          |
| - comisuras bucales hacia abajo  |    |    |          |
| - ojos almendrados   |    |    |          |
| 5. Hipogonadismo:.....   | Si | No | Moderado |
| a) Hipoplasia genital:   |    |    |          |
| Mujer: hipoplasia labios menores y/o clítoris.   |    |    |          |
| Hombre: criptorquidismo, hipoplasia del escroto, pene y testes pequeños (<P5).   |    |    |          |
| b) Desarrollo puberal incompleto sin intervención después de los 16 años:  |    |    |          |
| Mujer: amenorrea/ oligomenorrea después de los 16 años.  |    |    |          |
| Hombre: pelo corporal y facial disminuido, falta de cambio de voz.   |    |    |          |
| 6. Retraso mental de medio a moderado o problemas de aprendizaje, o retraso en el desarrollo global en edades menores a seis años..... | Si | No | Moderado |
| 7. Hiperfagia/ obsesión por la comida.....   | Si | No | Moderado |
| 8. Alteración en 15q11-q13: deleción, disomía materna, u otra anomalía en la región Prader-Willi .....                                 | Si | No |          |

**CRITERIOS MENORES:**

1. Movimientos fetales disminuidos.....	Si	No	Moderado
2. Llanto débil < 6 meses.....	Si	No	Moderado
3. Alteraciones del sueño o apnea durante el sueño.....	Si	No	Moderado
4. Problemas de comportamiento característicos: trastornos de comportamiento, explosiones de violencia, comportamiento obsesivo compulsivo .....	Si	No	Moderado
5. Estatura baja a los 15 años .....	Si	No	Moderado
6. Hipopigmentación piel y cabello rubio comparado con la familia .....	Si	No	Moderado
7. Manos pequeñas (<25%) y/o pies (<10%) para la altura.....	Si	No	Moderado
8. Manos estrechas y lado ulnar estrecho.....	Si	No	Moderado
9. Anomalías oculares (esotropía, miopía).....	Si	No	Moderado
10. Saliva viscosa.....	Si	No	Moderado
11. Defectos de articulación.....	Si	No	Moderado
12. Rascarse la piel.....	Si	No	Moderado

**PUNTUACIÓN:**

Los ocho criterios mayores se puntúan con un punto cada uno. Los doce criterios menores con ½ punto cada uno. Un total de ocho puntos son necesarios para el diagnóstico, siendo cinco o más criterios mayores.

**Protocolo corto**

**CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA EL SÍNDROME DE ANGELMAN**

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Peso al nacimiento (g): \_\_\_\_\_ Longitud al nacimiento (cm): \_\_\_\_\_ Perímetro craneal (cm): \_\_\_\_\_

Termino del embarazo (37-42 semanas) (SI) o (NO) si es no, semanas del embarazo \_\_\_\_\_

Edad de aparición de los primeros síntomas (meses) \_\_\_\_\_

Primeros síntomas \_\_\_\_\_

Edad del diagnóstico (meses) \_\_\_\_\_

	SI	NO	
Retraso del lenguaje			¿Cuántas palabras usa? _____
Risa paroxismal			
Ataxia			
Movimiento con sacudidas			
Hiperreflexia			
Puede caminar			
Microcefalia (<3 centiles)			
Braquicefalia			
Protusion de la lengua			
Macrostomia			
Pronagtismo			
Convulsiones			¿a qué edad comienzan? _____
EEG anormal			
Hiperactividad			

Comentarios:

**Protocolo ampliado****CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA EL SÍNDROME DE ANGELMAN****A. Datos presentes en el 100%**

Retraso mental, severo	Si	No
Afectación del habla, ninguna palabra	Si	No
Capacidad receptiva y comunicación no verbal superior a la verbal	Si	No
Fenotipo conductual		
Risa	Si	No
Apariencia feliz	Si	No
Personalidad fácilmente excitable	Si	No
Movimiento de manos en aleteo	Si	No
Conducta hipermotorica	Si	No
Déficit de atención	Si	No

**B. Datos en más del 80%**

Microcefalia (a los 2 años) PC:		
Absoluta	Si	No
Relativa	Si	No
Convulsiones	Si	No
Edad de inicio		
EEG característico	Si	No

**C. Datos asociados (20-80%)**

Occipital plano	Si	No
Surco occipital	Si	No
Protusión de la lengua	Si	No
Problemas de alimentación	Si	No
Prognatia	Si	No
Boca amplia	Si	No
Babeo	Si	No
Excesiva masticación	Si	No
Estrabismo	Si	No
Hipopigmentación	Si	No
Hiperactividad de los reflejos tendinosos extremidades inferiores	Si	No
Brazos levantados y flexionados especialmente durante la ambulación	Si	No
Aumento de la sensibilidad al calor	Si	No
Transtornos del sueño	Si	No
Atracción / fascinación por el agua	Si	No

## 2.2. Material de laboratorio

### 2.2.1. Material fungible

Material de plástico	Material de vidrio
----------------------	--------------------

#### Análisis citogenético

Tubos cónicos de 10 mL  
Falcon 25 cm<sup>2</sup>  
Jeringas de 1 y 10 mL

Botellas de 100 mL  
Cubetas Coplin de 50 mL  
Pipetas Pasteur  
Portaobjetos

#### Hibridación *in situ* fluorescente

Puntas de pipeta  
Tubos eppendorf 1 mL

Cubetas de hibridación de 50 mL  
Cubreobjetos 15x15  
Portaobjetos  
Probetas de 50 mL

#### Extracción de ADN

Pipetas desechables de 3 mL  
Puntas de pipeta  
Tubos cónicos de 50 mL  
Tubos de 1,5 y 0.2 mL

#### Análisis de microsatélites

Puntas de pipeta  
Tubos de 1,5 y 0.2 mL

Erlenmeyer 500 mL  
Probetas de 100, 500 y 1000 mL  
Vasos precipitados de 100 y 500 mL

#### Análisis de metilación

Bolsas de hibridación  
Puntas de pipeta  
Tubos eppendorf 1 mL

Erlenmeyer de 500 mL  
Vaso precipitado de 100 mL  
Probetas de 100, 500 y 1000 mL  
Cristal de 20x20 cm

**2.2.2. Material inventariable**

Agitador magnético	Selecta Agimatic-E
Agitador orbital	Selecta Rotabit
Balanza de precisión	Cobos A-150-SX
Baño agitador	Selecta Unitronic 320 OR
Baño 0°-100°C	Precistern
Bomba de vacío	Heto SUE 300E
Cabina de flujo laminar	Telstar
Centrifuga	Eppendorf
Centrifuga refrigerada	Jouan MR 22i
Congelador -20°C	Liebher
Cubeta electroforesis horizontal	Ecogen
Cubeta electroforesis vertical	Appligene
Equipo fotográfico	Polaroid MP-4
Espectrofotómetro	Hitachi U-3000
Estufa CO <sub>2</sub>	Forma
Estufa 37°C	Selecta
Fuente de alimentación	Genenco EPG Pegaso 100
Fuente de alimentación	Pharmacia EPS 3500
Microscopio óptico	Olympus
Microscopio de fluorescencia	Olympus BX-50
pHmetro	Crison 2000
Pipetas automáticas 10, 40, 100µl	Labsystem
Secador geles	SCIE-PLAS GD4534
Termociclador	Perkin Elmer 9600
Termociclador	MJR PTC-100
Transiluminador UV	Ecogen TFX-20
Vortex	Heidolph reax 2000

**2.2.3. Productos**

<b>Análisis citogenético</b>			
Ácido acético	Merck	Heparina sódica	Rovi
Citrato trisódico	Merck	Metanol	Merck
Colcemid	Gibco	L-glutamina	Gibco
Colorante Wright	Sigma	Penicilina / estreptomicina	Gibco
CIK	Merck	Medio RPMI 1640	Gibco
Fitohemaglutinina	Gibco	Suero fetal de ternera	Gibco

<b>Hibridación <i>in situ</i> fluorescente</b>			
20x SSC	Oncor	Rubber cement	Unión Rubber
DAPI	Vysis	Sonda D15S10	Vysis
Etanol	Merck	Sonda D15S11	Oncor
Formamida	Boehringer Mannheim	Sonda GABRB3	Oncor
HCl	Merck	Sonda SNRPN	Vysis
10x PBD	Oncor	Kit detección indirecta	Oncor

<b>Extracción de ADN</b>			
Cloroformo	Merck	NaCl	Merck
EDTA-Na <sub>2</sub>	Fluka	Proteinasa K	Boehringer Mannheim
Etanol	Merck	SDS	Fluka
MgCl <sub>2</sub>	Merck	Tris-base	Boehringer Mannheim

<b>Análisis de microsatélites</b>			
Ácido acético	Merck	HNO <sub>3</sub>	Fluka
Acrilamida	Eurobio	Marcador 100pb	Gibco
Agarosa	Genaxis	Marcador pBR322/HaeIII	Sigma
AgNO <sub>3</sub>	Fluka	Metanol	Merck
Persulfato de amonio	Eurobio	MgCl <sub>2</sub>	Merck
Bromuro de etidio	Merck	NaCl	Merck
Cloroformo	Merck	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Fluka
<b>Primers:</b>		Nucleótidos (dNTP)	Bioline
D15S11	Research Genetics	PDA	Biorad
D15S113	Research Genetics	Película Polaroid	Polaroid 667

D15S123	Research Genetics	Proteinasa K	Roche
D15S125	Research Genetics	Repel-Silene ES	Pharmacia Biotech
D15S128	Research Genetics	SDS	Fluka
D15S210	Research Genetics	Sol. transportadora	Sigma
D15S97	Research Genetics	Taq polimerasa	Ecogen
GABRB3	Research Genetics	10x TBE	Applichem
EDTA-Na <sub>2</sub>	Fluka	TEMED	Serva
Etanol	Merck	Tris-base	Boehringer Mannheim
Formaldehído	Panreac		

### Análisis de metilación

20x SSC	Oncor	Fijador B/W	AGFA
Ácido bórico	Boehringer Mannheim	HCl	Merck
Acetato sódico	Merck	DIG DNA labeling Kit	Boehringer Mannheim
Ácido maleico	Fluka	DIG Nucleic Acid Detection Kit	Boehringer Mannheim
Agarosa	Ecogen	Marcador $\lambda$ /EcoRI+HindIII	Promega
Anti-Digoxigenin-AP	Boehringer Mannheim	Membrana Nylon +	Boehringer Mannheim
Blocking reagent	Boehringer Mannheim	MgCl <sub>2</sub>	Ecogen
Bromuro de etidio	Merck	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
CDP-Star	Boehringer Mannheim	NBT	Boehringer Mannheim
CSPD	Boehringer Mannheim	NaCl	Merck
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Merck	NaOH	Panreac
Minipreps kit	Qiagen	Papel 3MM	Whatman
BglII	Promega	Película Hiperfilm-MP	Amersham
CfoI	Promega	Revelador B/W	AGFA
HindIII	Promega	SDS	Fluka
HpaII	Promega	10x TBE	Applichem
XbaI	Promega	Tris-HCl	Boehringer Mannheim
NotI	Promega	Tris-base	Boehringer Mannheim
Etanol	Merck	TURBO BLOTTER™	Scheicher&Schuell
EDTA-Na <sub>2</sub>	Fluka	Tween 20	Fluka

**2.2.4. Soluciones****Análisis citogenético****2x SSC**

CINa	17,53 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> -2H <sub>2</sub> O	8,82 g
H <sub>2</sub> O estéril	1 L

**Colorante Wright**

Colorante en polvo	1,3 g
Metanol	500 mL

Disolver en agitador magnético durante 60-120 minutos. Filtrar en un filtro 0.25  $\mu$ . Dejar en estufa a 37°C una semana.

**Hipotónico (CIK 0,75 M)**

CIK	5,5 g
H <sub>2</sub> O estéril	1 L

**Fijador Carnoy**

Metanol	300 mL
Ácido acético	100 mL

**Medio de cultivo**

Suero fetal de ternera	2 mL
Fitoheماغلوتينina	0.5 mL
L-Glutamina	0.1 mL
Penicilina / estreptomycin	0.1 mL
RPMI 1640	8 mL

**Tampón Sörensen**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,53 g
Na <sub>2</sub> PHO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	5,93 g
H <sub>2</sub> O estéril	1 L

**Hibridación *in situ* fluorescente****Solución desnaturalizante (pH 7):**

Formamida	28 mL
20x SSC	4 mL
H <sub>2</sub> O-tridestilada	8 mL

**Solución post-hibridación (0.4x SSC):**

20x SSC	800 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O-tridestilada	40 mL

**Solución 1x PBD:**

10x PBD	50 mL
H <sub>2</sub> O-tridestilada	450 mL

<b>Extracción de ADN</b>
--------------------------

**Tris 2M:**

Tris	24.2 g
H <sub>2</sub> O hasta	100 mL

**MgCl<sub>2</sub> 1M:**

MgCl <sub>2</sub>	9.5 g
H <sub>2</sub> O hasta	100 mL

**Solución lisis eritrocitos:**

Tris 2M	5 mL
MgCl <sub>2</sub> 1M	2.5 mL
H <sub>2</sub> O hasta	500 mL

Preparar en el momento de utilizarse.

**Tampón lisis leucocitos (pH= 8.2):**

CINa 5M	40 mL
EDTA-Na <sub>2</sub> 0.25M, pH= 8.0	4 mL
Tris 2M, pH= 7.5	2.5 mL
H <sub>2</sub> O hasta	500 mL

**Solución de proteinasa K (1.8 mg/mL):**

Proteinasa K	100 mg
SDS 10%	5 mL
EDTA-Na <sub>2</sub> 0.25M	400 µL
H <sub>2</sub> O hasta	50 mL

Alicuotar y guardar a -20°C

**Solución de lisis de leucocitos:**

Tampón de lisis de leucocitos	3 mL
SDS 10%	0.2 mL
Solución de proteinasa K	0.5 mL

**Tampón TBE (Tris-EDTA-borato):**Solución Stock 10x:

Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0.5M, pH=8	40 mL
H <sub>2</sub> O hasta	1000 mL

Solución de trabajo 1x:

Diluir 10 veces la solución stock con H<sub>2</sub>O

<b>Análisis de microsatélites</b>
-----------------------------------

**Tampón TBE (Tris-EDTA-borato):**Solución Stock 10x:

Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0.5M, pH=8	40 mL
H <sub>2</sub> O hasta	1000 mL

Solución de trabajo 1x:

Diluir 10 veces la solución stock con H<sub>2</sub>O.

**Solución transportadora para geles de Agarosa al 10x:**

Azul de bromofenol 0.25%	0.0625	g
Ficoll 400 25%	6.25	g
EDTA-Na <sub>2</sub> 0.1M	25	mL

Conservar en nevera a 4°C.

**Bromuro de Etidio (BrEt 10 mg/mL):**

BrEt	250	mg
H <sub>2</sub> O hasta	25	mL

Mezclar con agitador magnético varias horas hasta que el colorante se haya disuelto. Guardar en botella oscura o con papel de aluminio para protegerlo de la luz. Conservar a 4°C. El BrEt es un agente mutagénico y moderadamente tóxico. Emplear guantes y mascarilla para prepararlo y utilizarlo.

**0.28M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.5 mL Formaldehido 37%/1L**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.28M	17,8	g
Formaldehido 37%	300	µL
H <sub>2</sub> O hasta	600	mL

**Persulfato de amónico (APS) al 10%:**

APS	0.1	g
H <sub>2</sub> O	1	mL

Conservar en nevera a 4°C, máximo una semana.

**Solución de acrilamida al 8%**

Acrilamida	12	mL
TBE 10x	6	mL
H <sub>2</sub> O	42	mL
APS 10%	450	µL
TEMED	45	µL

**Análisis de metilación**

**Kit de Qiagen (minipreps)**

Solución 1  
Solución de lisis  
Solución de neutralización  
Solución QTB  
Solución de lavado  
Solución de elución

**Solución desnaturizante Southern:**

NaCl 1M	58.5	g
NaOH 0.1M	3.9	g
H <sub>2</sub> O hasta	1000	mL

**Solución neutralización Southern (pH= 8):**

Tris-HCl 1M	121.14	g
NaCl 1.5M	87.75	g
H <sub>2</sub> O hasta	1000	mL

**20x SSC:**

NaCl 3M	175	g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> -2 H <sub>2</sub> O 0.3M	88	g
H <sub>2</sub> O hasta	1000	mL

**NaCl 5M:**

NaCl	29.25	g
H <sub>2</sub> O hasta	100	mL

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2M:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21.29	g
H <sub>2</sub> O hasta	75	mL

Cristaliza y cuesta disolver. Calentar.

**EDTA-Na<sub>2</sub> 0.5M:**

EDTA	18.6	g
H <sub>2</sub> O hasta	100	mL

**Tampón lavado hibridación:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20mM	2.83	g
EDTA-Na <sub>2</sub> 0.5M	2	mL
SDS 1%	10	g
H <sub>2</sub> O hasta	1000	mL

**Tampón 1 detección CDP-Star pH= 8:**

Ácido maleico 0.1M	11.6	g
NaCl 3M	175	g
Tween 20, 0.3%	3	mL
H <sub>2</sub> O hasta	1000	mL

Solución turbia al principio, se aclara a pH>5.6. Poner el Tween 20 a pH>7, bajará el pH. Una vez alcanzado el pH de 6.5, este sube rápidamente al añadir NaOH.

**Tampón 2 detección CDP-Star:**

Tampón 1 detección CDP-Star	15	mL
Blocking reagent	0.5	g

**Tampón 3 detección CDP-Star pH= 9.5:**

Tris 0.1M	6	g
NaCl 0.1M	2.9	g
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O 50mM	5	g
H <sub>2</sub> O hasta	500	mL

**Tampón 1 detección NBT pH= 7.5:**

Ácido maleico 0.1M	11.6	g
NaCl 0.15M	8.7	g

**Tampón 2 detección NBT:**

Tampón 1 detección NBT	100	mL
Blocking reagent	1	g

**Solución conjugada NBT**

Tampón 2 detección NBT	20	mL
Anti-DIG-AP	4	µL

Material y métodos

**Tampón 3 detección NBT pH= 9.5:**

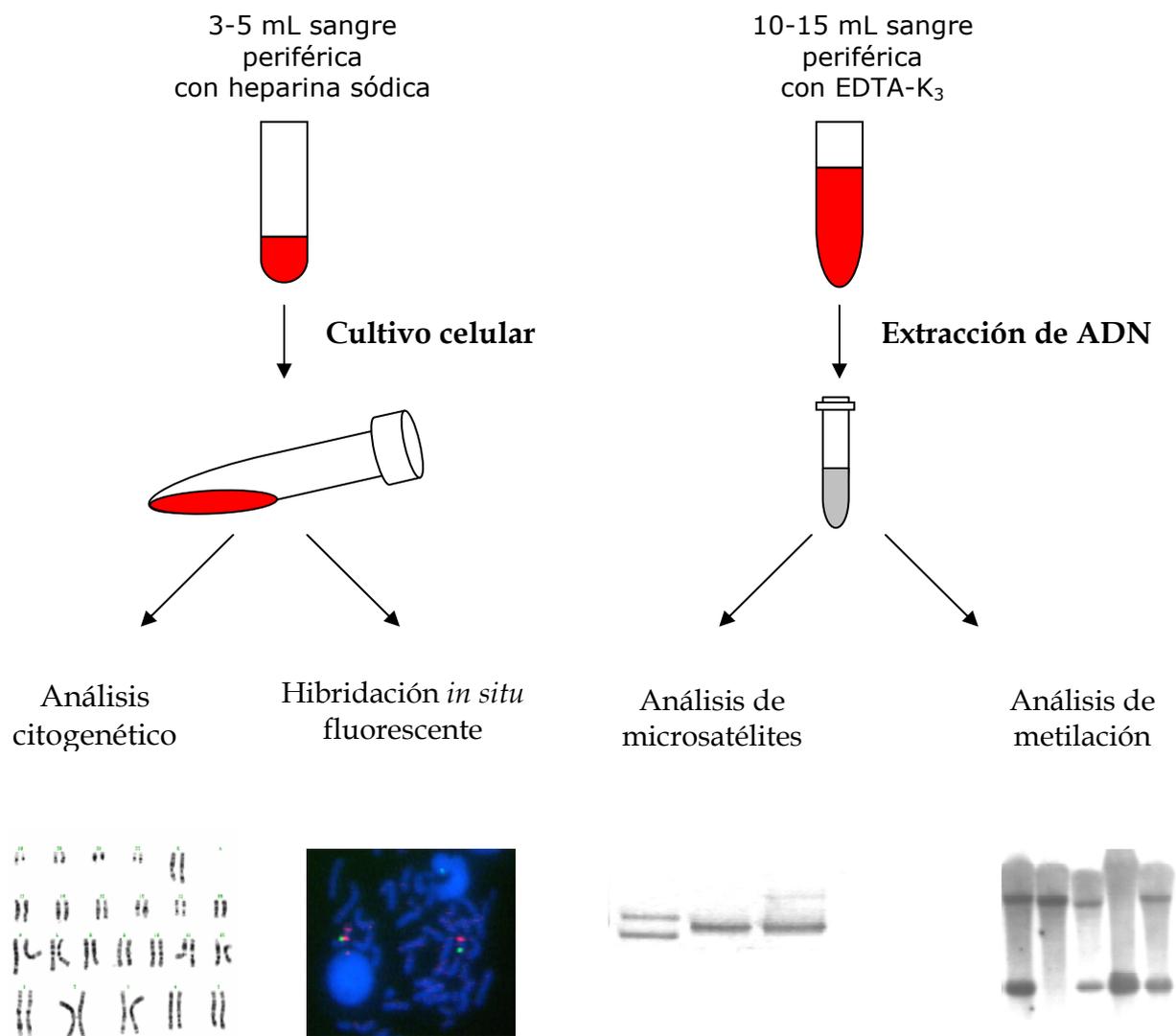
Tris 0.1M	6	g
NaCl 0.1M	2.9	g
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O 50mM	5	g
H <sub>2</sub> O hasta	500	mL

**Solución colorante NBT:**

Tampón 3	10	mL
NBT	200	μL

## 2.3. Metodología

A los pacientes se les extrajo 3-5 mL de sangre periférica con heparina sódica para el análisis citogenético y 10-15 mL de sangre periférica con EDTA-K<sub>3</sub> para el estudio molecular (Fig. 2.3.1).



**Figura 2.3.1.** Técnicas utilizadas

### 2.3.1. Análisis citogenético

Realizamos el estudio de cromosomas metafásicos con bandas G para detectar posibles alteraciones cromosómicas (Fig. 2.3.1).

#### Cultivo celular

1. Añadir 1 mL de sangre con heparina en 11 mL de medio de cultivo. Incubar 72 horas en una estufa a 37°C. Agitar diariamente el cultivo.

### Extracción del cultivo

1. Añadir 0.1 mL del antimetabólico colcemid (10  $\mu$ L/mg) dos horas antes de extraer el cultivo.
2. Pasar el cultivo a un tubo cónico y centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón celular en 10 mL de solución hipotónica (KCl 0.075 M). Añadir los primeros 2-3 mL gota a gota y en agitación, el resto hasta 10 mL añadirlo más rápidamente y en agitación.
4. Poner el tubo en baño maría a 37°C durante 30 minutos.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm. Eliminar sobrenadante.

### Fijación

1. Resuspender el botón celular con el fijador Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) recién preparado añadiendo los primeros 2 mL gota a gota por las paredes del tubo y en agitación. Luego añadir 6 mL más.
2. Centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
3. Repetir los pasos 1 y 2 dos veces más para eliminar restos citoplasmáticos.
4. Resuspender el botón celular en 0.5-2 mL de fijador para hacer las extensiones.

### Extensiones metafásicas

1. Sobre portaobjetos desengrasados en metanol dejar caer 1-2 gotas de la suspensión celular desde una altura de 20 centímetros. Dejar secar al aire.
2. Observar al microscopio de contraste de fases el aspecto de las extensiones. Los cromosomas deberán presentar un aspecto oscuro, si es brillante quiere decir que se han secado demasiado lento. Usar una placa caliente a 50°C para acelerar el paso de secado.
3. Lavar la preparación durante 2 minutos en fijador y dejar secar al aire.
4. Proceder con la tinción de bandas G o guardar la preparación a -20°C.

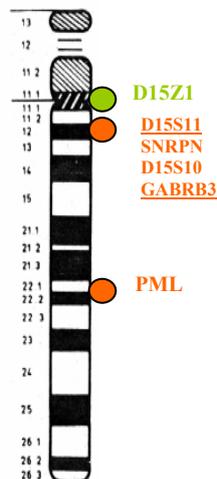
### Bandas G

1. Incubar las preparaciones en 2x SSC a 65°C durante 3-5 minutos.
2. Lavar con agua corriente y secar.
3. Teñir con colorante Wright en tampón Sørensen a una proporción 3:1 durante 2-4 minutos.
4. Lavar bien en agua corriente y dejar secar.

Para obtener una buena calidad de bandas es muy importante el tiempo de tinción. Si los cromosomas aparecen demasiado teñidos se pueden desteñir en metanol. Analizar al microscopio óptico unas 20 metafases.

### 2.3.2. Hibridación *in situ* fluorescente

Para valorar la presencia o ausencia de delección en 15q11-q13 se han utilizado sondas comercializadas D15S11 y SNRPN dentro de la región crítica del SPW y las sondas D15S10 y GABRB3 dentro la región crítica del SA.



Las sondas D15S11 y GABRB3 de Oncor<sup>®</sup>, son de marcaje indirecto con digoxigenina y presentan una sonda control en la región distal 15q22 (PML) (Fig. 2.3.2).

Las sondas D15S10 y SNRPN de Vysis, son de marcaje directo. Incluyen dos sondas control, una centromérica para 15p11.2 (D15Z1) y otra distal para 15q22 (PML), que permite observar si ha habido alguna reorganización, como una translocación, que afecte a estas regiones.

Figura 2.3.2. Localización de las sondas en el cromosoma 15

#### 2.3.2.1. Protocolo de hibridación para sondas ONCOR

1. Desnaturalizar la preparación con la solución desnaturalizante durante 2 minutos a 70°C. Más tiempo puede degradar el ADN.
2. Deshidratar la preparación en baños secuenciales de etanol frío al 70%, 80% y 96% durante 1 minuto en cada uno de ellos y secar a temperatura ambiente (TA).
3. Preparar la sonda: descongelar la sonda a 37°C unos 5 minutos, agitar en vortex y centrifugar.
4. Poner 10 µL de sonda sobre el cubreobjetos de 25x25 mm y colocar el portaobjetos sobre el cubreobjetos.
5. Sellar con cola líquida.
6. Incubar en la estufa a 37°C mínimo 12 horas en cámara húmeda.

#### Lavado post-hibridación:

7. Retirar la cola y el cubreobjetos con unas pinzas.
8. Lavar 5 minutos con 2x SSC en un baño a 72°C.
9. Lavar 15 minutos con 1x PBD a TA.

#### Detección:

10. Dispensar 8 µL de *Rhodamine-labeled anti-digoxigenin* sobre un cubreobjetos de plástico y colocar el portaobjetos.
11. Incubar 15 minutos a 37°C en cámara húmeda.
12. Lavar 2 veces con 1x PBD a TA y en agitación durante 4 minutos.

Amplificación:

13. Poner 8  $\mu\text{L}$  de *Rabbit Anti-Sheep Antibody I* sobre el portaobjetos.
14. Colocar un cubreobjetos de plástico sobre el portaobjetos e incubar 15 minutos a 37°C en cámara húmeda.
15. Lavar 2 veces con 1x PBD a TA y en agitación durante 4 minutos.
16. Poner 8  $\mu\text{L}$  de *Rhodamine Anti-Rabbit Antibody II* y cubrir con un cubreobjetos.
17. Incubar 15 minutos a 37°C en cámara húmeda.
18. Lavar dos veces con 1x PBD a TA y en agitación durante 4 minutos.
19. Secar a TA.
20. Poner 5 $\mu\text{L}$  de DAPI en un cubreobjetos de vidrio de 15x15 mm.
21. Colocar el portaobjetos sobre el cubreobjetos y sellar con esmalte de uñas. Guardar a -20°C o bien observar al microscopio de fluorescencia con los objetivos de inmersión de 60x y 100x. Emplear filtro para Texas Red o spectrumOrange y DAPI.

**2.3.2.2. Protocolo de hibridación para sondas Vysis**

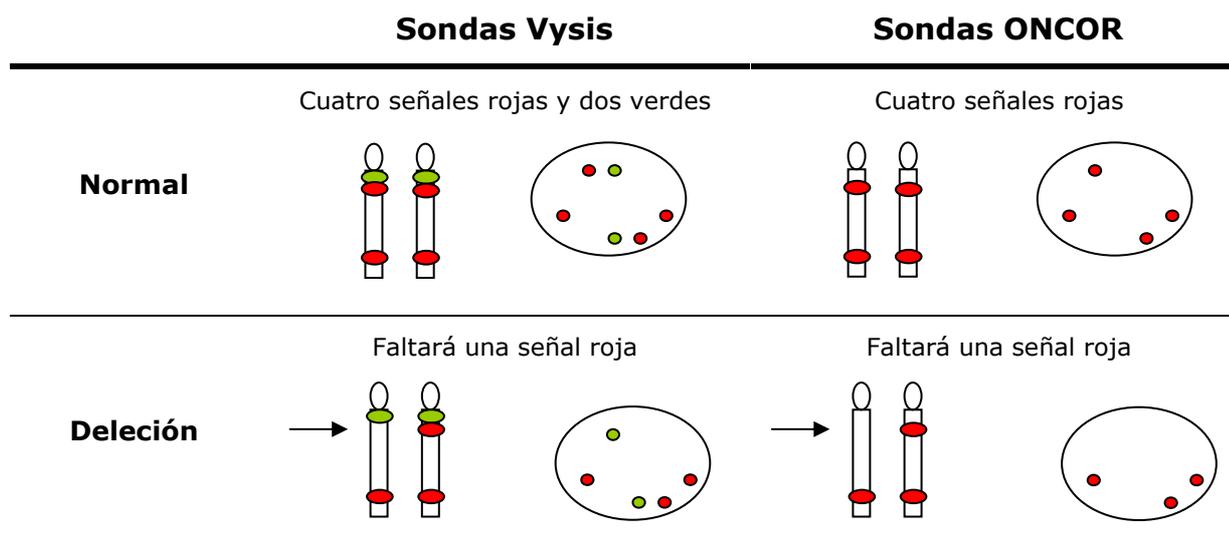
1. Desnaturalizar la preparación con la solución desnaturalizante durante 5 minutos a 73°C. Más tiempo puede degradar el ADN.
2. Deshidratar en baños secuenciales de etanol frío al 70%, 80% y 96% durante 1 minuto en cada uno de ellos.
3. Secar a TA.
4. Preparar la sonda: descongelar la sonda a 37°C unos 15 minutos, agitar en vortex y centrifugar. Preparar la solución de hibridación poniendo en un eppendorf:

Tampón de hibridación	3.5 $\mu\text{L}$
Sonda	0.5 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O-tridestilada	1 $\mu\text{L}$
5. Desnaturalizar la solución de hibridación durante 5 minutos en un baño a 73°C.
6. Poner 5  $\mu\text{L}$  de solución de hibridación sobre el cubreobjetos de 15x15mm.
7. Colocar el portaobjetos sobre el cubreobjetos.
8. Sellar con cola.
9. Incubar en estufa a 37°C mínimo 12 horas en cámara húmeda.
10. Retirar la cola líquida y el cubreobjetos con unas pinzas.
11. Eliminar el exceso de sonda con la solución de lavado post-hibridación durante 2 minutos en un baño a 73°C.
12. Lavar con tampón 1x PBD durante 1 minuto a TA.
13. Dejar secar a TA.
14. Añadir 5  $\mu\text{L}$  de DAPI, descongelado previamente a 37°C, sobre un cubreobjetos 15x15mm.
15. Colocar el portaobjetos sobre el cubreobjetos.
16. Sellar con esmalte de uñas.

17. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  o bien observar al microscopio de fluorescencia con los objetivos de inmersión de 60x y 100x. Emplear filtros spectrumOrange, spectrumGreen y DAPI.

### 2.3.2.3. Interpretación de los resultados

Tras realizar la hibridación se observan al microscopio de fluorescencia las preparaciones y se cuentan unas 50 metafases para determinar si está o no presente la deleción. La forma de interpretar las señales observadas al microscopio es la siguiente:



### 2.3.3. Extracción de ADN

Obtención de 10-15 mL de sangre periférica con EDTA-K<sub>3</sub>.

#### Lavado de la sangre:

1. Verter la sangre en un tubo de 50 mL.
2. Añadir suero fisiológico hasta 50 mL y agitar.
3. Centrifugar 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 2500 rpm (Jouan MR22i).
4. Aspirar sobrenadante.

#### Lisis de eritrocitos:

5. Añadir H<sub>2</sub>O destilada estéril hasta 50 mL.
6. Incubar 30 minutos en hielo.
7. Centrifugar 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 3000 rpm.
8. Aspirar sobrenadante (podemos congelar y guardar el botón).
9. Lavar con H<sub>2</sub>O destilada estéril.
10. Incubar 30 minutos en hielo.
11. Centrifugar 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 3000 rpm.
12. Aspirar sobrenadante.

## Material y métodos

### Lisis de leucocitos:

#### 13. Añadir:

Solución de proteinasa K	1 mL
SDS al 10%	400 µL
Solución de lisis de leucocitos	6 mL

14. Incubar a 37°C toda la noche en baño de agitación a 64 rpm.

### Precipitar proteínas:

15. Añadir 2 mL de NaCl 5.5 M (mezclar en vortex).

16. Centrifugar 15 minutos a 4°C a 3400 rpm.

17. Recuperar sobrenadante y poner en tubo nuevo.

18. Centrifugar 15 minutos a 4°C a 3400 rpm.

### Precipitar ADN:

19. Recuperar sobrenadante y añadir cloroformo 1:1.

20. Centrifugar 15 minutos a 4°C a 3000 rpm.

21. Recuperar sobrenadante y añadir 2 volúmenes de etanol frío, veremos el ADN.

22. Coger ADN con pipeta Pasteur en ganzúa y lavarlo con etanol 70%.

23. Resuspender el ADN en 500 µl de TE ó H<sub>2</sub>O destilada.

24. Incubar 2 horas en estufa a 37°C.

25. Agitar toda la noche en agitador orbital a 1300 rpm.

### Medir concentración de ADN en el espectrofotómetro:

Emplear programa Photometry. Calibrar el espectrofotómetro con un tubo blanco con 500 µL de H<sub>2</sub>O. Para medir la concentración de ADN en la muestra poner 30 µL de la solución de ADN en 570 µL de H<sub>2</sub>O (1/20). Leer la D.O a 260 nm para el ADN. Anotar absorvancia y concentración (µg/mL). Leer la D.O a 280 nm para las proteínas.

La concentración de ADN expresada en µg/mL la obtendremos multiplicando la DO a 260 nm por 1000. La pureza corresponde a la relación entre DO a 260 nm/280 nm. Se aconseja una pureza superior a 1.6 e inferior a 2.0.

$$[\text{ADN}] = \text{DO } 260 \times 1000$$

$$\text{Pureza} = \text{DO } 260 / \text{DO } 280$$

### **2.3.4. Análisis de microsatélites**

Se han empleado siete microsatélites de la región 15q11-q13 correspondientes a los loci D15S11, D15S128, D15S210, D15S122, D15S113, GABRB3 y D15S97, de centrómero a telómero. Estos marcadores son repeticiones de CA y GT. Han sido escogidos por su informatividad y posición dentro de la región crítica de SPW/SA. Un parámetro útil para esta selección es la heterocigosidad, que hace referencia a la proporción de heterocigotos en la población. Las características de estos microsatélites, secuencia de los cebadores, tamaño en pb, número de alelos y heterocigosidad, se recogen en la Tabla 2.3.1.

**Tabla 2.3.1.** Características de los microsatélites empleados

Secuencia de los cebadores		Tamaño (pb)	Alelos	Het.
	Forward	Reverse		
D15S11	5'GCTCTCTAAGATCACTGGATAGG3'	5'GACATGAACAGAGGTTAAATTGGTGG3'	243-263	10 74
D15S128	5'GCTGTGTGTAAGTGTGTTTATATC3'	5'GCAAGCCAGTGGAGAG3'	193-209	7 77
D15210	5'TGAACTAGGCAGCACACT3'	5'AACCAATGCTTGGACACAG3'	124-146	9 68
D15S122	5'GATAATCATGCCCCCA3'	5'CCCAGTATCTGGCACGTAG3'	143-159	9 77
D15S113	5'CATGACTGTTTTATCCCTGTGGC3'	5'CTGCTGCTTATACTCTTTCTCATT3'	130-140	6 73
D15S97	5'CTTCTAGCCTCAGGTTCCC3'	5'ATTCACCTTTCAAACCACCCC3'	168-186	10 90
GABRB3	5'CTCTTGTTCCTGTTGCTTATA CAC3'	5'CACTGTGCTAGTAGATTGAGCTC3'	180-201	11 83

Las condiciones de amplificación de estos microsatélites se han puesto a punto en nuestro laboratorio tomando como punto de partida las descritas por los diferentes autores D15S11, GABRB3, D15S113 y D15S97 (Mutirangura *et al.*, 1993b; Beckmann *et al.*, 1993), D15S128, D15S210 y D15S122 (Gyapay *et al.*, 1994) y D15S113 (Trent *et al.*, 1995).

### 2.3.4.1. Condiciones de amplificación

#### 1. Preparar una mezcla de reacción de PCR :

Tampón	1.5 $\mu$ L	1x
dNTP	1 $\mu$ L	2 mM
Mg <sup>2+</sup>	0.3 $\mu$ L	1.5 mM
Primer F	0.75 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
Primer R	0.75 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
	4.3 $\mu$ l	

#### 2. Preparar la solución de Taq polimerasa: 0.1 $\mu$ L de Taq polimerasa (0.5u) en 3.6 $\mu$ L H<sub>2</sub>O

#### 3. Poner en cada eppendorf:

Mezcla de reacción de PCR	4.3 $\mu$ L	
ADN	7 $\mu$ L	10 ng/ $\mu$ L
Solución Taq polimerasa	3.7 $\mu$ L	

#### 4. Iniciar el programa 1 o 2 del termociclador según las condiciones especificadas en la tabla 2.3.2.

**Tabla 2.3.2.** Programas de amplificación

Programa	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	Desnaturalización	94° C
		Desnaturalización	94° C
	29	Apareamiento	58° C
		Extensión	72° C
	1	Extensión final	72° C
			4 min.
			1 min.
			1 min. 30 seg.
			1 min.
			10 min.

	1	Desnaturalización	94° C	4 min.
	1	Desnaturalización	94°C	10 seg.
		Apareamiento	61°C	30 seg.
<b>2</b>		Ciclos descendentes en 1 °C hasta 51 °C		
		↓		
	20	Desnaturalización	94°C	10 seg.
		Apareamiento	51°C	30 seg.
	1	Extensión final	72°C	7 min.

5. Comprobación de la amplificación en gel de agarosa para evaluar la especificidad de la PCR.

- Preparar un gel al 2% con 0.8 g de agarosa y 40 mL de 1x TBE.
- Calentar la mezcla en el microondas unos 2 minutos hasta que empiece a hervir. La mezcla debe quedar transparente sin grumos de la agarosa.
- Dejar enfriar unos 10 minutos y añadir el BrEt en una relación de 0.5 µL por cada 10 mL de TBE.
- Verter la agarosa sobre el molde para el gel, poner el peine y esperar a que solidifique.
- Cargar en los pocillos del gel 5 µL con:

Producto de PCR	3 µL
Solución transportadora 10x	1 µL
H <sub>2</sub> O	1 µL

- Cargar marcador de peso molecular para determinar el tamaño de los fragmentos.
- Conectar la fuente de alimentación a 100V durante 1 hora.
- Al finalizar la electroforesis observar los fragmentos amplificados al transiluminador.
- Fotografiar.

**2.3.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

La electroforesis vertical en gel de poliacrilamida ofrece una mayor resolución que los geles de agarosa para secuencias de bajo peso molecular (<500 pb). Dependiendo del tamaño de poro del gel (3.5% a 20% poliacrilamida) se podrán separar fragmentos de 1000 a 10 pb respectivamente. El tamaño del poro está determinado por el porcentaje total de acrilamida. A mayor porcentaje de acrilamida poro más pequeño.

Un gel de poliacrilamida se forma por polimerización de monómeros de acrilamida en largas cadenas, las cuales son covalentemente unidas por un agente intercalante, Piperazine di-Acrylamide (PDA). La polimerización se inicia por radicales libres aportados por el persulfato de amonio (APS) y estabilizados por el N,N,N',N'-Tetramethylenediamine (TEMED). La reacción de polimerización dura entre 20 minutos y 2 horas.

1. Preparar el molde del gel enfrentando dos cristales 22x22 cm e interponiendo unos separadores de 0.7 mm en los márgenes derecho e izquierdo. Los cristales habrán sido lavados uno con etanol y otro con Repel Silane.
2. Con la ayuda de unas pinzas y cinta aislante se sellan los laterales, excepto la parte superior, por la que se añade la solución de poliacrilamida.

3. Preparar solución de poliacrilamida al 8%.
4. Añadir la solución de poliacrilamida por la parte libre superior con una jeringa. Colocar un peine que formará los pocillos.
5. Dejar polimerizar mínimo 1 hora.
6. Retirar la cinta aislante y colocar los cristales en la cubeta de electroforesis de modo que los pozos estén en contacto con el tampón 1x TBE de la cubeta superior.
7. Añadir tampón 1x TBE y retirar el peine. Con la ayuda de una jeringa lavar los pocillos para eliminar los restos de gel sin polimerizar.
8. Cargar los pocillos empleando puntas de pipeta de cabeza plana.
  - Muestra: 6  $\mu$ L Producto de PCR
  - 1.5  $\mu$ L Solución transportadora 10x
  - Marcador: 5  $\mu$ L Marcador pBR322
9. Conectar la fuente de alimentación a 45W durante 2 horas.
10. Proceder a la tinción con nitrato de plata.

### **2.3.4.3. Tinción con nitrato de plata**

Permite detectar pequeñas cantidades de ADN dando una mayor resolución que la tinción con BrEt.

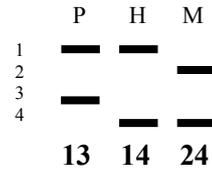
1. Retirar los cristales con el gel de la cubeta de electroforesis y separar los cristales entre sí haciendo palanca por los laterales.
2. Poner papel de filtro sobre el gel de poliacrilamida y trasladarlo a la bandeja de tinción.
3. Retirar el papel de filtro en una bandeja con una solución formada por 30 mL metanol + 30 mL ácido acético + 240 mL de H<sub>2</sub>O, recién preparada. Dejar durante 15 minutos.
4. Retirar la solución previa y fijar con un lavado en 30 mL etanol + 270 mL de H<sub>2</sub>O recién preparado durante 10 minutos.
5. Decantar y añadir 5 mL HNO<sub>3</sub> + 320 mL H<sub>2</sub>O, durante 10 segundos. Lavar dos veces en H<sub>2</sub>O.
6. Lavar en agitación y en oscuridad con 0.808 g AgNO<sub>3</sub> + 400 mL H<sub>2</sub>O, durante 25 minutos.
7. Lavar dos veces en H<sub>2</sub>O.
8. Revelar con 300 mL de la solución 0.28 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.5 mL formaldehído 37%/1L hasta ponerse marrón. Decantar y añadir 300 mL más hasta que aparezcan las bandas. Lavar con H<sub>2</sub>O.
9. Detener el revelado con 300 mL de ácido acético al 10%, mínimo 5 minutos.
10. Decantar y coger el gel con papel de filtro para secarlo en una secadora de geles durante unos 40 minutos.

### 2.3.4.4. Interpretación de los microsatélites

Los resultados que pueden aparecer son los siguientes:

#### Herencia biparental

El hijo (H) recibe un alelo (1,2,3 ó 4) de cada uno de los padres (P y M).



#### Disomía uniparental

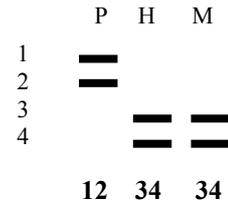
El hijo solo recibe alelos de uno de sus progenitores.

- **Disomía paterna:** los dos alelos proceden del padre **SA**
- **Disomía materna:** los dos alelos proceden de la madre **SPW**

Según si estos alelos sean o no los mismos, se pueden presentar dos situaciones:

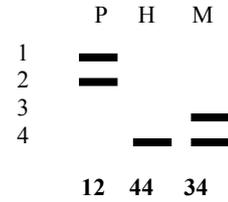
#### 1. Heterodisomía

Los dos alelos recibidos son diferentes. Proceden cada uno de un cromosoma homólogo.



#### 2. Isodisomía

Los dos alelos recibidos son el mismo. Proceden de un único cromosoma.

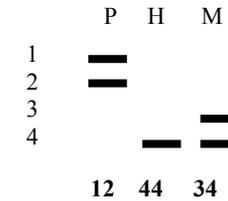


#### Deleción

El hijo solo recibe un alelo de uno de los padres.

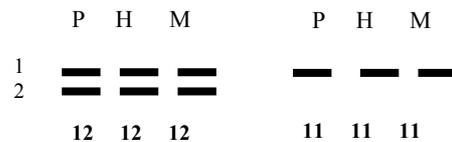
- **Deleción paterna:** solo recibe el alelo materno **SPW**
- **Deleción materna:** solo recibe el alelo paterno **SA**

El patrón de bandas de este resultado es el mismo que el de una isodisomía. Hace falta confirmarlo por FISH.



#### No informativo

Cuando no se puede saber el origen de los alelos que ha recibido el hijo. Los padres presentan el mismo patrón de bandas.



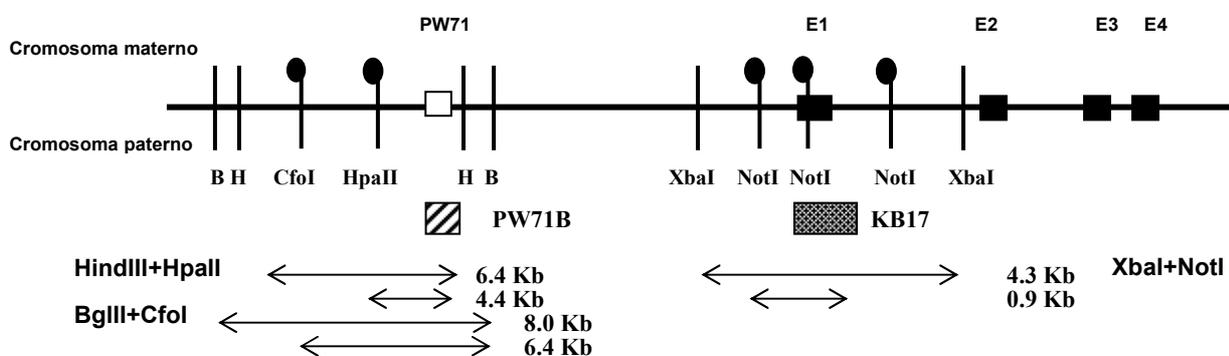
### 2.3.5. Análisis de metilación

Permite detectar regiones que están metiladas dentro del genoma. Para ello se emplean enzimas de restricción sensibles a la metilación. Estas enzimas reconocen una secuencia diana y cortan el ADN, pero si la diana está metilada la enzima no podrá cortar el ADN. Por tanto, tras la digestión enzimática del ADN genómico se obtendrán fragmentos de ADN de distinta longitud en función de si la diana está o no metilada. De este modo se puede detectar si hay un patrón de metilación diferencial en los cromosomas homólogos.

La región 15q11-q13 está regulada por la impronta, es decir, hay genes activos en el cromosoma paterno que no se expresan en el cromosoma materno porque están metilados. Basándose en estas observaciones se desarrolló un test diagnóstico para SPW/SA que analiza diferencias de metilación entre el alelo paterno y el alelo materno. Dos secuencias que cumplen estas características son el locus D15S63 (PW71) y el exón 1 del gen SNRPN.

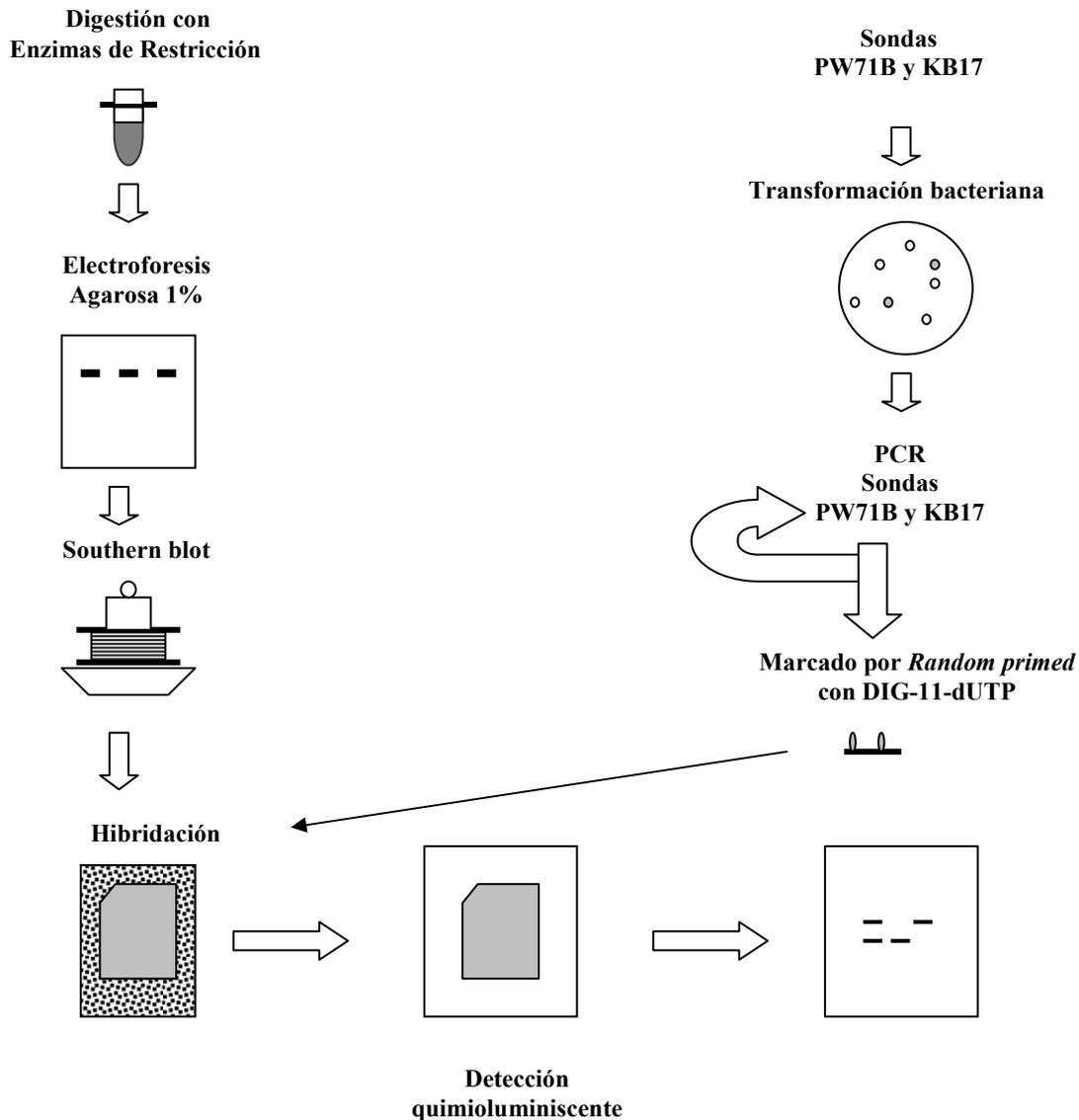
El estado de metilación del locus D15S63 puede ser valorado con dos combinaciones de enzimas: HindIII + HpaII y BglII + CfoI, y su posterior hibridación con la sonda PW71B. Este locus contiene como mínimo un sitio de restricción para las enzimas de restricción sensibles a metilación HpaII (CCGG) y CfoI (GCGC) que están metiladas en el cromosoma de origen materno pero no metiladas en el cromosoma de origen paterno (Fig. 2.3.2) (Dittrich *et al.*, 1992; Dittrich *et al.*, 1993).

El extremo 5' del gen SNRPN, exón 1, incluye una isla CpG y presenta un patrón de metilación diferencial. Este sitio presenta tres dianas para la enzima restricción sensible a metilación NotI (GCGGCCGC) que están metiladas en el cromosoma de origen materno pero no en el cromosoma de origen paterno. Cuando se digiere el ADN genómico con las enzimas XbaI y NotI y tras su hibridación con la sonda KB17 se obtienen dos fragmentos, uno de 4.3 Kb de origen materno donde la diana NotI está metilada y otro de 0.9 Kb de origen paterno donde la diana NotI no está metilada (Fig. 2.3.2). En un paciente con SPW solo se obtiene la banda de 4.3 Kb de origen materno, en el caso de un paciente con SA solo se obtiene la banda de 0.9 Kb de origen paterno.



**Figura 2.3.2.** Posición de las dianas de restricción para las enzimas HindIII, HpaII, BglII y CfoI en el locus D15S63, y XbaI y NotI en el locus SNRPN. HpaII, CfoI y NotI no reconocen la secuencia metilada del cromosoma materno. Cuadrado rayado: sonda PW71B; Rectángulo: sonda KB17; ●: Grupos metilo; Línea vertical: diana enzima restricción; □: Secuencia PW71; ■: Exones 1-4 del gen SNRPN

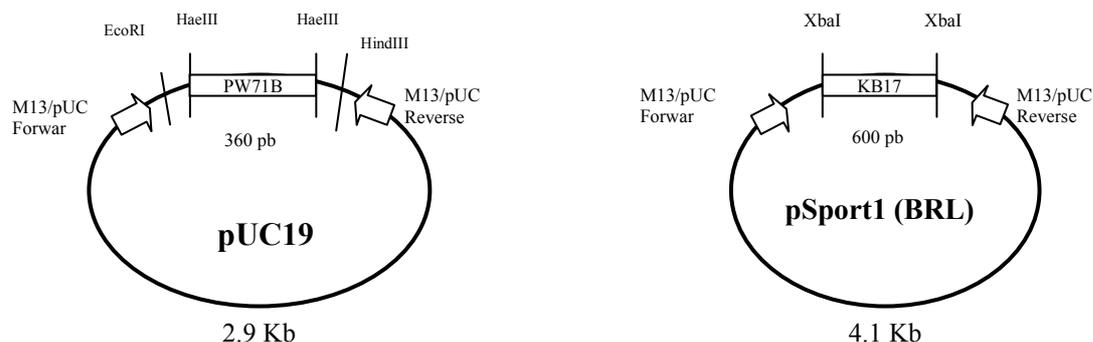
En la figura 2.3.3 se representan los diferentes pasos del análisis de metilación.



**Figura 2.3.3.** Esquema del análisis de metilación

### 2.3.5.1. Obtención de la sonda

Se han utilizado las sondas PW71B y KB17 integradas dentro de los plásmidos pUC19 y pSport1 (Fig. 2.3.4), proporcionadas por el Dr. Horsthemke del Instituto de Medicina Genética de la Universidad de Essen. Estos plásmidos se amplificaron mediante transformación de un cultivo bacteriano. De las colonias positivas se hicieron minipreps y a partir de este stock se amplificó la sonda por PCR con los *primers* universales pUC/M13. El resultado de esta amplificación es un fragmento de cerca de 400 pb para la sonda PW71B y de 1080 pb para KB17.



**Figura 2.3.4.** Plásmidos pUC19 y pSort1 (BRL)

### 2.3.5.1.1. Transformación con $CaCl_2$

Este método consiste en tratar células bacterianas (*E. coli*) con cationes divalentes y bajas temperaturas para desestructurar la membrana y así favorecer la incorporación del ADN plasmídico.

#### Preparación de células competentes

1. Resembrar 1/100 en 20 mL de medio LB de un cultivo *over night*.
2. Incubar a 37°C y en agitación hasta alcanzar una  $DO_{550}$  de 0,4 que corresponde aproximadamente a la mitad de la fase exponencial del ciclo de crecimiento de la célula bacteriana ( $10^8$  cel/mL).
3. Centrifugar el cultivo en un tubo estéril de polipropileno a 2000 g durante 10 minutos y a 4°C. Resuspender el sedimento en 10 mL de  $CaCl_2$  50mM frío agitando suavemente.
4. Dejar el tubo en hielo durante 1 hora.
5. Centrifugar 10 minutos a 2000 g y 4°C. Resuspender suavemente el sedimento en 1 mL de  $CaCl_2$  50mM frío.
6. Dejar el tubo en hielo durante 1 hora. Pasado este tiempo las células se encuentran en estado de competencia, y por tanto, aptas para ser transformadas.

#### Transformación

1. Mezclar en un tubo de vidrio frío y estéril 100  $\mu$ L de células con el ADN plasmídico (10 a 40 ng en menos de 10  $\mu$ L). Dejar el tubo en hielo como mínimo 30 minutos. Durante este tiempo el ADN se adhiere a la pared celular.
2. Incubar a 42°C durante 90 segundos y ponerlo 5 minutos a 4°C. Con este choque térmico el ADN se incorpora dentro de la célula.
3. Añadir 0.8 mL de LB con antibiótico e incubar a 37°C durante 1 hora en agitación suave, así la resistencia al antibiótico empezará a expresarse.
4. Sembrar 100  $\mu$ L en placas selectivas que se incubaran a 37°C durante 12-14 horas.

### Minipreps

Para recuperar el ADN plasmídico de las colonias bacterianas se ha empleado el kit de Qiagen.

1. Pasar 1,5 mL de cultivo de noche a un tubo eppendorf. Centrifugar 30 segundos a TA. Conservar el resto de cultivo a 4°C, que servirá, si el plásmido es el adecuado, para la obtención de un glicerado.
2. Resuspender en 600 µL de solución 1 más 6 µL de RNAsa 100 mg/mL para debilitar la pared celular.
3. Añadir 600 µL de solución de lisis. Mezclar bien por inversión y dejar 5 minutos a TA.
4. Añadir 600 µL de solución de neutralización. Mezclar bien por inversión. Se formaran grumos blancos que corresponden a los restos celulares. Dejar 10 minutos en hielo.
5. Centrifugar 15 minutos a 4°C.
6. Pasar el sobrenadante a un eppendorf nuevo y repetir el paso 5 para que no quede ningún grumo.
7. Equilibrar la columna con 1 mL de solución QTB. Dejar que caiga por gravedad.
8. Cargar el sobrenadante del paso 6 en la columna. Dejar que caiga por gravedad. El ADN quedará retenido en la columna. Volver a pasar el volumen que se eluye.
9. Lavar la columna tres veces con 1 mL de solución de lavado.
10. Eluir con 1 mL de solución de elución.
11. Añadir 700 µL de isopropanol para precipitar el ADN.
12. Centrifugar 15 minutos a 4°C.
13. Lavar con etanol 70%. Secar y resuspender en 30 µL de TE.

#### **2.3.5.1.2. Amplificación por PCR**

A partir del ADN plasmídico obtenido del miniprep se hacen sucesivas PCRs para obtener un pool de sonda. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 2.3.3.

**Tabla 2.3.3.** Programa de amplificación por PCR de las sondas PW71B y KB17

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Hot start	94°C	4 minutos
Añadir Taq	65°C	45 segundos
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Apareamiento	55°C	30 segundos
Extensión	72°C	95 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos

Los reactivos empleados para un volumen final de 25µL en la reacción de PCR se muestran en la Tabla 2.3.4. Los *primers* utilizados para la amplificación a partir del plásmido han sido los *primers* universales M13/pUC.

**Tabla 2.3.4.** Concentración de los reactivos para la amplificación de la sonda insertada en el plásmido

ADN	Tampón	Nucleótidos	Primer F	Primer R	Taq pol	H <sub>2</sub> O
1 μL	2.5 μL	2 μL	4 μL	4 μL	1.2 μL	10.3 μL
5 ng	1x	2.5 mM	10 pmol/μL	10 pmol/μL	6 u	

### Electroforesis de comprobación

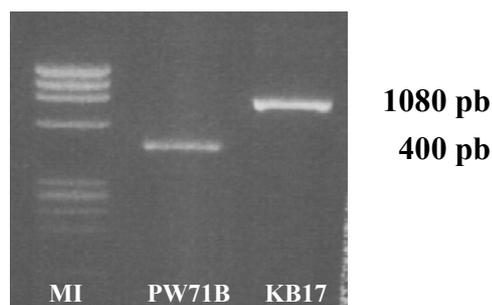
Preparar un gel de agarosa al 2% para confirmar que el fragmento amplificado corresponde con el tamaño de nuestra sonda (Fig. 2.3.5).

TBE 1x.....	40	mL
Agarosa 2 %.....	0.8	g
BrEt.....	2	μL

Cargar los pocillos y realizar la electroforesis durante 1 hora a 100 V.

Muestra:	5 μL PCR
	1 μL Solución transportadora 6x
Marcador:	10 μL marcador φ174/Hae III (0,03 μg/μL)

**Figura 2.3.5.** Amplificación de las sondas PW71B y KB17 mediante PCR. MI: Marcador HaeIII



### Determinación de la concentración de sonda amplificada

Comparando la intensidad de banda entre el marcador y el producto de PCR se puede determinar de una forma aproximada la concentración de sonda amplificada.

$$[\text{sonda}] = \frac{\mu\text{L marcador} \times [\text{marcador}] \text{ ng}/\mu\text{L} \times \frac{\text{tamaño de la banda del marcador}}{\text{de igual intensidad que la banda de la sonda (pb)}}}{\text{Tamaño total del marcador (pb)}}$$

#### **2.3.5.2. Marcado de la sonda por *Random primed***

Las sondas se han marcado con Digoxigenin-11-dUTP mediante la técnica de *Random primed* empleando el kit de marcaje de Boehringer-Mannheim.

1. Hervir durante 10 minutos 45 μL de sonda.
2. Poner en hielo 5 minutos.

## Material y métodos

### 3. Añadir:

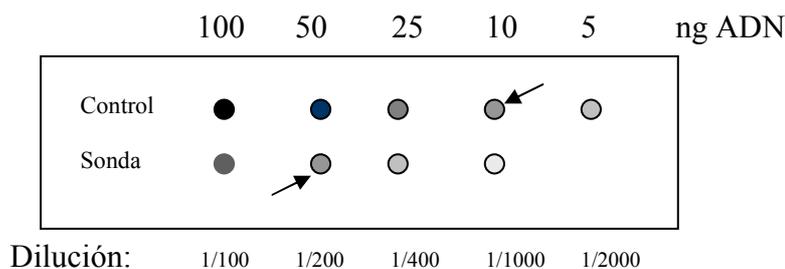
- 6  $\mu\text{L}$  Hexanucleotidos (vial 5)
- 6  $\mu\text{L}$  dNTP labeling mix (vial 6)
- 3  $\mu\text{L}$  enzima Klenow (vial 7)

4. Incubar a 37°C toda la noche.
5. Detener la reacción con 3  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.5 M.
6. Precipitar la sonda para eliminar los restos de la reacción de marcaje con 3.5  $\mu\text{L}$  CILi y 220  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto.
7. Guardar a -20°C toda la noche.
8. Centrifugar durante 20 minutos a 14000 rpm y 4°C para recuperar la sonda. Eliminar sobrenadante.
9. Añadir 80  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 %.
10. Centrifugar durante 8 minutos a 14000 rpm y 4°C. Eliminar sobrenadante.
11. Secar en bomba de vacío o en estufa a 68°C.
12. Añadir 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O-tridestilada y resuspender.

### Determinar por *Dot blot* la concentración de sonda marcada

1. Hacer un banco de diluciones del ADN control y de la sonda.
2. Poner 1 $\mu\text{L}$  de cada dilución sobre la membrana de nylon (DOT).
3. Exponer la membrana durante 3 minutos con UV para fijar el ADN a la membrana.
4. Lavar durante 1 minuto con 100 mL de tampón 1 detección NBT.
5. Retirar y lavar durante 30 minutos con 80 mL de tampón 2 detección NBT.
6. Retirar y lavar durante 30 minutos con 20 mL de solución conjugada NBT.
7. Retirar y lavar 2 veces durante 15 minutos con 100 mL de tampón 1 detección NBT.
8. Retirar y lavar durante 2 minutos con 20 mL de tampón 3 detección NBT.
9. Incubar la membrana en oscuridad dentro de una bolsa con 10 mL de solución colorante NBT.
10. Esperar 1-2 horas hasta que aparezca coloración.
11. Detener la reacción con H<sub>2</sub>O y dejar secar.

Sobre la membrana observaremos unos puntos con diferente intensidad de color que corresponde a las diferentes concentraciones de ADN establecidas a partir del ADN control. Comparando la intensidad de estos puntos, de concentración de ADN conocida, con la intensidad de la sonda, se puede saber la concentración de sonda marcada. Observando la figura 2.3.6, la intensidad de señal del ADN control a la dilución 1/1000 es igual a la correspondiente a la dilución 1/200 de la sonda.



**Figura 2.3.6.** Representación de un DOT BLOT para determinar la concentración de sonda marcada del total de sonda. Comparar intensidad de los DOT entre control y sonda: 10 ng → 1/200

Para conocer de una forma más exacta la concentración de sonda marcada se aplica la formula siguiente:

$$[\text{sonda marcada}] = \frac{5.2 \text{ ng}/\mu\text{L} [\text{ADN control}] \times \text{dilución sonda} (1/200)}{\text{dilución ADN control} (1/1000)} = 26 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

### 2.3.5.3. Southern blot

Los fragmentos obtenidos después de digerir el ADN genómico del paciente con enzimas de restricción se separan en geles de agarosa al 1% y se transfieren a una membrana de nylon por capilaridad según el método tradicional descrito en Sambbrook y Maniatis *et al.*, (1989), o empleando el TURBO BLOTTER™ (*Rapid Downward Transfer Systems*) que permite reducir el tiempo de transferencia de las 12-24 horas a 2-4 horas. Finalizada la transferencia el ADN es covalentemente unido a la membrana por UV-crosslinked. Sobre esta membrana se realiza la hibridación con la sonda previamente marcada. Transcurrida la hibridación se hace un lavado del exceso de sonda y se procede a la detección.

#### 2.3.5.3.1. Digestión enzimática

Las combinaciones de enzimas de restricción utilizadas han sido: HindIII+HpaII, BglII+CfoI, BglII+HpaII o XbaI+NotI.

1. Añadir en un eppendorf de 1.5 mL:

ADN .....	10 a 15	μg
HindIII / BglII / XbaI ... ..	40 a 50	u
HpaII / CfoI / NotI .....	40 a 50	u
Tampón .....	1	x
BSA .....	1	%
H <sub>2</sub> O hasta .....	140	μL

2. Vortex y pulso. Homogenizar bien.

3. Incubar a 37°C toda la noche.

- Preparar un gel de agarosa al 1% para comprobar que el ADN ha sido completamente digerido, se ha de observar un *smear* a lo largo del carril de migración.

TBE 1x .....	40	mL
Agarosa 1% .....	0,4	g
BrEt .....	3	µL

Cargar los pocillos y realizar la electroforesis a 100 V durante 40 minutos.

4 µL de la digestión
1 µL de solución transportadora 10x
5 µL de H <sub>2</sub> O

#### Precipitar y recuperar el ADN

- Añadir al eppendorf donde se ha realizado la digestión:

Etanol absoluto frío (2 vol.) .....	280	µL
Acetato sódico 3M pH 5.2 (1/10) .....	14	µL

- Agitar suavemente y guardar a 4°C toda la noche. Veremos la medusa de ADN.
- Centrifugar durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C.
- Descartar el sobrenadante.
- Lavar con 96 µL de etanol 70 %.
- Centrifugar durante 8 minutos a 14000 rpm a 4°C.
- Descartar sobrenadante y secar en bomba de vacío o estufa a 37°C durante 10 minutos aproximadamente. Resuspender en 18 µL de H<sub>2</sub>O.

#### **2.3.5.3.2. Electroforesis**

Se prepara un gel de agarosa al 1% formado por:

TBE 1x .....	50	mL
Agarosa 1%.....	0.5	g
BrEt .....	2.5	µL

Cargar los pocillos y realizar la electroforesis según las enzimas utilizadas (Tabla 2.3.5).

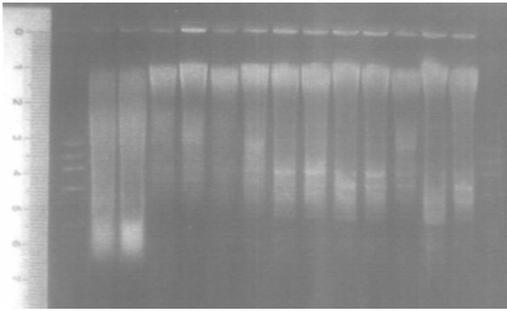
Muestra : 18 µL digestión + 2 µL solución transportadora 10x

Marcador : 15 µL λ/EcoRI + Hind III

**Tabla 2.3.5.** Condiciones de electroforesis

	<b>HindIII+HpaII</b>	<b>BglII+CfoI</b>	<b>XbaI+NotI</b>	<b>BglII+HpaII</b>
<b>Voltaje</b>	90 V	90 V	95 V	60 V
<b>Tiempo</b>	4 horas	4 horas	1 hora 30 minutos	1 hora 30 minutos

Finalizada la electroforesis hacer una fotografía del gel en el transiluminador de UV con una regla al inicio del gel (Fig. 2.3.7).



**Figura 2.3.7.** Fotografía de un gel de transferencia

**2.3.5.3.3. Transfereencia**

Para hacer la trasfereencia hay que preparar el gel con un tratamiento que facilita el proceso.

1. Lavar dos veces durante 15 minutos con HCl 0.25 M en agitación.
2. Lavar dos veces durante 30 minutos con solución desnaturizante en agitación.
3. Lavar durante 60 minutos con solución neutralizante en agitación.

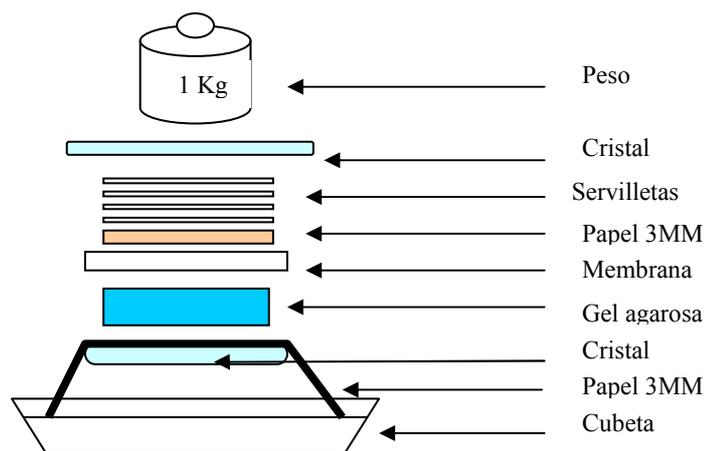
Método tradicional

Sobre una bandeja que contiene el tampón de transferencia 10x SSC colocar un cristal cuadrado o rectangular que servirá de soporte para la transferencia. Encima colocar por orden ascendente (Fig. 2.3.8):

- 1 papel 3MM, 30x20cm<sup>2</sup>, humedecido en 10x SSC.
- Gel de transferencia invertido, pozos orientados hacia el papel de filtro.
- Membrana de Nylon cargada + (2mm<sup>2</sup> más grande que el gel) humedecida en H<sub>2</sub>O.
- Papeles 3MM de igual tamaño que el gel, humedecidos en H<sub>2</sub>O.
- Servilletas.
- Cristal.
- Peso de 0.5 a 1 Kg.

Transferir de 12 a 24 horas.

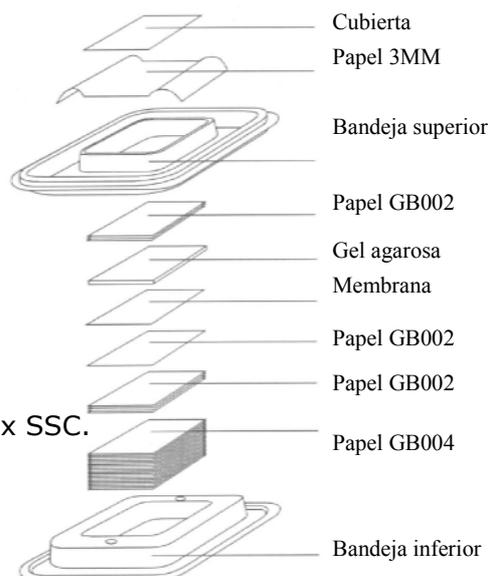
**Figura 2.3.8.**  
Transferencia según el método tradicional



Método rápido (Turbo blotter™)

Colocar de forma ascendente sobre la bandeja inferior:

- 20 hojas de papel GB004.
- 4 hojas de papel GB002.
- 1 hoja de papel GB002 humedecida en 10x SSC.
- Membrana de nylon.
- Gel de agarosa.
- 3 hojas de papel GB002 humedecidas en 10x SSC.
- Bandeja superior con 125 mL de tampón de transferencia 10x SSC.
- Hoja de conexión de papel 3MM humedecida en 10x SSC.
- Cubierta superior.



Una vez finalizada la transferencia:

1. Desmontar.
2. Ver al transiluminador si ha transferido todo el ADN del gel a la membrana.
3. Dejar secar la membrana entre papel 3 MM (> 30 minutos).
4. Fijar el ADN a la membrana con UV durante 3 minutos cara ADN y 1 minuto cara opuesta.
5. Se puede guardar la membrana varios días antes de hacer la hibridación.

**2.3.5.3.4. Hibridación**

La hibridación se realizó empleando las modificaciones de Engler-Blum *et al*, (1993), del protocolo de hibridación de Church and Gilbert, (1984). La hibridación consta de dos etapas: prehibridación e hibridación. En ambas etapas se utiliza la misma solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y temperatura a 68°C.

Pre-hibridación

Preparar 35 mL de solución de hibridación para los pasos de pre-hibridación e hibridación (Tabla 2.3.6). Se emplearan 20 mL para pre-hibridar una membrana de 100 cm<sup>2</sup> y los 15 mL restantes para mezclar con la sonda en la hibridación. Incubar a 68°C, como mínimo 1 hora.

**Tabla 2.3.6.** Solución de hibridación

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	EDTA	BR	SDS	H <sub>2</sub> O
0.25 M	1 mM	0.5 %	20 %	
4.37 mL	70 µL	0.175 g	7 g	30 mL

BR: Agente bloqueante

### Hibridación

1. Hervir durante 10 minutos 400 ng de sonda marcada en un eppendorf.
2. Enfriar en hielo sumergido en etanol durante 5 minutos.
3. Añadir la sonda desnaturalizada en 15 mL de solución de pre-hibridación a 68°C. Hacer un vortex.
4. Poner en la estufa a 68°C durante 6 minutos para eliminar las burbujas de la agitación.
5. Poner la membrana en una bolsa de hibridación.
6. Verter la solución de hibridación con la sonda en la bolsa de hibridación.
7. Cerrar la bolsa de hibridación con el sellador térmico.
8. Incubar a 68°C como mínimo 6 horas.
9. Lavar tres veces con 100 mL de tampón lavado de hibridación a 68°C durante 20 minutos, para extraer el exceso de sonda.

La solución de hibridación con la sonda puede ser reutilizada para otras hibridaciones. Recuperarla en un tubo cónico y congelar a -20°C. Para próximas hibridaciones solo habrá que descongelar la solución de hibridación en la estufa a 68°C y calentarla durante 15 minutos a 95°C en un baño María para desnaturalizar la sonda. Enfriar en hielo 10 minutos y seguir el protocolo de hibridación en el paso 4.

### **2.3.5.3.5. Detección quimioluminiscente**

Se emplean las variaciones descritas por Engler-Blum *et al*, (1993) del protocolo de detección luminiscente de Boehringer-Mannheim.

1. Lavar durante 5 minutos con 100 mL tampón 1 de detección CDP-Star.
2. Incubar en bandeja durante 60 minutos con 100 mL de tampón 2 CDP-Star.
3. Incubar durante 30 minutos en bolsa con 15 mL de solución conjugada.
4. Lavar cuatro veces durante 10 minutos en bandeja con tampón 1 de detección CDP-Star.
5. Incubar 5 minutos en bandeja con 20 mL de tampón 3 CDP-Star.
6. Incubar durante 5 minutos en bolsa con 2 mL de solución CDP-Star.
7. Retirar solución CDP-Star.
8. Secar brevemente entre papel 3MM.
9. Poner la membrana entre dos hojas de papel de transparencia.
10. Colocar la membrana sobre la película Amersham Hyperfilm MP.

### Exposición y revelado de la película

1. Exponer de 1-15 minutos la membrana a la película Amersham Hyperfilm MP en el casete de exposición. Se pueden hacer tantas exposiciones como se quieran.
2. En un cuarto oscuro tratar la película con revelador hasta que empiecen a intuirse las bandas.
3. Lavar con agua durante 5 minutos.

4. Tratar con fijador durante 5 minutos.
5. Lavar con agua abundante y dejar secar.

#### 2.3.5.4. Interpretación del análisis de metilación

Para interpretar las bandas observadas en la película necesitamos la fotografía que se hizo al gel antes de transferirlo. En esta fotografía hay una regla que nos indica junto con el marcador de peso molecular a que distancia se encuentran las bandas observadas en la película y por tanto su tamaño aproximado. En función de las enzimas y sonda utilizada obtendremos distintos tamaños de banda (Tabla 2.3.7).

**Tabla 2.3.7.** Interpretación del análisis de metilación

<b>PW71B</b>		<b>KB17</b>					
HindIII +HpaII	BglII + CfoI	XbaI +NotI	BglII +HpaII		<b>Normal</b>	<b>SPW</b>	<b>SA</b>
6.4 Kb	8.0 Kb	4.3 Kb	2.0 Kb	Alelo materno	■	■	
4.4 Kb	6.4 Kb	0.9 Kb	0.9 Kb	Alelo paterno	■		■

#### 2.3.5.5. Rehibridación

La membrana se puede reutilizar para futuras hibridaciones. La eliminación de la sonda de la membrana se realiza según el siguiente protocolo:

1. Lavar 5 minutos con agua destilada a TA.
2. Incubar durante 20 minutos en 5x SSC.
3. Incubar durante 10 minutos en 0.1 % de SDS a 95°C.
4. Membrana preparada para hibridar de nuevo.

### 3. Resultados



### 3.1. Síndrome de Prader-Willi

Se han estudiado un total de 151 pacientes con sospecha clínica de SPW, 75 varones y 76 hembras, y seis líquidos amnióticos.

#### 3.1.1. Análisis citogenético

El cariotipo con bandas G se ha realizado en 47 casos observándose un paciente con cariotipo 47,XXY (caso 74), seis pacientes con cariotipo normal pero con presencia de la deleción detectada mediante FISH (falsos negativos) y 40 casos con cariotipo normal.

#### 3.1.2. Estudio mediante hibridación *in situ* fluorescente

Se ha realizado la técnica de FISH en 140 casos, uno corresponde a un diagnóstico prenatal. La presencia de deleción se ha observado en 28 pacientes, 20 hembras y 8 varones, solo en seis de estos pacientes se realizó el cariotipo siendo este normal. En los 112 casos restantes, incluido el diagnóstico prenatal, no se observó la deleción. Algunos pacientes han sido valorados con sondas ONCOR, otros con sondas Vysis y otros con ambas (Tabla 3.1.1).

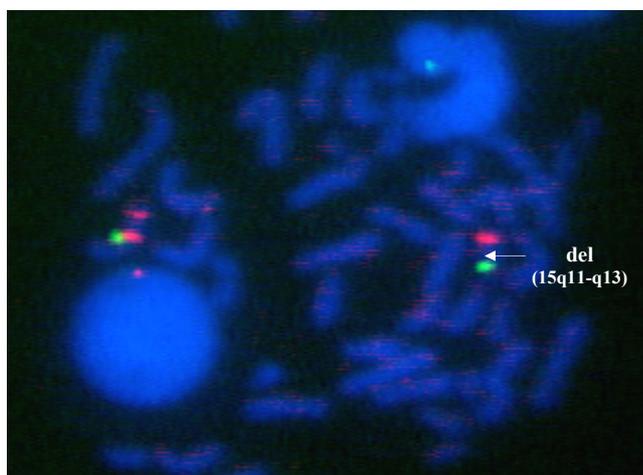
**Tabla 3.1.1.** Diagnóstico mediante FISH en pacientes SPW

Sondas		Análisis realizados	Normales	Deleción
ONCOR	D15S11	15	8	7
	GABRB3	15	8	7
Vysis	D15S10	104	83	21
	SNRPN	96	75	21
<b>Pacientes analizados:</b>		<b>140*</b>	112*	28*

\* El número de pacientes analizados no corresponde con la sumatoria de las columnas debido a que algunos pacientes fueron estudiados con varias sondas.

En la figura 3.1.1 puede observarse la hibridación con la sonda SNRPN de Vysis en un caso con deleción.

**Figura 3.1.1.**  
Deleción 15q11-q13  
observada con la  
sonda SNRPN de Vysis



### 3.1.3. Análisis de microsatélites

El estudio de microsatélites se ha realizado en 85 familias. Fueron informativas 79, 16 presentaron ausencia del alelo paterno, 10 por deleción confirmada mediante FISH, cinco por DUP descartando la deleción mediante FISH, en uno no se ha podido determinar la etiología al no realizarse la FISH y 63 presentaron HBP para los distintos marcadores. Cinco de estas familias con HBP correspondieron a un diagnóstico prenatal (Tabla 3.1.2).

**Tabla 3.1.2.** Estudio de microsatélites de pacientes SPW

N°	H	P	M	11	H	P	M	210	H	P	M	113	H	P	M	GABRB3	H	P	M	97	H	P	M	128	H	P	M	122					
<b>Pacientes con ausencia del alelo paterno: deleción paterna o disomía materna</b>																																	
30	c	bc	ac	Del/DM									c	ab	c	Del/DM								c	bc	ac	Del/DM						
50	ab	b	ab	NI					Del/DM							NI							ab	bc	ab	NI							
53				Del/DM												Del/DM																	
67				Del/DM																													
86				NI												NI									Del/DM								
96																									Del/DM								
191							NI																							Del/DM			
311																								a	bc	ab	Del/DM						
431	a	a	ab	NI	a	ab	a	NI					a	a	ab	NI	b	ab	bc	NI	c	ab	c	Del/DM	Del/DM								
611																								b	a	b	Del/DM						
701	a	bc	ac	Del/DM	a	ab	a	NI									b	a	ab	Del/DM													
761				NI																					Del/DM								
841					a	b	ab	Del/DM					a	b	ac	Del/DM	b	a	bc	Del/DM	a	a	ab	NI									
981	a	a	a	NI	a	ac	ab	NI	a	a	a	NI	a	ab	ab	NI	a	a	a	NI	b	ac	bd	Del/DM	Del/DM	a	a	a	NI				
1141	a	a	ab	NI	b	a	bc	Del/DM					a	ac	ab	NI	b	bc	ab	NI													
1241				NI					Del/DM				Del/DM							NI					NI								
<b>Pacientes con alelos paterno y materno: Herencia biparental</b>																																	
24				HBP												HBP															HBP		
49	bc	ac	ab	HBP	ab	ac	ab	HBP					ac	ab	ac	HBP	ab	a	b	HBP	b	ab	b	NI									
64	ab	ab	ab	NI	ac	ab	ac	NI					a	aa	ab	NI	ac	ab	c	HBP	b	ab	b	NI							HBP		
77				NI				HBP												NI					NI								
93				NI																HBP				HBP		HBP							
111				NI				NI					ab	ab	bb	HBP	ab	a	ab	HBP					NI								
131				NI																HBP				HBP		NI							
151	bc	ab	ac	HBP	ac	bc	ad	HBP					ac	a	bc	HBP	ad	bd	ac	HBP													
171	ab	ab	ab	NI	a	ab	ab	NI					bc	ac	ab	HBP	ac	a	bc	HBP	ab	b	a	HBP									
211	a	a	ab	NI	a	ab	a	NI					ac	ac	ab	HBP	b	ab	b	NI	a	a	a	NI	a	a	a	NI	a	a	a	NI	
231				HBP	ab	bc	a	HBP									NI	a	ab	a	NI				NI								
301	a	ab	a	NI	cd	bc	ad	HBP					a	a	ab	NI	b	b	ab	NI	c	ac	bc	NI									
314	ab	a	bc	HBP	a	a	ab	NI					ac	ab	ac	HBP	a	a	a	NI													
341				HBP																HBP					NI								
371	ab	bc	a	HBP	a	a	ab	NI					a	bc	ac	NI	a	ab	a	NI	ac	ac	ab	HBP									
471	ac	ab	cd	HBP	ab	ab	a	HBP					c	ac	bc	NI	ab	bc	ac	HBP	a	a	ab	NI									
501	ab	a	ab	NI	bc	ac	b	HBP					a	ab	a	NI	bc	ac	b	HBP	a	a	a	NI									
521	a	a	a	NI									ab	ac	bc	HBP	a	ac	ab	NI	a	a	a	NI	a	a	a	NI	a	ab	a	NI	
531	ab	ab	b	HBP	ab	ab	ac	HBP					a	a	ab	NI	ab	ab	a	HBP	a	ab	a	NI									
541	ab	ab	ab	NI	ac	ac	ab	HBP					ab	a	bc	HBP	ab	b	a	HBP	b	bc	ab	NI									
551	ab	a	ab	NI	ab	ab	a	HBP					ab	ab	ac	HBP	ab	ac	b	HBP	ab	b	ab	NI									
561	a	ab	ab	NI	a	a	a	NI					bc	b	bc	HBP	c	ac	bc	NI	ac	ac	bc	HBP									
571					a	a	a	NI					ab	ab	b	HBP	ab	ab	ab	NI	ab	b	ac	HBP									
581	bc	bc	ab	HBP	ab	ab	a	HBP					ab	ab	b	HBP	a	a	a	NI	ab	ac	bb	HBP									
621	ab	ab	a	HBP	ab	ab	ab	NI					ab	ab	ab	NI	a	a	ab	NI	ac	ac	ab	HBP									
631	ab	b	a	HBP	ab	b	a	HBP					ab	ab	a	HBP	a	a	ab	NI	a	ab	a	NI									
641	b	ab	bc	NI	ab	ac	b	HBP					bc	b	ac	HBP	bc	b	ac	HBP													

Nº	H	P	M	11	H	P	M	210	H	P	M	113	H	P	M	GABRB3	H	P	M	97	H	P	M	128	H	P	M	122
651	a	a	a	NI	ab	ab	a	HBP					b	bc	ab	NI	c	ac	bc	NI	ab	bc	a	HBP				
661	ac	c	ab	HBP	b	b	ab	NI					ad	ac	bd	HBP	c	ac	bc	NI								
671	ab	ab	ab	NI	c	bc	ac	NI	b	b	ab	NI	ab	a	ab	HBP	a	a	a	NI	a	ab	a	NI				
691	a	a	a	NI	ab	ac	bc	HBP	b	ab	b	NI	ac	ac	ab	HBP	ab	ab	a	HBP								
711	ab	ab	ac	HBP	ac	bc	ab	HBP	b	b	ab	NI	ab	ab	a	HBP	a	ab	ab	NI								
721	a	ab	a	NI	ab	bd	ac	HBP	a	ab	a	NI	b	ab	b	NI	a	ab	a	NI	ab	b	ab	HBP				
731	ac	a	bc	HBP	c	ac	bc	NI	bc	ac	b	HBP	a	a	a	NI	ac	a	bc	HBP	ab	ab	a	HBP				
741	bc	ac	ab	HBP	ab	ab	a	HBP					bc	ac	ab	HBP	a	a	a	NI	bc	ac	ab	HBP				
751				NI				HBP								HBP				NI				NI				HBP
771	b	ab	b	NI	a	ab	a	NI					a	ab	a	NI	ab	b	ab	HBP	ab	ab	a	HBP				
781	ab	b	a	HBP	ab	a	ab	HBP	b	ab	b	NI	ac	a	bc	HBP	bc	ac	ab	HBP	b	ab	bc	NI				
831	a	ab	a	NI	a	a	a	NI					b	ab	b	NI	ac	ab	c	HBP	ab	a	b	HBP				
851	b	b	ab	NI	ac	ac	ab	HBP					ab	ab	a	HBP	a	a	a	NI	bc	bc	ab	HBP				
881	a	ab	a	NI	ac	ab	ac	HBP					b	bc	ab	NI	ab	ac	ab	HBP	ab	a	b	HBP				
891	cd	ac	bd	HBP	ac	ab	ac	HBP					bc	b	ac	HBP	ac	a	bc	HBP	ab	b	a	HBP				
901	ab	b	ac	HBP	bd	ad	bc	HBP					ab	ab	a	HBP	bc	bc	ac	HBP								
911	ab	ab	ab	NI	a	a	ab	NI					ab	ab	a	HBP	ab	ab	a	HBP	ab	ac	b	HBP				
921	a		a	NI	b		ab	NI					a		a	NI	ab		bc	HBP	b		ab	NI				
941	b	ab	ab	NI	bc	-	ac	HBP					bc	ab	ac	HBP	bc	bc	ac	HBP	ab	a	b	HBP				
951	a	ab	a	NI	a	a	a	NI					bc	ab	ac	HBP	cd	ac	bd	HBP	ab	ac	b	HBP				
961	ab	a	ab	HBP	ab	ab	a	HBP					a	a	ab	NI	ab	b	a	HBP	a	ab	ab	NI				
971	a	ab	a	NI	ad	cd	ab	HBP					bc	ac	b	HBP	ab	ab	a	HBP	ab	ab	ab	NI				
991	ab	a	ab	HBP	ab	ab	ab	NI					ad	ab	cd	HBP	ab	b	ac	HBP	ac	c	ab	HBP				
1011	ab	b	a	HBP	bc	ab	bc	HBP					a	a	ab	NI	ab	ab	b	HBP	a	ac	ab	NI				
1031	ab	a	ab	HBP	bc	cd	ab	HBP					a	ab	a	NI	ab	ab	bc	HBP	b	b	ab	NI				
1041	ab	a	bc	HBP	ab	ab	ab	NI					bc	ab	ac	HBP	a	ab	a	NI	b	bc	ab	NI				
1061	ab	ab	a	HBP	ab	ab	ac	HBP					ab	bd	ac	HBP	ac	ab	ac	HBP	bc	c	ab	HBP				
1071	ab	a	ab	HBP	ab	ac	ab	HBP					ac	a	bc	HBP	ab	ad	bc	HBP	ac	bc	ad	HBP				
1081	b	ab	bc	NI	a	ab	a	NI					ab	a	ab	HBP	b	ab	ab	NI	b	b	ab	NI				
1091	a	ab	ac	NI	a	a	a	NI					ab	a	bc	HBP	ac	bc	a	HBP	ac	ad	bc	HBP				
1111	ab	bc	ac	HBP	a	a	a	NI					ab	ab	ac	HBP	a	a	ab	NI	b	bc	ab	NI				
1131	a		a	NI	ab		bc	HBP					ab		bc	HBP	ab		b	HBP	a		a	NI				
1161	bc	ac	ab	HBP	b	ab	b	NI					c	bc	ac	NI	ab	bc	ab	HBP	ab	a	ab	NI				
1171	b	ab	ab	NI									a	a	ab	NI	ab	ac	bc	HBP	a	a	a	NI				
1181	ab	ab	ab	NI									ab	ac	ab	HBP	ab	ab	b	HBP	b	ab	ab	NI				
1401	ab	ab	b	HBP					a	a	a	NI	ab	ac	b	HBP								ac	ab	ac	HBP	

Pacientes no informativos

41				NI																									
80				NI																									
90				NI												NI													
321				NI				NI				NI				NI				NI				NI				NI	
1001	a	ab	ab	NI	a	ab	a	NI					a	ac	ab	NI	a	ab	a	NI	ab	ab	ab	NI	b	ab	ab	NI	
1151	a	ab	a	NI													-	ab	ac	NI	b	b	ab	NI					

P: padre; M: madre; H: hijo; HBP: herencia biparental; NI: no informativo; Marcadores: D15S11, D15S210, D15S113, GABRB3, D15S97, D15S128 y D15S122; Alelos: a, b, c, y d.

El microsatélite más informativo ha sido el GABRB3 con una informatividad del 61,3% (Tabla 3.1.3).

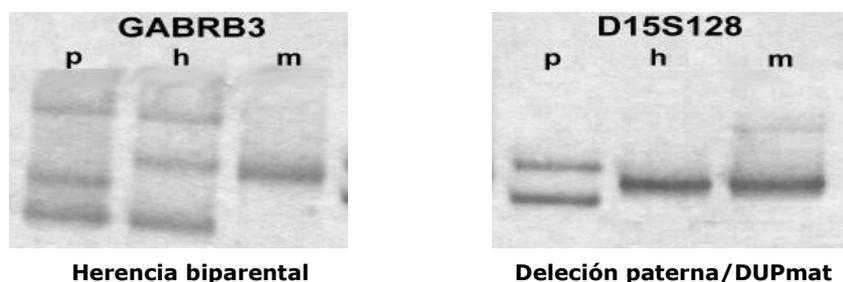
**Tabla 3.1.3.** Informatividad de los microsatélites en las 85 familias SPW

	D15S11	D15S210	D15S113	GABRB3	D15S97	D15S128	D15S122	Total
<b>Del P / DM</b>	4	2	2	4	2	7	1	<b>16</b>
<b>HBP</b>	29	32	1	42	37	23	3	<b>63</b>
<b>NI</b>	46	29	8	29	28	37	6	<b>6</b>
<b>Informatividad%</b>	41,8	54	27,3	61,3	58,2	44,7	40	

Del P/ DM: Delección paterna o Disomía materna; HBP: Herencia biparental; NI: No informativo.

Informatividad = (Nº de casos positivos / Nº de casos totales)x100

En la Figura 3.1.2 se observan los resultados del análisis de microsatélites para los marcadores GABRB3 y D15S128, en un caso de HBP y en un caso de delección 15q11-q13 de origen paterno confirmada por FISH.



**Figura 3.1.2.** Resultado del análisis de microsatélites en caso de HBP y en caso de delección 15q11-q13 de origen paterno. p: padre; h: hijo; m: madre

### 3.1.4. Análisis de metilación

El SPW se ha confirmado en 19 de los 110 pacientes analizados mediante *Southern blot* (Tabla 3.1.4). En 74 casos se ha analizado la región D15S63 con la sonda PW71B, en 28 casos se ha analizado la región del exón 1 del gen SNRPN con la sonda KB17 y en ocho casos se han analizado las dos regiones.

El estado de metilación de HpaII en la región D15S63 se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas HindIII+HpaII en 53 casos, siete han presentado la ausencia de la banda de origen paterno de 4,4Kb confirmando el SPW y 46 han presentado un patrón de herencia biparental (6,4Kb+4,4Kb) descartando el SPW. Mientras que el estado de metilación de CfoI se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas BglII+CfoI en 29 casos, cuatro han presentado la ausencia de la banda de origen paterno de 6,4Kb confirmando el SPW y 25 han presentado un patrón de herencia biparental (8Kb+6,4Kb) descartando el SPW.

El estado de metilación de NotI en la región del exón 1 del gen SNRPN se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas XbaI+NotI en 31 casos, nueve han presentado la ausencia de la banda de origen paterno de 0,9Kb confirmando el SPW y 22 han presentado un patrón de herencia biparental (4,3Kb+0,9Kb) descartando el SPW. Mientras que el estado de

metilación de HpaII se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas BglII+HpaII en cinco casos, uno ha presentado la ausencia de la banda de origen paterno de 0,9Kb confirmando el SPW y cuatro han presentado un patrón de herencia biparental (2Kb+0,9Kb) descartando el SPW.

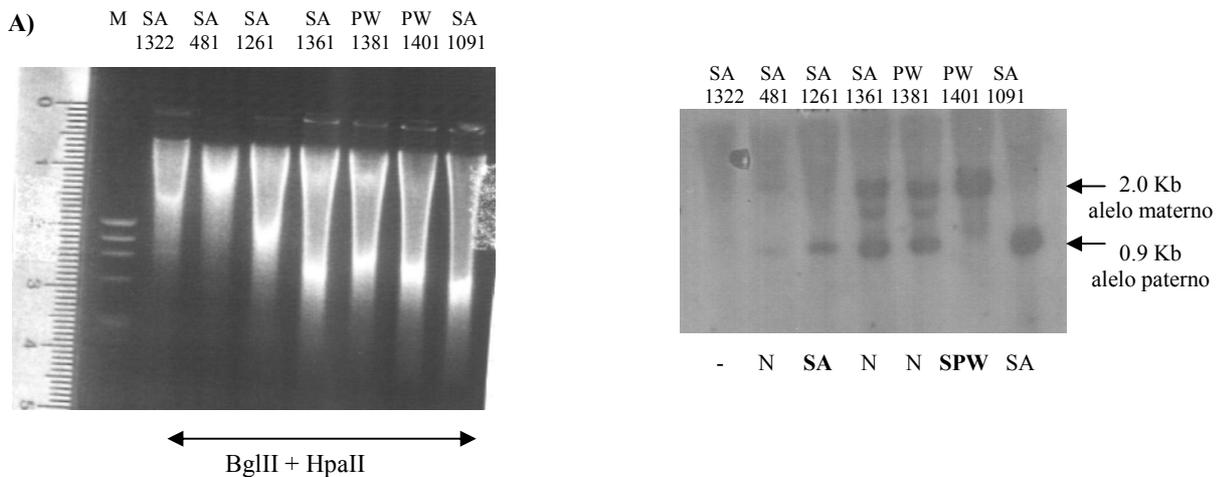
**Tabla 3.1.4.** Diagnóstico mediante análisis de metilación en pacientes SPW

Sonda	Enzimas	Análisis realizados	Normales	SPW
PW71B	HindIII+HpaII (6,4kb + 4,4kb)	53	46	7
	BglII+CfoI (8kb + 6,4kb)	29	25	4
KB17	XbaI+NotI (4,3kb + 0,9kb)	31	22	9
	BglII+HpaII (2kb + 0,9kb)	5	4	1
Pacientes analizados:		110*	91*	19*

\*El número de pacientes analizados no corresponde con la sumatoria de las columnas debido a que algunos pacientes fueron valorados con ambas sondas o con varias combinaciones de enzimas.

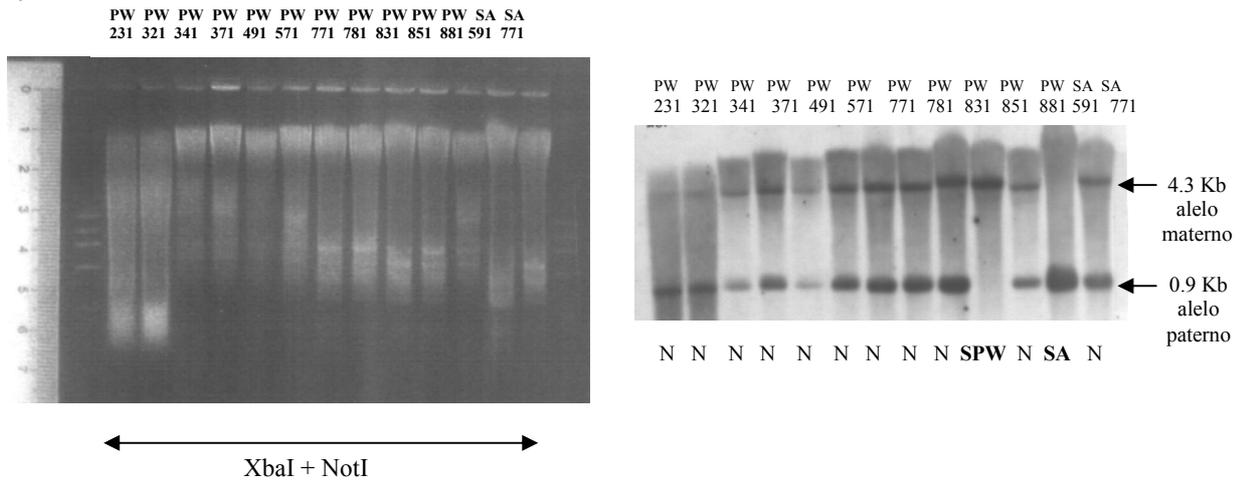
La etiología de los 19 pacientes que han presentado un patrón de metilación compatible con el SPW se ha valorado mediante FISH y/o análisis de microsatélites obteniendo 11 deleciones, una DUPmat y dos DI. En cinco pacientes no se ha podido confirmar la etiología, los pacientes 30 y 811 al no realizarse el estudio mediante FISH, mientras que en los pacientes 101, 1321 y 1471 con FISH normal no pudo realizarse el análisis de microsatélites.

En la Figura 3.1.3 se observan varias etapas del proceso del análisis de metilación, como la digestión del ADN con diferentes enzimas de restricción en los geles de transferencia y el resultado de la hibridación con la sonda KB17 tras la detección quimioluminiscente con CDPstar.



Resultados

B)



**Figura 3.1.3.** Geles de transferencia del ADN digerido con diferentes enzimas y resultado de la detección quimioluminiscente con CDP-Star. A) Digestión con BglII+HpaII. Hibridación con la sonda KB17. B) Digestión con XbaI+NotI. Hibridación con la sonda KB17

### 3.1.5. Valoración genética global

Se ha confirmado el diagnóstico del SPW en 40 pacientes. La etiología ha sido la siguiente: 28 pacientes han presentado la delección 15q11-q13, confirmada mediante FISH, en ninguno de ellos se ha observado la delección citogenéticamente; cinco pacientes han presentado DUPmat (casos 50, 86, 96, 761 y 1241), siendo heterodisomías los casos 50 y 1241, de los demás se interpretaron los geles pero no se registraron los alelos; dos pacientes (851 y 1401) han presentado DI, tienen FISH normal, HBP en el estudio de microsatélites y un patrón de metilación SPW; en cinco pacientes se desconoce la etiología, tres (101, 1321 y 1471) con un patrón de metilación SPW y FISH normal, podrían tratarse de pacientes SPW causado por DUP o bien por DI, uno (30) con ausencia del alelo paterno para los marcadores D15S11 y GABRB3 y un patrón de metilación SPW podría tratarse de un caso de delección o DUP y uno (811) con solo un patrón de metilación SPW podría tratarse de delección, DUP o DI (Tabla 3.1.5).

**Tabla 3.1.5.** Frecuencia de las alteraciones moleculares en el SPW

Alteración molecular	Casos (35)	%
Delección paterna	28	80
Disomía materna	5	14,3
Defecto de impronta	2	5,7
Etiología sin determinar	5	

Los resultados obtenidos de los 151 pacientes con sospecha clínica de SPW y los seis líquidos amnióticos estudiados se desglosan en la tabla 3.1.6 en función de las técnicas moleculares empleadas para el diagnóstico. En 47 pacientes se ha realizado el diagnóstico utilizando una sola de las técnicas de análisis, en 45 se han utilizado dos de las técnicas, y en 65 se han aplicado todas. El resultado de las pruebas genéticas de cada paciente se recoge en la Tabla 3.1.7.

**Tabla 3.1.6.** Resultados genéticos globales del SPW

Análisis	Delección Paterna	Disomía Materna	Defecto Impronta	Sin etiología	Normal	Total
FISH	13	-	-	-	19 + 1 <sup>Prenatal</sup>	33
Microsatélites	-	-	-	-	1 + 5 <sup>Prenatal</sup>	6
Metilación	-	-	-	1	7	8
FISH + Microsatélites	4	4	-	-	-	8
FISH + Metilación	5	-	-	3	26	34
Microsatélites + Metilación	-	-	-	1	2	3
FISH + Microsatélites + Metilación	6	1	2	-	56	65
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>117</b>	<b>157</b>

**Tabla 3.1.7.** Resultado del estudio molecular en cada paciente SPW

Nº	Sexo	Citogenética	FISH	Microsatélites							Metilación		Ptos.
				11	210	113	GAB RB3	97	128	122	PW71B	KB17	
<b>Delección paterna</b>													
37	H		Del										7
38	H		Del										7.25
41	H		Del	NI									8
53	H		Del	Del		Del							9
67	H		Del	Del									7
74	V	47, XXY	Del										8
80	H		Del	NI									6.5
90	H		Del	NI		NI							7.5
121	H		Del										9
141	V		Del										11.5
161	V	46,XY	Del										8.75
191	H	46,XX	Del		NI				Del				12
251	H		Del										11.5
311	H	46,XX	Del					Del		PW (6.4 Kb)			11.5
411	V		Del										13
431	H		Del	NI	NI		NI	NI	Del		PW (4.3 Kb)		7
591	H		Del										6
611	H		Del					Del					6.75
701	V		Del	Del	NI			Del			PW (4.3 Kb)		9.5
841	V		Del		Del		Del	Del	NI		PW (8 Kb)		3.75
981	H		Del	NI	NI	NI	NI	NI	Del	NI	PW (8 Kb)		11
1141	H		Del	NI	Del		NI	NI			PW (6.4 Kb)		6.25
1251	V	46,XY	Del								PW (6.4 Kb)	PW (4.3 Kb)	9
1281	H		Del									PW (4.3 Kb)	6
1291	V		Del							PW (8 Kb)			8.5
1331	H		Del									PW (4.3 Kb)	9.5
1421	H	46,XX	Del										11.5
1451	H		Del									PW (4.3 Kb)	
<b>Disomía uniparental materna</b>													
50	H		Normal	NI		DM	NI	NI					7.75
86	H	46,XX	Normal	NI			NI		DM				4
96	V		Normal						DM				9.75
761	V		Normal	NI					DM				
1241	V		Normal	NI		DM	DM	NI	NI		PW (6.4 Kb)		8
<b>Defecto de impronta</b>													
851	H	46,XX	Normal	NI	HBP		HBP	NI	HBP		PW (6.4 Kb)	PW (4.3 Kb)	7
1401	H		Normal	HBP		NI	HBP		NI	HBP		PW (2 Kb)	5
<b>Etiología sin determinar</b>													
30	V			Del/ DM			Del/ DM			Del/ DM	PW (6.4 Kb)		6
101	V	46,XY	Normal								PW(6.4 Kb)		6.25
811	V										PW (8 Kb)		6

1321	H		Normal						PW (4.3 Kb)	
1471	H		Normal						PW (4.3 Kb)	7
FISH normal y/o HBP										
24	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	HBP	Normal (6.4Kb+4.4Kb)			7
49	F			HBP HBP	HBP HBP	NI				
56	V		Normal				Normal (6.4Kb+4.4Kb)			
57	H		Normal				Normal (6.4Kb+4.4Kb)			5
63	H		Normal							4
64	V		Normal	NI	NI	NI	HBP NI NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)		5
77	H		Normal	NI	HBP	NI	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)		6
83	F		Normal							
84	H		Normal				Normal (6.4Kb+4.4Kb)			5
93	H	46,XX	Normal	NI		HBP HBP HBP	Normal (6.4Kb+4.4Kb)			8
99			Normal				Normal (6.4Kb+4.4Kb)			5.5
111	V	46,XY	Normal	NI	NI	HBP HBP NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)			8
131	V		Normal	NI		HBP HBP NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)			8.5
151	H		Normal	HBP HBP	HBP HBP		Normal (6.4Kb+4.4Kb)			9.5
171	V	46,XY	Normal	NI	NI	HBP HBP HBP	Normal (6.4Kb+4.4Kb)			
181	V		Normal							6
201	H		Normal							
211	V		Normal	NI	NI	HBP NI NI NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)			8
221			Normal							
231	V	46,XY	Normal	HBP HBP	NI NI NI		Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)			6.5
241	H		Normal							4
261	H		Normal							5
271	V		Normal							4
291	V		Normal							4
301	H	46,XX	Normal	NI	HBP	NI NI NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)			
314	F			HBP NI	HBP NI					
321	H		Normal	NI NI NI	NI NI NI NI		Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)			8
331	H	46,XX	Normal							7
341	V		Normal	HBP	HBP	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)		8.5
361	H	46,XX	Normal				Normal (8Kb+6.4Kb)			7.5
371	V	46,XY	Normal	HBP NI	NI NI HBP		Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)			6
381	H		Normal							5
391	V		Normal							4
401	V		Normal							9
421	V		Normal							8
451	H		Normal				Normal (6.4Kb+4.4Kb)			7
461	H		Normal				Normal (8Kb+6.4Kb)			6.5
471	V		Normal	HBP HBP	NI HBP NI		Normal (6Kb+4.4Kb)			5.5
481	V		Normal							2
491	V						Normal(4.3Kb + 0.9Kb)			8
501	V	46,XY	Normal	NI	HBP	NI HBP NI	Normal (6Kb+4.4Kb)			3.5
511	V		Normal							8
521	H		Normal	NI		HBP NI NI NI	Normal (6Kb+4.4Kb)			4
531	V		Normal	HBP HBP	NI HBP NI		Normal (6Kb+4.4Kb)			4

Resultados

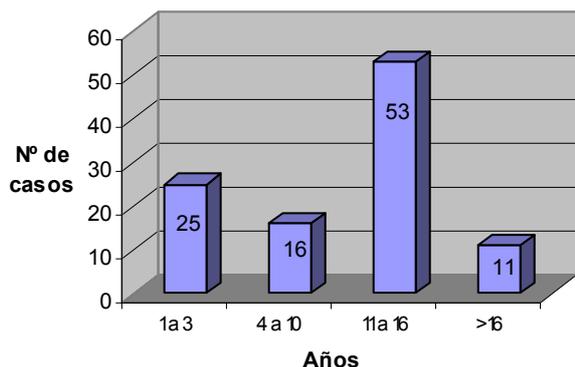
541	V	46,XY	Normal	NI	HBP	HBP	HBP	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	6
551	H		Normal	NI	HBP	HBP	HBP	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	6
561	V			NI	NI	HBP	NI	HBP		5
571	V		Normal		NI	HBP	NI	HBP	Normal(4.3Kb + 0.9Kb)	8
581	H		Normal	HBP	HBP	HBP	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	10
601	H	46,XX	Normal						Normal (6Kb+4.4Kb)	5
621	H		Normal	HBP	NI	NI	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	4
631	V		Normal	HBP	HBP	HBP	NI	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	3
641	V		Normal	NI	HBP	HBP	HBP		Normal (8Kb+6.4Kb)	6
651	H		Normal	NI	HBP	NI	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	8.5
661	V		Normal	HBP	NI	HBP	NI		Normal (8Kb+6.4Kb)	5.5
671	H	46,XX	Normal	NI	NI	NI	HBP	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	8.5
681	H								Normal (6Kb+4.4Kb)	6
691	H	46,XX	Normal	NI	HBP	NI	HBP	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	5
711	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	7.5
721	H	46,XX	Normal	NI	HBP	NI	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	4
731	H		Normal	HBP	NI	HBP	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	3
741	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	HBP	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	6
751	F			NI	HBP	HBP	NI	NI	HBP	
771	H	46,XX	Normal	NI	NI	NI	HBP	HBP	Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)	
781	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	HBP	Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)	5
791	H	46,XX	Normal						Normal (8Kb+6.4Kb)	
801	V	46,XY	Normal						Normal (8Kb+6.4Kb)	6.5
821	V		Normal							
831	V	46,XY	Normal	NI	NI	NI	HBP	HBP	Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)	9
861	V		Normal						Normal (8Kb+6.4Kb)	
871	V		Normal						Normal (8Kb+6.4Kb)	
881	V		Normal	NI	HBP	NI	HBP	HBP	Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)	6.5
891	V		Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	4.5
901	F			HBP	HBP	HBP	HBP			
911	H	46,XX	Normal	NI	NI	HBP	HBP	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	4.5
921	V	46,XY	Normal	NI	NI	NI	HBP	NI	Normal (6Kb + 4.4Kb) Normal (4.3Kb+0.9Kb)	6
931	H	46,XX	Normal						Normal (8Kb+6.4Kb)	6
941	V	46,XY	Normal	NI	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	6
951	V	46,XY	Normal	NI	NI	HBP	HBP	HBP	Normal (8Kb + 6.4Kb)	6
961	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	4
971	H		Normal	NI	HBP	HBP	HBP	NI	Normal (6.4kb+4.4Kb)	
991	H			HBP	NI	HBP	HBP	HBP	Normal (6.4Kb+4.4Kb) Normal (4.3Kb+0.9Kb)	6
1001	V		Normal	NI	NI	NI	NI	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	6.5
1011	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	5.5
1031	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	3
1041	H		Normal	HBP	NI	HBP	NI	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	7
1051	V	46,XY	Normal						Normal (8Kb + 6.4Kb)	
1061	H		Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	8.5
1071	F			HBP	HBP	HBP	HBP	HBP		
1081	H		Normal	NI	NI	HBP	NI	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1091	H		Normal	NI	NI	HBP	HBP	HBP	Normal (6.4Kb+4.4Kb) Normal (4.3Kb+0.9Kb)	

1101	H	46,XX	Normal					Normal (6.4Kb+4.4Kb)		
1111	V	46,XY	Normal	HBP	NI	HBP	NI	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1121	V	46,XY	Normal						Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1131	V		Normal	NI	HBP	HBP	HBP	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1151	V			NI				NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1161	V		Normal	HBP	NI	NI	HBP	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1171	V		Normal	NI		NI	HBP	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1181	V		Normal	NI		HBP	HBP	NI	Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1191	V	46,XY	Normal						Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1201	H		Normal							
1211	V		Normal							Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1221	V	46,XY	Normal						Normal (8Kb+6.4 Kb)	
1231	V								Normal (8Kb+6.4 Kb)	Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1261	V								Normal (6.4Kb+4.4Kb)	
1271	H		Normal							
1301	H		Normal							Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1311	H		Normal							Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1341	V		Normal							Normal (2 Kb+0.9 Kb)
1351	V									Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1371	H									Normal (2 Kb+0.6 Kb)
1381	V		Normal							Normal (2 Kb+0.9 Kb)
1391	V		Normal							Normal (2 Kb+0.6 Kb)
1411	H		Normal							
1431	H		Normal							Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1441	V	46,XY	Normal							Normal (4.3Kb+0.9Kb)
1461	V	46,XY	Normal							Normal (4.3Kb+0.9Kb)

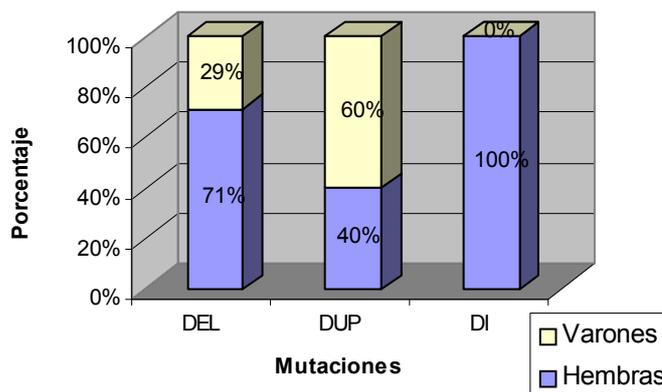
V: varón; H: hembra; F: feto; Del: deleción; DM: disomía materna; HBP: herencia biparental; NI: no informativo.

### 3.1.6. Valoración clínica

Se ha recogido el protocolo clínico a 108 de 151 pacientes con sospecha clínica de SPW. La edad media ha sido de 10 años [0.2 - 33] (Gráfica 3.1.1). El diagnóstico de SPW se ha confirmado en 40 pacientes (26 H y 14 V), representan el 26,5% de la población analizada. La distribución por sexos de cada etiología se observa en la Gráfica 3.1.2. Los pacientes con deleción han sido mayoritariamente hembras (20 H vs. 8 V), la DUP ha sido similar (2 H vs. 3 V) y los dos casos con DI han sido hembras.



Gráfica 3.1.1. Agrupación por edades



Gráfica 3.1.2. Relación mutación-sexo

La puntuación media de los pacientes con diagnóstico molecular de SPW obtenida con el test de Holm para las diferentes alteraciones ha sido de 8,1 [3,75 - 13] (Tabla 3.1.8).

Tabla 3.1.8. Puntuación según protocolo clínico en pacientes SPW

Alteración	Puntuación media	Rango
Deleción	8,7	[3,7 - 13]
DUPmat	7,4	[4 - 9,75]
Defecto de impronta	6	[5 - 7]
Etiología sin determinar	6,3	[6 - 7]

*Pacientes SPW menores de tres años*

Se han analizado nueve hembras y tres varones. La puntuación media ha sido de 6,2 [3,75-9]. En la Tabla 3.1.9 se han agrupado los pacientes para relacionar las manifestaciones clínicas con la etiología teniendo en cuenta los criterios mayores y menores. Todos los pacientes mostraron hipotonía, facies característica y retraso global del desarrollo.

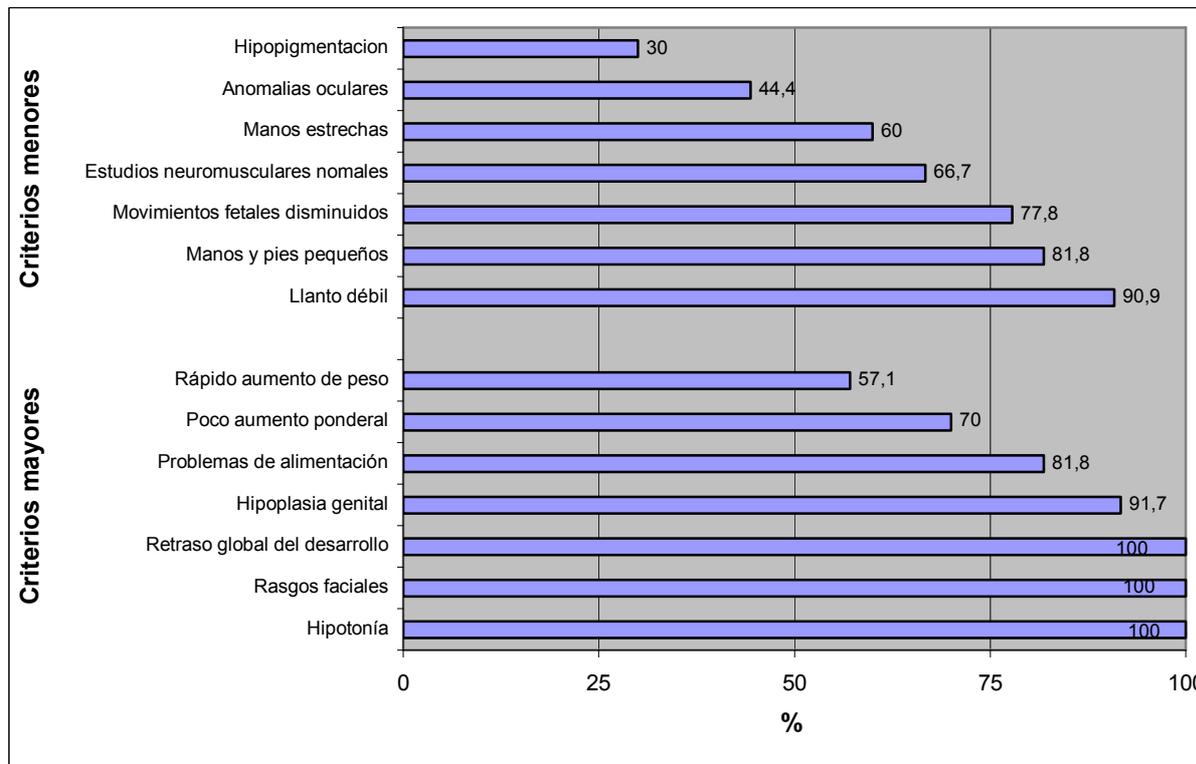
**Tabla 3.1.9.** Características clínicas antes de los 3 años de los pacientes SPW según la alteración molecular

Nº	Edad	Sexo	Criterios mayores						Criterios menores						Puntuación	Alteración		
			Hipotonia	Problemas de alimentación	Poco aumento ponderal	Facies característica	Hipoplasia genital	Retraso global del desarrollo	Rápido aumento de peso	Llanto débil < 6 meses	Movimientos fetales disminuidos	Hipopigmentación	Manos y pies pequeños	Manos estrechas			Anomalias oculares	Estudios neuromusculares
38	1,8	H	s	s	s	m	s	s	n	s	m	n	s		s	7,25	Del	
41	1,9	H	s	m	m	s	s	s	s	s	s	n	s	n	s	8	Del	
*53	1	H	s	s	s	s	s	s	s	s	s	n	s	s	n	n	9	Del
*431	0,2	H	s	s	s	s	s		n	s		s	s	s			7	Del
591	0,2	H	s	s	s	m	n	s		s	s				s		6	Del
*611	0,3	H	s	m	n	s	s	s		s	m	m	m	s	n	s	6,75	Del
841	1,2	V	s	n	n	s	m	m	n	m	m	n	n	m			3,75	Del
1141	1	H	s	m	s	s	s	s		s	n	n	s	n	m		6,25	Del
1281	0,5	H	s	s	s	m	s	s		n		s	s	n	n	n	6	Del
86	2,8	H	s	n		m	s		s	m	n	n	n	m	n		4	DM
101	0,8	V	s	s	n	m	s	s		s	s	n	m	n	n	s	6,25	SPW
811		V	s			m	s	s	s				m	m	s	s	6	SPW
<b>n/N</b>			12/12	9/11	7/10	12/12	11/12	10/10	4/7	10/11	7/9	3/10	9/11	6/10	4/9	4/6	<b>Media = 6,2</b>	
<b>%</b>			100	81,8	70	100	91,7	100	57,1	90,9	77,7	30	81,8	60	44,4	66,6	<b>[3,75-9]</b>	

V: varón; H: hembra; s: sí; n: no; m: moderado; en blanco: no registrado; Del: delección;

DM: disomía materna; \*: valorados por la CONGE; n/N= nº de casos que presentan un criterio / nº total de casos

En la Gráfica 3.1.3 se representan los criterios mayores y menores ordenados según su frecuencia.



**Gráfica 3.1.3.** Frecuencia de las características clínicas en los pacientes SPW menores de tres años

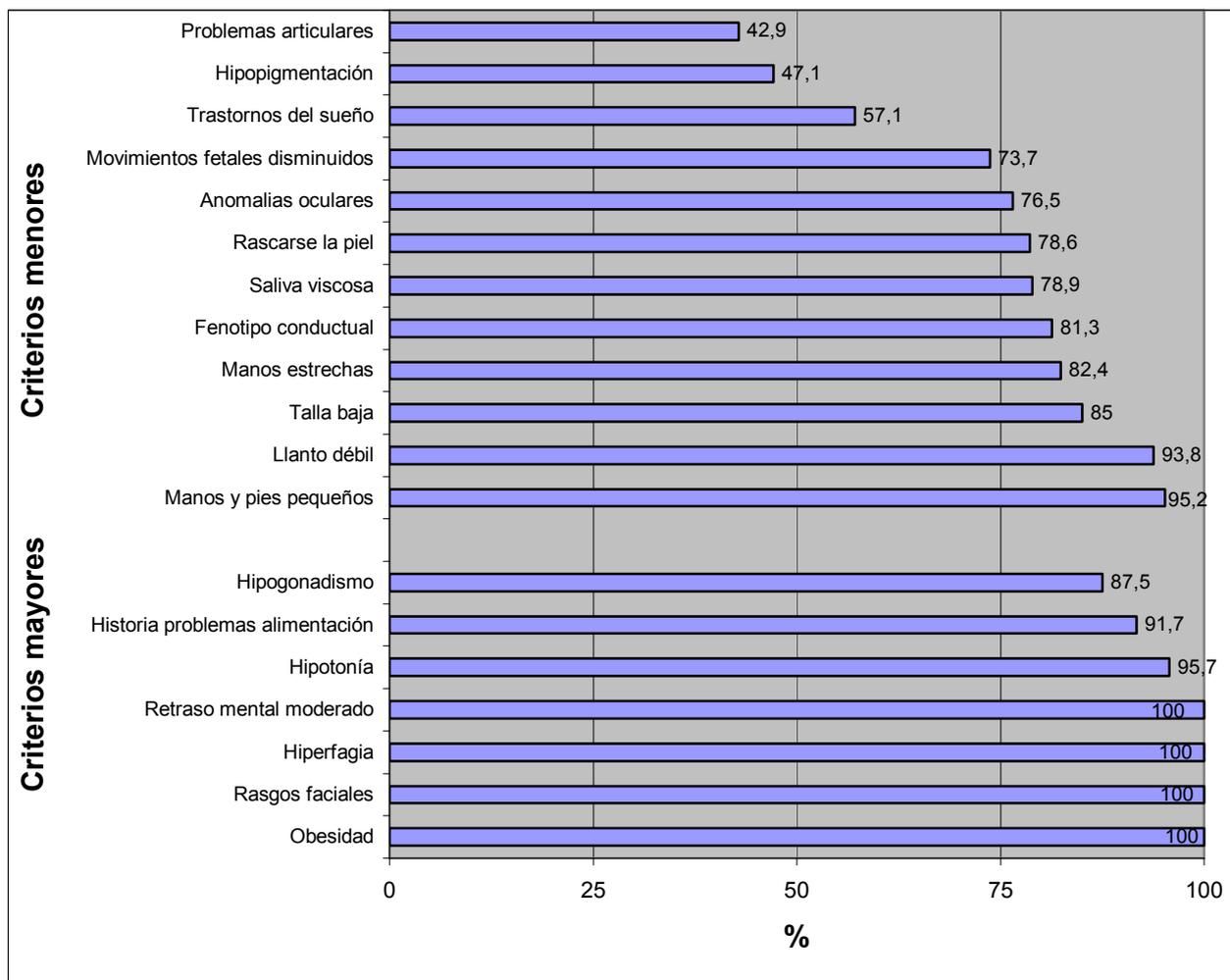
*Pacientes SPW mayores de tres años*

Se han analizado 17 hembras y 11 varones con una edad media de 12 años [3,4-33]. La puntuación media ha sido de 8,7 [5-13]. Los pacientes se han agrupado para relacionar las manifestaciones clínicas con la etiología teniendo en cuenta los criterios mayores y menores (Tabla 3.1.10). Todos los pacientes han manifestado hiperfagia, obesidad, retraso mental moderado y rasgos faciales característicos, observándose en más del 90%, hipotonía, historia de problemas de alimentación, manos y pies pequeños y llanto débil (Gráfica 3.1.4).

**Tabla 3.1.10.** Características clínicas a partir de los 3 años de los pacientes SPW según la alteración molecular

Nº	Edad	Sexo	Criterios mayores						Criterios menores											Puntuación	Alteración			
			Hipotonía adulto	Historia problemas alimen	Obesidad	Rasgos faciales	Hipogonadismo	Retraso mental moderado	Hiperfagia	Movimientos fetales dism	Llanto débil <6 meses	Trastorno del sueño	Fenotipo conductual	Talla baja	Hipopigmentación	Manos y pies pequeños	Manos estrechas	Anomalías oculares	Saliva viscosa			Problemas articulares	Rascarse la piel	
*311	3,4	H	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	n	s	n	s	s	s	s	s	s	n	11,5	Del
90	5	H	s	s	s	s		s	s	n	s	n	n		n	n		s	s				7,5	Del
*981	5,6	H	s	s	s	m	s	s	s	s	s	s	s	s	s	n	m	m	n	s			11	Del
*1331	6	H	s	s	s	s	s	s		s		n		s			s	s					9,5	Del
1421	12	H	s	s	s	s	n	s	s	s	s	s	s	m	m	s	s	s	s	s	s	s	11,5	Del
74	12	V	s	n	s	s	s	s	s	n		s	s	n	n	s	n	n	n	n	s		8	Del
*701	12	V	s	s	s	s	s	s	s	s	s		s	s	s	s	s	s	n	n	s		11,5	Del
1251	12	V	s	s	s	s	s	s	s	n	s	n	n	m	s	s	s	s	n	n	m		10	Del
*141	13,4	V	s	s	s	s	s	s	s	s	s		m	s	s	s	s		s	n	s		11,5	Del
*411	14	V	s	s	s	s	s	s	s	s	s		s	s	s	s	s	s	s	s	n		13	Del
251	14,8	H	s	s	s	s	s	s	s			s	s	s	s	s	s	s	s	s			11,5	Del
191	16	H	s	s	s	s	s	s	s	s	s	n	s	s	n	s	n	s	s	n	s		12	Del
67	17	H	s	s	s	s	s	s	s														7	Del
1291	18	V	n	s	s	s	s	s	s				s	s	s	s	n	n	n	n			8,5	Del
1451	20	H																						Del
37	25,5	H	s	s	s	s	s	s	s														7	Del
161	30,4	V	s	s	s	s	s	s		m	m	n	m	n	n	m	m	s	s	m	m		8,75	Del
80	33	H		s	s	s	s	s	s					s									6,5	Del
121		H	s	s	s	s		s	s	n		n		s		s		s		s			9	Del
851	5,4	H	s	s		s	n			s	s				n	s	s	n					5	DI
1401	29	H			s		s		s	s			s	n	s	s	n	s					7	DI
50	3,3	H	s	n	s	s	s	s	s	s	n		m	s		s		s					8,5	DM
*1241	11	V	s	s			s	s		s	s	s		s		s	s		s		s		8	DM
96	17	V	s	s	m	s	s	s	s	n	s	m	m	m	n	m	m	s	s	n	s		9,75	DM
761		V																						DM
30	13,7	V	s	s	s	s	n	s	s						n								6	SPW
*1471	10	H	s	s			s			s	s	s	s	n		s	s		s		s		7	SPW
1321		H																						SPW
<b>n/N</b>			22/23	22/24	22/22	23/23	20/23	23/20	20/20	14/19	15/16	8/14	13/16	17/20	8/17	20/21	14/17	13/17	15/19	6/14	11/14	<b>Media = 8,7</b>		
<b>%</b>			95,7	91,7	100	100	83	100	100	73,7	93,8	57,1	81,3	85	47,1	95,2	82,4	76,5	78,9	42,9	78,6	<b>[5-13]</b>		

V: varón; H: hembra; s: sí; n: no; m: moderado; en blanco: no registrado; Del: delección; DM: disomía materna; DI: defecto de impronta; \*: valorados por la CONGE; n/N= nº de casos que presentan el criterio / nº total de casos



**Gráfica 3.1.4.** Frecuencia de las características clínicas en los pacientes SPW mayores de tres años

### 3.1.7. Relación genotipo-fenotipo

En la Tabla 3.1.11 se observa la frecuencia con la que se manifiestan cada uno de los rasgos, antes y después de los tres años, según la alteración molecular en la población afecta.

**Tabla 3.1.11.** Frecuencia de las características clínicas de los pacientes SPW

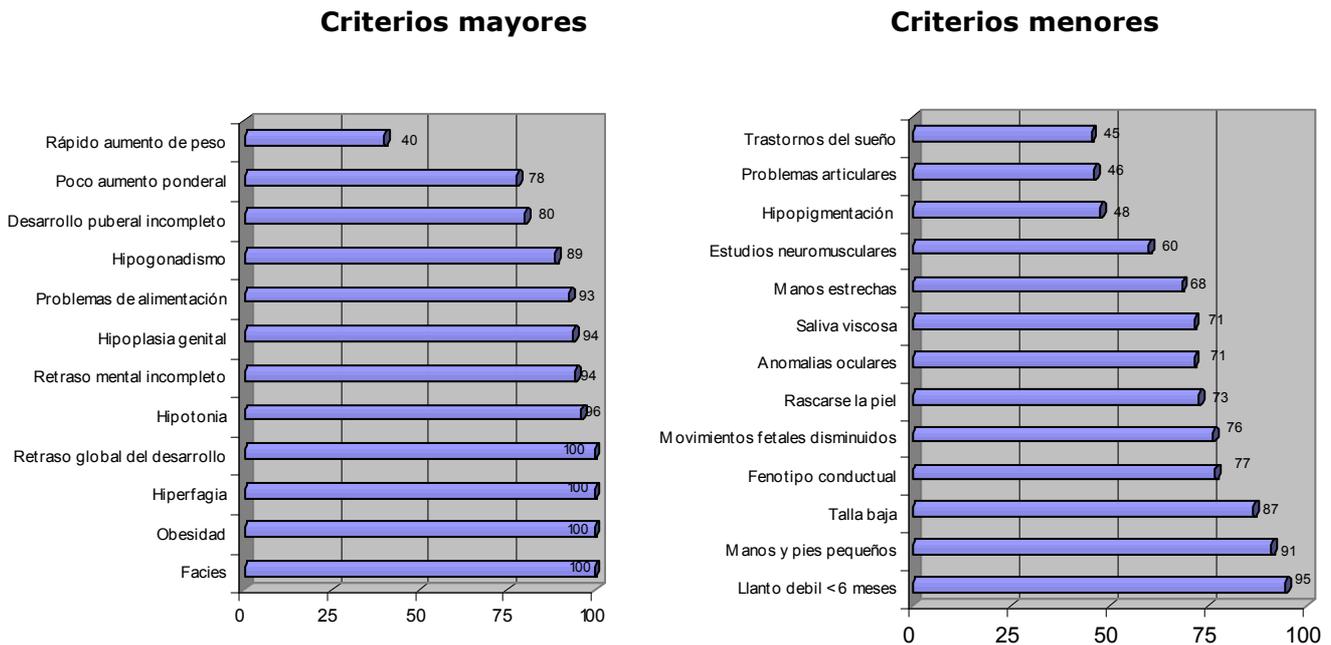
	Deleción Paterna		Disomía Materna		Defecto de impronta		Etiología sin determinar		Total	
	(28)		(5)		(2)		(5)		(40)	
CRITERIOS MAYORES	%	n / N	%	n / N	%	n / N	%	n/N	%	n / N
D Hiperfagia	100	17 / 17	100	2 / 2	100	1 / 1	0	0 / 0	100	20 / 20
C Hipotonía	96	26 / 27	100	4 / 4	100	2 / 2	100	3 / 3	97	35 / 36
C Facies característica	100	28 / 28	100	3 / 3	100	1 / 1	100	2 / 2	100	34 / 34
D Obesidad	100	19 / 19	100	2 / 2	100	1 / 1	0	0 / 0	95	22 / 23
D Retraso mental moderado	100	19 / 19	100	3 / 3	0	-	100	1 / 1	100	23 / 23
A Retraso global del desarrollo	100	7 / 7	-	-	50	1 / 2	100	2 / 2	91	10 / 11
C Problemas de alimentación	93	26 / 28	50	2 / 4	100	2 / 2	100	2 / 2	89	32 / 36
A Hipoplasia genital	88	23 / 26	100	4 / 4	50	1 / 2	100	1 / 1	88	29 / 33
D Hipogonadismo	80	4 / 5	-	-	50	1 / 2	-	-	71	5 / 7
A Rápido aumento de peso	40	2 / 5	100	1 / 1	50	1 / 2	100	1 / 1	55	5 / 9
A Poco aumento ponderal	78	7 / 9	0	0 / 1	0	0 / 2	0	0 / 1	54	7 / 13
CRITERIOS MENORES										
C Llanto débil	95	18 / 19	75	3 / 4	100	2 / 2	100	2 / 2	93	25 / 27
C Manos y pies pequeños	91	21 / 23	75	3 / 4	100	2 / 2	100	3 / 3	91	29 / 32
D Fenotipo conductual	77	10 / 13	100	2 / 2	0	0 / 0	100	1 / 1	81	13 / 16
D Talla baja	87	13 / 15	66	2 / 3	100	1 / 1	0	0 / 1	80	16 / 20
D Saliva viscosa	71	10 / 14	100	3 / 3	100	1 / 1	100	1 / 1	79	15 / 19
D Rascarse la piel	73	8 / 11	100	2 / 2	0	0 / 0	100	1 / 1	79	11 / 14
C Movimientos fetales disminuidos	75	15 / 20	50	2 / 4	100	2 / 2	100	2 / 2	75	21 / 28
C Manos estrechas	68	13 / 19	100	3 / 3	100	2 / 2	66	2 / 3	74	20 / 27
C Anomalías oculares	75	15 / 20	50	1 / 2	0	0 / 2	50	1 / 2	65	17 / 26
A Estudio neuromuscular normal	50	2 / 4	0	0	50	1 / 2	100	2 / 2	62	5 / 8
D Trastorno del sueño	45	5 / 11	100	2 / 2	0	0 / 0	100	1 / 1	57	8 / 14
D Problemas articulares	46	6 / 13	0	0 / 1	0	0 / 0	-	-	43	6 / 14
C Hipopigmentación	57	8 / 14	0	0 / 2	0	0 / 2	0	0 / 1	42	8 / 19
Puntuación media	8,7		7,4		6		6,3		8,1	
Rango	[3,75- 13]		[4- 9,75]		[5- 7]		[6- 7]		[3,75- 13]	

A: antes de los 3 años; D: después de los 3 años; C: común en los dos periodos; n/N= nº de casos que cumplen el criterio / nº total de casos que cumplen el criterio

**3.1.7.1. Pacientes con delección**

Los criterios mayores más frecuentes en los 28 pacientes con delección (20 hembras y 8 varones) han sido: retraso global del desarrollo, hiperfagia, obesidad, retraso mental moderado y rasgos faciales característicos. Entre los criterios menores, los más frecuentes han sido llanto débil (95%), manos y pies pequeños (91%) y talla baja (87%)(Tabla 3.1.11).

En la Gráfica 3.1.5 se han representado los criterios mayores y menores ordenados según su frecuencia.



**Gráfica 3.5.** Frecuencia de los criterios mayores y menores en los pacientes SPW con delección

*Relación por sexo*

La puntuación media ha sido similar en ambos sexos, (8,4 H vs. 8,9 V), siendo frecuente en las hembras: hipotonía, desarrollo puberal incompleto, retraso mental moderado e hiperfagia, y en los varones: obesidad, hiperfagia y rasgos faciales (Tabla 3.1.10).

*Relación por edad*

La mayoría de los pacientes menores de 3 años han sido hembras (8/9). La edad ha estado comprendida entre 0,2 y 1,9 años siendo la media 0,9. La puntuación media recogida en el protocolo clínico ha sido de 6,7 [3,75-9] presentando la mayoría cinco de los criterios mayores (Tabla 3.1.9). Solo el paciente 841 ha presentado una puntuación inferior a la esperada (3,75 pts.), coincide con el único varón y presenta una expresión clínica moderada. Aún así presenta rasgos típicos como la hipotonía y facies característica fundamentales para el diagnóstico. Todos

los pacientes han presentado hipotonía, facies característica y retraso global del desarrollo. Los problemas de alimentación y el poco aumento ponderal también ha sido generalizado salvo en los pacientes 611 y 841. Los movimientos fetales disminuidos junto con el llanto débil y manos y pies pequeños los han presentado el 85%. La hipopigmentación sin embargo se ha observado tan solo en 3/8 (37,5%).

Los pacientes con delección mayores de 3 años han sido siete varones y 12 hembras de edades comprendidas entre los 3,4 y 33 años siendo la media 15. Han presentado una puntuación media de 9,7 [6,5-13], estando presentes más de cinco criterios mayores (Tabla 3.1.10). Todos han manifestado obesidad, hiperfagia y rasgos faciales característicos. El retraso mental moderado está presente en 17/18 (94,4%) y el hipogonadismo y la hipotonía en 16/17 (94,1%). Los criterios menores más frecuentes han sido el llanto débil 10/10 (100%), manos y pies pequeños 14/15 (93,3%), talla baja 13/15 (86,7%) y anomalías oculares 12/14 (85,7%). Presentan hipopigmentación 8/13 (61,5%). Los rasgos menos frecuentes han sido los trastornos del sueño 5/11 (45,5%) y los problemas de articulación 6/13 (46,2%).

### **3.1.7.2. Pacientes con disomía uniparental**

Los criterios más frecuentes observados en los cinco pacientes con DUP han sido, hipotonía (4/4), hipoplasia genital (4/4), retraso mental moderado (3/3), rasgos faciales característicos (3/3), hiperfagia (2/2) y obesidad (2/2). El aumento ponderal en la infancia ha sido normal y no presentan hipopigmentación, ni problemas articulares (Tabla 3.1.9 y Tabla 3.1.10).

#### *Relación por sexo*

La puntuación media ha sido de 7,4 [4-9,75] observándose que la puntuación media es superior en los varones 8,9 vs. 5,9 en hembras.

#### *Relación por edad*

Menores de 3 años solo está la paciente 86, diagnosticada a los 2,8 años. Manifestó hipotonía, hipoplasia genital y rápido aumento de peso. La apariencia facial fue moderada. El estudio molecular permitió confirmar la sospecha inicial del síndrome en esta paciente a pesar de presentar un fenotipo moderado (Tabla 3.1.9).

De los cuatro pacientes mayores de tres años solo se remitió el protocolo clínico de tres de ellos (Tabla 3.1.10). La puntuación media ha sido de 8,5. Manifestaron hipotonía, hipogonadismo, retraso mental moderado, talla baja, manos y pies pequeños y saliva viscosa. No se observó hipopigmentación ni problemas articulares.

### **3.1.7.3. Pacientes con defecto de impronta**

Los dos únicos pacientes con DI han sido hembras y han manifestado las características clínicas esperadas correspondientes al síndrome (Tabla 3.1.10).

La paciente 851 de 5,4 años presentó hipotonía, rasgos faciales característicos, historia de problemas de alimentación, movimientos fetales disminuidos y llanto débil, pero no manifestó hipogonadismo ni hipopigmentación. Es de destacar que no presentó obesidad.

La paciente 1401 de 29 años presentó obesidad, hiperfagia, hipogonadismo, talla baja, manos y pies pequeños, movimientos fetales disminuidos y llanto débil. No presentó hipopigmentación. La ausencia de hipopigmentación es una característica normal entre los pacientes con DI.

### **3.1.7.4. Pacientes SPW sin etiología determinada**

Los dos pacientes menores de tres años presentaron hipotonía, hipoplasia genital y retraso global del desarrollo. La apariencia facial fue moderada. No presentaron hipopigmentación (Tabla 3.1.9).

Solo se registró la clínica de dos de los tres pacientes mayores de 3 años. Ambos presentaron hipotonía e historia de problemas de alimentación (Tabla 3.1.10).

### **3.1.8. Análisis estadístico**

Se ha aplicado el test de Fisher para comparar si hay diferencias en las características clínicas según la etiología y según el sexo. Para las características analizadas no se han observado diferencias estadísticamente significativas, solo se han observado diferencias en problemas de alimentación, siendo más frecuentes en los pacientes con delección (87% vs. 12,9%,  $p= 0,070$ ).

### 3.2. Síndrome de Angelman

Se han estudiado 147 pacientes con sospecha clínica de SA, 83 varones y 64 hembras, y dos líquidos amnióticos.

#### 3.2.1. Análisis citogenético

El cariotipo con bandas G se ha realizado en 63 pacientes detectándose seis alteraciones cromosómicas (Tabla 3.2.1), sin embargo, la deleción observada en el paciente 421 no se observó mediante FISH (falso positivo). El cariotipo con deleción se observa en la Figura 3.2.1. De los 57 pacientes con cariotipo normal 15 presentaron la deleción mediante FISH (falsos negativos).

**Tabla 3.2.1.** Alteraciones cromosómicas en el SA

Caso	Cariotipo
281	46,XX,del(15)(q12)
421	46,XX,del(15)(q12)
1041	46,XX,del(15)(q12)
97	45,XY,t(15;15)
341	45,XY,t(15;15)
791	46,XY,t(2;12)(q14.2;q15)



**Figura 3.2.1.** Cariotipo 46,XX,del(15)(q12) mediante bandas G

### 3.2.2. Estudio mediante hibridación *in situ* fluorescente

La técnica de FISH se ha realizado en 140 casos correspondiendo dos de ellos a un diagnóstico prenatal. La presencia de delección se ha observado en 39 pacientes (21 varones y 18 hembras). Los dos casos de diagnóstico prenatal han sido normales.

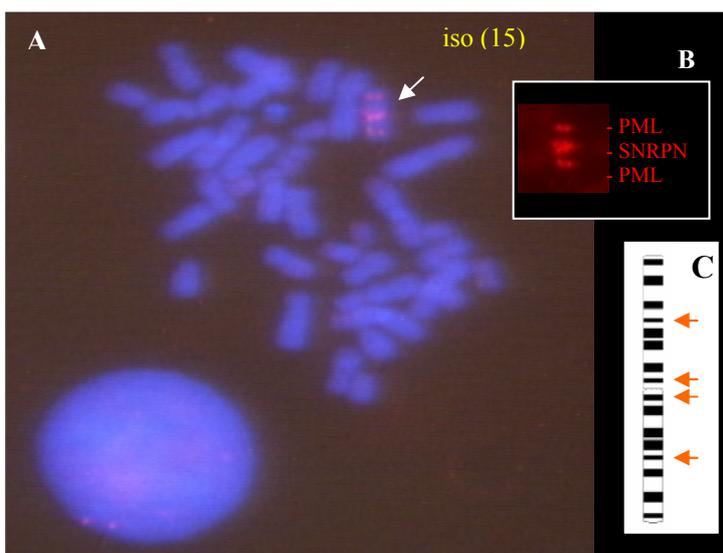
Los casos 97 y 341 con t(15;15) observada por citogenética no presentaron la delección (Fig. 3.2.2). Los casos 281 y 1041 con del(15)(q12) observada citogenéticamente se confirmó mediante FISH, no así el caso 421, que presentó un resultado normal. En 15 casos con estudio citogenético normal se ha confirmado la delección mediante FISH (falsos negativos).

El resultado del análisis mediante FISH se recoge en la Tabla 3.2.2, algunos pacientes han sido valorados con sondas ONCOR, otros con sondas Vysis y otros con ambas. Los pacientes que han sido estudiados empleando ambas sondas han dado un resultado concordante, a excepción del paciente 291 en que la sonda D15S11 de ONCOR llevó a un error de interpretación.

**Tabla 3.2.2.** Diagnóstico mediante FISH en pacientes SA

Sondas	Análisis realizados	Normales	Delección
ONCOR	D15S11	9	5
	GABRB3	11	5
Vysis	D15S10	122	34
	SNRPN	112	27
<b>Pacientes analizados:</b>		<b>140*</b>	<b>39*</b>

\*El número de pacientes analizados no corresponde con la sumatoria de las columnas porque algunos pacientes fueron estudiados con varias de las sondas.



**Figura 3.2.2.** Isocromosoma 15 observado mediante FISH con la sonda SNRPN. Se observa una señal intensa para la sonda SNRPN (15q11-q13) intercalada entre dos señales distales para la sonda PML (15q22) ambas en rojo. No se observa señal verde correspondiente a la sonda D15Z1 (15q11.2). A) Filtro triple, B) Filtro *SpectrumOrange*, C) Idiograma

### 3.2.3. Análisis de microsatélites

Se ha realizado en 95 familias siendo 91 informativas, 28 presentaron ausencia del alelo materno, en 20 fue por delección confirmada mediante FISH, en cuatro por DUPpat descartando la delección mediante FISH y en cuatro no se determinó la etiología al no realizarse la FISH. Presentaron HBP para los distintos marcadores 63 familias (Tabla 3.2.3).

**Tabla 3.2.3.** Estudio de microsatélites en pacientes SA

Nº	H P M	11	H P M	210	H P M	113	H P M	GABR B3	H P M	97	H P M	128	H P M	122
<b>Pacientes con ausencia del alelo materno: delección materna o disomía paterna</b>														
48	ad ad bc		DP					DP						
29			NI					NI					Del/DP	
35	b ab b		NI			ab ab bc		NI			b b ac		Del/DP	
38			Del/DP					Del/DP					NI	
44			Del/DP					Del/DP		Del/DP				Del/DP
97												a ab bc		Del/DP
221			b bc ac						a ab b			Del/DP	c ac bd	Del/DP
251			NI					NI						Del/DP
271	b ab b		NI	a a ab			c cd ab	Del/DP	a a a		NI	c ac bc		NI
281	b ab a		Del/DP	a a ab			a ac bc	Del/DP	a ab ac		NI	a a a		NI
321	a a b		Del/DP	a a ab			a ac bc	Del/DP	a ab ab		NI	b ab b		NI
341								NI				b ab a		Del/DP
411	b ab a		Del/DP	b b a			a ab a	NI	a a a		NI	b b ab		NI
501												c bc a		Del/DP
571			b ab a						a ab a		NI	a a b		Del/DP
591	a a a		NI	b b ac			a a ab	NI	a ab b		Del/DP		ab b ab	NI
641												b ab a		Del/DP
661												a ac b		Del/DP
711	a a a		NI	a ab ac			b b ac	Del/DP	b ab bc		NI	a a b		Del/DP
741	a ab a		NI	a a ab			a ac bc	Del/DP	b ab b		NI	a a a		NI
801									b ab a		Del/DP	a a a		NI
811												a ab b		Del/DP
841			a ac bd				b ab a	Del/DP	a a a		NI	a a ab		NI
1041	b b a		Del/DP				a a ab	NI	b ab a		Del/DP	c c ab		Del/DP
1071	a a ab		NI	a ab ab			a ac ab	NI	a a bc		Del/DP	b ab bc		NI
1101	a a ab		NI	b bc ab			a ac bc	Del/DP	a a ab		NI	b bc ab		NI
1121			a a ab				b ab bc	NI	a a b		Del/DP	b b a		Del/DP
1161	a a a		NI	b ab ac			a ab ac	NI	c bc ac		NI	a ac ab		NI
<b>Pacientes con alelos paterno y materno: herencia biparental</b>														
12			NI											HBP
19	a a a		NI	ab b ac			bc bc ab	HBP	ac ab cd		HBP	ab bd ac		HBP
22			NI								NI			HBP
171	a a a		NI	a ab a			ab a ab	HBP	b ab b		NI	ac bc ab		HBP
241			HBP					HBP						NI
261	ab ab a		HBP	ab ab a			a a ab	NI	bc ab cd		HBP	ab ab ab		NI
291	bc ab ac		HBP	ac ac ab			b b ab	NI	a a a		NI	ab b a		HBP
294	ac ab ac		HBP	ac ac ab			b b ab	NI	a a a		NI	ab b a		HBP
301	a ab a		NI	ab ab a			ab bc a	HBP	a a ab		NI	a ab ab		NI
													ab	ab

Resultados

401	b ab ab	a a a	NI	ac ab c	HBP	ac ab bc	HBP	a ab a	NI					
431	ab ac b	HBP	ab ab a	NI	ab bc a	HBP	a a a	NI	a a a	NI				
441	ac bc a	HBP	ad bd ac	HBP	ab a b	HBP	a a ab	NI	ab ac ab	HBP				
451	a ab a	NI	ab ab b	HBP	ac ac ab	NI	ab ab a	NI	ab a ab	HBP				
481	a - a	NI	a a a	NI	a a a	NI	a a ab	NI	ab b a	HBP				
491	ab a b	HBP	bd bc ad	HBP	ac bc a	HBP	bc ab bc	HBP	ac ab ac	HBP				
511	a ab	NI	a a	NI	ac ab	HBP	ab ab	NI	ab bc	HBP				
521	a a	NI	ab a	HBP	a a	NI	a a	NI	ab ab	HBP				
541	ab bd ac	HBP	ac ac bc	HBP	bd ad bc	HBP	ab ac bc	HBP	b ab bc	NI				
551	ab a ab	HBP	bc ab ac	HBP	ab ab ab	NI	ab ab ac	HBP	ac ab ac	HBP				
561	a a a	NI	ab a b	HBP	ab ac ab	HBP	a ab a	NI	ac cd ab	HBP				
581	a a	NI	a a	NI	ab a	HBP	a ab	NI	a ab	NI				
611	ab ab ab	NI	a ab a	NI	a a ab	NI	a a a	NI	ab a b	HBP				
621	ab a ab	HBP	ab a b	HBP	ab a b	HBP	ab ab a	HBP	ac ad bc	HBP				
631	a ab a	NI	ab bc ac	HBP	ab a b	HBP	a a a	NI	a ac ab	NI				
671	ab a b	HBP	bd bc ad	HBP	a ab a	NI	ab ab bc	HBP	ab ac bc	HBP				
681	ab a ab	HBP	ab a b	HBP	b ab ab	NI	b ab b	NI	a ac ab	NI				
691	b ab ab	NI	ab a ab	HBP	ab ab a	HBP			b ab b	NI				
701	a a ab	NI	bc bd ac	HBP	a ab ac	NI			ab a b	HBP				
731	a ab a	NI	b bc ab	NI	bc ac b	HBP	bc ac bc	HBP	ac ab bc	HBP	a a a	NI		
734	ab ab a	HBP	ac bc ab	HBP	ab ac b	HBP	bc ac bc	HBP	b ab bc	NI	a a a	NI		
751	a a a	NI	a a a	NI	c ac bc	NI	ab ab ac	HBP	ab a ab	HBP				
761	ab ab a	HBP	a ab a	NI	ab ac ab	HBP	a ab ac	NI	a ab a	NI	a a a	NI	bc ac ab	HBP
771	ab ac b	HBP	ab ac b	HBP	a a a	NI	ad bd ac	HBP	bc ac b	HBP				
781	ab a ab	HBP	b bc ab	NI	ab ab ab	NI	a a a	NI	a a a	NI				
791	ac ac ab	HBP	b ab b	NI	bc ac ab	HBP	bc ab ac	HBP	ac ab c	HBP				
821	a ab ab	NI	a ab ab	NI	ac bc ac	HBP	ac ab c	HBP	ab a bc	HBP				
831	ab ac ab	HBP	a a a	NI	bc b ac	HBP	b b ab	NI	ab a b	HBP				
851	a a a	NI	ab bc ad	HBP	ab a b	HBP	a a ab	NI	a ab a	NI				
871	ac bc a	HBP	ab bc a	HBP	ab bc ac	HBP	ac bc ad	HBP	ab ac b	HBP				
881	ab ab a	HBP	bc ac bc	HBP	ab ad bc	HBP	ab b a	HBP	a a a	NI				
891	a a ab	NI	bd cd ab	HBP	bc bd ac	HBP	b ab bc	NI	ab ac b	HBP				
901	ab ab	NI	ab bc	HBP	a ab	NI	ab a	HBP	b ab	NI				
921	b b ab	NI	ac ab cd	HBP	cd bc ad	HBP	a a ab	NI	ab ac b	HBP				
931	bc cd ab	HBP	ab ac ab	HBP	bc bc ac	HBP			bc ac b	HBP				
941	ab a ab	HBP	b ab ab	NI	bc bc ab	HBP	bc cd ab	HBP	ac ab c	HBP				
951	ab ac ab	HBP	ab a ab	HBP	a ac ab	NI	ab ab a	HBP	ab a bc	HBP				
961	a a a	NI	ab a ab	HBP	ac bc ab	HBP	bc ab cd	HBP	ab ac bd	HBP				
981	bc ab c	HBP	ab ad bc	HBP	a a a	NI	ac bc a	HBP	bc ac bd	HBP				
991	ac bc ad	HBP	ab ab ac	HBP	ab b a	HBP	a a a	NI	ac bc ab	HBP				
1001	ab bc ab	HBP	a ab ab	NI	ab a ab	HBP	ab ab ab	NI	a a a	NI				
1011	bd bc ad	HBP	a ab ab	NI	ab ac ab	HBP	bc ac b	HBP	cd ac bd	HBP				
1021	a a	NI	a a	NI	a ab	NI	b ab	NI	ab bc	HBP				
1031	a ab a	NI	b ab ab	NI	ab ab a	HBP	a ab a	NI	ab ab a	HBP				
1051	ab bc a	HBP	ac bc a	HBP	bc ac ab	HBP	ad cd ab	HBP	ab ac ab	HBP				
1061	a a a	NI	bc ab c	HBP	ac ac ab	HBP	ab bc ac	HBP	bc cd ab	HBP				
1081	ac bc a	HBP	ab b ac	HBP	b ab b	NI	ac ab ac	HBP	b ab b	NI				
1091	b ab b	NI	ab ad bc	HBP	ac ab ac	HBP	b bc ab	NI	bc bc ab	HBP				
1111	a a ab	NI	a a a	NI	ab ab a	HBP	ab b a	HBP	ab bc ab	HBP				
1131	ab bc	HBP	ab bc	HBP	ac ab	HBP	b ab	NI	a a	NI				

1141	ab	a	ab	HBP	a	ab	ac	NI	a	ac	ab	NI	b	ab	b	NI	b	ab	b	NI
1151	a	a	a	NI	ab	a	ab	HBP	bc	ab	ac	HBP	a	a	a	NI	b	b	ab	NI
1171	a	a	ab	NI	ac	a	bc	HBP	ac	ab	ac	HBP	ab	ab	a	HBP	ab	ab	b	HBP

**Pacientes no informativos y/o con estudio incompleto**

10	NI				NI										
27	NI														
41	NI				NI										
651	ab	ab	NI	a	a	NI	a	ab	NI	a	a	NI	b	ab	NI

P: padre; M: madre; H: hijo; Del/DP: deleción o disomía paterna; HBP: herencia biparental; NI: no informativo.

La informatividad de los microsatélite se recoge en la Tabla 3.2.4.

**Tabla 3.2.4.** Diagnóstico mediante estudio de microsatélites

	D15S11	D15S210	D15S113	GABRB3	D15S97	D15S128	D15S122	Total
Del M / DP	7	6	0	11	7	14	1	28
HBP	31	38	3	39	26	40	2	63
NI	44	30	1	32	42	35	2	4
<b>Informatividad</b>	46,3	59,5	75	61	44	60,7	60	

Del M/ DP: Deleción materna o Disomía paterna; HBP: Herencia biparental; NI: No informativo.  
 Informatividad = (Nº de casos positivos / Nº de casos totales)×100

En la Figura 3.2.3 se observa el resultado del análisis de microsatélites en dos casos.



**Figura 3.2.3.** Resultado del análisis de microsatélites para el marcador D15S128 en un caso de deleción 15q11-q13 de origen materno o isodisomía paterna y un caso no informativo. h: hijo; p: padre; m: madre

### 3.2.4. Análisis de metilación

Se ha confirmado el SA en 17 de los 97 pacientes analizados mediante *Southern blot*. La región D15S63 se ha analizado en 79 casos con la sonda PW71B, en 15 se ha analizado la región del exón 1 del gen SNRPN con la sonda KB17 y en tres se han analizado las dos regiones (Tabla 3.2.5).

**Tabla 3.2.5.** Diagnóstico mediante análisis de metilación

Sonda	Enzimas	Análisis realizados	Normales	SA
PW71B	HindIII+HpaII (6,4kb + 4,4kb)	52	45	7
	BglII+CfoI (8kb + 6,4kb)	29	22	7
KB17	XbaI+NotI (4,3kb + 0,9kb)	11	8	3
	BglII+HpaII (2kb + 0,9kb)	7	6	1
Pacientes analizados:		97*	80*	17*

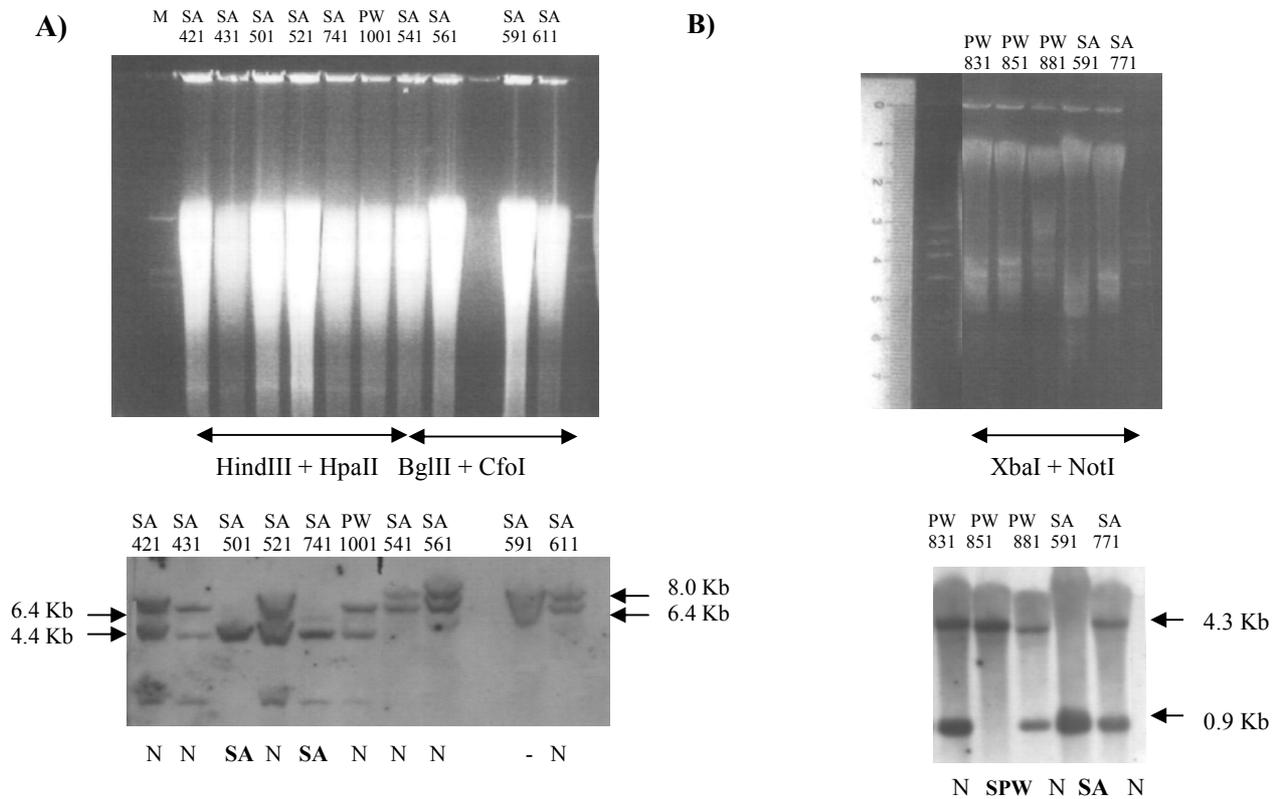
\*El número de pacientes analizados no corresponde con la sumatoria de las columnas porque algunos pacientes fueron valorados con ambas sondas o con varias combinaciones de enzimas.

El estado de metilación de HpaII en la región D15S63 se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas HindIII+HpaII en 52 casos, siete han presentado la ausencia de la banda de origen materno de 6,4Kb confirmando el SA y 45 han presentado un patrón de herencia biparental (6,4Kb+4,4Kb) descartando la posibilidad de una delección, DUPpat o un DI, pero no descarta el SA. El estado de metilación de CfoI se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas BglII+CfoI en 29 casos, siete han presentado la ausencia de la banda de origen materno de 8Kb confirmando el SA y 22 han presentado un patrón de herencia biparental (8Kb+6,4Kb).

El estado de metilación de NotI en la región del exón 1 del gen SNRPN se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas XbaI+NotI en 11 casos, tres han presentado la ausencia de la banda de origen materno de 4,3Kb confirmando el SA y ocho han presentado un patrón de herencia biparental (4,3Kb+0,9Kb). Mientras que el estado de metilación de HpaII se ha analizado mediante una doble digestión con las enzimas BglII+HpaII en siete casos, uno ha presentado la ausencia de la banda de origen paterno de 2Kb confirmando el SA y seis han presentado un patrón de herencia biparental (2Kb+0,9Kb).

La etiología de los 17 pacientes que han presentado un patrón de metilación compatible con el SA se ha valorado mediante FISH y/o análisis de microsatélites obteniéndose 14 delecciones y dos DUPpat. En el paciente 35 con la ausencia del alelo materno en el análisis de microsatélites, no se ha podido determinar la etiología al no realizarse la FISH.

En la Figura 3.2.4 se observa el resultado del análisis de metilación con las sondas PW71B y KB17 de algunos pacientes.



**Figura 3.2.4.** Geles de transferencia del ADN digerido y resultado de la detección quimioluminiscente con CDP-Star. A) Digestión con HindIII+HpaII y BglII+CfoI. Hibridación con la sonda PW71B. B) Digestión con XbaI+NotI. Hibridación con la sonda KB17

### 3.2.5. Valoración genética global

El diagnóstico de SA se ha confirmado en 47 pacientes. La etiología ha sido la siguiente: 39 pacientes han presentado la delección 15q11-q13, confirmada mediante FISH, en los pacientes 281 y 1041 observada por citogenética; cuatro pacientes han presentado DUPpat, dos con presencia de un isocromosoma 15 (casos 97 y 341), uno con isodisomía (caso 741) y uno con heterodisomía (caso 48); cuatro pacientes (35, 251, 411 y 591) presentan ausencia del alelo materno y no se ha determinado su etiología; 15 pacientes con estudio molecular normal han presentado una puntuación igual o mayor a diez, clínicamente son SA típicos y son candidatos a presentar mutación en el gen UBE3A o formar parte del grupo de pacientes SA de etiología desconocida (Tabla 3.2.6).

**Tabla 3.2.6.** Frecuencia de alteraciones en el SA

Alteración	62 casos	% sobre 58 casos
Delección 15q11-q13 materna	39	67,2
DUPpat	4	6,9
Molecular Normal ( $\geq 10$ ptos.)	15	25,9
SA con etiología sin determinar	4	

En la Tabla 3.2.7 se observan los resultados globales obtenidos según las técnicas utilizadas en los 149 pacientes. En 36 pacientes se ha realizado el diagnóstico utilizando una sola de las técnicas de análisis, en 43 se han utilizado dos de las técnicas y en 70 se han aplicado todas. El resultado de las pruebas genéticas de cada paciente se recoge en la Tabla 3.2.8.

**Tabla 3.2.7.** Diagnóstico del SA según técnicas empleadas

Análisis	Delección Materna	Disomía Paterna	Etiología sin determinar	Normal			Total
				$\geq 10$	$< 10$	No Valorado	
FISH	15	-	-	2	10	1 + 2 <sup>Prenatal</sup>	30
Microsatélites	-	-	3	-	1	-	4
Metilación	-	-	-	-	2	-	2
FISH + Microsatélites	10	2	-	1	3	2	18
FISH + Metilación	4	-	-	2	8	8	22
Microsatélites + Metilación	-	-	1	-	2	-	3
FISH + Microsatélites + Metilación	10	2	-	10	32	16	70
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>58</b>	<b>29</b>	<b>149</b>

**Tabla 3.2.8.** Estudios moleculares en pacientes SA

Nº e x o	S	CITOGENETICA	FISH	Microsatélites						Metilación		Puntuación
				11	210	113	GA BR B3	97	128	122	PW71B	
<b>Delección materna</b>												
6	H		Del									16
15	V	46,XY	Del									9
16	V		Del									8
25	V		Del									9
26	H	46,XX,16qh+	Del									14
29	V		Del	NI		NI		Del				12
32	V		Del									11
38	V	46,XY	Del	Del		Del		NI				10
44			Del	Del		Del	Del		Del			
121	H	46,XX	Del									11
131	H		Del									
151	H		Del									9
211	H	46,XX	Del									9
221	H	46,XX	Del		Del			Del	Del			9
231	V		Del									8
271	V	46,XY	Del	NI	NI		Del	NI	NI			15
281	H	46,XX,del(15)(q12)	Del	Del	NI		Del	NI	NI			9
321	H		Del	Del	NI		Del	NI	NI			11
331	H	46,XX	Del									9
371	H	46,XX	Del									11
501	V		Del					Del		SA(4.4 kb)		14
571	V	46,XY	Del		Del			NI	Del			4
641	V	46,XY	Del						Del			11
661	H		Del						Del			15
711	V	46,XY	Del	NI	NI		Del	NI	Del	SA (6.4 kb)		14
801	V	46,XY	Del					Del	NI	SA (6.4 kb)		11
811	V	46,XY	Del						Del	SA (6.4 kb)		12
841	H	46,XX	Del		Del		Del	NI	NI	SA (6.4 kb)		10
1041	H	46,XX,del(15)(q12)	Del	Del			NI	Del	Del	SA (4.4 Kb)		5
1071	V		Del	NI	NI		NI	Del	NI	SA (4.4 Kb)		15
1101	H		Del	NI	NI		Del	NI	NI	SA (4.4 Kb)	SA (0.9 Kb)	8
1121	H		Del		NI		NI	Del	Del	SA (4.4 Kb)		7
1161	V		Del	NI	Del		NI	NI	NI	SA (4.4 Kb)		10
1211	V		Del									12
1261	V		Del							SA (0.9 Kb)		
1281	H		Del							SA (6.4 kb)		14
1291	V		Del							SA (6.4 kb)		14
1301	V		Del									
1321	H		Del							SA (0.9 Kb)		14

Resultados

**Disomía uniparental paterna**

48	V	46,XY	Normal	DP		DP					10
97	V	45,XY,der(15;15)	Normal						DP		12
341	V	45,XY,der(15;15)	Normal				NI	DP	NI	SA (4.4 kb)	13
741	H		Normal	NI	NI	DP	NI	NI		SA (6.4 Kb)	8

**Etiología sin determinar**

35	V			NI		NI		Del/DP			11
251	V			NI		NI		Del/DP			10
411	H	46,XX		Del/DP	Del/DP	NI	NI	NI			11
591	H	46,XX		NI	Del/DP	NI	Del/DP	NI		SA (0.9 Kb)	13

**Diagnóstico molecular normal y ≥ 10 puntos**

101	V	46,XY	Normal								10
301	H		Normal	NI	HBP	HBP	NI	NI		Normal (6Kb+4.4Kb)	10
511	V	46,XY	Normal	NI	NI	HBP	NI	HBP			10
541	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	NI		Normal (6Kb+4.4Kb)	10
791	V	46,XY,t(2;12)	Normal	HBP	NI	HBP	HBP	HBP		Normal (8Kb+6.4Kb)	10
821	V		Normal	NI	NI	HBP	HBP	HBP		Normal (8Kb+6.4Kb)	10
891	V	46,XY	Normal	NI	HBP	HBP	NI	HBP		Normal (4.3Kb+ 0.9Kb)	10
951	H		Normal	HBP	HBP	NI	HBP	HBP		Normal (6Kb+4.4Kb)	10
1051	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	HBP		Normal (6Kb+4.4Kb)	10
1091	H		Normal	NI	HBP	HBP	NI	HBP		Normal (2Kb+0.9kb)	12
1111	H		Normal	NI	NI	HBP	HBP	HBP		Normal (6 Kb+4.4Kb)	11
1201	H	46,XX	Normal	NI			NI	HBP		Normal (4.3Kb+0.9Kb)	12
1331	V		Normal							Normal (8kb+6.4kb)	13
1341	H	46,XX	Normal							Normal (8 kb+6.4kb) Normal (4.3Kb+0.9Kb)	16
1391	H		Normal								14

**Diagnóstico molecular normal y < 10 puntos**

10	V		Normal	NI		NI				Normal (6Kb+4.4Kb)	5
11	H		Normal								
12	V			NI				HBP		Normal (6Kb+4.4Kb)	4
19	V		Normal	NI	HBP	HBP	HBP	HBP		Normal (6Kb+4.4Kb)	2
22	V		Normal	NI			NI	HBP	HBP		9
27	V		Normal	NI						Normal (6Kb+4.4Kb)	9
41	V		Normal	NI				NI		Normal (6Kb+4.4Kb)	
45	V	46,XY	Normal							Normal (6Kb+4.4Kb)	5
47	V		Normal								5
111	V	46,XY	Normal								8
141	V		Normal							Normal (6Kb+4.4Kb)	
161	V	46,XY	Normal							Normal (6Kb+4.4Kb)	6
171	V		Normal	NI	NI	HBP	NI	HBP		Normal (6Kb+4.4Kb)	5
181	V		Normal							Normal (6Kb+4.4Kb)	5
191	V	46,XY,15s+	Normal								5
201	H	46,XX	Normal							Normal (6Kb+4.4Kb)	8
241	H			HBP		HBP		NI			7
261	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	NI		Normal (6Kb+4.4Kb)	

291	V	Normal	HBP	HBP	NI	NI	HBP				
294	V	Normal	HBP	HBP	NI	NI	HBP				
311	V							Normal (4.3Kb+0.9Kb)	8		
351	V	Normal							5		
361	H	Normal							5		
391	V	Normal							5		
401	H	Normal		NI	HBP	HBP	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)			
421	H	46,XX,del(15)(q12)	Normal					Normal (6Kb+4.4Kb)			
431	V	46,XY	Normal	HBP	NI	HBP	NI	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	3	
441	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	HBP	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	4	
451	H	Normal	NI	HBP	NI	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)			
471	H	Normal							3		
481	H	Normal	NI	NI	NI	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	Normal (2Kb+ 0.9Kb)	8	
491	V	Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)			
521	H	46,XX	Normal	NI	HBP	NI	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	4	
531	H	Normal							2		
551	H	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)		6	
561	H	Normal	NI	HBP	HBP	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)		4	
581	H	46,XX	Normal	NI	NI	HBP	NI	NI		3	
611	V	Normal	NI	NI	NI	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)		4	
621	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	8	
631	H	46,XX	Normal	NI	HBP	HBP	NI	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	6	
644	F	Normal									
651	H	Normal	NI	NI	NI	NI	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)		5	
671	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	HBP		5	
681	H	46,XY	Normal	HBP	HBP	NI	NI	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	6	
691	V	46,XY	Normal	NI	HBP	HBP	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)		6	
701	V	Normal	NI	HBP	NI		HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)		4	
731	V	Normal	NI	NI	HBP	HBP	HBP	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	9	
734	H	Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	NI	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)		
751	V	Normal	NI	NI	NI	HBP	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)			
761	H	46,XX	Normal	HBP	NI	HBP	NI	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	2
771	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	HBP	Normal (4.3Kb+0.9Kb)		
781	H	46,XX	Normal	HBP	NI	NI	NI	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	8	
831	V	46,XY	Normal	HBP	NI	HBP	NI	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	6	
851	H	46,XX	Normal	NI	HBP	HBP	NI	NI	Normal (8Kb+6.4Kb)	6	
871	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)	4	
881	V	Normal	HBP	HBP	HBP	HBP	NI	Normal (4.3Kb+0.9Kb)		5	
901	V	46,XY	Normal	NI	HBP	NI	HBP	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	7	
921	H	46,XX	Normal	NI	HBP	HBP	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	6	
931	V	46,XY	Normal	HBP	HBP	HBP		HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)		
941	V	46,XY	Normal	HBP	NI	HBP	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	8	
961	V	Normal	NI	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (8Kb+6.4Kb)		3	
981	H	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)			
991	H	46,XX	Normal	HBP	HBP	HBP	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	6	
1001	V	Normal	HBP	NI	HBP	NI	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)		6	
1011	V	Normal	HBP	NI	HBP	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)			

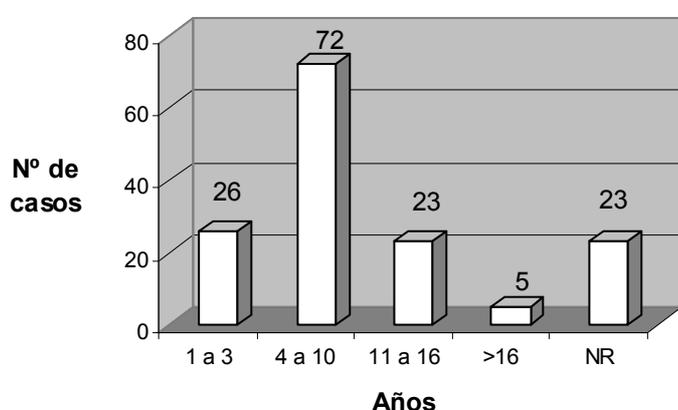
Resultados

<b>1021</b>	V	Normal	NI	NI	NI	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	
<b>1031</b>	V	Normal	NI	NI	HBP	NI	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	3
<b>1061</b>	H 46,XX	Normal	NI	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	
<b>1081</b>	H	Normal	HBP	HBP	NI	HBP	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	
<b>1131</b>	V	Normal	HBP	HBP	HBP	NI	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	4
<b>1141</b>	V 46,XY	Normal	HBP	NI	NI	NI	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	
<b>1151</b>	V	Normal	NI	HBP	HBP	NI	NI	Normal (6Kb+4.4Kb)	
<b>1171</b>	V		NI	HBP	HBP	HBP	HBP	Normal (6Kb+4.4Kb)	6
<b>1181</b>	V 46,XY	Normal							7
<b>1191</b>	V 46,XY	Normal							4
<b>1221</b>	V	Normal						Normal (4.3Kb+0.9Kb)	9
<b>1231</b>	V 46,XY	Normal						Normal (6Kb+4.4Kb)	7
<b>1241</b>	H	Normal						Normal (6Kb+4.4Kb)	7
<b>1251</b>	H	Normal						Normal (6Kb+4.4Kb)	
<b>1271</b>	H	Normal						Normal (4.3Kb+0.9Kb)	7
<b>1284</b>	F	Normal							
<b>1311</b>	V	Normal						Normal (2Kb+0.9Kb)	
<b>1351</b>	V	Normal						Normal (8kb+6.4kb)	
<b>1361</b>	V	Normal						Normal (2Kb+0.9Kb)	
<b>1371</b>	H	Normal						Normal (2Kb+0.9Kb)	
<b>1381</b>	H							Normal (2Kb+0.9Kb)	9
<b>1401</b>	H 46,XX	Normal						Normal (2Kb+0.9Kb)	

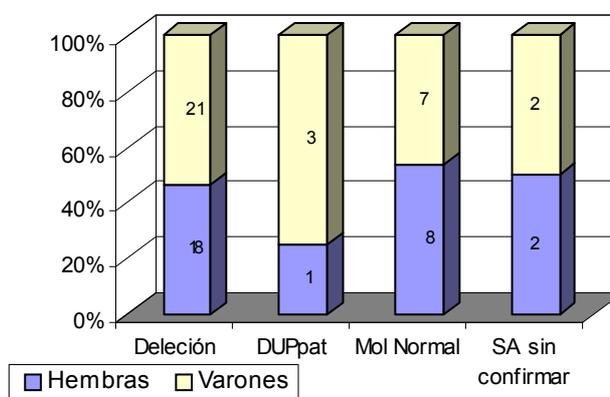
V: varón; H: hembra; F: feto; Del: deleción; DP: disomía paterna; HBP: herencia biparental; NI: no informativo.

### 3.2.6. Valoración clínica

Se ha recogido el protocolo clínico a 106 de 147 pacientes con sospecha clínica de SA. La edad media ha sido de 5,7 años [0-26] (Gráfica 3.2.1). El diagnóstico de SA se ha confirmado molecularmente en 47 pacientes y clínicamente 15 pacientes pueden ser considerados SA al presentar una puntuación igual o superior a 10. Estos 62 pacientes (33 V y 29 H) representan el 41,6% de la población analizada. La distribución por sexo de cada etiología se observa en la Gráfica 3.2.2. La distribución ha sido similar en los pacientes con deleción (21 V vs. 18 H) y en los pacientes con un estudio molecular normal y criterios consistentes (7 V y 8 H), en los pacientes con DUPpat hay una mayor proporción de varones (3 V y 1 H).



Gráfica 3.2.1. Agrupación por edades



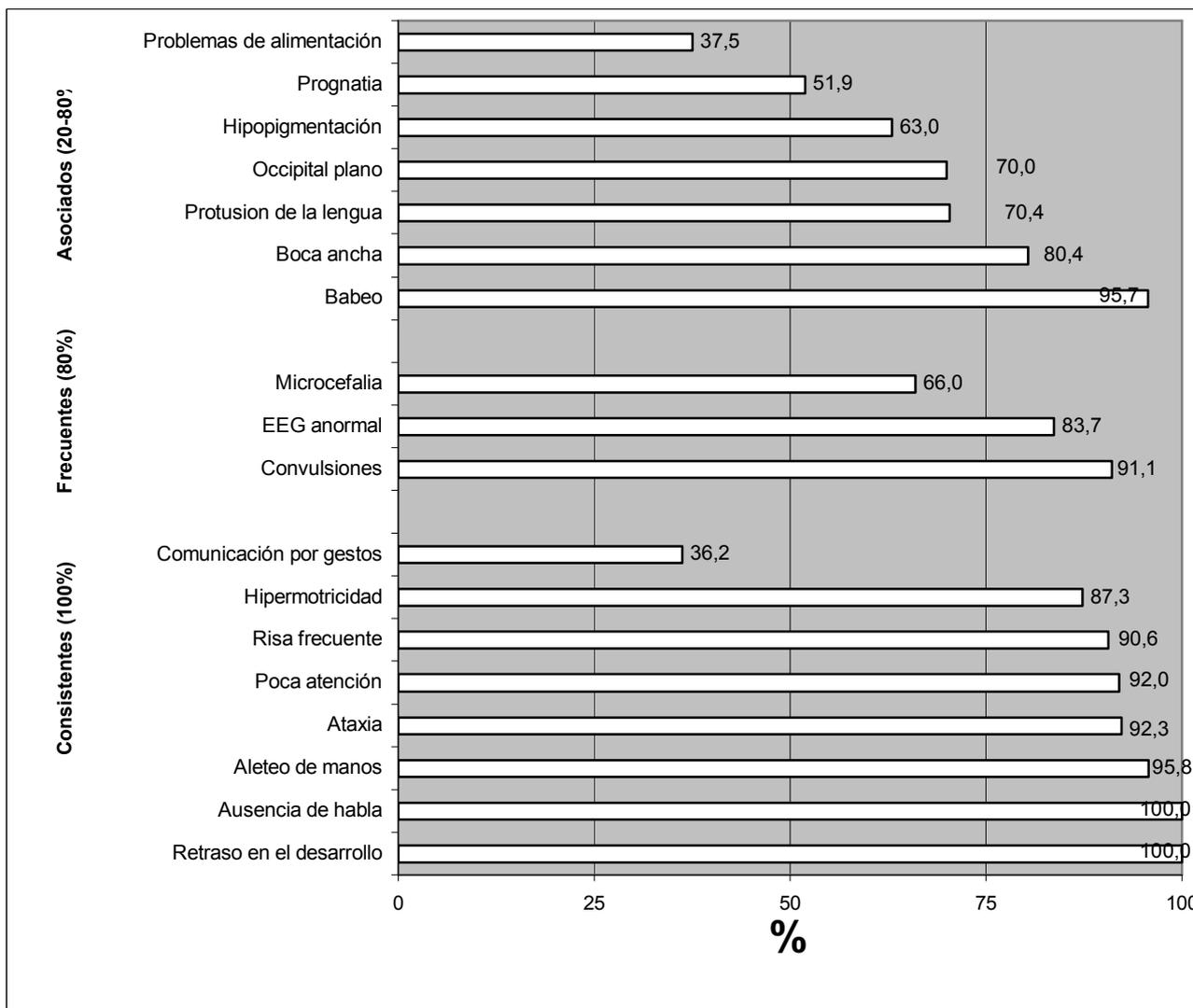
Gráfica 3.2.2. Relación mutación-sexo

La puntuación media de los pacientes con diagnóstico molecular de SA obtenida con los protocolos clínicos para las diferentes alteraciones se recoge en la Tabla 3.2.9, siendo la media global de 10 [4-16].

Tabla 3.2.9. Puntuación según protocolo clínico en pacientes SA

Alteración	Puntuación media	Rango
Deleción	10,9	[4 - 16]
DUPmat	10,7	[8 - 13]
Molecular normal ( $\geq 10$ ptos.)	11,2	[10 - 16]
Etiología sin determinar	11,3	[10 - 13]

Las características clínicas de los 62 pacientes agrupadas en consistentes, frecuentes y asociadas se representan en la Gráfica 3.2.3.



**Gráfica 3.2.3.** Características clínicas de los pacientes SA

La población afecta formada por 33 varones y 29 hembras, de edad media 5 años [0,9-26], ha presentado una puntuación media de 10,6 [4-16]. Todos los pacientes han manifestado retraso en el desarrollo y ausencia de habla. Las características presentes en más del 80% de los pacientes han sido aleteo de manos, babeo, ataxia, poca atención, convulsiones y risa frecuente. Las características menos frecuentes han sido comunicación por gestos, problemas de alimentación y prognatia (Gráfica 3.2.3).

Los 47 pacientes en los que se ha confirmado molecularmente el SA se han agrupado según la alteración molecular para relacionar las manifestaciones clínicas de acuerdo a la clasificación de: consistentes, frecuentes o asociadas. El registro individual de cada paciente para la población afecta se recoge en la Tabla 3.2.10.

**Tabla 3.2.10.** Características clínicas de los pacientes SA según la alteración molecular

Nº	Edad diagnóstico	Sexo	Consistentes 100%								Frecuentes 80%			Asociadas 20-80%						Puntuación	Consistentes	
			Retraso en el desarrollo	Hablar < 3 palabras	Comunicación por gestos	Ataxia	Risa frecuente	Aleteo de manos	Hipermotricidad	Poca atención	Microcefalia	Convulsiones	EEG anormal	Occipital plano	Protusión de la lengua	Problemas de alimentación	Prognatia	Boca ancha	Babeo			Hipopigmentación
<b>Pacientes con delección</b>																						
661	14	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	15	8
711	14	V	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	14	8
26	2	H	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	13	8
6		H	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	7
271	6	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	7
1071	1	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	7
1281	9	H	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	14	7
1291		V	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	14	7
32	9	V	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	11	7
1321		H	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	14	6
501	10	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	14	6
811	2	V	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	12	6
641	1	V	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	11	6
1101		H	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	6
29	6	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	5
121	11	H	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	11	5
371	5	H	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	11	5
801	10	V	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	11	5
841	4	H	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	5
1161	2	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	5
211	2	H	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	9	5
221	9	H	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	9	5
281	2	H	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	9	5
331	13	H	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	5
15		V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	5
16	2	V	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	8	5
321	12	H	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	4
38	9	V	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	10	4
25	6	V	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	9	4
231		V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	8	4
1121	1	H	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	7	4
571	2	V	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	4	4
151	15	H	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	9	3
1041	1	H	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	5	3
131	16	H																				
44		V																				
1301		V																				

Resultados

Pacientes con disomía uniparental paterna																					
341	7	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	7
97		V	+	+	+		+	+	+	+										12	7
48	9	V	+	+	+		-	+	+	+	-	+								10	6
741		H	+	+	+	+	+	-	-	+										8	6
Pacientes con etiología sin determinar																					
591	1	H	+	+	+	+		+	+	-	-	+	+							13	6
35	6	V		+		+	+	+	+											11	5
411		H	+	+	-	+	+		+											11	5
251	4	V	+	+	-	+	+		+											10	5
n°/N			42/42	40/40	12/42	36/38	33/38	17/18	35/41	17/19	24/39	38/41	30/34	24/33	26/39	5/9	19/37	28/36	16/16	15/20	Media=9,7
%			100	100	29	95	87	94	85	89	62	93	88	73	67	56	51	78	100	75	[4-16]

V: varón; H: hembra; +: presente; -: ausente; En blanco: no registrado.

De los casos con estudio molecular normal se dispone del protocolo clínico de 62, de estos, 15 pueden considerarse clínicamente SA típicos al presentar una puntuación igual o superior a 10. Las características clínicas se recogen en la Tabla 3.2.11.

**Tabla 3.2.11.** Características clínicas de los pacientes SA con estudio molecular normal

Nº	Consistentes								Frecuentes			Asociados								Puntuación	Consistentes
	Edad	Retraso en el desarrollo	Ausencia de habla	Comunicación por gestos	Ataxia	Risas	Aleteo de manos	Hipermotricidad	Poca atención	Microcefalia	Convulsiones	EEG	Occipital plano	Protusión de la lengua	Problemas de alimentación	Prognatismo	Macrostomía	Babeo	Hipopigmentación		
<b>Pacientes con 10 o más puntos</b>																					
1341		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+	+	-	+	+	+	+	16	10
1391	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	14	10
1331	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	13	10
1091	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	12	10
1201	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	12	9
1111		+	+		+	+		+		+	+	+		+		+	+			11	8
101	8	+	+		+	+		+		+	+	+		+		-	+			10	8
821	13	+	+		+	+		+		-	+	-		-	+	-	-	+	-	10	8
541	3	+	+		+	+		+		+	+	+		+		+	-			10	8
891	7	+	+		-	+		+		+	+	+		+		+	+			10	7
301	2	+	+		+	+		-		+	+	+		+		+	+			10	7
511	13	+	+		+	+		+		-	+	+		+		+	+			10	7
791	4	+	+		+			+		+	+	+		+		+	+			10	7
951	6	+	+		-	+		+		+	+	+		+		+	+			10	7
1051	12	+	+		+	+				+	+			-	-	+	-	+	+	10	6
n°/N		15/15	15/15	5/5	12/14	15/15	6/6	13/14	6/6	11/14	13/15	11/15	4/7	12/15	1/7	8/15	13/15	6/7	2/7	Media=11,1	
%		100	100	100	86	100	100	93	100	79	87	73	57	80	14	53	87	86	29	[10-16]	

**Pacientes con menos de 10 puntos**

621	2	+	+		+	+		+		+	+	+		+	-	-				9	8	
731	16	+	+		-	+	+	+	+	-	+	-		-	+	-	-	-	+	-	9	7
481	6	+	+		+	+		+		-	+	+		+	-	+	-			9	7	
201	3	+		+	+	+		+		+	-	+		+		-	+			9	7	
1221	11	+	+		-	+	+	+	+	+	-			-	-	-	-	+	+	-	9	7
22	15	+		+	+		+		+		+						+	+	+	9	6	
1381	26	+			+	+		+		-	+	+		+		+	+			9	6	
941	17	+	+		+	+		+		+	-	-		+		+	+			9	6	
1271	23	+	+		+	+		+		+	+			-		+	-			8	7	
901	4	+	+		-	+		+		+	+	+		+		-	-			8	7	
781		+	+		+	+		-	+	+	-			-	+	-	-	+	-	8	6	
111	12	+	+		+			+		+	-	+		+		+	-			8	6	
241	4	+	+		-	+		+		+	-	+		+		-	+			8	6	
1181	9	+	+		+	+		-		-	+			+		+	+			8	5	
551	11	+	+		+	+		+		-	+	+		-		-	-			7	7	
831	5	+	+		+	+		+		-	+	+		-		-	-			7	7	
851	10	+	+		+	+		+		-	+	+		-		-	-			7	7	
1001		+	+		+	+		+		+	-	+		-						7	7	
631	17	+	+		+	+		-		+	+	+		-		-	-			7	7	
1171	6	+	+		+	+		-		+	+	+		-		-	-			7	7	
1241	10	+	+	+		+		+	+	-				-	-	-	-	-	+	7	6	
1231	7	+	+	+		+	+	-	+	-	-	-		+	-	-	-	-	-	7	6	
991	2	+	+		+	+		+		-	-			+		-	+			7	5	
691	7	+	+		+	+		-		-	+	-		-		+	+			7	5	
921	6	+	+		+	-		+			-			+		+	+			7	4	
881	6	+	+		+	+		+		-	-	+		-		-	-			6	6	
391	10	+	+		-	+		-		+	+	+		-		-	-			6	6	
361	4	+	+		-	+		-		-	+	+		-		+	-			6	5	
671	3	+	+			+		-		+	-	+		+			-			6	5	
351	5	+	+		-	+		-		+	-	-		-		+	+			6	4	
651	15	+	+		-	+		-		-	+	-		-		+	+			6	4	
1131	14	+	+		-	+		+		+		-		-		-	-			5	5	
441	4	+	+		-	+		+		-	-			+		-	-			5	4	
521	20	+	+		+	-		+		-	-			-		+	-			5	4	
1191	2	+	+		+	+		-		-	-	-		+		-	-			5	4	
561	11	+	-		+	+		-		-	+	-		-		-	+			5	4	
871	4	+	+		+	-				-	+	-		-		-	+			5	4	
611	13	+	+		-	+		-		-	+	-		-		+	-			5	4	
701	14	+	+		-	-		+		-	-	-		+		+	-			5	3	
961	14	+	+		+	+		-		-	-	-		-		-	-			4	4	
1031		+	+		-	+		+		-	-	-		-		-	-			4	4	
431	10	+	+			+				-	-			-		-	+			4	3	
471	6	+	+		-	+		-		-	-	-		-		+	-			4	3	
581	6	+	+		-	-		-		+	-	-		-		-	+			4	3	
761	3	+	+		-	-		-		+	-	-		-		-	-			3	3	
531	6	+	+		-	-		-		-	-	-		-		+	-			3	2	
491	15	+	-		-	-		-		-	+	-		-		-	-			2	2	
n°/N	47/47	42/44	4/4	25/43	37/45	4/5	24/44	6/7	18/44	21/45	17/37	1/5	16/46	1/6	17/45	16/46	4/7	1/6	Media= 6			
%	100	95	100	58	82	80	55	86	41	47	46	20	35	17	38	35	57	17	[2-9]			

### 3.2.7. Relación genotipo-fenotipo

Se ha aplicado el test estadístico de Fisher para analizar si existen diferencias clínicas entre los pacientes según la etiología. Para los criterios analizados se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar pacientes con deleción con pacientes con DUPpat en problemas de alimentación, protusión de la lengua, prognatia y diferencias en la comunicación por gestos (Tabla 3.2.12).

**Tabla 3.2.12.** Diferencias clínicas pacientes con deleción vs. pacientes DUPpat

Característica clínica	Deleción	DUPpat	Test de Fisher
Problemas de alimentación	100%	0%	0.008
Protusión de la lengua	73%	0%	0.011
Prognatia	57%	0%	0.051
Comunicación por gestos	23%	75%	0.060

La frecuencia de los rasgos clínicos agrupada en función de la alteración molecular se recoge en la Tabla 3.2.13.

**Tabla 3.2.13.** Frecuencia de las características clínicas de pacientes SA

CARACTERÍSTICAS	Deleción Materna (39)		Disomía Paterna (4)		Etiología sin determinar (4)		Molecular normal (15)	
	%	n / N	%	n / N	%	n / N	%	n / N
<b>Consistentes 100%</b>								
Retraso en el desarrollo	100	35 / 35	100	4 / 4	100	3/3	100	15 / 15
Habla <3 palabras	100	33 / 33	100	4 / 4	100	3/3	100	15 / 15
Aleteo de manos	100	13 / 13	75	3 / 4	100	1/1	100	6 / 6
Ataxia	94	31 / 33	100	2 / 2	100	3/3	86	12 / 14
Poca atención	92	13 / 14	100	4 / 4	0	0/1	100	6 / 6
Risa frecuente	88	28 / 32	75	3 / 4	100	2/2	100	15 / 15
Hipermotricidad	85	29 / 34	75	3 / 4	100	3/3	93	13 / 14
Comunicación por gestos	23	8 / 35	75	3 / 4	33	1/3	100	5 / 5
<b>Frecuentes 80%</b>								
Convulsiones	94	32 / 34	75	3 / 4	100	3/3	87	13 / 15
EEG anormal	86	25 / 29	100	2 / 2	100	3/3	73	11 / 15
Microcefalia	61	20 / 33	67	2 / 3	66,7	2/3	79	11 / 14
<b>Asociadas 20-80%</b>								
Babeo	100	13 / 13	100	3 / 3	0	0/0	86	6 / 7
Problemas de alimentación	100	5 / 5	0	0 / 4	0	0/0	14	1 / 7
Boca ancha	81	24 / 29	50	2 / 4	67	2/3	87	13 / 15
Hipopigmentación	80	12 / 15	50	2 / 4	100	1/1	29	2 / 7
Protusión de la lengua	73	24 / 33	0	0 / 4	100	2/2	80	12 / 15
Occipital plano	67	18 / 27	100	3 / 3	100	3/3	57	4 / 7
Prognatia	57	17 / 30	0	0 / 4	67	2/3	53	8 / 15

**3.2.7.1. Pacientes con delección**

Los 39 pacientes con delección de edad media 5 años [1-16], presentan como rasgos principales retraso en el desarrollo 35/35, hablan menos de tres palabras 33/33 y aleteo de manos 13/13 (Tabla 3.2.13). Está presente en más del 80% de los pacientes ataxia, poca atención, risa frecuente e hipermotricidad. Se comunican por gestos solo 8/35 (23%). Las características asociadas más frecuentes han sido el babeo (13/13) y los problemas de alimentación (5/5).

**3.2.7.2. Pacientes con disomía uniparental paterna**

Los cuatro pacientes con DUP de edad media 4 años [0,9-9 años], presentan retraso del desarrollo, hablan menos de tres palabras, ataxia, poca atención, EEG anormal, babeo y occipital plano (Tabla 3.2.13). Destaca la ausencia de problemas de alimentación, protusión de la lengua y prognatia. La capacidad para comunicarse por gestos se observa en 3/4 (75%) y la hipopigmentación en 2/4 (50%).

En los dos pacientes con isocromosoma se hizo un estudio más completo registrándose características no incluidas en el protocolo clínico inicial (Tabla 3.2.14).

**Tabla 3.2.14.** Pacientes con isocromosoma

<b>Características clínicas</b>	<b>Caso 341</b>	<b>Caso 97</b>
Peso al nacimiento	3560 g	3100 g
Altura al nacimiento	50 cm	50 cm
Perímetro craneal (centile)	50,5 cm (3er c)	-
Edad de inicio de la convulsiones (años)	0.6	0.6
Edad de inicio de la marcha (años)	7	5
Edad (años)	9	4
Peso ( <i>centile</i> )	28 Kg (50)	28,6 Kg (97)
Altura ( <i>centile</i> )	130 cm (50)	100,3 cm (10)
Hiperfagia	-	+

### **3.2.7.3. Pacientes con estudio molecular normal**

Quince casos han sido considerados pacientes SA al presentar una puntuación igual o superior a 10, siendo la puntuación media de 11,1 [10-16] (Tabla 3.2.11). La edad media ha sido de 7,3 años [2-13]. Manifiestan todos los criterios consistentes esperados del síndrome, siendo buena la capacidad de comunicación por gestos. Los criterios asociados se observan en menos del 60% de los pacientes salvo macrostomía (87%), babeo (86%) y protusión de la lengua (80%) (Tabla 3.2.13).

## 4. Discusión

#### 4.1. Técnicas de diagnóstico molecular

Disponer de técnicas de laboratorio que confirmen de forma eficiente los individuos con sospecha de SPW y SA es de gran importancia clínica, principalmente en recién nacidos y durante la infancia, y particularmente en individuos que no manifiestan el conjunto de anomalías clínicas que caracterizan a cada uno de estos síndromes. Se ha observado que el 45% de los niños entre 0-12 meses con hipotonía severa de etiología desconocida tienen SPW (Gillissen-Kaesbach *et al.*, 1995b). Rasgos como flojedad al nacimiento, llanto débil, pobre succión, dificultades en la alimentación e hipogonadismo se han observado en todos los casos SPW con un estudio genético positivo (Whittington *et al.*, 2002). No obstante, el 3-4% de los pacientes con una puntuación superior a ocho con el test de Holm no presentan una mutación molecular (Robinson *et al.*, 1991; Gillissen-Kaesbach *et al.*, 1995b), mientras que entre los pacientes con una puntuación entre 5 y 6 hay un 30% que tienen estudios moleculares positivos (Erdel *et al.*, 1996). En el SA ocurre una situación similar, el fenotipo comienza a evidenciarse a partir de los dos años, siendo muchos rasgos inespecíficos y comunes con otras patologías dificultando el diagnóstico clínico. Debido a esta variabilidad es imprescindible el análisis genético para confirmar estos síndromes, clarificar el riesgo de recurrencia para las familias con individuos afectados e iniciar el tratamiento.

Debido a que la base genética de estos síndromes es heterogénea, pueden estar causados por delección, DUP, DI o mutaciones intragénicas, es necesario el empleo de diversas técnicas para conocer la etiología. La FISH, el análisis de microsatélites y el análisis de metilación permiten diagnosticar aproximadamente al 99% de los pacientes con SPW y al 80% de los pacientes SA (ASGH/ACMG, 1996).

##### 4.1.1. Análisis citogenético

El análisis citogenético realizado en 47/151 pacientes con sospecha clínica de SPW no ha revelado ninguna alteración en el cromosoma 15, solamente el paciente 74 presentó un cariotipo anómalo 47,XXY (Rego *et al.*, 1997). Aunque la delección 15q11-q13 la presentan el 70% de los pacientes con SPW, solo son detectados con el análisis citogenético de alta resolución el 40-50% (Buttler, 1990; van den Ouweland *et al.*, 1995). Se considera que la frecuencia de alteraciones citogenéticas en el SPW, principalmente translocaciones equilibradas, es del 0,1% (Nicholls and Knepper, 2001).

El análisis citogenético realizado en 63/147 pacientes con sospecha clínica de SA ha detectado dos delecciones 15q11-q13 (casos 281 y 1041), dos translocaciones 15;15 (casos 97 y 341) y una translocación equilibrada 2;12 (caso 791). La frecuencia de anomalías cromosómicas estructurales responsables de causar el SA sin incluir la delección en la presente serie es del 3,2% (2/63), ligeramente superior al 1-2% descrito por Chan *et al.*, (1993).

### Valoración técnica

En seis pacientes SPW y en 15 pacientes SA no se observó la delección en el cariotipo (falsos negativos), mientras que en el caso SA 421 la delección observada citogenéticamente no se confirmó molecularmente (falso positivo). Según estos resultados podemos decir que el análisis cromosómico es insuficiente para detectar la delección. Una de las principales razones es que la región 15q proximal puede variar en tamaño debido a su proximidad al centrómero, al polimorfismo centromérico que hace que haya una tendencia a curvarse, y a la variabilidad en la condensación de los homólogos (Knoll *et al.*, 1993; Plaja *et al.*, 2001).

La sospecha de delección debe ser confirmada mediante FISH debido a los falsos negativos y falsos positivos observados en el análisis del cariotipo (Kuwano *et al.*, 1992; Delach *et al.*, 1994). El análisis citogenético es más útil para la detección de reorganizaciones que puedan predisponer a delección o bien para descartar otras anomalías cromosómicas.

#### **4.1.1. Análisis mediante FISH**

Esta técnica ha permitido detectar la presencia de delección en la región 15q11-q13 en el 73,7% de los pacientes SPW (28/38) y en el 63% de los pacientes SA (39/62). La frecuencia observada es similar al 70-75% descrita en la literatura (Teshima *et al.*, 1996). La eficacia de la FISH ha sido del 100%, todos los pacientes con delección han mostrado señal de hibridación solo en uno de los cromosomas 15, mientras que en todos los pacientes sin delección se ha observado señal de hibridación en los dos cromosomas 15.

La FISH ha demostrado una mayor eficacia frente a la citogenética convencional en la detección de la delección en pacientes con sospecha de SPW o SA. En nuestra serie la frecuencia de falsos negativos citogenéticos aclarados gracias a la FISH ha sido del 20% (22/110), valor alto debido a que la resolución empleada ha sido de 550 bandas, mientras que la frecuencia de falsos positivos ha sido del 0,9% (1/110). Teniendo en cuenta únicamente las delecciones, solo se han observado el 8,3% (2/24), otros autores describen que solo el 41% (12/29) (van den Ouweland *et al.*, 1995) y el 53% (8/15) (Teshima *et al.*, 1996) de las delecciones fueron identificadas usando el análisis cromosómico con resolución de 850 bandas, poniendo de manifiesto la limitación de esta técnica. Nuestros resultados coinciden con estudios previos y concluyen que el análisis mediante FISH es un método de diagnóstico rápido, seguro y eficaz para la detección de la delección 15q11-q13 y puede reemplazar la técnica de bandas G para el diagnóstico de la delección (Kuwano *et al.*, 1992; Delach *et al.*, 1994; Butler, 1995; Bettio *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995; Erdel *et al.*, 1996).

##### 4.1.1.1. Valoración de las sondas

El resultado de la hibridación utilizando sondas procedentes de diferentes casas comerciales no ha mostrado discrepancias salvo en un caso (SA 291), interpretado inicialmente como delección con la sonda D15S11 de ONCOR. El estudio de microsatélites de este paciente mostró herencia biparental para los marcadores D15S11, D15S210 y D15S128. Al repetir la

FISH con las sondas SNRPN y D15S10 de Vysis, se observó señal de hibridación para ambas sondas en los dos cromosomas 15, pero la sonda control PML en la región 15q22 mostró una señal más débil en uno de los homólogos. Esta señal fue la que no se observó al utilizar la sonda D15S11 de ONCOR, interpretándose el resultado como deleción. En casos como este, la presencia de una sonda control centromérica (D15Z1 de Vysis) facilita la identificación de la región 15q proximal y lleva a una interpretación correcta. Se ha descrito que la eficiencia y especificidad de la hibridación para la sonda D15S10 es del 100% (Erdel *et al.*, 1996).

#### 4.1.1.2. Mosaicismo de la deleción 15q11-q13

El mosaicismo en el SPW es un tema en discusión siendo varios estudios los que han sugerido su existencia. Aunque ha sido observada mediante FISH en cinco pacientes SPW con un 14-78% de mosaicismo (Mowery-Rushton *et al.* 1996; Golden *et al.*, 1999; Malzac *et al.*, 1998), se ha puesto en duda y sugerido su revisión (Nicholls, 2000). La revisión de tres de estos pacientes descartó el mosaicismo, retractándose los autores (Mowery-Rushton *et al.*, 2000). El paciente estudiado por Malzac *et al.*, con la deleción 15q11-q13 en el 20% de las células, presentó un análisis de metilación normal. Estos autores indican que el análisis de metilación no es lo bastante sensible para identificar casos de deleción en mosaico porque la población de células normales enmascara la metilación uniparental de las células con el cromosoma 15 delecionado. Sugieren que en el análisis de FISH se estudien por lo menos 100 metafases y que el análisis de metilación se realice en varios tejidos (leucocitos y fibroblastos). El número de metafases analizadas en nuestro estudio fue inicialmente de 80, luego consideramos que 50 era un número suficiente para detectar la deleción y descartar un posible mosaicismo. En ninguno de nuestros pacientes hemos observado mosaicismo. Nicholls (2000) duda que un mosaicismo tan bajo observado en el paciente de Malzac *et al.*, (1998) pueda manifestarse como un SPW clásico, y cree que el fenotipo en este paciente puede tener otra explicación. La verdadera existencia de mosaicismo para la deleción 15q11-q13 en el SPW está por demostrar.

En el SA se ha descrito una familia con dos hijos afectados por deleción 15q11-q13, sugiriendo los autores que es la presencia de mosaicismo germinal de la deleción en la madre la que ha conducido a esta recurrencia inesperada, al observar el mismo haplotipo en la región distal a la deleción en los dos hijos afectados y un hijo normal (Kokkonen *et al.*, 2000). Parece que el mosaicismo germinal es más frecuente en el SA, no solo para la deleción, si no también para mutaciones en CI (Gilbert *et al.*, 1997). Lo que no se han descrito son pacientes SA mosaico para la deleción, pero sí pacientes mosaico para el DI (Buiting *et al.*, 2003).

#### **4.1.2. Análisis de microsatélites**

El estudio de microsatélites permite no solo determinar el origen parental de la delección demostrada por FISH, sino también identificar las disomías. Cuando los marcadores próximos al centrómero muestran heterocigosidad indican una no disyunción en meiosis I denominada heterodisomía, mientras que cuando los marcadores próximos al centrómero muestran reducción a homocigosidad se dice que ha ocurrido una no disyunción en meiosis II denominada isodisomía (Robinson *et al.*, 1991). Sin embargo, no es posible diferenciar entre delección e isodisomía ya que en ambos casos solo se observará un alelo, que no sabremos si está presente en una o dos copias. Para diferenciarlas hay que recurrir a la FISH, o bien emplear marcadores distales, que se interpretará como delección si los marcadores distales presentan HBP, mientras que si son homocigotos se interpretará como una isodisomía.

##### **4.1.2.1. Familias SPW**

Trazar la transmisión del cromosoma 15 de los padres al hijo ha sido posible en 79 familias, 16 presentaron ausencia del alelo paterno, de las cuales 10 fueron causadas por delección confirmándose mediante FISH, cinco resultaron por DUPmat siendo heterodisomías los pacientes 50 y 1241, mientras que no se pudo determinar en los pacientes 86, 96 y 761 al no registrarse los alelos y no disponer de marcadores externos, estos tres pacientes puede que presenten heterodisomía ya que la mayoría de los pacientes SPW con DUPmat (71-81%) la presentan (Robinson *et al.*, 1991; Mascari *et al.*, 1992), y en el paciente 30 no se ha determinado la etiología ya que la información de los tres microsatélites empleados no permite diferenciar si se trata de delección o isodisomía. En 63/79 familias se observó HBP, en cinco de estas familias se realizó un diagnóstico prenatal.

##### **4.1.2.2. Familias SA**

Noventa y una familias fueron informativas, 28 pacientes presentaron ausencia del alelo materno, en 20 se confirmó mediante FISH que la ausencia del alelo materno fue por delección; en cuatro por DUP, siendo el paciente 48 una heterodisomía al presentar heterocigosidad en el marcador D15S11, el paciente 741 una isodisomía y los pacientes 97 y 341 una isodisomía al presentar homocigosidad para el marcador D15S128, causada por un isocromosoma 15, previamente diagnosticados de translocación 15;15 (Poyatos *et al.*, 2002); y en cuatro pacientes no se ha determinado si es delección o DUP al no realizarse la FISH. Se ha observado HBP en 63/91 familias.

#### 4.1.2.3. Relación DUPmat vs. DUPpat

La DUPmat en nuestra serie ha sido del 14,3% (5/35), inferior al 25% descrita en la literatura (Nicholls *et al.*, 1998), mientras que la DUPpat ha sido del 6,5% (4/62), superior al 2-4% descrito por Nicholls *et al.*, (1998), pero similar a la descrita por Lossie *et al.*, (2001). Como en estudios previos también observamos una mayor frecuencia de DUPmat frente a las DUPpat (Mascari *et al.* 1992; Mutirangura *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1993-1996; Fridman *et al.*, 2000). Una razón de esta diferencia es la rara ocurrencia de no disyunción meiotica en los gametos masculinos (Ginsburg *et al.*, 2000). La DUP resulta de dos procesos independientes de no disyunción que conducen a la simultanea ganancia y pérdida de cada uno de los homólogos. Teóricamente, la ganancia de un cromosoma materno podría ocurrir en meiosis o mitosis, pero la predominancia de heterodisomías en el SPW (DUPmat) sugiere que ocurre en la meiosis por no disyunción, mientras que la ganancia de un cromosoma paterno ocurre mayoritariamente en mitosis. De modo que los casos de DUPpat podrían ocurrir por la pérdida del homólogo materno en meiosis. Situación que en general sería letal en el embrión temprano, salvo que fuera compensada por la reduplicación del homólogo paterno durante un periodo de tiempo muy corto antes, durante o después de la fertilización.

Otra razón puede ser debido a que la trisomía 15 tenga mayor viabilidad en el desarrollo fetal temprano, proporcionando más oportunidades para que ocurra un segundo evento de no disyunción mitótica dando lugar a una DUPmat. Mientras que la monosomía 15 puede ser letal extremadamente pronto, siendo pocos los casos en los que pueda ocurrir el segundo evento que generaría una DUPpat.

Se especula que la no disyunción materna es el primer evento en ambos, seguido de un rescate de una trisomía 15 (SPW) o de una monosomía 15 (SA). Si esto es así, los casos de DUPpat también podrían estar asociados con una edad materna avanzada (Mutirangura *et al.*, 1993).

#### 4.1.2.4. Valoración de la técnica

Los microsatélites empleados han sido informativos en el 94,4% de la población analizada, siendo los más informativos GABRB3 (60,9%), D15S210 (57,4%) y D15S128 (53,6%). Solo en 10 familias (6 SPW y 4 SA) el estudio de microsatélites no ha sido informativo. La proximidad de los microsatélites empleados y su localización entre los puntos de rotura BP2 y BP3 no ha permitido determinar el tamaño de las deleciones ni diferenciar si son de clase I o de clase II.

La PCR es una técnica rápida que emplea pequeñas cantidades de ADN (ng) pero requiere analizar a los padres.

### 4.1.3. Análisis de metilación

El análisis de metilación con detección quimioluminiscente realizado en 110 pacientes con sospecha clínica de SPW ha confirmado el diagnóstico en 19 pacientes, siendo la etiología por deleción en 11, por DUPmat en uno y por DI en dos. En cinco pacientes no se ha determinado la etiología, en los pacientes 30 y 811 al no realizarse la FISH, mientras que en los pacientes 101, 1321 y 1471 con FISH normal no pudo realizarse el análisis de microsatélites, estos tres pacientes pueden tratarse de DUPmat pero no puede descartarse la posibilidad de DI.

En 17 de los 97 pacientes analizados con sospecha clínica de SA se ha observado un patrón de metilación compatible con el SA. La etiología ha sido por deleción en 14, por DUPpat en dos, mientras que en el paciente 591 solo se puede descartar la posibilidad de un DI al observarse la ausencia del alelo materno en el estudio de microsatélites, puede tratarse de una deleción o una isodisomía ya que no se realizó la FISH.

#### 4.1.3.1. Aspectos metodológicos

El análisis de metilación es una técnica que permite diagnosticar el SPW/SA al valorar el patrón de metilación dentro de la región 15q11-q13. La información obtenida al analizar el locus D15S63 y/o el exón 1 del gen SNRPN, es que la ausencia de la banda de origen paterno confirma el SPW, la ausencia de la banda de origen materno confirma el SA, y un patrón de herencia biparental descarta el SPW en todos los casos, salvo que haya ocurrido una translocación en el locus SNRPN (Sun *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 1996; Conroy *et al.*, 1997; Kuslich *et al.*, 1999). No ocurre lo mismo en el SA ya que el 20% de los pacientes con un patrón de metilación normal presentan el SA causado por mutación del gen UBE3A o bien son de etiología desconocida (Malzac *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999).

El análisis de metilación se puede realizar en el locus D15S63 con la sonda PW71B o en el exón 1 del gen SNRPN con la sonda KB17, ambas parecen igual de informativas, pero se considera que la sonda KB17 es más atractiva técnicamente al no presentar secuencias repetidas y al estar biológicamente asociada con un gen en lugar de con un fragmento de ADN anónimo (Gillissen-Kaesbach *et al.*, 1995b; Kubota *et al.*, 1996; Beuten *et al.*, 1996; Buchholz *et al.*, 1997).

En la presente serie se ha empleado la sonda PW71B para analizar la metilación diferencial de dos sitios, dentro del locus D15S63, que representan una diana de restricción para las enzimas sensibles a metilación HpaII y CfoI respectivamente. El resultado obtenido empleando la combinación de enzimas HindIII+HpaII en 105 casos (53 sospecha de SPW y 52 sospecha de SA) y las enzimas BglII+CfoI en 58 casos (29 SPW y 29 SA) ha sido igualmente informativo (Tabla 3.1.4.) y similar a estudios previos (Gillissen-Kaesbach *et al.*, 1995; van den Ouweland *et al.*, 1995; Dittrich *et al.*, 1996; Buttler *et al.*, 1996). Nuestros resultados apoyan la validez de esta sonda para el diagnóstico del SPW y SA.

La sonda KB17 se ha empleado para analizar la metilación diferencial del exón 1 del gen SNRPN con las enzimas sensibles a metilación HpaII y NotI. El resultado obtenido empleando las

enzimas XbaI+NotI en 42 casos (31 SPW y 11 SA) y las enzimas BglII+HpaII en 12 casos (5 SPW y 7 SA) ha sido igualmente informativo (Tabla 3.1.4) y similar a estudios previos, siendo válidas para el diagnóstico (Kubota *et al.*, 1996; Beuten *et al.*, 1996; Buchholz *et al.*, 1997).

En once pacientes (8 SPW y 3 SA) se analizaron las dos regiones obteniendo el mismo resultado.

El análisis de metilación ha permitido no tan solo confirmar el SPW y SA, si no también identificar a los pacientes con DI, los cuales no hubieran sido diagnosticados, ya que presentan FISH normal y HBP en el análisis de microsatélites.

#### 4.1.3.2. Valoración de la técnica de Southern blot y detección quimioluminiscente

El *Southern blot* es una técnica lenta y laboriosa que requiere muchos tratamientos antes de poder llevar a cabo la detección. Los pasos críticos son:

- La digestión del ADN: una digestión parcial puede dar fragmentos de diferente tamaño. Se ha observado que cuando se emplean muestras de sangre recogidas con heparina sódica, la digestión puede ser parcial, especialmente con NotI, haciendo difícil la interpretación al aparecer fragmentos de longitud variable (Kubota *et al.*, 1996).

- Las condiciones de hibridación: deben ser óptimas para conseguir la mayor sensibilidad y evitar el *background*.

Aunque la mayoría de los laboratorios emplean la detección radioactiva, la detección quimioluminiscente ha demostrado ser una alternativa eficaz en el análisis de metilación mediante *Southern blot*. Su sensibilidad ha aumentado gracias al empleo de sustratos como el CDP-Star que emiten una potente señal lumínica bajo la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. La estabilidad de estos sustratos es superior a los 14 días de vida media del P<sup>32</sup>. Se emplea digoxigenina (11dUTP-DIG) para marcar las sondas que son detectadas mediante anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. Los tiempos de exposición se han reducido notablemente (30min. vs. 1-3 días), aunque requiere una mayor cantidad de ADN (>10 µg vs. 4-7 µg). Su principal limitación es la pérdida de sensibilidad causada por el *background* en períodos de exposición largos (Engler-Blum *et al.*, 1993).

#### 4.1.3.3. Valoración del análisis de metilación

La sonda PW71B para el análisis del locus D15S63 (Dittrich *et al.* 1992-96) y la sonda KB17 para el análisis del exón 1 del gen SNRPN (Sutcliffe *et al.*, 1994) han demostrando su robustez en el diagnóstico del SPW/SA, siendo hoy día las utilizadas por la mayoría de los laboratorios. El análisis en estos loci ha puesto de manifiesto que en ocasiones se observan variaciones o contradicciones del resultado esperado. Estas situaciones poco frecuentes que se describen a continuación recomiendan el uso de la sonda KB17.

## Discusión

- El locus D15S63 (PW71) está hipometilado en corion, placenta y tumores sólidos, lo que impide realizar el diagnóstico prenatal en el primer trimestre con esta sonda (van den Ouweland *et al.*, 1995; Gillessen-Kaesbach *et al.*, 1995a; ASGH/ACMG, 1996).
- Dos pacientes SA presentaron un patrón de metilación normal con la sonda PW71B pero compatible con el SA con la sonda KB17 (Malzac *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 1997).
- En la población de judíos ashkenazis hay una delección de 28 Kb dentro del locus D15S63 que constituye una variante neutral poco frecuente y conduce a resultados falsos positivos en el análisis con la sonda PW71B (Buiting *et al.*, 1999).
- Una paciente SA con microdelecciones de 5Kb y 22pb en el CI presentó reducción en la intensidad de la banda materna al analizar el locus D15S63, mientras que en el análisis del locus SNRPN presentó un patrón típico de SA (Buiting *et al.*, 1999).
- Se recomienda precaución en la interpretación de los resultados, ya que la presencia de dos bandas pero una de ellas de menor intensidad indica la presencia de mosaicismo de un DI (Otha *et al.*, 1999; Buiting *et al.*, 2003).
- Una limitación de la técnica es un patrón de metilación normal en los casos de translocaciones equilibradas dentro del gen SNRPN que no generan delección ni DUP (Sun *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 1996; Conroy *et al.*, 1997; Kuslich *et al.*, 1999). Estos casos enfatizan la importancia del análisis citogenético convencional en paralelo con el análisis de metilación para detectar estos casos raros de translocación con patrón de metilación normal.
- Se han descrito cuatro pacientes con un patrón de metilación alterado en D15S63, pero normal en el locus SNURF-SNRPN. Dos pacientes SPW presentaron un patrón de metilación SA y dos pacientes SA presentaron un patrón de metilación SPW. Estos casos demuestran que pueden ocurrir cambios en la metilación restringidos espacialmente. En algunos casos, estos cambios pueden reflejar una propagación incompleta de la impronta (Runte *et al.*, 2001).

El estudio exhaustivo de la región 15q11-q13 ha demostrado la existencia de otros loci con metilación diferencial, importantes en el funcionamiento de la impronta, que no son dianas para enzimas de restricción sensibles a metilación, por lo que su estudio no puede realizarse mediante *Southern blot* (Zeschnigk *et al.*, 1997). Una técnica que permite analizar todas las citosinas metiladas independientemente de que formen parte de una diana de restricción es la MS-PCR (Herman, 1996). La aplicación de la MS-PCR tras el tratamiento del ADN con bisulfito sódico para el diagnóstico del SPW/SA la desarrollaron Zeschnigk *et al.*, (1997). Esta técnica ha demostrado ser igual o más eficaz que el *Southern blot*, pero menos lenta, laboriosa y costosa, por lo que está reemplazándolo.

#### 4.2. Consejo genético en el SPW

En la presente serie se ha ofrecido asesoramiento genético a las familias con hijos afectos informando del posible riesgo de tener otro hijo con SPW en futuros embarazos. En seis familias se ha realizado un diagnóstico prenatal, una por tener un hijo con deleción, dos por tener hijos con DUPmat y tres por la presencia de trisomía 15 en biopsias de vellosidades coriales.

En la familia con un hijo con deleción 15q11-q13 se le informó que esta alteración ocurre de forma esporádica en la línea germinal masculina. A pesar de que la recurrencia es extremadamente rara, considerándose un riesgo teórico de tener otro hijo afecto de SPW por deleción bajo, <1% (Hendrickson *et al.*, 1991), se realizó la FISH a partir de líquido amniótico. El resultado fue normal descartando la presencia de deleción en el feto.

En dos familias con un hijo con DUPmat se les informó que la disomía normalmente está causada por no disyunción en meiosis I materna y se asocia con la edad materna avanzada (Robinson *et al.*, 1991), siendo el riesgo teórico de tener otro hijo afecto con DUPmat bajo, <1%. En las dos familias se realizó un diagnóstico prenatal en líquido amniótico mediante análisis de microsatélites descartando la posibilidad de una DUPmat en el feto al observar herencia biparental de los marcadores analizados.

En las tres familias con trisomía 15 en biopsias de vellosidades coriales se recomendó realizar una amniocentesis ya que en ocasiones puede perderse un cromosoma 15 del cigoto trisómico en una nueva no disyunción. Un cariotipo normal en la amniocentesis puede acabar en el nacimiento de un feto normal, pero en un tercio de los casos, consecuencia de la segunda no disyunción, los dos cromosomas 15 tienen el mismo origen parental causando DUP. Para descartar la posibilidad de DUPmat se realizó el estudio de microsatélites observando herencia biparental para los marcadores estudiados.

Puede ocurrir que el feto presente un cariotipo normal y la trisomía 15 quede confinada a placenta, lo cual se detecta en el 0.027% de las muestras de vellosidad corial a las 9-12 semanas de gestación (EUROMIC, 1999). Algunos de los embarazos con mosaicismo confinado a placenta progresan y nace un bebé normal, otros resultan en muerte fetal intrauterina, retraso en el crecimiento intrauterino o morbilidad prenatal (Kalousaek *et al.*, 1987-1991; Morichon-Delvallez *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1997).

En ocasiones, en la amniocentesis puede observarse una trisomía 15 o una trisomía 15 en mosaico, en ambos casos el feto manifestará malformaciones severas en el corazón, hipotonía severa, retraso en el crecimiento intrauterino, dismorfismo craneal (macrocefalia, puente nasal plano, boca pequeña, micrognatia), ventrículo hipoplástico, los pacientes mueren a los pocos días (Sundberg *et al.*, 1994; Milunsky *et al.*, 1996; Chistian *et al.*, 1996). Se han descrito casos de trisomía 15 en mosaico y DUPmat con fenotipo SPW severo (Olander *et al.*, 2000).

### **4.3. Alteraciones genéticas en la población SPW**

El estudio molecular realizado en la presente serie de 151 pacientes con sospecha de SPW y seis líquidos amnióticos ha permitido confirmar el síndrome en 40 pacientes (26,5%), aunque en cinco no se ha determinado la etiología.

La presencia de delección ha sido del 80% (28/35) ligeramente superior al 65-75% citado en la literatura (Nicholls *et al.*, 1998). No obstante, si tenemos en cuenta que tres de los cinco pacientes en los que no se ha determinado la etiología tienen FISH normal, la frecuencia es prácticamente similar 73,7% (28/38). El diagnóstico de los pacientes con delección ha sido confirmado mediante FISH. El paciente 74 presentó, además de la delección 15q11-q13 observada mediante FISH, un cariotipo 47,XXY correspondiente al síndrome de Klinefelter (Rego *et al.*, 1997). Esta situación es poco frecuente, se han descrito cinco casos más, dos causados por DUPmat (Trent *et al.*, 1991; Tu *et al.*, 1992; Butler *et al.*, 1997; Geffroy *et al.*, 1998; Nowaczyk *et al.*, 2004). La probabilidad de que ocurran estas dos condiciones juntas por azar es de 1 en 5-20 millones de recién nacidos.

La frecuencia de DUPmat ha sido del 14,3% (5/35), inferior al 20-30% descrita en la literatura (Nicholls and Knepper, 2001). No obstante, si tenemos en cuenta que cinco pacientes en los que no se ha determinado la etiología, podrían ser DUPmat, la frecuencia sería similar.

El DI se ha observado en el 5,7% (2/35) de los pacientes analizados, siendo esta frecuencia similar a la citada en la literatura (Nicholls and Knepper, 2001). Solo se han descrito unos 60 casos y de ellos el 14% han presentado microdelección del CI (Buiting *et al.*, 2003).

Cinco pacientes han sido diagnosticados como SPW mediante el análisis de metilación pero no se ha determinado su etiología. La ausencia de alelos paternos en el estudio de microsatélites del paciente 30 nos hace suponer que este paciente sería compatible con una DUPmat. Un resultado normal mediante FISH lo confirmaría. En los pacientes 101, 1321 y 1471 se descartó la posibilidad de una delección mediante FISH. La etiología en estos pacientes puede ser DUPmat o DI pero sin un estudio de microsatélites no se puede confirmar. El paciente 811 se estudió solamente con el análisis de metilación. La etiología en este paciente puede ser delección 15q11-q13, DUPmat o DI.

Un patrón de metilación normal permitió descartar el SPW en 91 pacientes. En 20 únicamente se realizó la FISH, por lo que solo se puede descartar la delección, estos casos pueden ser SPW causados por DUPmat o DI, el análisis de metilación lo descartaría.

#### 4.4. Correlación genotipo-fenotipo en el SPW

La manifestación clínica del SPW es heterogénea, los rasgos pueden aparecer en mayor o menor grado o estar ausentes de un paciente a otro. Comparando la clínica de los pacientes en función de la etiología se puede establecer si hay diferencias fenotípicas entre ellos e identificar rasgos peculiares para cada etiología. Todas las características clínicas no han sido recogidas en cada paciente.

##### 4.4.1. Pacientes con delección 15q11-q13

La presentación neonatal está asociada con hipotonía neonatal profunda, problemas de alimentación, disminución de los reflejos tendinosos, llanto débil y frecuente inactividad fetal (Stephenson, 1992; Holm *et al.*, 1993). En nuestra serie de nueve pacientes con delección menores de tres años (Tabla 3.1.9), la mayoría hembras (8/9), han presentado hipotonía, facies característica y retraso global del desarrollo, criterios considerados clínicamente relevantes en el neonato (Miller *et al.*, 1999). Los problemas de alimentación y el poco aumento ponderal también han sido generalizados salvo en dos pacientes. El 85% ha presentado movimientos fetales disminuidos, llanto débil y manos y pies pequeños. Casi siempre, los problemas de alimentación y los movimientos fetales disminuidos están asociados con la hipotonía central (Cassidy *et al.*, 1997). La presente serie ha manifestado las características clínicas esperadas del síndrome, salvo la hipopigmentación que ha sido ligeramente inferior a la descrita (37,5% vs. el 48.5%) por Cassidy *et al.*, (1997).

A partir de los tres años se inicia una nueva fase caracterizada por el incremento del apetito y la ganancia de peso, mientras que la hipotonía y los problemas de alimentación mejoran o desaparecen (Holm *et al.*, 1993). En la presente serie, los siete varones y 11 hembras de edad media 15 años han manifestado obesidad, hiperfagia y rasgos faciales característicos (Tabla 3.1.10). La puntuación media ha sido de 9,7 [6,5-13], estando presentes más de cinco criterios mayores. En esta etapa es característico el retraso en el desarrollo neuropsicomotor, les cuesta aprender a sentarse, caminar y articular el habla. El retraso mental moderado ha estado presente en 17/18 pacientes (94,4%), superior al 71% descrito por Webb *et al.*, (2002). La hipotonía y el hipogonadismo han sido frecuentes, 16/17 pacientes (94,1%), similar al 96% y 100% respectivamente descrito por Cassidy *et al.*, (1997).

Respecto a los criterios menores el más frecuente ha sido el llanto débil 10/10 (100%). La frecuencia de otros criterios ha sido similar a estudios previos (Mitchell *et al.*, 1997; Cassidy *et al.*, 1997; Fridman *et al.*, 2000), manos y pies pequeños 14/15 (93,3%), talla baja 13/15 (86,7%), hipopigmentación 8/13 (61,5%), anomalías oculares 12/14 (85,7%) y trastornos del sueño 5/11 (45,5%). Sí hemos observado una menor frecuencia en los problemas de articulación del habla 46,2% (6/13) frente al 95,7% descrito por Cassidy *et al.*, (1997).

#### **4.4.2. Pacientes con disomía uniparental**

Los pacientes con DUP han presentado una puntuación media de 7,4 [4-9,75], manifestando la mayoría de los rasgos clínicos esperados del SPW (Tabla 3.1.11). La baja frecuencia observada en los problemas de alimentación y el aumento ponderal normal podría interpretarse como un mejor crecimiento que en los pacientes con delección como sugieren Mitchell *et al.*, (1996). No obstante, el reducido número de casos no permite obtener conclusiones significativas. Ninguno de los pacientes valorados presenta hipopigmentación, coincidiendo con la observación de que este criterio es menos frecuente en los pacientes con DUP 15% frente al 48,5% en los pacientes con delección (Cassidy *et al.*, 1997).

La presencia de hipotonía e hipoplasia genital en una paciente de 2,8 años fueron decisivos en la sospecha clínica del SPW a pesar de tener una puntuación baja. La apariencia facial de esta paciente fue moderada, coincidiendo con la sugerencia de que el diagnóstico de las DUP puede verse retrasado debido a una apariencia facial menos característica (Cassidy *et al.*, 1997; Gunay-Aygun *et al.*, 1997).

El paciente con DUPmat podría describirse tras los resultados obtenidos como aquel que al nacimiento presenta hipotonía e hipoplasia genital, manifestando posteriormente hiperfagia, rápido aumento de peso, obesidad, facies característica, retraso mental moderado, manos estrechas, saliva viscosa y trastornos del sueño, principales características del síndrome. Presentaría una manifestación moderada en rasgos como problemas de alimentación y anomalías oculares, siendo poco frecuente la hipopigmentación y los problemas de articulación del habla.

#### **4.4.3. Pacientes con defecto de impronta**

Solo dos pacientes han presentado DI. La paciente de 5,4 años con una puntuación de cinco presentó hipotonía, historia de problemas de alimentación y rasgos faciales característicos, mientras que la paciente de 29 años y siete puntos presentó obesidad, hiperfagia e hipogonadismo. Ambas presentaron movimientos fetales disminuidos, manos y pies pequeños y manos estrechas. Ninguna presentó hipopigmentación ni anomalías oculares (Tabla 3.1.10). La ausencia de estos dos rasgos es característica entre los pacientes con DI y se explica por la presencia del gen OCA2.

Los pacientes con DI se pueden considerar molecularmente similares a los pacientes con DUP, ambos tienen silenciados los genes SPW y presentan una doble dosis de genes maternos. Clínicamente presentarían un fenotipo similar, tal como sucede en la presente serie en la que todos los pacientes presentan hipotonía, hiperfagia, saliva viscosa y manos estrechas, y no presentan problemas articulares ni hipopigmentación y el aumento ponderal es normal (Tabla 3.1.11).

#### 4.4.4. Pacientes SPW sin etiología determinada

De los cinco pacientes en los que no se ha determinado su etiología, el paciente 30 de 13 años presentó obesidad, hiperfagia, retraso mental moderado, rasgos faciales característicos, hipotonía e historia de problemas de alimentación (Tabla 3.1.10). La ausencia de hipogonadismo e hipopigmentación nos hace suponer que este paciente sería compatible con una DUPmat.

Tres pacientes pueden presentar DUP o DI pero no es posible diferenciar clínicamente estas etiologías. El paciente 101 es un varón que manifestó a los 9 meses hipotonía, movimientos fetales disminuidos, problemas de alimentación, hipoplasia genital, retraso global del desarrollo, llanto débil y facies característica. No presentó hipopigmentación (Tabla 3.1.9). La ausencia de este rasgo es común en pacientes con DUP y DI. Del paciente 1321 no se remitió el protocolo clínico. La paciente 1471 de 10 años, con una puntuación de 7, manifestó hipotonía, hipogonadismo, historia de problemas de alimentación, movimiento fetal disminuido, llanto débil, trastornos del sueño, fenotipo conductual característico y manos y pies pequeños. No presentó talla baja (Tabla 3.1.10).

El paciente 811 es un varón con hipotonía, hipoplasia genital, retraso global del desarrollo, rápido aumento de peso y rasgos faciales moderados que registró una puntuación de 6. En base a estos rasgos no es posible asociarle una etiología, aunque una apariencia facial moderada es frecuente entre los pacientes con DUP (Cassidy *et al.*, 1997).

#### 4.4.5. Pacientes con sospecha clínica con estudio molecular normal

De los 111 pacientes con estudio molecular normal se recogió el protocolo clínico a 60. La puntuación fue inferior a ocho en el 87,7% de los pacientes con un patrón de metilación normal, pero hubo ocho pacientes (13,3%) en los cuales la puntuación fue superior a ocho. Un porcentaje similar de casos con clínica SPW y patrón de metilación normal ha sido descrito por otros autores (Buchholz *et al.*, 1997). Estos casos pueden tratarse de otras patologías que comparten rasgos comunes con el SPW, como puede ser el síndrome de Bardet-Biedl, la ortodistrofia hereditaria de Albright y el síndrome de Cohen en los cuales el retraso mental y del desarrollo están asociados con la obesidad (Gunay-Aygun *et al.*, 1997). El análisis de metilación es decisivo en estos casos para descartar el SPW.

De los 20 pacientes en los que únicamente se realizó la FISH, tres presentaron una puntuación superior a ocho (Tabla 3.1.7), pueden ser compatibles con DUPmat o DI, pero también pueden formar parte del 10% de casos con una puntuación superior a ocho y patrón de metilación normal (Buchholz *et al.*, 1997).

#### **4.4.6. Valoración clínica global**

La complejidad del SPW llevó al desarrollo de protocolos clínicos para facilitar su diagnóstico, sirviendo de herramienta de apoyo para clínicos no familiarizados con el síndrome. Los criterios clínicos propuestos por Holm *et al.*, (1993) permiten sospechar la presencia del SPW en el paciente pero es necesario confirmarlo mediante el diagnóstico molecular, ya que no todos los pacientes presentan todos los rasgos y algunos son comunes con otras patologías.

El test estadístico de Fisher aplicado a nuestra serie de 40 pacientes no es significativo para las manifestaciones analizadas, salvo para los problemas de alimentación, obteniendo resultados semejantes a estudios previos (Mitchell *et al.*, 1996, Cassidy *et al.*, 1997; Guany-Aygun *et al.*, 1997). Se puede establecer que hay unos rasgos que son comunes entre los pacientes y otros rasgos en los cuales se observan diferencias según la etiología.

##### 4.4.6.1. Rasgos comunes

No hay diferencias significativas en la frecuencia y severidad en criterios como hipotonía neonatal, obesidad, hiperfagia, retraso en el desarrollo, facies característica, hipogonadismo, manos y pies pequeños, anomalías dentales, saliva viscosa, alteraciones de comportamiento y problemas de sueño. Otros autores tampoco encuentran diferencias en IQ medio, edad de caminar, altura en adultos, escoliosis y vomito disminuido (Cassidy *et al.*, 1997). Estos rasgos ocurren de forma similar en los dos grupos y sugiere que los pacientes con delección presentan un fenotipo similar a los pacientes con DUP.

##### 4.4.6.2. Rasgos diferenciales

Para algunos criterios hay evidencias que indican que hay diferencias significativas entre los pacientes con DUP y los pacientes con delección. Algunas de estas diferencias son rasgos secundarios que pueden no afectar significativamente a la prognosis y no tienen repercusión en la historia natural.

En nuestra serie se observan diferencias entre delección y DUPmat solo en problemas de alimentación (93% vs. 50%,  $p= 0.070$ ). Otros autores observan que las mujeres con DUP además de menos problemas de alimentación, muestran una hiperfagia más tardía y menor obesidad. Comparando por sexos describen que las mujeres con DUP están menos obesas que las mujeres con delección. No obstante estos resultados podrían estar influidos por factores externos o ser reflejo de una variación de la muestra (Mitchell *et al.*, 1996; Gunay-Aygun *et al.*, 1997).

Respecto a la facies característica no se han observado diferencias entre pacientes con delección y DUPmat como describen Cassidy *et al.*, (1997). Como la apariencia facial es un rasgo subjetivo, puede ser responsable de que la edad mínima de diagnóstico sea más temprana en pacientes con delección que en pacientes con DUP (0,9 años vs. 2,8 años en nuestra serie; 2 meses vs. 3.5 años en Cassidy *et al.*, 1997). Se ha establecido que la edad media de diagnóstico

de los pacientes con delección es 3,8 años frente a los 9,3 años en los pacientes con DUP (Gunay-Aigunt *et al.*, 1997).

En nuestra serie la hipopigmentación ha estado presente en el 37,5% de los pacientes menores de tres años y en el 61,5% de los pacientes mayores de tres años, la media es similar al 48,5% descrita por Cassidy *et al.*, (1997), siendo más frecuente en los pacientes con delección (48,5% vs. 15%,  $p= 0.038$ ). Este rasgo está asociado con la presencia del locus OCA2 (P) no imprintado y localizado en la región SA más distal. La variabilidad alelica de este locus determina las diferencias de pigmentación en los pacientes y problemas oculares.

Cassidy *et al.*, (1997) describen diferencias estadísticamente significativas, con una mayor frecuencia, en la habilidad inusual en hacer puzzles, rascarse la piel y una alta resistencia al dolor en los pacientes con delección. Además, observaron una tendencia a una mayor frecuencia de problemas en el habla entre los pacientes con delección (95,7% vs. 71,4%;  $p= 0.0574$ ).

Otros autores han observado que los pacientes con DUP presentan un menor peso y talla al nacer (Mitchell *et al.*, 1996; Gunay-Aygun *et al.*, 1997). Este retraso en el crecimiento podría ser debido a una insuficiencia placentaria al presentar trisomía 15 confinada a placenta tal como se describe para otras trisomías (Kalousek, 1994). No obstante, el tamaño de la placenta no ha sido estudiado sistemáticamente (Gunay-Aygun *et al.*, 1997).

Referente al nivel de habilidad intelectual hay discrepancias, algunos estudios describen que los paciente con DUP tienen una mayor habilidad intelectual que los pacientes con delección (IQ medio 71 vs. 63) (Dykens *et al.*, 1999), mientras que otros no describen diferencias (Gillissen-Kaesbach *et al.*, 1995; Cassidy *et al.*, 1997; Veltman *et al.*, 2004).

Boer *et al.*, (1999) encuentran que los pacientes con DUP son más propensos que los pacientes con delección a alteraciones afectivas severas y rasgos psicóticos, siendo de adultos casi siempre psicóticos (Webb *et al.*, 2002). También se ha observado que los pacientes con DUP tienen mayores niveles de síntomas asociados con el autismo (Dykens *et al.*, 1999; Veltman *et al.*, 2004).

Recientemente se ha descrito que los pacientes con DUP caminan antes que los pacientes con delección (22 meses vs. 29,7 meses), quizás la hipotonía sea más severa en los casos con delección y esto hace que caminen más tarde, mientras que los casos DUP tienen más dificultades en la coordinación motora (Veltman *et al.*, 2004). Problemas de coordinación motora también han sido observados en casos con duplicación 15q proximal (Bolton *et al.*, 2001), sugiriendo que las duplicaciones pueden tener un impacto en el desarrollo motor.

#### 4.5. Importancia del diagnóstico clínico

Independientemente de la etiología, hay unos rasgos que permiten al especialista sospechar la presencia del SPW y solicitar un estudio molecular para confirmarlo. Gracias al avance molecular y la experiencia clínica se ha podido observar que los criterios propuestos en 1993, a pesar de una sensibilidad aceptable de muchos de ellos, pueden ser demasiado exclusivos. Se ha observado que el 16,7% de los pacientes con un diagnóstico molecular positivo no los cumplen, en nuestra serie el 8,1% (3/37) presentan una puntuación inferior a seis, por lo que sería conveniente un sistema de puntuación menos estricto (Gunay-Aygun *et al.*, 2001). Estos autores sugieren que el estudio molecular se extienda a casos que cumplan unas características mínimas agrupadas por edad y basadas en las fases de la historia natural del SPW (Tabla 4.5.1). Con esta estrategia se consigue seleccionar a que pacientes con una puntuación baja se les debe realizar un test molecular.

**Tabla 4.5.1.** Características mínimas para un diagnóstico molecular

<b>Edad</b>	<b>Rasgos suficientes</b>
Recién nacidos	Hipotonía y pobre succión
2 a 6 años	Hipotonía con historia de pobre succión Retraso global del desarrollo
6 a 12 años	Historia de hipotonía con pobre succión Retraso global del desarrollo Apetito excesivo (hiperfagia, obsesión por la comida) con obesidad central si no es controlada
Mayores de 12 años	Dificultades de aprendizaje Apetito excesivo (hiperfagia, obsesión por la comida) con obesidad central si no es controlada Hipogonadismo hipotalámico y/o problemas típicos de comportamiento (trastornos de comportamiento y rasgos compulsivos obsesivos)

En nuestra serie solo tres pacientes con diagnóstico molecular de SPW han presentado una puntuación inferior a seis, manifestando hipotonía, facies característica e hipoplasia genital. La hipotonía es una de las características mínimas sugeridas. Lo que sí se observa en nuestra serie, agrupada por edad de 0-3 años y mayores de tres años, es que todos los pacientes con diagnóstico molecular presentan siempre una serie de criterios (Tabla 4.5.2).

**Tabla 4.5.2.** Criterios siempre presentes entre nuestros pacientes SPW

<b>Edad</b>	<b>Criterios</b>
0-3 años	Hipotonía Facies característica Retraso global del desarrollo
>3 años	Hiperfagia Obesidad Rasgos faciales

La sospecha neonatal del SPW y su confirmación mediante análisis de metilación en recién nacidos, proporciona la oportunidad para dirigir y prevenir problemas y complicaciones que puedan ocurrir más tarde (Gillissen-Kaesbach *et al.*, 1995; Fridman *et al.*, 2000). Con la confirmación temprana del SPW se evitan test de diagnóstico invasivos como biopsias musculares para estudiar la hipotonía, gastroscopias para problemas de alimentación o pruebas neurológicas. Además, posibilita una prognosis adecuada ofreciendo opciones terapéuticas para la prevención y tratamiento de la obesidad, como proporcionar una dieta adecuada, estimular hábitos de alimentación y realizar ejercicios apropiados para reducir problemas relacionados con la obesidad (diabetes, hipertensión y problemas respiratorios) los cuales son las principales causas de morbi/mortalidad durante la adolescencia.

#### 4.6. Alteraciones genéticas en la población SA

El estudio molecular realizado en la presente serie de 147 pacientes con sospecha de SA y dos líquidos amnióticos ha permitido confirmar el síndrome en 47 pacientes. Se han añadido 15 pacientes con estudio molecular normal y una puntuación igual o superior a 10 al considerarlos candidatos a presentar una mutación en el gen UBE3A o formar parte del grupo de pacientes de etiología desconocida. Estos 62 pacientes considerados SA clásicos representan el 41,6% de la población analizada con sospecha de SA, porcentaje superior al 20% observado por otros autores (Buchholz *et al.*, 1997; Malzac *et al.*, 1998; Lossie *et al.*, 2001).

La presencia de delección ha sido del 63% (39/62) similar al 65-75% citado en la literatura (Nicholls *et al.*, 1998; Lossie *et al.*, 2001). El diagnóstico de los pacientes se ha confirmado mediante FISH. En el paciente 44, con distrofia muscular de Becker por delección de los exones 3-9 del gen de la distrofina (Colomer *et al.*, 1994) pero con retraso mental severo, inusual en estos pacientes, se confirmó mediante FISH la sospecha inicial de SA (Poyatos *et al.*, 1999). Esta coincidencia es una situación infrecuente en la que las dos mutaciones *de novo* han ocurrido al azar en la línea germinal femenina, siendo el primer caso descrito. La delección ocurre principalmente por la recombinación desigual entre secuencias repetidas que flanquean la región 15q11-q13, Gimelli *et al.*, (2003) han identificado en algunas de las madres de pacientes SA con delección de clase II la presencia de una inversión de la región entre los puntos de rotura BP2 y BP3, sugiriendo que esta inversión podría predisponer a delección. Consideran esta inversión un polimorfismo genómico que estaría presente en el 4,5% de la población general, pero como hay pocos casos de recurrencia de la delección 15q11-q13 (<1%), la penetrancia es baja (0,1-0,2%).

La DUPpat se ha observado en el 6,5% (4/62) de los pacientes, frecuencia similar a la descrita por Lossie *et al.*, (2001). En dos pacientes la DUPpat ha estado causada por la presencia de un isocromosoma 15, alteración de la que se han descrito en la literatura tan solo seis casos incluidos los nuestros (Freeman *et al.*, 1993; Tonk *et al.*, 1996; Beuten *et al.*, 1996; Fridman *et al.*, 1998; Poyatos *et al.*, 2002). El reducido número de pacientes con esta alteración y el que las isodisomías sean más frecuentes que la heterodisomías indica que pueda existir un mecanismo selectivo-correctivo. La menor frecuencia de heterodisomías podría explicarse por la baja probabilidad de que ocurra una no disyunción en la meiosis masculina y por el mecanismo de corrección de una trisomía 15. En nuestra serie uno de los cuatro pacientes con DUPpat ha presentado heterodisomía.

Cuatro pacientes han sido diagnosticados como SA mediante el análisis de microsatélites, pero no se ha determinado su etiología, siendo compatibles con delección o DUPpat.

El DI es una alteración descrita en el 7% de los pacientes SA (Lossie *et al.*, 2001; Buiting *et al.*, 2003) pero en nuestra serie no se ha observado ningún caso.

Han presentado un estudio molecular normal 102 casos, 80 presentaron un patrón de metilación normal (Tabla 3.2.5), por lo que se descarta la posibilidad de una delección, DUPpat o

DI, a seis se les realizó la FISH y los microsatélites, por lo que solamente se puede descartar la deleción o DUPpat y a 13 únicamente se les realizó la FISH, por lo que solo se puede descartar la deleción (Tabla 3.2.7). En estos pacientes no se puede descartar completamente el SA con las pruebas moleculares realizadas, siendo el diagnóstico exclusivamente clínico.

Considerando la clínica y un patrón de metilación normal, el 76% (47/62) manifestaron una amplia variedad de rasgos relacionados con el síndrome, donde el diagnóstico clínico no es concluyente, mientras que el 24% restante (15/62) son considerados SA clásicos, los cuales pueden presentar una mutación en el gen UBE3A o ser pacientes SA de etiología desconocida. Estos 15 pacientes se han incluido en un proyecto de investigación, confirmándose la presencia de mutación en el gen UBE3A en dos de ellos (Camprubí, comunicación personal). En la literatura se describe que el 4-8% de los pacientes SA presentan una mutación en el gen UBE3A (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997), mientras que un 10-15% son pacientes de etiología desconocida (Fang *et al.*, 1999), en la presente serie ha sido de 3,2% y 20,8 respectivamente.

#### **4.7. Correlación genotipo-fenotipo en el SA**

Los rasgos en el SA pueden aparecer en mayor o menor grado o estar ausentes de un paciente a otro, siendo conveniente un diagnóstico molecular para confirmar la sospecha. Una vez confirmada la etiología se puede establecer si hay diferencias fenotípicas e identificar rasgos consistentes para cada etiología. Todas las características clínicas no han sido recogidas en cada paciente.

##### **4.7.1. Pacientes con deleción 15q11-q13**

Los treinta y nueve pacientes con deleción (21 V y 18 H) de edad media 5,2 años [0,1-16] y puntuación media 10,8 [4-16], han presentado como características más frecuentes, retraso en el desarrollo, ausencia de habla y aleteo de manos (Tabla 3.2.13). La frecuencia de ataxia (94%), convulsiones (94%), risa frecuente (88%), hipopigmentación (80%), protusión de la lengua (73%) y microcefalia (61%) es similar a la descrita por otros autores (Saitoh *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996; Moncla *et al.*, 1999) a excepción de la microcefalia, del 90%, en la serie de Moncla *et al.*, (1999). Sí se observa una menor frecuencia en el occipital plano (67% vs. 90%) y la prognatia (57% vs. 86%) respecto a la serie de Saitoh *et al.*, (1994). La comunicación por gestos observada en 8/35 pacientes (23%) es limitada pero como describen Moncla *et al.*, (1999) les permite expresar sus necesidades básicas y preferencias alimenticias utilizando toques repetitivos para llamar la atención. Se considera que el desarrollo mental equivale al de una edad de 3 años (Brun, 2002). La distribución por sexo es equivalente, de acuerdo con Saitoh *et al.*, (1994), aunque otros autores han encontrado una mayoría de hembras, sugiriendo que es más fácil reconocer el síndrome en hembras (Clayton-Smith *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996).

Una de las comparativas clínicas más completa entre pacientes con delección y pacientes sin delección puso de manifiesto que hay características que son más frecuentes y determinan una mayor severidad en los pacientes con delección (Moncla *et al.*, 1999). Observaron un desarrollo motor tardío y en menor grado que en los otros grupos, que dependía del grado de expresión de la ataxia y las convulsiones. Así, aunque el 75% de los pacientes pueden caminar independientemente, la edad media de inicio es a los 5,2 años [2,5-10]. La epilepsia se inicia a una edad temprana, 20 meses de media [6 meses – 5 años] y es más severa. El dismorfismo facial es más típico, mientras que la altura y la obesidad es menor. Fridman *et al.*, (2000) observaron además que el diagnóstico se hacía antes en pacientes con delección.

Los pacientes con delección, además de la ausencia del gen UBE3A, han perdido el gen GABRB3, considerado responsable parcial del déficit neurológico de los pacientes, ocasionando temblores, convulsiones, espasmos, EEG anormal y otros rasgos típicos del SA (DeLorey *et al.*, 1998; Holopainen *et al.*, 2001). La mayor severidad de la epilepsia en los pacientes con delección respecto a los pacientes con mutación en el gen UBE3A apunta que la deficiencia en GABRB3 pueda actuar como un modificador de la expresión de la epilepsia. Se ha sugerido que variantes del receptor GABA pueden jugar un papel en el autismo (Buxbaum *et al.*, 2002), no obstante, aunque se han descrito pacientes que manifiestan rasgos autistas, los SA no son autistas, especialmente por su habilidad para comprometerse en una reciprocidad social apropiada e interacción personal (Williams *et al.*, 2001). También se ha sugerido que una disminución de la inhibición GABAérgica contribuya al insomnio, estando la subunidad  $\beta 3$  implicada en procesos del sueño (Buhr *et al.*, 2002).

#### **4.7.2. Pacientes con disomía uniparental**

Los cuatro pacientes con DUP (3 V y 1 H) de edad media 4 años [0,1-9] han presentado una puntuación media de 10,6 [8-13], siendo la puntuación más alta en los pacientes con isocromosoma. Manifiestan la mayoría de los rasgos clínicos esperados, sin embargo, hay ausencia de problemas de alimentación, protusión de la lengua y prognatia (Tabla 3.2.13). La capacidad para comunicarse por gestos es buena, se observa en el 75% de los pacientes y ello posibilita que puedan desarrollar una comunicación con otros miembros de la familia a través de un código gestural (Brun, 2002). La ausencia de protusión de la lengua y prognatia en nuestros pacientes coincide con la observación de que el dismorfismo facial es moderado en los pacientes con DUPpat (Moncla *et al.*, 1999). La hipopigmentación, observada en dos pacientes (50%), es superior a la descrita por Moncla *et al.*, (1999). La microcefalia observada solo en los pacientes con isocromosoma 15, representa una frecuencia del 67%, superior al 15,8% y 31,6% descrita por otros autores que no incluyen pacientes con isocromosoma (Moncla *et al.*, 1999; Fridman *et al.*, 2000). La frecuencia de las convulsiones, observada en tres pacientes, dos con isocromosoma 15, es del 75%, superior al 42,1% recopilada por Fridman *et al.*, (2000). Estos resultados nos conducen a plantear la hipótesis de que los pacientes con isocromosoma

presentan un fenotipo que no difiere del observado en pacientes con delección (Poyatos *et al.*, 2002).

El fenotipo de los pacientes con DUPpat es considerado menos severo que el de los pacientes con delección al presentar un mejor crecimiento físico, pocas o ninguna convulsión, menor ataxia, epilepsia menos severa de inicio a los 5,4 años, comienzan a caminar temprano a los 2,5 años y tienen mayores habilidades cognitivas y comunicativas (Bottani *et al.*, 1994; Guillessen-kaesbach *et al.*, 1995; Tonk *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997; Fridman *et al.*, 1998; Moncla *et al.*, 1999). Sin embargo, en nuestros dos pacientes con isocromosoma 15 y en los pacientes con isodisomía descritos por Beuten *et al.*, (1996) y Prasad *et al.*, (1997) no se observan diferencias respecto a los pacientes con delección. Principalmente por la pobre capacidad comunicativa verbal y no verbal, el inicio temprano de las convulsiones a los 7 y 8 meses, y comienzan a caminar tarde, a los 5-7 años. En base a estas observaciones y las obtenidas al comparar nuestros dos pacientes con 14 pacientes con DUPpat (4 con isocromosoma y 10 con isodisomía) recogidos de la literatura, sugerimos que en un 25% de los pacientes con DUPpat el fenotipo puede considerarse severo (Poyatos *et al.*, 2002). Qué ocurre en estos pacientes con isocromosoma 15 o isodisomía para que presenten un fenotipo más severo que los pacientes con DUPpat no está claro. Ambos presentan dos copias de la región 15q11-q13 de origen paterno, por lo que solo se produce la ausencia de genes regulados por la impronta, el resto de genes estarán en una dosis normal. Una posible explicación de esta severidad podría ser la deficiencia de genes reguladores del crecimiento en estos pacientes, como ocurriría en los pacientes con delección. Smith *et al.*, (1998) proponen que la presencia de dos copias de estos genes en los pacientes con DUP serían responsables del mejor crecimiento respecto a los pacientes con delección. Otra posible causa podría ser que existiese un bajo nivel de mosaicismo de trisomía 15, tal como se ha descrito en un paciente SPW con DUPmat y un fenotipo severo (Olander *et al.*, 2000). Aunque quizás sean otros factores los determinantes de este fenotipo más severo, que de momento desconocemos, como el bagaje genético.

#### **4.7.3. Pacientes SA sin etiología determinada**

Cuatro pacientes (2 V y 2 H) con una puntuación media de 11 [10-13] y una edad media de 3 años [1-6], han sido diagnosticados como SA mediante el análisis de microsatélites, pero no se ha determinado su etiología siendo compatibles con delección o DUPpat. Clínicamente manifiestan la mayoría de las características del síndrome (Tabla 3.2.10). La ausencia de comunicación por gestos en dos pacientes sugiere que puedan presentar delección 15q11-q13. Mientras que el paciente 591 podría tratarse de una DUPpat al presentar comunicación por gestos y ausencia de microcefalia, no obstante este es el paciente con la mayor puntuación. Con los rasgos clínicos recogidos no es suficiente para asignar una etiología.

#### **4.7.4. Pacientes con sospecha clínica con estudio molecular normal**

Se han establecido dos grupos para diferenciar aquellos pacientes que son candidatos a presentar una mutación en el gen UBE3A de aquellos que probablemente no serán SA. Esta clasificación se ha hecho en función de que presenten como mínimo 10 puntos, aunque otros autores se basan en la presencia de todos los criterios consistentes y frecuentes (Buchholz *et al.*, 1998).

##### Pacientes con $\geq 10$ puntos

Quince pacientes (7 V y 8 H), con edad media de 4,3 años [0.1-15], han presentado 10 o más puntos y representan el 14,7% (15/102) de los casos con estudio molecular normal (Tabla 3.2.7). Estos pacientes han manifestado las principales características del síndrome (Tabla 3.2.11). Las características consistentes se observan con frecuencias similares a las de los pacientes con delección. En cuanto a los rasgos frecuentes como la microcefalia, presente en 11/14 (79%) de los pacientes, es superior a la de nuestros pacientes con delección (61%) y a la descrita en pacientes con mutación en el gen UBE3A (63,6%) (Moncla *et al.*, 1999). Otros autores consideran que la microcefalia es igual de frecuente en pacientes con mutación en el gen UBE3A y de etiología desconocida, y similar a la de pacientes con delección (Lossie *et al.*, 2001). Respecto a las frecuencias de convulsiones (87%) y EEG anormal (73%) han sido similares a las de los pacientes con delección (94% y 86%), aunque otros autores han observado que las convulsiones junto con la epilepsia son menos severas (Moncla *et al.*, 1999; Lann *et al.*, 1999).

Loisse *et al.*, (2001) consideran que los pacientes con mutación en el gen UBE3A presentan un fenotipo intermedio entre los pacientes con delección y los pacientes con DUPpat o DI. Las convulsiones, ausencia de habla y microcefalia, son similares a la de los pacientes con delección, mientras que se observan diferencias menores en el prognatismo mandibular (58% vs. 100%) y en la hipotonía truncal (91% vs. 54%). Respecto a los pacientes con DUPpat o con DI son similares en el desarrollo de habilidades motoras, la capacidad para seguir ordenes simples, pigmentación y desarrollo de obesidad. Este fenotipo se observa en la paciente 1201 con mutación en el gen UBE3A, presenta una puntuación de 12, observándose la ausencia de convulsiones, EEG anormal, occipital plano, problemas de alimentación, prognatia e hipopigmentación. En la paciente 1341 con mutación en el gen UBE3A presenta el fenotipo típico SA, incluida la hipopigmentación, pero no presenta convulsiones.

El fenotipo de los pacientes de etiología desconocida ha sido similar al de los pacientes con delección (tabla 3.2.13), como proponen Lossie *et al.*, (2001). Sin embargo, han presentado una menor frecuencia en problemas de alimentación (14% vs. 100%) e hipopigmentación (29% vs. 80%) y una mayor frecuencia en la comunicación por gestos (100% vs. 23%).

Se piensa que estos pacientes pueden tener una expresión inapropiada del ARN antisentido desde el alelo materno en la ausencia de cambios de metilación en SNURF-SNRPN. Los estudios en sangre no lo evidencian pero se debe tener en cuenta que no se han estudiado

células del cerebro. Es posible que algunos pacientes tengan metilación normal en sangre pero una metilación y expresión de SNURF-SNRPN sentido/UBE3A antisentido anormal en cerebro (Runte et al., 2004).

#### Pacientes con menos de 10 puntos

De los 87/102 pacientes con estudio molecular normal (Tabla 3.2.7), se recogió el protocolo clínico a 47, presentando menos de 10 puntos. Las características consistentes menos frecuentes fueron ataxia (58%) e hipermotricidad (55%), observándose las mayores diferencias en las características frecuentes y asociadas (Tabla 3.2.11 y Tabla 3.2.13). Estos resultados sugieren que las características frecuentes y asociadas pueden ser determinantes en la distinción de los pacientes SA de otras patologías. En estos pacientes se debe investigar otra patología que pueda mimetizar en algunos rasgos al SA (Williams *et al.*, 2001). Pueden presentar alteraciones cromosómicas como la *delección 22q13.3*, manifiestan retraso mental, retraso del habla expresiva y comportamiento feliz; la *delección 17q13.2*, con risa frecuente, aleteo de manos y retraso global del desarrollo pero su vocabulario es más extenso y tienen el pulgar localizado proximalmente; la *delección 4p*, donde se observa risa frecuente, palabras no inteligibles, babeo excesivo, pelo y piel claros. En otros casos la alteración puede afectar a un solo gen como el *síndrome de Rett*, que presenta hipotonía, convulsiones y microcefalia durante la infancia, está causado por mutación en el gen MECP2; la *deficiencia en metil tetrahidrofolato reductasa*, observándose convulsiones, ataxia, disposición feliz y ausencia de habla; la *alfa talasemia y retraso mental asociado al cromosoma X (ATRX)*, manifiestan protusión de la lengua y retraso mental profundo; el *síndrome de Gurrieri*, con convulsiones y ausencia de habla. También puede ser por síntomas complejos como en la *Palsia cerebral*, con presencia de hipotonía, problemas de alimentación, disposición feliz y ataxia, se diferencia por un mayor funcionamiento cognitivo y habla.

#### **4.7.5. Valoración clínica global**

La presente serie de 62 pacientes SA, sugiere que hay rasgos que son comunes entre los pacientes y rasgos en los cuales se observan diferencias en severidad y frecuencia según la etiología.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas según la etiología en los siguientes rasgos: retraso en el desarrollo, habla, ataxia, risa frecuente, aleteo de manos, hipermotricidad, poca atención, microcefalia, convulsiones, EEG anormal, occipital plano, boca ancha, babeo e hipopigmentación. Las frecuencias observadas para la mayoría de los rasgos analizados han sido semejantes a las de estudios previos que comparaban pacientes con delección con pacientes sin delección (Saitoh *et al.*, 1994; Buntinx *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Hou *et al.*, 1997).

En cambio, se han observado diferencias entre delección y DUPpat en problemas de alimentación (100% vs. 0%,  $p=0.008$ ), protusión de la lengua (73% vs. 0%,  $p=0.011$ ),

prognatia (57% vs. 0%,  $p=0.051$ ) y comunicación por gestos (23% vs. 75%,  $p=0.060$ ) (Tabla 3.2.12). Estos resultados señalan que en los pacientes con DUP el dismorfismo facial es menos evidente y presentan una mejor comunicación por gestos que los pacientes con deleción. De estas diferencias solo se coincide en los problemas de comunicación con lo descrito por Moncla *et al.*, (1999) y Lossie *et al.*, (2001), quienes observan diferencias en microcefalia, pigmentación y en otros rasgos como habilidad para caminar y edad de inicio, epilepsia y edad de inicio, peso y altura, apoyando la hipótesis de que el fenotipo en los pacientes con DUPpat es menos severo (Bottani *et al.*, 1994). En otras comparativas que no tuvieron en cuenta estos rasgos solo se describe una menor frecuencia en la microcefalia e hipopigmentación en los pacientes con DI (Burguer *et al.*, 1996), y en general no observaron diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de rasgos analizados (Saitoh *et al.*, 1997; Laan *et al.*, 1998; Gillessen-Kaesbach *et al.*, 1999). Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de recoger la mayor información posible de los pacientes, incorporando su valoración en los criterios de diagnóstico propuestos por Williams *et al.* (1995), ya que son decisivos para poner de manifiesto diferencias fenotípicas que caracterizan a cada una de las clases moleculares, que pueden dividirse en cuatro grupos fenotípicos por grado de severidad decreciente en: pacientes con deleción, pacientes de etiología desconocida, pacientes con mutación en el gen UBE3A y pacientes con DUP o con DI (Lossie *et al.*, 2001).

Gillessen-Kaesbach *et al.*, (1999) describen siete pacientes SA con DI que no manifiestan ataxia, microcefalia y rasgos faciales típicos SA, pero sí presentan obesidad, hipotonía muscular y retraso mental moderado, rasgos típicos del SPW. Además, tres de estos pacientes tenían una cierta capacidad de habla y podían comunicarse con otros. Estos pacientes son casos esporádicos en los que no se observó microdeleción de CI y el fenotipo moderado se puede explicar por un DI incompleto o por mosaicismo celular.

#### **4.8. Protocolo de diagnóstico molecular para SPW/SA**

De nuestra experiencia a lo largo de 10 años, iniciada en 1993 con los estudios de FISH utilizando las sondas D15S11 y GABRB3 de ONCOR y en 1995 con las sondas SNRPN y D15S10 de Vysis, en 1994 con el estudio de microsatélites con tinción con nitrato de plata y en 1996 con el análisis de metilación con detección quimioluminiscente empleando la sonda PW71B y en 1997 la sonda KB17, se ha desarrollado un algoritmo para el diagnóstico molecular del SPW/SA (Fig. 4.1) que se está utilizando desde el año 1997. Este algoritmo que se describe a continuación coincide con las recomendaciones del *American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Test and Technology Transfer Committee* (ASGH/ACMG 1996) para el diagnóstico y determinación de la base genética de SPW/SA, que sugirió dos estrategias de diagnóstico: I) Realizar primero el análisis de metilación mediante *Southern*, orientada a laboratorios de biología molecular y II) Realizar primero el análisis cromosómico y la FISH, dirigida a laboratorios de citogenética, y cumple los requisitos establecidos recientemente por la

UK Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) y la European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) (Harvey *et al.*, 2002).

1. Iniciar un *screening* con el análisis de metilación en paralelo con el análisis citogenético.

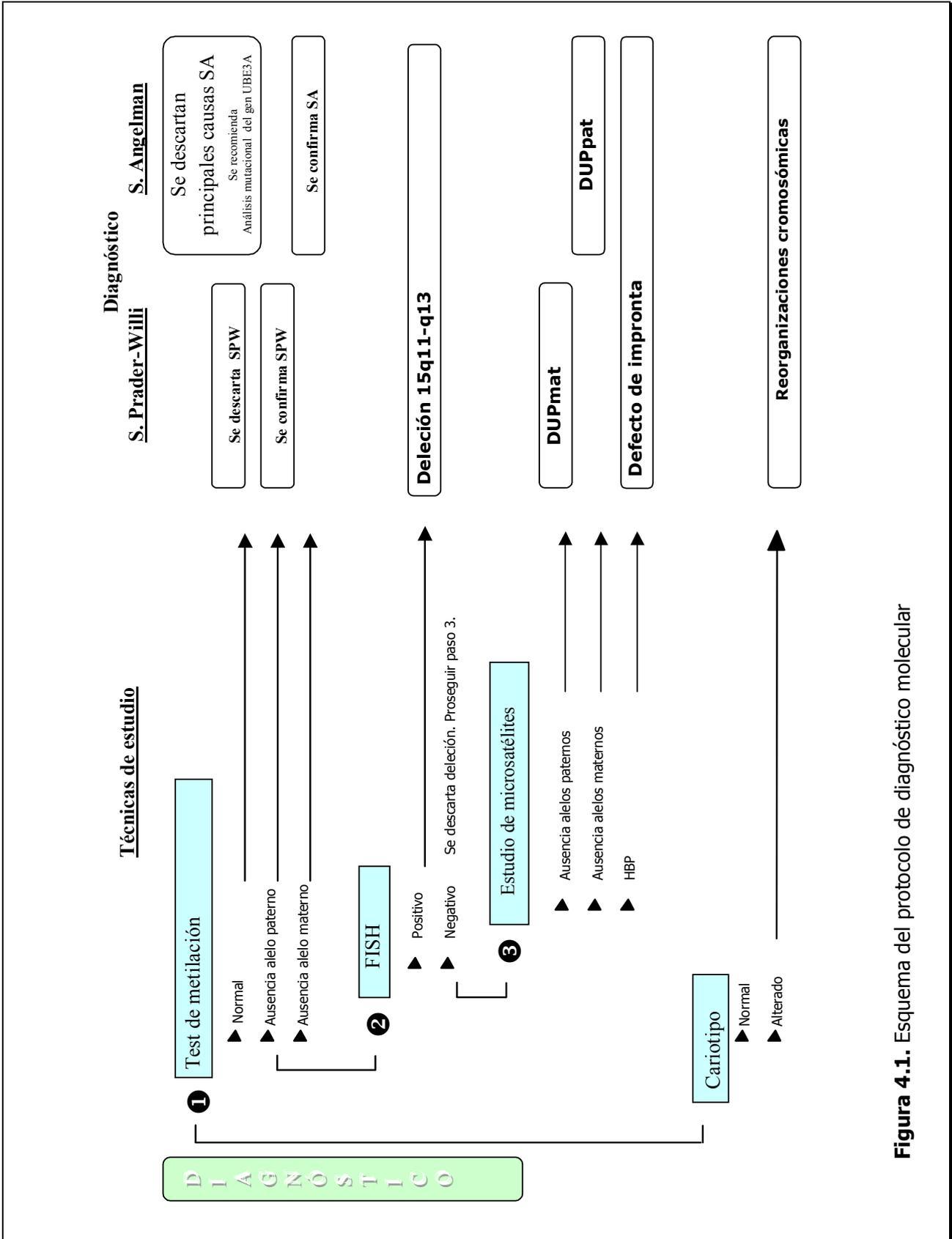
- A) Un patrón de metilación normal descartará el SPW en el 99% de los casos. Debido a que se han descrito algunos casos de pacientes SPW con un patrón de metilación normal y translocación con rotura en el gen SNRPN (Sun *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 1996; Conroy *et al.*, 1997; Kuslich *et al.*, 1999), es necesario el análisis citogenético para descartarlo definitivamente. En el SA se descartan las principales causas responsables. Se recomienda el análisis mutacional del gen UBE3A en los pacientes con la presencia de rasgos consistentes.
- B) Un patrón de metilación alterado con ausencia del alelo paterno confirma el SPW. La ausencia del alelo materno confirma el SA.

2. Los casos con un patrón de metilación compatible con el SPW o SA se estudiarán mediante FISH con las sondas SNRPN y/o D15S10 de Vysis.

- A) Un resultado positivo, ausencia de señal en uno de los homólogos, confirma la presencia de deleción en 15q11-q13.
- B) Un resultado negativo indicará proseguir con el estudio de microsatélites.

3. El estudio de microsatélites detectará DUP o se sospechará de un DI.

- A) La ausencia de alelos paternos confirmará el SPW causado por una DUPmat.
- B) La ausencia de alelos maternos confirmará el SA causado por DUPpat.
- C) Si se observa una HBP, se sospechará de un DI.
- D) Si los microsatélites empleados no son informativos no se puede determinar la etiología. En estos casos se emplearán nuevos microsatélites, algunos de ellos externos a la región 15q11-q13.



**Figura 4.1.** Esquema del protocolo de diagnóstico molecular

## 5. Conclusiones

### Técnicas de diagnóstico

- ✓ El análisis citogenético debe considerarse como prueba rutinaria para descartar posibles reorganizaciones que impliquen al cromosoma 15 u otras anomalías cromosómicas. Se han detectado cuatro alteraciones cromosómicas: dos pacientes SA con 45,XY,i(15), un paciente SPW con 47,XXY y un caso de sospecha de SA con 46,XX,t(2;12).
- ✓ La FISH ha demostrado una mayor eficacia frente a la citogenética convencional en la detección de la deleción, siendo la frecuencia de falsos negativos del 95,6% y la de falsos positivos del 1,5%. Se considera la FISH un método rápido y fiable para el diagnóstico de la deleción 15q11-q13.
- ✓ El análisis de microsatélites solo se recomienda en aquellos casos con sospecha de SPW/SA y resultado normal mediante FISH, para confirmar/descartar una DUP.
- ✓ El análisis de metilación mediante *Southern blot* con detección quimioluminiscente es una alternativa válida a la detección radioactiva. Representa el mejor test de diagnóstico para confirmar/descartar el SPW/SA aunque no permite conocer la etiología.
- ✓ Se ha establecido un protocolo de diagnóstico molecular: el análisis de metilación y el análisis citogenético se debe realizar a todos los pacientes SPW/SA para confirmar/descartar la patología y otras anomalías cromosómicas. En los casos positivos se debe realizar primero la FISH y en caso de resultado negativo se debe proceder al estudio de microsatélites para conocer la etiología. Los casos con sospecha de SPW con un estudio molecular normal permite descartar este diagnóstico. Los casos con sospecha de SA con un estudio molecular normal, pueden presentar una mutación en el gen UBE3A o ser pacientes SA de etiología desconocida. Se recomienda la secuenciación del gen UBE3A en los pacientes SA con una puntuación mínima de 10.

### **Síndrome de Prader-Willi**

- ✓ El estudio molecular realizado en 157 casos con sospecha de SPW ha confirmado el síndrome en 40 pacientes. La etiología ha sido la siguiente: 28 pacientes con deleción 15q11-q13, cinco pacientes con DUPmat, dos pacientes con DI y cinco pacientes sin determinar la etiología.
- ✓ El fenotipo de los pacientes con deleción, DUPmat y DI es similar.
  - Antes de los tres años todos los pacientes han manifestado hipotonía y retraso en el desarrollo y a partir de los tres años los principales rasgos han sido hiperfagia, obesidad, retraso mental moderado y rasgos faciales característicos.
  - Solo se observan ligeras diferencias en los pacientes con deleción que presentan una mayor severidad en problemas de alimentación y una facies más característica.

### **Síndrome de Angelman**

- ✓ El estudio molecular realizado en 149 pacientes con sospecha de SA ha confirmado el síndrome en 47, presentando 39 deleción 15q11-q13, cuatro DUPpat y en cuatro no se ha determinado la etiología.
- ✓ Clínicamente se han incluido 15 pacientes con estudio molecular normal al presentar una puntuación mínima de 10, son candidatos a presentar una mutación en el gen UBE3A o ser pacientes SA de etiología desconocida.
- ✓ Se han observado diferencias entre pacientes con deleción y DUPpat en problemas de alimentación, protusion de la lengua, prognatia y comunicación por gestos, indicando un fenotipo menos severo en los pacientes con DUPpat a excepción de los dos pacientes con isocromosoma 15 que manifiestan un fenotipo severo, similar al de los pacientes con deleción.

## 6. Bibliografia



- Abeliovich, D., Dagan, J., Werner, M., Lerer, I., Shapira, Y., and Meiner, V. (1995). Simultaneous formation of inv dup(15) and dup(15q) in a girl with developmental delay: origin of the abnormal chromosomes. *Eur J Hum Genet* **3**:49-55.
- Aizawa, T., Maruyama, K., Kondo, I., and Yoshikawa, K. (1992). Expression of Necdin, an embryonic carcinoma-derived nuclear protein, in developing mouse brain. *Dev Brain Res* **68**:265-274.
- Akefeldt, A., Tornhage, C.J., Gillberg, C., (1999). A woman with Prader-Willi syndrome gives birth to a healthy baby girl. *Dev Med Child Neurol* **41**:789-90.
- Albrecht, U., Sutcliffe, J. S., Cattanach, B. M., Beechey, C. V., Armstrong, D., Eichele, G., and Beaudet, A. L. (1997). Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* **17**:75-8.
- Amos-Landgraf, J. M., Ji, Y., Gottlieb, W., Depinet, T., Wandstrat, A. E., Cassidy, S. B., Driscoll, D. J., Rogan, P. K., Schwartz, S., and Nicholls, R. D. (1999). Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* **65**:370-86.
- Angelman, H. (1965). "Puppet" children: a report on three cases. *Dev Med Child Neurol* **7**:681-688.
- Angulo, M., Castro-Magana, M., and Uy, J. (1991). Pituitary evaluation and growth hormone treatment in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol* 167-73.
- ASHG/ACMG (1996). Diagnostic testing for Prader-Willi and Angelman syndromes: Report of the ASHG/ACMG Test and Technology Transfer Committee. *Am J Hum Genet* **58**:1085-8.
- Beckmann, J., Tomfohrde, J., and Barnes, R. (1993). A linkage map of human chromosome 15 with an average resolution of 2 cM and containing 55 polymorphic microsatellites. *Hum Mol Genet* **2**:2019-2030.
- Bestor TH, Coxon A. (1993). Cytosine methylation The pros and cons of DNA methylation. *Curr Biol* **3**(6):384-6.
- Bettio, D., Rizzi, N., Giardino, D., Grugni, G., Briscioli, V., Selicorni, A., Carnevale, F., and Larizza, L. (1995). FISH analysis in Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* **56**:224-8.
- Bettio, D., Rizzi, N., Giardino, D., Gurrieri, F., Silvestri, G., Grugni, G., and Larizza, L. (1997). FISH characterization of small supernumerary marker chromosomes in two Prader-Willi patients. *Am J Med Genet* **68** :99-104.
- Beuten, J., Hennekam, R. C., Van Roy, B., Mangelschots, K., Sutcliffe, J. S., Halley, D. J., Hennekam, F. A., Beaudet, A. L., and Willems, P. J. (1996). Angelman syndrome in an inbred family. *Hum Genet* **97**:294-8.
- Bielinska, B., Blaydes, S. M., Buiting, K., Yang, T., Krajewska-Walasek, M., Horsthemke, B., and Brannan, C. I. (2000). De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat Genet* **25**:74-8.
- Bjerre, I., Fagher, B., Ryding, E., and Rosen, I. (1984). The Angelman or "happy puppet" syndrome. Clinical and electroencephalographic features and cerebral blood flow. *Acta Paediatr Scand* **73**:398-402.
- Blennow, E., Bui, T. H., Kristoffersson, U., Vu, T. H., Anneren, G., Holmberg, E., and Nordenskjold, M. (1994). Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39105 consecutive prenatal diagnoses: Prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* **14**:1019-1028.
- Boccaccio, I., Glatt-Deeley, H., Watrin, F., Roedel, N., Lalande, M., and Muscatelli, F. (1999). The human MAGEL2 gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. *Hum Mol Genet* **8**:2497-505.
- Boer, H. And Clarke, D. (1999). Development and behaviour in genetic syndromes: Prader-Willi syndrome. *J Applied Res Intell Dis* **12**:269-301.

Bolton PF, Dennis NR, Browne CE, Thomas NS, Veltman MW, Thompson RJ, Jacobs P. (2001). The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet* **105**(8):675-85. Review

Bottani A, Robinson WP, DeLozier-Blanchet CD, Engel E, Morris MA, Schmitt B, Thun-Hohenstein L, Schinzel A. (1994). Angelman syndrome due to paternal uniparental disomy of chromosome 15: a milder phenotype?. *Am J Med Genet* **51**(1):35-40.

Brannan, C. I. and Bartolomei, M. S. (1999). Mechanisms of genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* **9**:164-70.

Branson C. (1981). Speech and language characteristics of children with Prader-Willi syndrome. pp. 179-183, Baltimore, MD: University Park Press. 179-183.

Browne, C. E., Dennis, N. R., Maher, E., Long, F. L., Nicholson, J. C., Sillibourne, J., and Barber, J. C. (1997). Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* **61**:1342-52.

Brun, C. (2002). Estudi de la conducta adaptativa i la seva relació amb el fenotip físic i conductual en la síndrome d'Angelman. Tesis Doctoral.

Buchholz, T., Jackson, J., and Smith, A. (1997). Methylation analysis at three different loci within the imprinted region of chromosome 15q11-q13. *Am J Med Genet* **72**:117-9.

Buchholz T, Jackson J, Robson L, Smith A. (1998). Evaluation of methylation analysis for diagnostic testing in 258 referrals suspected of Prader-Willi or Angelman syndromes. *Hum Genet* **103**(5):535-9.

Buhr, A., Bianchi, M. T., Baur, R., Courtet, P., Pignay, V., Boulenger, J. P., Gallati, S., Hinkle, D. J., MacDonald, R. L., and Sigel, E. (2002). Functional characterization of the new human GABA(A) receptor mutation beta-3(R192H). *Hum Genet* **111**:154-160.

Buiting, K., Neumann, M., Ludecke, H. J., Senger, G., Claussen, U., Antich, J., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1990). Microdissection of the Prader-Willi syndrome chromosome region and identification of potential gene sequences. *Genomics* **6**:521-7.

Buiting, K., Greger, V., Brownstein, B. H., Mohr, R. M., Voiculescu, I., Winterpacht, A., Zabel, B., and Horsthemke, B. (1992). A putative gene family in 15q11-13 and 16p11.2: possible implications for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5457-61.

Buiting, K., Dittrich, B., Robinson, W. P., Guitart, M., Abeliovich, D., Lerer, I., and Horsthemke, B. (1994). Detection of aberrant DNA methylation in unique Prader-Willi syndrome patients and its diagnostic implications. *Hum Mol Genet* **3**:893-5.

Buiting, K., Saitoh, S., Gross, S., Dittrich, B., Schwartz, S., Nicholls, R. D., and Horsthemke, B. (1995). Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* **9**:395-400.

Buiting, K., Dittrich, B., Gross, S., Lich, C., Farber, C., Buchholz, T., Smith, E., Reis, A., Burger, J., Nothen, M. M., Barth-Witte, U., Janssen, B., Abeliovich, D., Lerer, I., van den Ouweland, A. M., Halley, D. J., Schrandt-Stumpel, C., Smeets, H., Meinecke, P., Malcolm, S., Gardner, A., Lalonde, M., Nicholls, R. D., Friend, K., and Horsthemke, B. (1998). Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* **63**:170-80.

Buiting, K., Gross, S., Ji, Y., Senger, G., Nicholls, R. D., and Horsthemke, B. (1998). Expressed copies of the MN7 (D15F37) gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet Cell Genet* **81**:247-53.

Buiting, K., Lich, C., Cottrell, S., Barnicoat, A., and Horsthemke, B. (1999). A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* **105**:665-6.

Buiting, K., Dittrich, B., Dworniczak, B., Lerer, I., Abeliovich, D., Cottrell, S., Temple, I. K., Harvey, J. F., Lich, C., Gross, S., and Horsthemke, B. (1999). A 28-kb deletion spanning D15S63 (PW71) in five

- families: a rare neutral variant? *Am J Hum Genet* **65**(6):1588-94.
- Buiting, K., Farber, C., Kroisel, P., Wagner, K., Brueton, L., Robertson, M. E., Lich, C., and Horsthemke, B. (2000). Imprinting centre deletions in two PWS families: implications for diagnostic testing and genetic counseling. *Clin Genet* **58**:284-90.
- Buiting, K., Barnicoat, A., Lich, C., Pembrey, M., Malcolm, S., and Horsthemke, B. (2001). Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **68**:1290-4.
- Buiting, K.; Gross, S.; Lich, C.; Gillessen-Kaesbach, G.; el-Maarri, O., and Horsthemke, B. (2003). Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* **72**(3):571-7.
- Buntinx, I. M., Hennekam, R. C., Brouwer, O. F., Stroink, H., Beuten, J., Mangelschots, K., and Fryns, J. P. (1995). Clinical profile of Angelman syndrome at different ages. *Am J Med Genet* **56**:176-83.
- Burger, J., Buiting, K., Dittrich, B., Gross, S., Lich, C., Sperling, K., Horsthemke, B., and Reis, A. (1997). Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **61** :88-93.
- Burger, J., Horn, D., Tonnie, H., Neitzel, H., and Reis, A. (2002). Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **111**:233-7.
- Burke, L. W., Wiley, J. E., Glenn, C. C., Driscoll, D. J., Loud, K. M., Smith, A. J., and Kushnick, T. (1996). Familial cryptic translocation resulting in Angelman syndrome: implications for imprinting or location of the Angelman gene? *Am J Hum Genet* **58**:777-84.
- Butler MG, Hedges LK, Rogan PK, Seip JR, Cassidy SB, Moeschler JB. (1997). Klinefelter and trisomy X syndromes in patients with Prader-Willi syndrome and uniparental maternal disomy of chromosome 15--a coincidence? *Am J Med Genet* **72**(1):111-4.
- Butler, M. G. and Palmer, C. G. (1983). Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* **1**:1285-6.
- Butler, M. G., Meaney, F. J., and Palmer, C. G. (1986). Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **23**:793-809.
- Butler, M. G. and Meaney, F. J. (1987). An anthropometric study of 38 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **26**:445-55.
- Butler, M. G. (1989). Hypopigmentation: a common feature of Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **45**:140-6.
- Butler, M. G. (1990). Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet* **35**:319-32.
- Butler, M. G. (1995). High resolution chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization in patients referred for Prader-Willi or Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **56**:420-2.
- Butler, J. V., Whittington, J. E., Holland, A. J., Boer, H., Clarke, D., and Webb, T. (2002). Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi syndrome: a population-based study. *Dev Med Child Neurol* **44**:248-55.
- Buxbaum, J. D., Silverman, J. M., Smith, C. J., Greenberg, D. A., Kilifarski, M., Reichert, J., Cook, E. H. Jr, Fang, Y., Song, C. Y., and Vitale, R. (2002). Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol Psychiatry* **7**:311-6.
- Carrozzo, R., Rossi, E., Christian, S. L., Kittikamron, K., Livieri, C., Corrias, A., Pucci, L., Fois, A., Simi, P., Bosio, L., Beccaria, L., Zuffardi, O., and Ledbetter, D. H. (1997). Inter- and intrachromosomal rearrangements are both involved in the origin of 15q11-q13 deletions in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **61**:228-31.
- Cassidy, S. B. (1984). Prader-Willi syndrome. *Curr Probl Pediatr* **14**:1-55.

- Cassidy, S. B. (1997). Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* **34**:917-23.
- Cassidy, S. B., Forsythe, M., Heeger, S., Nicholls, R. D., Schork, N., Benn, P., and Schwartz, S. (1997). Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* **68**:433-40.
- Cassidy, S. B. and Schwartz, S. (1998). Prader-Willi and Angelman syndromes. Disorders of genomic imprinting. *Medicine (Baltimore)* **77**:140-51.
- Cattanach, B. M., Barr, J. A., Beechey, C. V., Martin, J., Noebels, J., and Jones, J. (1997). A candidate model for Angelman syndrome in the mouse. *Mamm Genome* **8**:472-8.
- Cavaille, J., Buiting, K., Kieffmann, M., Lalande, M., Brannan, C. I., Horsthemke, B., Bachellerie, J. P., Brosius, J., and Huttenhofer, A. (2000). Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:14311-6.
- Ciechanover, A. and Schwartz, A. L. (1994). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB* **8**:182-191.
- Ciofi, P., Tramu, G., and Bloch, B. (1990). Comparative immuno-histochemical study of the distribution of neuropeptide Y, growth hormone-releasing factor and the carboxyterminus of precursor protein GHRF in the human hypothalamic infundibular area. *Neuroendocrinology* **51**:429-36.
- Clarke, D. (1998). Prader-Willi syndrome and psychotic symptoms:2. A preliminary study of prevalence using the Psychopathology Assessment Schedule for Adults with Developmental Disability checklist. *J Intellect Disabil Res* **42 ( Pt 6)**:451-4.
- Clayton-Smith, J. (1993). Clinical research on Angelman syndrome in the United Kingdom: observations on 82 affected individuals. *Am J Med Genet* **46**:12-5.
- Clayton-Smith, J. (2001). Angelman syndrome: evolution of the phenotype in adolescents and adults. *Dev Med Child Neurol* **47**:476-480.
- Clift, S., Dahlitz, M., and Parkes, J. D. (1994). Sleep apnoea in the Prader-Willi syndrome. *J Sleep Res* **3**:121-126.
- Colomer J, Gallano P, Nicholson LV, Tizzano E, Baiget M. (1994). Severe mental retardation in a young boy with an in-frame deletion in the dystrophin gene. *Eur J Pediatr* **153**(7):492-4.
- Connerton-Moyer, K. J., Nicholls, R. D., Schwartz, S., Driscoll, D. J., Hendrickson, J. E., Williams, C. A., and Pauli, R. M. (1997). Unexpected familial recurrence in Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **70**:253-60.
- Conroy, J. M.; Grebe, T. A.; Becker, L. A.; Tsuchiya, K.; Nicholls, R. D.; Buiting, K.; Horsthemke, B.; Cassidy, S. B., and Schwartz, S. (1997). Balanced translocation 46,XY,t(2;15)(q37.2;q11.2) associated with atypical Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **61**(2):388-94.
- Cook, E. H. Jr, Lindgren, V., Leventhal, B. L., Courchesne, R. Y., Lincoln, A., Shulman, C., Lord, C., and Courchesne, E. (1997). Autism or Atypical Autism in Maternally but Not Paternally Derived Proximal 15q Duplication. *Am J Hum Genet* **60**:928-934.
- Crolla, J. A., Harvey, J. F., Sitch, F. L., and Dennis, N. R. (1995). Supernumerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. *Hum Genet* **95**:161-70.
- Culiat, C. T., Stubbs, L. J., Montgomery, C. S., Russell, L. B., and Rinchik, E. M. (1994). Phenotypic consequences of deletion of the gamma 3, alpha 5, or beta 3 subunit of the type A gamma-aminobutyric acid receptor in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:2815-8.
- Curfs, L. M., Verhulst, F. C., and Fryns, J. P. (1991). Behavioral and emotional problems in youngsters with Prader-Willi syndrome. *Genet Couns* **2**:33-41.
- Curfs, L. M. and Fryns, J. P. (1992). Prader-Willi syndrome: a review with special attention to the cognitive and behavioral profile. *Birth Defects Orig Artic Ser* **28**:99-104.

- Chamberlain, S. J. and Brannan, C. I. (2001). The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine Ube3a antisense transcript but represses paternal Ube3a. *Genomics* **73**:316-22.
- Chan, C. T., Clayton-Smith, J., Cheng, X. J., Buxton, J., Webb, T., Pembrey, M. E., and Malcolm, S. (1993). Molecular mechanisms in Angelman syndrome: a survey of 93 patients. *J Med Genet* **30**:895-902.
- Cheng, S. D., Spinner, N. B., Zackai, E. H., and Knoll, J. H. (1994). Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosomes 15 from 11 patients. *Am J Hum Genet* **55**:753-9.
- Chitayat, D., Davis, E. B., McGillivray, B. C., Hayden, M. R., and Hall, J. G. (1989). Perinatal and first year follow-up of patients with Prader-Willi syndrome: normal size of hands and feet. *Clin Genet* **35**:161-6.
- Christian, S. L., Robinson, W. P., Huang, B., Mutirangura, A., Line, M. R., Nakao, M., Surti, U., Chakravarti, A., and Ledbetter, D. H. (1995). Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* **57**:40-8.
- Christian, S. L., Smith, A. C., Macha, M., Black, S. H., Elder, F. F., Johnson, J. M., Resta, R. G., Surti, U., Suslak, L., Verp, M. S., and Ledbetter, D. H. (1996). Prenatal diagnosis of uniparental disomy 15 following trisomy 15 mosaicism. *Prenat Diagn* **16**(4):323-32.
- Christian, S. L., Bhatt, N. K., Martin, S. A., Sutcliffe, J. S., Kubota, T., Huang, B., Mutirangura, A., Chinault, A. C., Beaudet, A. L., and Ledbetter, D. H. (1998). Integrated YAC contig map of the Prader-Willi/Angelman region on chromosome 15q11-q13 with average STS spacing of 35 kb. *Genome Res* **8**:146-57.
- Christian, S. L., Fantes, J. A., Mewborn, S. K., Huang, B., and Ledbetter, D. H. (1999). Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* **8**:1025-37.
- Church GM and Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7):1991-5.
- Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. (2000). The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development *Hum Mol Genet* **9**(19):2885-94.
- Dawson, A. J., Mogk, R., Rothenmund, H., and Bridge, P. J. (2002). Paternal origin of a small, class I inv dup(15). *Am J Med Genet* **107**:334-6.
- de los Santos, T., Schweizer, J., Rees, C. A., and Francke, U. (2000). Small evolutionarily conserved RNA, resembling C/D box small nucleolar RNA, is transcribed from PWCR1, a novel imprinted gene in the Prader-Willi deletion region, which is highly expressed in brain. *Am J Hum Genet* **67**:1067-82.
- Delach, J. A., Rosengren, S. S., Kaplan, L., Greenstein, R. M., Cassidy, S. B., and Benn, P. A. (1994). Comparison of high resolution chromosome banding and fluorescence in situ hybridization (FISH) for the laboratory evaluation of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **52**:85-91.
- DeLorey, T. M., Handforth, A., Anagnostaras, S. G., Homanics, G. E., Minassian, B. A., Asatourian, A., Faselow, M. S., Delgado-Escueta, A., Ellison, G. D., and Olsen, R. W. (1998). Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci* **18**:8505-14.
- DiMario, F. J. Jr, Dunham, B., Burleson, J. A., Moskovitz, J., and Cassidy, S. B. (1994). An evaluation of autonomic nervous system function in patients with Prader-Willi syndrome. *Pediatrics* **93**:76-81.
- Dittrich, B., Robinson, W. P., Knoblauch, H., Buiting, K., Schmidt, K., Gillissen-Kaesbach, G., and Horsthemke, B. (1992). Molecular diagnosis of the Prader-Willi and Angelman syndromes by detection of parent-of-origin specific DNA methylation in 15q11-13. *Hum Genet* **90**:313-5.
- Dittrich, B., Buiting, K., Gross, S., and Horsthemke, B. (1993). Characterization of a methylation imprint in the Prader-Willi syndrome chromosome region. *Hum Mol Genet* **2**:1995-9.
- Dittrich, B., Buiting, K., and Horsthemke, B. (1996a). PW71 methylation test for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Am J Med Genet* **61**:196-7.

- Dittrich, B., Buiting, K., Korn, B., Rickard, S., Buxton, J., Saitoh, S., Nicholls, R. D., Poustka, A., Winterpacht, A., Zabel, B., and Horsthemke, B. (1996b). Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nat Genet* **14**:163-70.
- Donlon, T. A., Lalande, M., Wyman, A., Bruns, G., and Latt, S. A. (1986). Isolation of molecular probes associated with the chromosome 15 instability in the Prader-Willi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:4408-12.
- Donlon, T. A. (1988). Similar molecular deletions on chromosome 15q11.2 are encountered in both the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Hum Genet* **80**:322-8.
- Driscoll, D. J., Waters, M. F., Williams, C. A., Zori, R. T., Glenn, C. C., Avidano, K. M., and Nicholls, R. D. (1992). A DNA methylation imprint, determined by the sex of the parent, distinguishes the Angelman and Prader-Willi syndromes. *Genomics* **13**:917-24.
- Dykens, E. M., Hodapp, R. M., Walsh, K., and Nash, L. J. (1992). Profiles, correlates, and trajectories of intelligence in Prader-Willi syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **31**:1125-30.
- Dykens, E. M., Cassidy, S. B., and King, B. H. (1999). Maladaptive behavior differences in Prader-Willi syndrome due to paternal deletion versus maternal uniparental disomy. *Am J Ment Retard* **104**:67-77.
- Eichler, E. (1998). Masquerading repeats: paralogous pitfalls of the human genome. *Genome Res* **8**:758-762.
- Einfeld, S. L., Smith, A., Durvasula, S., Florio, T., and Tonge, B. J. (1999). Behavior and emotional disturbance in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **82**:123-7.
- El-Maarri, O., Buiting, K., Peery, E. G., Kroisel, P. M., Balaban, B., Wagner, K., Urman, B., Heyd, J., Lich, C., Brannan, C. I., Walter, J., and Horsthemke, B. (2001). Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* **27**:341-4.
- Engel, E. (1980). A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* **6**(2):137-43.
- Engemann, S.; Stroedicke, M.; Paulsen, M.; Franck, O.; Reinhardt, R.; Lane, N.; Reik, W., and Walter, J. (2000). Sequence and functional comparison in the Beckwith-Wiedemann region: implications for a novel imprinting centre and extended imprinting. *Hum Mol Genet* **9**(18):2691-706.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J., and Muller, G. A. (1993). Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal Biochem* **210**(2):235-44.
- Erdel, M., Schuffenhauer, S., Buchholz, B., Barth-Witte, U., Kochl, S., Utermann, B., Duba, H. C., and Utermann, G. (1996). Routine screening for microdeletions by FISH in 77 patients suspected of having Prader-Willi or Angelman syndromes using YAC clone 273A2 (D15S10). *Hum Genet* **97**:784-93.
- European Collaborative Research on Mosaicism in CVS (EUROMIC). (1999). Trisomy 15 CPM: Probable Origins, Pregnancy Outcome and Risk of Fetal UPD. *Prenat Diagn* **19**:29-35.
- Fang, P., Lev-Lehman, E., Tsai, T. F., Matsuura, T., Benton, C. S., Sutcliffe, J. S., Christian, S. L., Kubota, T., Halley, D. J., Meijers-Heijboer, H., Langlois, S., Graham, J. M. Jr, Beuten, J., Willems, P. J., Ledbetter, D. H., and Beaudet, A. L. (1999). The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* **8**:129-35.
- Fantes, J. A., Mewborn, S. K., Lese, C. M., Hedrick, J., Brown, R. L., Dyomin, V., Chaganti, R. S., Christian, S. L., and Ledbetter, D. H. (2002). Organisation of the pericentromeric region of chromosome 15: at least four partial gene copies are amplified in patients with a proximal duplication of 15q. *J Med Genet* **39**:170-7.
- Farber, C., Dittrich, B., Buiting, K., and Horsthemke, B. (1999). The chromosome 15 imprinting centre (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of SNRPN that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC microdeletion. *Hum Mol Genet* **8**:337-43.
- Farber, C., Gross, S., Neesen, J., Buiting, K., and Horsthemke, B. (2000). Identification of a testis-specific

- gene (C15orf2) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* **65**:174-83.
- Ferguson-Smith, A. C. (1996). Imprinting moves to the centre. *Nat Genet* **14**:119-21.
- Filipowicz, W. (2000). Imprinted expression of small nucleolar RNAs in brain: Time for RNomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:14035-14037.
- Freeman, S. B.; May, K. M.; Pettay, D.; Fernhoff, P. M., and Hassold, T. J. (1993). Paternal uniparental disomy in a child with a balanced 15;15 translocation and Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **45**(5):625-30.
- Fridman, C., Varela, M. C., Nicholls, R. D., and Koiffmann, C. P. (1998). Unusual clinical features in an Angelman syndrome patient with uniparental disomy due to a translocation 15q15q. *Clin Genet* **54**:303-8.
- Fridman, C. and Koiffmann, C. P. (2000). Origin of uniparental disomy 15 in patients with Prader-Willi or Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **94**(3):249-53.
- Fryberg, J. S., Breg, W. R., and Lindgren, V. (1991). Diagnosis of Angelman syndrome in infants. *Am J Med Genet* **58**:64.
- Fung, D. C., Yu, B., Cheong, K. F., Smith, A., and Trent, R. J. (1998). UBE3A "mutations" in two unrelated and phenotypically different Angelman syndrome patients. *Hum Genet* **102**:487-92.
- Gabriel, J. M., Gray, T. A., Stubbs, L., Saitoh, S., Ohta, T., and Nicholls, R. D. (1998). Structure and function correlations at the imprinted mouse Snrpn locus. *Mamm Genome* **9**:788-93.
- Gallagher, R. C., Pils, B., Albalwi, M., and Francke, U. (2002). Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **71**(3):669-78.
- Gardner, R. Jr (1996). Psychiatry needs a basic science titled sociophysiology. *Biol Psychiatry* **39**:833-4.
- Geffroy S, Evrard V, Taufour D, Vanderbecken S, de Martinville B.(1998). Further example of a patient with Prader-Willi and Klinefelter syndromes of different parental origins. *Am J Med Genet* **80**(3):286-7.
- Gilbert, H. L., Buxton, J. L., Chan, C. T., McKay, T., Cottrell, S., Ramsden, S., Winter, R. M., Pembrey, M. E., and Malcolm, S. (1997). Counselling dilemmas associated with the molecular characterisation of two Angelman syndrome families. *J Med Genet* **34**(8):651-5.
- Gillessen-Kaesbach, G., Albrecht, B., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1995a). Further patient with Angelman syndrome due to paternal disomy of chromosome 15 and a milder phenotype. *Am J Med Genet* **56**:328-9.
- Gillessen-Kaesbach, G., Gross, S., Kaya-Westerloh, S., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1995b). DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* **32**:88-92.
- Gillessen-Kaesbach, G., Demuth, S., Thiele, H., Theile, U., Lich, C., and Horsthemke, B. (1999). A previously unrecognised phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* **7**:638-44.
- Gimelli, G., Pujana, M. A., Patricelli, M. G., Russo, S., Giardino, D., Larizza, L., Cheung, J., Armengol, L., Schinzel, A., Estivill, X., and Zuffardi, O. (2003). Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* **12**:849-858.
- Ginsburg, C., Fokstuen, S., and Schinzel, A. (2000). The contribution of uniparental disomy to congenital development defects in children born to mothers at advanced childbearing age. *Am J Med Genet* **95**:454-460.
- Glatt, K., Glatt, H., and Lalande, M. (1997). Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics* **41**:63-9.
- Glenn, C. C., Nicholls, R. D., Robinson, W. P., Saitoh, S., Niikawa, N., Schinzel, A., Horsthemke, B., and Driscoll, D. J. (1993a). Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet* **2**:1377-82.

- Glenn, C. C., Porter, K. A., Jong, M. T., Nicholls, R. D., and Driscoll, D. J. (1993b). Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene. *Hum Mol Genet* **2**:2001-5.
- Glenn, C. C., Saitoh, S., Jong, M. T., Filbrandt, M. M., Surti, U., Driscoll, D. J., and Nicholls, R. D. (1996). Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *Am J Hum Genet* **58** :335-46.
- Golden, W. L., Sudduth, K. W., Burnett, S. H., and Kelly, T. E. (1999). Mosaicism in Prader-Willi syndrome: detection using fluorescent in situ hybridization. *Am J Med Genet* **85**(4):424-5.
- Gray, T. A., Saitoh, S., and Nicholls, R. D. (1999). An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5616-21.
- Greenswag, L. R. (1987). Adults with Prader-Willi syndrome: a survey of 232 cases. *Dev Med Child Neurol* **29**:145-52.
- Gunay-Aygun, M., Cassidy, S. B., and Nicholls, R. D. (1997). Prader-Willi and other syndromes associated with obesity and mental retardation. *Behav Genet* **27**(4):307-24.
- Gunay-Aygun, M., Heeger, S., Schwartz, S., and Cassidy, S. B. (1997). Delayed diagnosis in patients with Prader-Willi syndrome due to maternal uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* **71**:106-10.
- Gunay-Aygun, M., Schwartz, S., Heeger, S., O'Riordan, M. A., and Cassidy, S. B. (2001). The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* **108**(5):E92.
- Gyapay, G., Morissette, J., and Vignal, A. (1994). Généthon human genetic linkage map. *Nat Genet* **7**:246-339.
- Hakonarson, H., Moskovitz, J., Daigle, K. L., Cassidy, S. B., and Cloutier, M. M. (1995). Pulmonary function abnormalities in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* **126**:565-70.
- Hall, J. G. (1990). Angelman's syndrome, abnormality of 15q11-13, and imprinting. *J Med Genet* **27**:141.
- Halleck, M. S., Pradhan, D., Blackman, C., Berkes, C., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (1998). Multiple members of a third subfamily of P-type ATPases identified by genomic sequences and ESTs. *Genome Res* **8**:354-361.
- Hamabe, J., Fukushima, Y., Harada, N., Abe, K., Matsuo, N., Nagai, T., Yoshioka, A., Tonoki, H., Tsukino, R., and Niikawa, N. (1991a). Molecular study of the Prader-Willi syndrome: deletion, RFLP, and phenotype analyses of 50 patients. *Am J Med Genet* **41**:54-63.
- Harvey, J., Voelckel, M., Malzac, P., Moncla, A., Ramsden, S., and Matthijs, G. (2002). Draft Best Practice Guidelines for Molecular Analysis of Prader Willi and Angelman Syndromes. Clinical Molecular Genetics Society.
- Hamabe, J., Kuroki, Y., Imaizumi, K., Sugimoto, T., Fukushima, Y., Yamaguchi, A., Izumikawa, Y., and Niikawa, N. (1991b). DNA deletion and its parental origin in Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* **41**:64-8.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., and Baylin S.B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9821-26.
- Herzing, L. B., Kim, S. J., Cook, E. H. Jr, and Ledbetter, D. H. (2001). The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* **68**:1501-5.
- Holm, V. A., Cassidy, S. B., Butler, M. G., Hanchett, J. M., Greenswag, L. R., Whitman, B. Y., and Greenberg, F. (1993). Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* **91**:398-402.
- Holopainen, I. E., Metsahonkala, E. L., Kokkonen, H., Parkkola, R. K., Manner, T. E., Nagren, K., and Korpi, E. R. (2001). Decreased binding of. *Ann Neurol* **49**:110-3.
- Holland, A. J., Treasure, J., Coskeran, P., Dallow, J., Milton, N., and Hillhouse, E. (1993). Measurement of

- excessive appetite and metabolic changes in Prader-Willi syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* **17**:527-32.
- Hou, J. W., Wang, P. J., and Wang, T. R. (1997). Angelman syndrome assessed by neurological and molecular cytogenetic investigations. *Pediatr Neurol* **16**(1):17-22.
- Hudgins, L. and Cassidy, S. B. (1991). Hand and foot length in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **41**:5-9.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., and Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO* **13**:4129-4135.
- Huntriss, J., Barr, J. A., Horn, D., Williams, D. G., and Latchman, D. S. (1994). Mice lacking Snrpn expression show normal regulation of neuronal alternative splicing capacities. *Mol Biol Rep* **20**:19-25.
- Jalal, S. M., Persons, D. L., Dewald, G. W., and Lindor, N. M. (1994). Form of 15q proximal duplication appears to be a normal euchromatic variant. *Am J Med Genet* **52**:495-7.
- Jay, P., Rougeulle, C., Massacrier, A., Moncla, A., Mattei, M. G., Malzac, P., Roeckel, N., Taviaux, S., Lefranc, J. L., Cau, P., Berta, P., Lalande, M., and Muscatelli, F. (1997). The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* **17**:357-61.
- Ji, Y., Walkowicz, M. J., Buiting, K., Johnson, D. K., Tarvin, R. E., Rinchik, E. M., Horsthemke, B., Stubbs, L., and Nicholls, R. D. (1999). The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **8**:533-42.
- Jiang, Y. H., Armstrong, D., Albrecht, U., Atkins, C. M., Noebels, J. L., Eichele, G., Sweatt, J. D., and Beaudet, A. L. (1998). Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* **21**:799-811.
- Jiang, Y., Lev-Lehman, E., Bressler, J., Tsai, T. F., and Beaudet, A. L. (1999). Genetics of Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **65**(1):1-6.
- Jong, M. T., Carey, A. H., Stewart, C. L., Rinchik, E. M., Glenn, C. C., Driscoll, D., and Nicholls, R. D. (1993). The ZNF127 gene encodes a novel C3H4 zinc-finger protein and its expression is regulated by genomic imprinting. *Am J Hum Genet* **53**:A697.
- Jong, M. T., Gray, T. A., Ji, Y., Glenn, C. C., Saitoh, S., Driscoll, D. J., and Nicholls, R. D. (1999a). A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* **8**:783-93.
- Jong, M. T., Carey, A. H., Caldwell, K. A., Lau, M. H., Handel, M. A., Driscoll, D. J., Stewart, C. L., Rinchik, E. M., and Nicholls, R. D. (1999b). Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. *Hum Mol Genet* **8**:795-803.
- Kalousek, D.K., Dill, F.J., Pantzar, T., McGillivray, b.C., Yong, S.L. and Wilson, R.D. (1987). Confined chorionic mosaicism in prenatal diagnosis. *Hum Genet* **77**:163-167.
- Kalousek, D.K., Howard-Peebles, P.N., Olson, S.B., Barrett, I.J., Dorfmann, A., Black, S.H and Schulmann, J.D. (1991). Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of IUGR association with confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* **11**:743-750.
- Kao, F. T., Beaudenon, S., Talis, A., Huibregtse, J. M., and Howley, P. M. (2000). Human papillomavirus type 16 E6 induces self ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J Virol* **74**:6408-6417.
- Kaplan, L. C., Wharton, R., Elias, E., Mandell, F., Donlon, T., and Latt, S. A. (1987). Clinical heterogeneity associated with deletions in the long arm of chromosome 15: report of 3 new cases and their possible genetic significance. *Am J Med Genet* **28**:45-53.
- Kaplan, J., Fredrickson, P. A., and Richardson, J. W. (1991). Sleep and breathing in patients with the Prader-Willi syndrome. *Mayo Clin Proc* **66**:1124-6.
- Kehrer-Sawatzki, H., Schwickardt, T., Assum, G., Rocchi, M., and Krone, W. (1997). A third neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogene at chromosome 15q11.2. *Hum Genet* **100**:595-600.

- King, R. A., Wiesner, G. L., Townsend, D., and White, J. G. (1993). Hypopigmentation in Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **46**:40-4.
- Kishino, T., Lalonde, M., and Wagstaff, J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**:70-3.
- Kishino, T. and Wagstaff, J. (1998). Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes. *Genomics* **47**:101-7.
- Knoll, J. H., Nicholls, R. D., and Lalonde, M. (1989a). On the parental origin of the deletion in Angelman syndrome. *Hum Genet* **83**:205-7.
- Knoll, J. H., Nicholls, R. D., Magenis, R. E., Graham, J. M. Jr, Lalonde, M., and Latt, S. A. (1989b). Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* **32**:285-90.
- Knoll, J. H., Glatt, K. A., Nicholls, R. D., Malcolm, S., and Lalonde, M. (1991). Chromosome 15 uniparental disomy is not frequent in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **48**:16-21.
- Knoll, J. H., Wagstaff, J., and Lalonde, M. (1993). Cytogenetic and molecular studies in the Prader-Willi and Angelman syndromes: an overview. *Am J Med Genet* **46**:2-6.
- Kokkonen, H. and Leisti, J. (2000). An unexpected recurrence of Angelman syndrome suggestive of maternal germ-line mosaicism of del(15)(q11q13) in a Finnish family. *Hum Genet* **107**:83-5.
- Kosaki, K., McGinniss, M. J., Veraksa, A. N., McGinnis, W. J., and Jones, K. L. (1997). Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am J Med Genet* **73** :308-13.
- Kubota, T., Aradhya, S., Macha, M., Smith, A. C., Surh, L. C., Satish, J., Verp, M. S., Nee, H. L., Johnson, A., Christian, S. L., and Ledbetter, D. H. (1996). Analysis of parent of origin specific DNA methylation at SNRPN and PW71 in tissues: implication for prenatal diagnosis. *J Med Genet* **33**:1011-4.
- Kubota, T., Das, S., Christian, S. L., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Ledbetter, D. H. (1997). Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet* **16**:16-7.
- Kumar, S., Talis, A. L., and Howley, P. M. (1999). Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J Biol Chem* **274**:18785-18792.
- Kuslich, C. D.; Kobori, J. A.; Mohapatra, G.; Gregorio-King, C., and Donlon, T. A. (1999). Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the SNRPN gene. *Am J Hum Genet* **64**(1):70-6.
- Kuwano, A., Mutirangura, A., Dittrich, B., Buiting, K., Horsthemke, B., Saitoh, S., Niikawa, N., Ledbetter, S. A., Greenberg, F., Chinault, A. C., and et, a. I. (1992). Molecular dissection of the Prader-Willi/Angelman syndrome region (15q11-13) by YAC cloning and FISH analysis. *Hum Mol Genet* **1**:417-25.
- Laan, L. A., den Boer, A. T., Hennekam, R. C., Renier, W. O., and Brouwer, O. F. (1996). Angelman syndrome in adulthood. *Am J Med Genet* **66**:356-60.
- Laan, L. A., Renier, W. O., Arts, W. F., Buntinx, I. M., vd Burgt, I. J., Stroink, H., Beuten, J., Zwinderman, K. H., van Dijk, J. G., and Brouwer, O. F. (1997). Evolution of epilepsy and EEG findings in Angelman syndrome. *Epilepsia* **38**:195-9.
- Laan, L. A., Halley, D. J., den Boer, A. T., Hennekam, R. C., Renier, W. O., and Brouwer, O. F. (1998). Angelman syndrome without detectable chromosome 15q11-13 anomaly: clinical study of familial and isolated cases. *Am J Med Genet* **76**(3):262-8.
- Laan, L. A.; v Haeringen, A., and Brouwer, O. F. (1999). Angelman syndrome: a review of clinical and genetic aspects. *Clin Neurol Neurosurg* **101**(3):161-70.
- Latham KE, Doherty AS, Scott CD, Schultz RM, (1994). Igf2r and Igf2 gene expression in androgenetic, gynogenetic, and parthenogenetic preimplantation mouse embryos: absence of regulation by genomic imprinting. *Genes Dev* **8**:290-9.

- Laurance, B. M., Brito, A., and Wilkinson, J. (1981). Prader-Willi Syndrome after age 15 years. *Arch Dis Child* **56**:181-6.
- Leana-Cox, J., Jenkins, L., Palmer, C. G., Plattner, R., Sheppard, L., Flejter, W. L., Zackowski, J., Tsien, F., and Schwartz, S. (1994). Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes, using probes specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome region: clinical implications. *Am J Hum Genet* **54**:748-56.
- Ledbetter, D. H., Riccardi, V. M., Airhart, S. D., Strobel, R. J., Keenan, B. S., and Crawford, J. D. (1981). Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* **304**:325-9.
- Ledbetter, D. H., Mascarello, J. T., Riccardi, V. M., Harper, V. D., Airhart, S. D., and Strobel, R. J. (1982). Chromosome 15 abnormalities and the Prader-Willi syndrome: a follow-up report of 40 cases. *Am J Hum Genet* **34**:278-85.
- Lee, S. and Wevrick, R. (2000). Identification of novel imprinted transcripts in the Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome deletion region: further evidence for regional imprinting control. *Am J Hum Genet* **66** :848-58.
- Lee, S., Kozlov, S., Hernandez, L., Chamberlain, S. J., Brannan, C. I., Stewart, C. L., and Wevrick, R. (2000). Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* **9**:1813-9.
- Leibowitz, SF., Hammer, N. J., and Chang, K. (1981). Hypothalamic pareventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol behav* **27**:1031-40.
- Lindgren, A. C., Hagenas, L., Muller, J., Blichfeldt, S., Rosenborg, M., Brismar, T., and Ritzen, E. M. (1997). Effects of growth hormone treatment on growth and body composition in Prader-Willi syndrome: a preliminary report. The Swedish National Growth Hormone Advisory Group. *Acta Paediatr Suppl* **423**:60-2.
- Long, F. L., Duckett, D. P., Billam, L. J., Williams, D. K., and Crolla, J. A. (1998). Triplication of 15q11-q13 with inv dup(15) in a female with developmental delay. *J Med Genet* **35**:425-8.
- Lossie, A. C., Whitney, M. M., Amidon, D., Dong, H. J., Chen, P., Theriaque, D., Hutson, A., Nicholls, R. D., Zori, R. T., Williams, C. A., and Driscoll, D. J. (2001). Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* **38**:834-45.
- MacDonald, H. R. and Wevrick, R. (1997). The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* **6**:1873-8.
- Magenis, R. E., Brown, M. G., Lacy, D. A., Budden, S., and LaFranchi, S. (1987). Is Angelman syndrome an alternate result of del(15)(q11q13)? *Am J Med Genet* **28**:829-38.
- Magenis, R. E., Toth-Fejel, S., Allen, L. J., Black, M., Brown, M. G., Budden, S., Cohen, R., Friedman, J. M., Kalousek, D., Zonana, J., and et, a. I. (1990). Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences. *Am J Med Genet* **35**:333-49.
- Malcolm, S., Clayton-Smith, J., Nichols, M., Robb, S., Webb, T., Armour, J. A., Jeffreys, A. J., and Pembrey, M. E. (1991). Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* **337**:694-7.
- Malzac, P., Moncla, A., Pedellier, K., Vo Van, C., Girardot, L., and Voelckel, M. A. (1998). Atypical molecular findings identify limits of technical screening tests for Prader-Willi and Angelman syndrome diagnoses. *Am J Med Genet* **78**(3):242-4.
- Malzac, P., Webber, H., Moncla, A., Graham, J. M., Kukulich, M., Williams, C., Pagon, R. A., Ramsdell, L. A., Kishino, T., and Wagstaff, J. (1998). Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* **62**:1353-60.
- Mascari, M. J., Gottlieb, W., Rogan, P. K., Butler, M. G., Waller, D. A., Armour, J. A., Jeffreys, A. J., Ladda, R. L., and Nicholls, R. D. (1992). The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med* **326**(24):1599-607.
- Matsuura, T., Sutcliffe, J. S., Fang, P., Galjaard, R. J., Jiang, Y. H., Benton, C. S., Rommens, J. M., and Beaudet, A. L. (1997). De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in

Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**:74-7.

Maufroid JP, Bradshaw RA, Boilly B, Hondermarck H. (1996). Nerve growth factor induced neurite outgrowth from amphibian neuroepithelial precursor cells is prevented by dipeptides inhibiting ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Dev Biol* **40**(3):609-11

Meguro, M., Kashiwagi, A., Mitsuya, K., Nakao, M., Kondo, I., Saitoh, S., and Oshimura, M. (2001). A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* **28**:19-20.

Milunsky, J.M., Wyandt, H.E., Amos, J.A., Kang, Z., Huang, X.L., Elias, E. and Milunsky A. (1994). Trisomy 15 mosaicism and uniparental disomy (UPD) in a liveborn infant. *Am J Hum Genet* **55**:A112;636.

Miller, S. P., Riley, P., and Shevell, M. I. (1999). The neonatal presentation of Prader-Willi syndrome revisited. *J Pediatr* **134**:226-8.

Minassian, B. A., DeLorey, T. M., Olsen, R. W., Philippart, M., Bronstein, Y., Zhang, Q., Guerrini, R., Van Ness, P., Livet, M. O., and Delgado-Escueta, A. V. (1998). Angelman syndrome: correlations between epilepsy phenotypes and genotypes. *Ann Neurol* **43**:485-93.

Mitchell JR, Collins K. (2000). Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* **6**(2):361-71.

Mitchell, J., Schinzel, A., Langlois, S., Gillissen-Kaesbach, G., Schuffenhauer, S., Michaelis, R., Abeliovich, D., Lerer, I., Christian, S., Guitart, M., McFadden, D. E., and Robinson, W. P. (1996). Comparison of phenotype in uniparental disomy and deletion Prader-Willi syndrome: sex specific differences. *Am J Med Genet* **65**:133-6.

Miura, K., Kishino, T., Li, E., Webber, H., Dikkes, P., Holmes, G. L., and Wagstaff, J. (2002). Neurobehavioral and electroencephalographic abnormalities in Ube3a maternal-deficient mice. *Neurobiol Dis* **9**:149-59.

Mohandas, T. K., Park, J. P., Spellman, R. A., Filiano, J. J., Mamourian, A. C., Hawk, A. B., Belloni, D. R., Noll, W. W., and Moeschler, J. B. (1999). Paternally derived de novo interstitial duplication of proximal 15q in a patient with developmental delay. *Am J Med Genet* **82**:294-300.

Moncla, A., Malzac, P., Livet, M. O., Voelckel, M. A., Mancini, J., Delaroziere, J. C., Philip, N., and Mattei, J. F. (1999). Angelman syndrome resulting from UBE3A mutations in 14 patients from eight families: clinical manifestations and genetic counselling. *J Med Genet* **36**:554-60.

Moncla, A., Malzac, P., Voelckel, M. A., Auquier, P., Girardot, L., Mattei, M. G., Philip, N., Mattei, J. F., Lalande, M., and Livet, M. O. (1999). Phenotype-genotype correlation in 20 deletion and 20 non-deletion Angelman syndrome patients. *Eur J Hum Genet* **7**(2):131-9.

Morichon-delvallez, N., Mussat, P., Dumez, Y. and Vekemans, M. (1993). Trisomy 15 in chorionic villi and Prader-Willi syndrome at birth. *Prenat Diagn* **13**:307-308.

Mowery-Rushton, P. A.; Hanchett, J. M.; Zipf, W. B.; Rogan, P. K., and Surti, U. (1996). Identification of mosaicism in Prader-Willi syndrome using fluorescent in situ hybridization. *Am J Med Genet* **66**(4):403-12.

Mowery-Rushton, P. A., Hanchett, J. M., Zipf, W. B., Rogan, P. K., and Surti, U. (2000). Mosaicism in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **90**(2):177.

Muller, J. (1997). Hypogonadism and endocrine metabolic disorders in Prader-Willi syndrome. *Acta Paediatr Suppl* **423**:58-9.

Muscатели, F., Abrous, D. N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P., and Cremer, H. (2000). Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**:3101-10.

Mutirangura, A., Greenberg, F., Butler, M. G., Malcolm, S., Nicholls, R. D., Chakravarti, A., and Ledbetter, D. H. (1993a). Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum Mol Genet* **2**:143-51.

- Mutirangura, A., Jayakumar, A., Sutcliffe, J. S., Nakao, M., McKinney, M. J., Buiting, K., Horsthemke, B., Beaudet, A. L., Chinault, A. C., and Ledbetter, D. H. (1993b). A complete YAC contig of the Prader-Willi/Angelman chromosome region (15q11-q13) and refined localization of the SNRPN gene. *Genomics* **18**:546-52.
- Mutirangura, A., Kuwano, A., Ledbetter, S. A., Chinault, A. C., and Ledbetter, D. H. (1992). Dinucleotide repeat polymorphism at the D15S11 locus in the Angelman/Prader-Willi region (AS/PWS) of chromosome 15. *Hum Mol Genet* **1**:139.
- Nadeau, J. H. and Sankoff, D. (1997). Comparable rates of gene loss and functional divergence after genome duplications early in vertebrate evolution. *Genetics* **147**(3):1259-66.
- Nakao, M., Sutcliffe, J. S., Durtschi, B., Mutirangura, A., Ledbetter, D. H., and Beaudet, A. L. (1994). Imprinting analysis of three genes in the Prader-Willi/Angelman region: SNRPN, E6-associated protein, and PAR-2 (D15S225E). *Hum Mol Genet* **3**:309-15.
- Nawaz, Z., Lonard, D. M., Smith, C. L., Lev-Lehman, E., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1999). The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* **19**:1182-9.
- Nicholls, R. D., Knoll, J. H., Butler, M. G., Karam, S., and Lalande, M. (1989a). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **342**:281-5.
- Nicholls, R. D., Knoll, J. H., Glatt, K., Hersh, J. H., Brewster, T. D., Graham, J. M. Jr, Wurster-Hill, D., Wharton, R., and Latt, S. A. (1989b). Restriction fragment length polymorphisms within proximal 15q and their use in molecular cytogenetics and the Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **33**:66-77.
- Nicholls, R. D., Pai, G. S., Gottlieb, W., and Cantu, E. S. (1992). Paternal uniparental disomy of chromosome 15 in a child with Angelman syndrome. *Ann Neurol* **32**:512-8.
- Nicholls, R. D., Saitoh, S., and Horsthemke, B. (1998). Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* **14**:194-200.
- Nicholls, R. D. (1999). Incriminating gene suspects, Prader-Willi style. *Nat Genet* **23**(2):132-4.
- Nicholls, R. D. (2000). Mosaicism in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **90**(2):175-6.
- Nicholls, R. D. and Knepper, J. L. (2001). Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**:153-75.
- Ning, Y., Roschke, A., Christian, S. L., Lesser, J., Sutcliffe, J. S., and Ledbetter, D. H. (1996). Identification of a novel paternally expressed transcript adjacent to snRPN in the Prader-Willi syndrome critical region. *Genome Res* **6**:742-6.
- Nowaczyk MJ, Zeesman S, Kam A, Taylor SA, Carter RF, Whelan DT. (2004). Boy with 47,XXY,del(15)(q11.2q13) karyotype and Prader-Willi syndrome: a new case and review of the literature. *Am J Med Genet* **15**;125A(1):73-6.
- Obata Y, Kaneko-Ishino T, Koide T, Takai Y, Ueda T, Domeki I, Shiroishi T, Ishino F, Kono T. (1998). Disruption of primary imprinting during oocyte growth leads to the modified expression of imprinted genes during embryogenesis. *Development* **125**(8):1553-60.
- Ohta, T., Buiting, K., Kokkonen, H., McCandless, S., Heeger, S., Leisti, H., Driscoll, D. J., Cassidy, S. B., Horsthemke, B., and Nicholls, R. D. (1999). Molecular mechanism of angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* **64**:385-96.
- Ohta, T., Gray, T. A., Rogan, P. K., Buiting, K., Gabriel, J. M., Saitoh, S., Muralidhar, B., Bilienska, B., Krajewska-Walasek, M., Driscoll, D. J., Horsthemke, B., Butler, M. G., and Nicholls, R. D. (1999). Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **64**:397-413.
- Olander, E., Stamberg, J., Steinberg, L., and Wulfsberg, E. A. (2000). Third Prader-Willi syndrome phenotype due to maternal uniparental disomy 15 with mosaic trisomy 15. *Am J Med Genet* **93**(3):215-8.
- Ozcelik, T., Leff, S., Robinson, W., Donlon, T., Lalande, M., Sanjines, E., Schinzel, A., and Francke, U.

- (1992). Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* **2**:265-9.
- Penner, K. A., Johnston, J., Faircloth, B. H., Irish, P., and Williams, C. A. (1993). Communication, cognition, and social interaction in the Angelman syndrome. *Am J Med Genet* **46**:34-9.
- Perk, J., Makedonski, K., Lande, L., Cedar, H., Razin, A., and Shemer, R. (2002). The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *EMBO J* **21**(21):5807-14.
- Petersen, M. B., Brondom-Nielson, K., Hansen, L. K., Wulff, K. (1995). Clinical, cytogenetic and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish country. *Am J Med Genet* **60**:261-2.
- Plaja A, Miro R, Fuster C, Perez C, Sarret E, Esteve P, Egozcue J. (2001). Bends in human mitotic metaphase chromosomes revisited: 15q11-13 is the most frequent non-random autosomal bend in blood cultures. *Am J Med Genet* **101**(2):106-13.
- Poyatos, D., Coll, M. D., Guitart, M., and Colomer, J. (1999). Confirmation of Angelman syndrome in a boy previously reported as having Becker muscular dystrophy and severe mental retardation. *Eur J Pediatr* Dec; **158**(12):1006.
- Poyatos, D., Guitart, M., Gabau, E., Brun, C., Mila, M., Vaquerizo, J., and Coll, M. D. (2002). Severe phenotype in Angelman syndrome resulting from paternal isochromosome 15. *J Med Genet* **39**:E4.
- Prader, A., Labhart, A., Willi, H. (1956). Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach Myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz. Med. Wschr.* **86**: 1260-1261.
- Prasad, C. and Wagstaff, J. (1997). Genotype and phenotype in Angelman syndrome caused by paternal UPD 15. *Am J Med Genet* **70**:328-9.
- Pujana, M. A., Nadal, M., Guitart, M., Armengol, L., Gratacos, M., and Estivill, X. (2002). Human chromosome 15q11-q14 regions of rearrangements contain clusters of LCR15 duplicons. *Eur J Hum Genet* **10**:26-35.
- Purvis-Smith, S. G., Saville, T., Manass, S., Yip, M. Y., Lam-Po-Tang, P. R., Duffy, B., Johnston, H., Leigh, D., and McDonald, B. (1992). Uniparental disomy 15 resulting from "correction" of an initial trisomy 15. *Am J Hum Genet* **50**:1348-50.
- Reed, M. L. and Leff, S. E. (1994). Maternal imprinting of human SNRPN, a gene deleted in Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* **6**:163-7.
- Rego, A., Coll, M. D., Regal, M., Guitart, M., Escudero, T., and Garcia-Mayor, R. V. (1997). A case with 47,XXY,del(15)(q11;q13) karyotype associated with Prader-Willi phenotype. *Horm Res* 48(1):44-6.
- Reik, W., Collick A., and Norris ML. (1987). Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice: a new mechanism for disease. *Nature* **328**:248-251.
- Reis, A., Dittrich, B., Greger, V., Buiting, K., Lalande, M., Gillessen-Kaesbach, G., Anvret, M., and Horsthemke, B. (1994). Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* **54**:741-7.
- Reis, A., Kunze, J., Ladanyi, L., Enders, H., Klein-Vogler, U., and Niemann, G. (1993). Exclusion of the GABAA-receptor beta 3 subunit gene as the Angelman's syndrome gene. *Lancet* **341**:122-3.
- Repetto, G. M., White, L. M., Bader, P. J., Johnson, D., and Knoll, J. H. (1998). Interstitial duplications of chromosome region 15q11q13: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet* **79**:82-9.
- Rinchik, E. M., Bultman, S. J., Horsthemke, B., Lee, S. T., Strunk, K. M., Spritz, R. A., Avidano, K. M., Jong, M. T., and Nicholls, R. D. (1993). A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* **361**(6407):72-6.
- Riordan, D. and Dawson, A. J. (1998). The evaluation of 15q proximal duplications by FISH. *Clin Genet* **54**:517-21.

- Ritchie, R. J., Mattei, M. G., and Lalande, M. (1998). A large polymorphic repeat in the pericentromeric region of human chromosome 15q contains three partial gene duplications. *Hum Mol Genet* **7**:1253-60.
- Rivera, H., Zuffardi, O., and Gargantini, L. (1990). Nonreciprocal and jumping translocations of 15q1--qter in Prader- Willi syndrome. *Am J Med Genet* **37**:311-7.
- Roberts, S., Maggouta, F., Thompson, R., Price, S., and Thomas, S. (2002). A patient with a supernumerary marker chromosome (15), Angelman syndrome, and uniparental disomy resulting from paternal meiosis II non- disjunction. *J Med Genet* **39**:E9.
- Robinson, W. P., Bottani, A., Xie, Y. G., Balakrishnan, J., Binkert, F., Machler, M., Prader, A., and Schinzel, A. (1991). Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am J Hum Genet* **49**:1219-34.
- Robinson, W. P., Bernasconi, F., Mutirangura, A., Ledbetter, D. H., Langlois, S., Malcolm, S., Morris, M. A., and Schinzel, A. A. (1993a). Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am J Hum Genet* **53**:740-51.
- Robinson, W. P., Lorda-Sanchez, I., Malcolm, S., Langlois, S., Schuffenhauer, S., Knoblauch, H., Horsthemke, B., and Schinzel, A. A. (1993b). Increased parental ages and uniparental disomy 15: a paternal age effect? *Eur J Hum Genet* **1**:280-6.
- Robinson, W. P., Binkert, F., Gine, R., Vazquez, C., Muller, W., Rosenkranz, W., and Schinzel, A. (1993c). Clinical and molecular analysis of five inv dup(15) patients. *Eur J Hum Genet* **1**:37-50.
- Robinson, W. P., Spiegel, R., and Schinzel, A. A. (1993c). Deletion breakpoints associated with the Prader-Willi and Angelman syndromes (15q11-q13) are not sites of high homologous recombination. *Hum Genet* **91**:181-4.
- Robinson, W. P., Dutly, F., Nicholls, R. D., Bernasconi, F., Penaherrera, M., Michaelis, R. C., Abeliovich, D., and Schinzel, A. A. (1998). The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *J Med Genet* **35**:130-6.
- Robinson, W. P., Kuchinka, B. D., Bernasconi, F., Petersen, M. B., Schulze, A., Brondum-Nielsen, K., Christian, S. L., Ledbetter, D. H., Schinzel, A. A., Horsthemke, B., Schuffenhauer, S., Michaelis, R. C., Langlois, S., and Hassold, T. J. (1998). Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15: dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* **7**(6):1011-9.
- Rougeulle, C., Glatt, H., and Lalande, M. (1997). The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat Genet* **17**:14-5.
- Rougeulle, C., Cardoso, C., Fontes, M., Colleaux, L., and Lalande, M. (1998). An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* **19**:15-6.
- Rubin, K. and Cassidy, SB. (1988). Hypogonadism and osteoporosis.
- Runte, M., Huttenhofer, A., Gross, S., Kiefmann, M., Horsthemke, B., and Buiting, K. (2001). The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* **10**:2687-700.
- Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K. (2004). SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* **114**(6):553-61.
- Russek SJ, Farb DH. (1994). Mapping of the beta 2 subunit gene (GABRB2) to microdissected human chromosome 5q34-q35 defines a gene cluster for the most abundant GABAA receptor isoform. *Genomics* **23**(3):528-33.
- Sachs, E. S., van Hemel, J. O., den Hollander, J. C., and Jahoda, M. (1987). Marker chromosomes in a series of 10,000 prenatal diagnoses. Cytogenetic and follow-up studies. *Prenat Diagn* **7**:81-89.
- Saitoh, S., Kubota, T., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Sugimoto, T., Wagstaff, J., and Lalande, M. (1992). Familial Angelman syndrome caused by imprinted submicroscopic deletion encompassing GABAA receptor beta 3-subunit gene. *Lancet* **339**:366-7.

- Saitoh, S., Harada, N., Jinno, Y., Hashimoto, K., Imaizumi, K., Kuroki, Y., Fukushima, Y., Sugimoto, T., Renedo, M., Wagstaff, J., and et, a. I. (1994). Molecular and clinical study of 61 Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* **52**:158-63.
- Saitoh, S., Buiting, K., Rogan, P. K., Buxton, J. L., Driscoll, D. J., Arnemann, J., Konig, R., Malcolm, S., Horsthemke, B., and Nicholls, R. D. (1996). Minimal definition of the imprinting center and fixation of chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7811-5.
- Saitoh, S., Buiting, K., Cassidy, S. B., Conroy, J. M., Driscoll, D. J., Gabriel, J. M., Gillissen-Kaesbach, G., Glenn, C. C., Greenswag, L. R., Horsthemke, B., Kondo, I., Kuwajima, K., Niikawa, N., Rogan, P. K., Schwartz, S., Seip, J., Williams, C. A., and Nicholls, R. D. (1997). Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet* **68**:195-206.
- Saitoh, S. and Wada, T. (2000). Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **66**:1958-62.
- Sambbbrook and Maniattis (1989).
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J. M. (1995). protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thiolester cascade. *Nature* **373**:81-83.
- Schinzal, A. A., Brecevic, L., Bernasconi, F., Binkert, F., Berthet, F., Wuilloud, A., and Robinson, W. P. (1994). Intrachromosomal triplication of 15q11-q13. *J Med Genet* **31**:798-803.
- Schrander-Stumpel, C., Sijstermans, H., Curfs, L., and Fryns, J. P. (1998). Sudden death in children with Prader-Willy syndrome: a call for collaboration. *Genet Couns* **9**:231-2.
- Schulze, A., Hansen, C., Skakkebaek, N. E., Brondum-Nielsen, K., Ledbeter, D. H., and Tommerup, N. (1996). Exclusion of SNRPN as a major determinant of Prader-Willi syndrome by a translocation breakpoint. *Nat Genet* **12**:452-4.
- Schulze, A., Mogensen, H., Hamborg-Petersen, B., Graem, N., Ostergaard, J. R., and Brondum-Nielsen, K. (2001). Fertility in Prader-Willi syndrome: a case report with Angelman syndrome in the offspring. *Acta Paediatr*, **90**, 455-9.
- Simon, I., Tenzen, T., Reubinoff, B. E., Hillman, D., McCarrey, J. R., and Cedar, H. (1999). Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* **401**(6756):929-32.
- Smeets, D. F., Hamel, B. C., Nelen, M. R., Smeets, H. J., Bollen, J. H., Smits, A. P., Ropers, H. H., and van Oost, B. A. (1992). Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome in cousins from a family with a translocation between chromosomes 6 and 15. *N Engl J Med* **326**:807-11.
- Smith, A., Wiles, C., Haan, E., McGill, J., Wallace, G., Dixon, J., Selby, R., Colley, A., Marks, R., and Trent, R. J. (1996). Clinical features in 27 patients with Angelman syndrome resulting from DNA deletion. *J Med Genet* **33**(2):107-12.
- Smith, A., Marks, R., Haan, E., Dixon, J., and Trent, R. J. (1997). Clinical features in four patients with Angelman syndrome resulting from paternal uniparental disomy. *J Med Genet* **34**:426-9.
- Smith, A., Robson, L., and Buchholz, B. (1998). Normal growth in Angelman syndrome due to paternal UPD. *Clin Genet* **53**:223-5.
- Spinner, N. B., Zackai, E., Cheng, S. D., and Knoll, J. H. (1995). Supernumerary inv dup(15) in a patient with Angelman syndrome and a deletion of 15q11-q13. *Am J Med Genet* **57**:61-5.
- Stalker, H. J. and Williams, C. A. (1998). Genetic counseling in Angelman syndrome: the challenges of multiple causes. *Am J Med Genet* **77**:54-9.
- Stephenson, J. B. (1980). Prader-Willi syndrome: neonatal presentation and later development. *Dev Med Child Neurol* **22**:792-5.
- Stephenson, J. B. (1992). Neonatal presentation of Prader-Willi syndrome. *Am J Dis Child* **146**:151-2.

- Sun, Y., Nicholls, R. D., Butler, M. G., Saitoh, S., Hainline, B. E., and Palmer, C. G. (1996). Breakage in the SNRPN locus in a balanced 46,XY,t(15;19) Prader-Willi syndrome patient. *Hum Mol Genet* **5**:517-24.
- Sundberg, K., Brocks, V., Jacobsen, J.R. and Beck, B. (1994). True trisomy 15 mosaicism, detected by amniocentesis at 12 weeks of gestation and fetal echocardiography. *Prenat diagn* **14**:559-563.
- Sutcliffe, J. S., Nakao, M., Christian, S., Orstavik, K. H., Tommerup, N., Ledbetter, D. H., and Beaudet, A. L. (1994). Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* **8**:52-8.
- Sutcliffe, J. S., Han, M., Christian, S. L., and Ledbetter, D. H. (1997a). Neuronally-expressed necdin gene: an imprinted candidate gene in Prader-Willi syndrome. *Lancet* **350**:1520-1.
- Sutcliffe, J. S., Jiang, Y. H., Galijaard, R. J., Matsuura, T., Fang, P., Kubota, T., Christian, S. L., Bressler, J., Cattanaach, B., Ledbetter, D. H., and Beaudet, A. L. (1997b). The E6-Ap ubiquitin-protein ligase (UBE3A) gene is localized within a narrowed Angelman syndrome critical region. *Genome Res* **7**:368-77.
- Swaab, D. F. (1997). Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Paediatr Suppl* **423**:50-4.
- Swaab, D. F., Purba, J. S., and Hofman, M. A. (1995). Alterations in the hypothalamic paraventricular nucleus and its oxytocin neurons (putative satiety cells) in Prader-Willi syndrome: a study of five cases. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:573-9.
- Tantravahi, U., Nicholls, R. D., Stroh, H., Ringer, S., Neve, R. L., Kaplan, L., Wharton, R., Wurster-Hill, D., Graham, J. M. Jr, Cantu, E. S., and et, a. I. (1989). Quantitative calibration and use of DNA probes for investigating chromosome abnormalities in the Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **33**:78-87.
- Tasset, D. M., Hartz, J. A., and Kao, F. T. (1988). Isolation and analysis of DNA markers specific to human chromosome 15. *Am J Hum Genet* **42**:854-66.
- Teshima, I., Chadwick, D., Chitayat, D., Kobayashi, J., Ray, P., Shuman, C., Siegel-Bartelt, J., Strasberg, P., and Weksberg, R. (1996). FISH detection of chromosome 15 deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Am J Med Genet* **62**:217-23.
- Tollervey, D. and Kiss, T. (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol* **9**:337-342.
- Tomlinson, I. M., Cook, G. P., Carter, N. P., Elaswarapu, R., Smith, S., Walter, G., Buluwela, L., Rabbitts, T. H., and Winter, G. (1994). Human immunoglobulin VH and D segments on cromosoma 15q11.2 and 16p11.2. *Hum Mol Genet* **3** :853-860.
- Tonk, V., Schultz, R. A., Christian, S. L., Kubota, T., Ledbetter, D. H., and Wilson, G. N. (1996). Robertsonian (15q;15q) translocation in a child with Angelman syndrome: evidence of uniparental disomy. *Am J Med Genet* **66**:426-8.
- Trent RJ, Volpato F, Smith A, Lindeman R, Wong MK, Warne G, Haan E. (1991). Molecular and cytogenetic studies of the Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* **28**(10):649-54.
- Trent, R. J., Nassif, N. T., and Deng, Z. M. (1995). A physical map of the Angelman Syndrome critical region al locus D15S113 (LS6-1). *Am J Hum Genet* **57**:A1580.
- Tsai, T. F., Jiang, Y. H., Bressler, J., Armstrong, D., and Beaudet, A. L. (1999). Paternal deletion from Snrpn to Ube3a in the mouse causes hypotonia, growth retardation and partial lethality and provides evidence for a gene contributing to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **8**:1357-64.
- Tu JB, Hartridge C, Izawa J. (1992). Psychopharmacogenetic aspects of Prader-Willi syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **31**(6):1137-40.
- Ungaro, P., Christian, S. L., Fantes, J. A., Mutirangura, A., Black, S., Reynolds, J., Malcolm, S., Dobyns, W. B., and Ledbetter, D. H. (2001). Molecular characterisation of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14. *J Med Genet* **38**:26-34.
- van den Ouweland, A. M., van der Est, M. N., Wesby-van Swaay, E., Tijmensen, T. S., Los, F. J., Van Hemel, J. O., Hennekam, R. C., Meijers-Heijboer, H. J., Niermeijer, M. F., and Halley, D. J. (1995). DNA

- diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes with the probe PW71 (D15S63). *Hum Genet* **95**:562-7.
- Veltman, MW., Thompson, R.J., Roberts, SE., Thomas, NS., Whittington, J. and Bolton, PF. (2004). Prader-Willi syndrome--a study comparing deletion and uniparental disomy cases with reference to autism spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **13**(1):42-50.
- Volpe, R. G., Clark, N. E., Mazzatta, J. A., and Schlein, S. R. (1995). The lower extremity manifestations of Prader-Willi syndrome. *J Foot Ankle Surg* **34**:223-7.
- Vu, T. H. and Hoffman, A. R. (1997). Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet* **17**:12-3.
- Wagstaff, J., Chaillet, J. R., and Lalonde, M. (1991a). The GABAA receptor beta 3 subunit gene: characterization of a human cDNA from chromosome 15q11q13 and mapping to a region of conserved synteny on mouse chromosome 7. *Genomics* **11**:1071-8.
- Wagstaff, J., Knoll, J. H., Fleming, J., Kirkness, E. F., Martin-Gallardo, A., Greenberg, F., Graham, J. M. Jr, Menninger, J., Ward, D., Venter, J. C., and et, a. I. (1991b). Localization of the gene encoding the GABAA receptor beta 3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *Am J Hum Genet* **49**:330-7.
- Wandstrat, A. E., Leana-Cox, J., Jenkins, L., and Schwartz, S. (1998). Molecular cytogenetic evidence for a common breakpoint in the largest inverted duplications of chromosome 15. *Am J Hum Genet* **62**:925-36.
- Watrin, F., Roeckel, N., Lacroix, L., Mignon, C., Mattei, M. G., Disteche, C., and Muscatelli, F. (1997). The mouse Necdin gene is expressed from the paternal allele only and lies in the 7C region of the mouse chromosome 7, a region of conserved synteny to the human Prader-Willi syndrome region. *Eur J Hum Genet* **5**:324-32.
- Webb, T., Malcolm, S., Pembrey, M. E., and Clayton-Smith, J. (1993). Inheritance of parental chromosomes 15 in Angelman syndrome-- implications for the family. *Genet Couns* **4**:1-6.
- Webb, T. (1994). Inv dup(15) supernumerary marker chromosomes. *J Med Genet* **31**:585-94.
- Webb, T., Whittington, J., Clarke, D., Boer, H., Butler, J., and Holland, A. (2002). A study of the influence of different genotypes on the physical and behavioral phenotypes of children and adults ascertained clinically as having PWS. *Clin Genet* **62**(4):273-81.
- Wevrick, R. and Francke, U. (1996). Diagnostic test for the Prader-Willi syndrome by SNRPN expression in blood. *Lancet* **348**:1068-9.
- Wevrick, R., Kerns, J. A., and Francke, U. (1994). Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* **3**:1877-82.
- Wharton, R. H. and Bresnan, M. J. (1989). Neonatal respiratory depression and delay in diagnosis in Prader-Willi syndrome. *Dev Med Child Neurol* **31**:231-6.
- White, L. and Knoll, J. H. (1995). Angelman syndrome: validation of molecular cytogenetic analysis of chromosome 15q11-q13 for deletion detection. *Am J Med Genet* **56**:101-5.
- Whittington, J. E., Holland, A. J., Webb, T., Butler, J., Clarke, D., and Boer, H. (2001). Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi syndrome in one UK Health Region. *J Med Genet* **38**:792-8.
- Whittington, J., Holland, A., Webb, T., Butler, J., Clarke, D., and Boer, H. (2002). Relationship between clinical and genetic diagnosis of Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* **39**(12):926-32.
- Williams, C. A., Angelman, H., Clayton-Smith, J., Driscoll, D. J., Hendrickson, J. E., Knoll, J. H., Magenis, R. E., Schinzel, A., Wagstaff, J., Whidden, E. M., and et, a. I. (1995). Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* **56**:237-8.
- Williams, C. A., Lossie, A., and Driscoll, D. (2001). Angelman syndrome: mimicking conditions and phenotypes. *Am J Med Genet* **101**(1):59-64.

- Wirth, J., Back, E., Huttenhofer, A., Nothwang, H. G., Lich, C., Gross, S., Menzel, C., Schinzel, A., Kioschis, P., Tommerup, N., Ropers, H. H., Horsthemke, B., and Buiting, K. (2001). A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* **10**:201-10.
- Wolffe, A. P. and Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**(5439):481-6.
- Yamamoto, Y., Huibregtse, J. M., and Howley, P. M. (1997). The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics* **41**:263-6.
- Yang, T., Adamson, T. E., Resnick, J. L., Leff, S., Wevrick, R., Francke, U., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Brannan, C. I. (1998). A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nat Genet* **19**:25-31.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* **13**(8):335-40.
- Zeschnigk, M., Lich, C., Buiting, K., Doerfler, W., and Horsthemke, B. (1997). A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet* **5**:94-8.
- Zeschnigk, M., Schmitz, B., Dittrich, B., Buiting, K., Horsthemke, B., and Doerfler, W. (1997). Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet* **6**:387-95.
- Zipf, W. B. and Berntson, G. G. (1987). Characteristics of abnormal food-intake patterns in children with Prader-Willi syndrome and study of effects of naloxone. *Am J Clin Nutr* **46**:277-81.
- Zori, R. T., Hendrickson, J., Woolven, S., Whidden, E. M., Gray, B., and Williams, C. A. (1992). Angelman syndrome: clinical profile. *J Child Neurol* **7**:270-80.