

SÍNDROME DE PRADER-WILLI Y SÍNDROME DE ANGELMAN

Caso clínico: Neonato con hipotonía y criptorquidia.

PILAR CARRASCO SALAS.

Centro de Genética Molecular Genetaq (Málaga).

Palabras clave: metilación ADN, síndrome Prader-Willi, síndrome Angelman, impronta genómica.

EXPOSICIÓN DEL CASO CLÍNICO

Presentamos el caso de un recién nacido varón con hipotonía neonatal y criptorquidia bilateral (ausencia de testículos en la bolsa escrotal), hijo de padres sanos no consanguíneos. La madre había sufrido un aborto previo. El embarazo fue de 36 semanas, controlado y sin patología, con movimientos fetales normales. Parto espontáneo, de presentación cefálica. Peso: 2,620 g. Longitud: 50,1 cm y perímetro craneal: 32 cm.

A los 15 días de edad ingresa por hipotonía marcada y ganancia ponderal nula. Recibe alimentación mediante sonda nasogástrica por succión ineficaz.

La hipotonía plantea un diagnóstico diferencial amplio, que implica la realización de numerosas exploraciones complementarias para descartar causas tan diversas como sufrimiento fetal agudo, malformaciones cerebrales, enfermedades neuromusculares o metabólicas o síndromes genéticos. La criptorquidia puede ocurrir como una alteración aislada en niños sanos o, por el contrario, la podemos encontrar formando parte de otras enfermedades endocrinas, genéticas, diversos síndromes u otras anomalías morfológicas.

Para descartar las principales enfermedades que cursan con hipotonía durante el periodo neonatal, se realizaron ecografías (cerebral y abdominal) y tomografía computarizada craneal, y se solicitaron estudios metabólicos (amonio, lactato, piruvato, gasometría venosa, aminoácidos y ácidos orgánicos en sangre y orina, ácidos grasos de cadena muy larga, carnitina libre y total y acilcarnitinas) cariotipo y estudio genético del síndrome Prader-Willi y del síndrome de di George.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Prader-Willi (SPW) es una enfermedad genética compleja que se produce por la deficiencia de los genes que se expresan en el alelo paterno en la región 15q11-q13. La deficiencia en esa misma región de los genes que se expresan en el alelo materno da lugar a otra enfermedad distinta: el síndrome de Angelman (SA).

La región 15q11-q13 es una de las regiones cromosómicas en las que se han detectado genes improntados o marcados. A diferencia de la mayoría de genes de nuestro genoma, que se expresan desde sus dos alelos, el materno y el paterno, los genes improntados son aquellos que se expresan exclusiva o preferencialmente sólo en uno de ellos, es decir, uno de los alelos no se transcribe y por tanto, el genoma improntado es funcionalmente haploide.

El fenómeno de marcaje del ADN, conocido como impronta genómica, no supone cambios en la secuencia de nucleótidos de esos genes; se produce por la adición de grupos metilos a los residuos de citosina de los dinucleótidos formados por citosina y guanina (CpGs). Los grupos metilos pueden crear una configuración local de la cromatina que hace los genes inaccesibles y por ello transcripcionalmente inactivos. En general, un alto nivel de metilación de los genes se relaciona con un bajo nivel transcripcional, aunque no siempre es así.

El marcaje tiene lugar durante la gametogénesis. En cada ciclo reproductivo, los patrones de marcaje o *imprinting* han de establecerse de nuevo, puesto que lo que en una meiosis es material de origen paterno (por ejemplo, transmisión de un varón a su hija), en la siguiente meiosis pasa a ser marcado como materno (cuando esa hija tenga descendencia). Para poder cambiar el *imprinting* es necesario borrar toda la información previa.

Todos los genes improntados en esta región, incluyendo el gen *SNURF-SNRPN*, muestran expresión específica del alelo paterno (es decir no están metilados en el alelo paterno), excepto los genes *UBE3A* y *ATP10A*, que muestran expresión materna en ciertos tejidos, especialmente cerebro. El centro de *imprinting* de esta región consta de dos partes: un centro de *imprinting* para SPW y otro para SA (Figura 1).

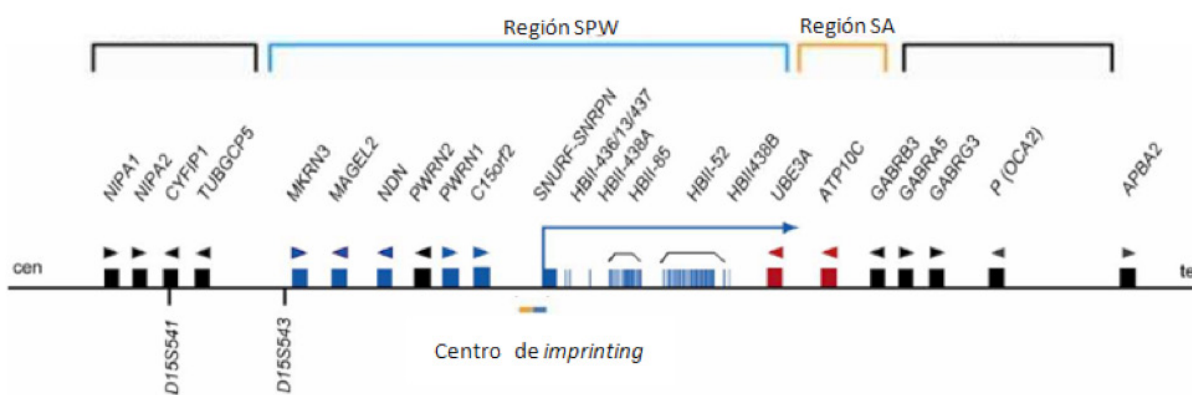


Figura 1: Genes localizados en la región SPW y SA. Las cajas azules representan los genes expresados en el alelo paterno, las rojas los que se expresan en el alelo materno y las negras los que se expresan desde los dos alelos. Las flechas indican el sentido de la transcripción. El centro de imprinting tiene una estructura bipartita: una región SA (en naranja) y otra SPW (en azul)..

En la oogénesis se activa el centro de *imprinting* SA, que, a su vez, bloquea la función del centro de *imprinting* SPW. Como resultado, los gametos femeninos sólo expresan los genes *UBE3A* y *ATP10A*. En cambio, en la espermatogénesis el centro AS está bloqueado, de manera que el centro de *imprinting* SPW es ahora activo y promueve la expresión de todos los genes de expresión paterna, y bloquea la expresión de *UBE3A* y *ATP10A*.

1.1. Rasgos clínicos

Los rasgos clínicos del SPW y del SA son diferentes, a pesar de ser debidos a anomalías en la misma región 15q11-q13. La incidencia es similar en ambos: 1 de cada 20.000 recién nacidos.

El SPW se caracteriza por hipotonía neonatal, apariencia facial característica, hipogonadismo, hiperfagia con obesidad de comienzo a los 1-2 años de edad, estatura baja, retraso en el desarrollo, retraso mental moderado y un fenotipo conductual propio del síndrome. No obstante, muchos de sus rasgos son poco específicos y otros cambian con la edad, sobre todo a partir de los 3 años. Esta variabilidad puede a veces dificultar su diagnóstico clínico, sobre todo a edades tempranas.

El SA se caracteriza por risa inmotivada, dismorfia craneofacial (microcefalia, prognatismo, lengua protuberante), marcha espasmódica, lenguaje prácticamente nulo, hipermotricidad, retraso mental grave y convulsiones.

1.2. Alteraciones moleculares

Estos dos síndromes pueden ser consecuencia de varias anomalías genéticas: 1) delección de la región 15q11-q13, 2) disomía uniparental (DUP), 3) mutaciones de *imprinting* y 4) mutaciones en el gen *UBE3A* en el caso del SA (Figura 2).

La delección de la región 15q11-q13 se observa en la mayoría de los pacientes con SPW y SA (un 70 % aproximadamente). En el SPW la delección ocurre siempre en el alelo paterno, mientras que en el SA se observa en el materno.

Se habla de DUP cuando ambas copias de un cromosoma determinado, o de una región cromosómica, proceden de un solo progenitor. Si los dos cromosomas son idénticos como resultado de la duplicación de uno de ellos, se habla de isodisomía, mientras que si los dos cromosomas presentes son los dos homólogos de un mismo progenitor se denomina heterodisomía. En el SPW se observa DUP materna (los dos cromosomas 15 proceden de la madre y faltan los genes paternos), mientras que en los pacientes con SA se detecta DUP paterna. La DUP es más frecuente en el SPW que en el SA (25-30 % frente a 2-5 %, respectivamente).

En algunos pacientes (1 - 3 % en SPW y 2 - 4 % en SA) la enfermedad se debe a mutaciones que afectan a los centros de *imprinting*. Como consecuencia, no se pueden reestablecer

los patrones durante la gametogénesis en el caso de que haya transmisión de un sexo al opuesto (madre-hijo ó padre-hija). El resultado es el mismo que se observa en la disomía uniparental: ambos alelos llevan el mismo patrón de *imprinting*. Un ejemplo es el caso de una abuela portadora de una mutación en el centro de *imprinting* SPW del cromosoma 15 que ha heredado de su madre y que lleva marcado como materno. Al transmitir este cromosoma a sus hijos varones, el cromosoma mutado pasará marcado como materno, por lo que no es necesario reestablecer el *imprinting* y los hijos serán portadores sanos (llevarán un cromosoma marcado como paterno y otro como materno). En cambio, en la siguiente generación, estos varones deberán pasar su cromosoma 15 marcado como paterno, y la marca que lo identificaba como materno deberá ser borrada durante la espermatogénesis y sustituida por la marca que lo identifique como paterno. Sin embargo, en estos individuos dicho cambio no será posible, debido a la mutación en el centro de *imprinting* del cromosoma 15 materno, por lo que la descendencia llevará dos cromosomas con patrón materno y desarrollará SPW.

La mayoría de defectos de *imprinting* se debe a mutaciones epigenéticas, es decir, mutaciones que producen cambios en la cromatina pero no en la secuencia de nucleótidos. La metilación del ADN o la modificación de histonas son dos mecanismos epigenéticos de regulación génica. Las mutaciones epigenéticas en estos síndromes se producen normalmente de manera espontánea, no son heredadas. Si las epimutaciones se producen durante la formación de los gametos, todas las células del paciente estarán afectadas. Si por el contrario, ocurre después de la fecundación, resultará en mosaicismo somático (sólo algunas poblaciones celulares tendrán el defecto de *imprinting*). En aproximadamente un tercio de los pacientes con SA y una mutación epigenética, se observa un patrón alterado de metilación en mosaico. Sin embargo, el mosaicismo somático en pacientes con SPW y una mutación epigenética es raro.

En un 10 - 15 % de los casos, el defecto de *imprinting* se debe a la presencia de una microdelección. En la mayoría de los casos, esta microdelección es familiar y está asociada a un 50 % de riesgo de recurrencia, sin embargo en algunos casos se trata de una delección *de novo* o es consecuencia de un mosaicismo germinal (mosaicismo en los espermatozoides o en los óvulos) en el padre o en la madre.

Po último, en un 10 % de los pacientes con SA se detecta una mutación en el gen *UBE3A*. La mayoría de mutaciones son *de novo*, sólo un 20 % aproximadamente de las madres llevan la misma mutación.

1.3. Consejo genético

Es muy importante de cara al consejo genético conocer por qué causas se ha producido el SPW o el SA y si se trata de alteraciones *de novo* o heredadas. Para la descendencia, el riesgo de recurrencia de las delecciones de la región 15q11-q13 y de la DUP es menor del 1 %, excepto si éstos se han producido por la presencia de algún reordenamiento cromosómico en alguno de los progenitores, en cuyo caso el riesgo es mayor.

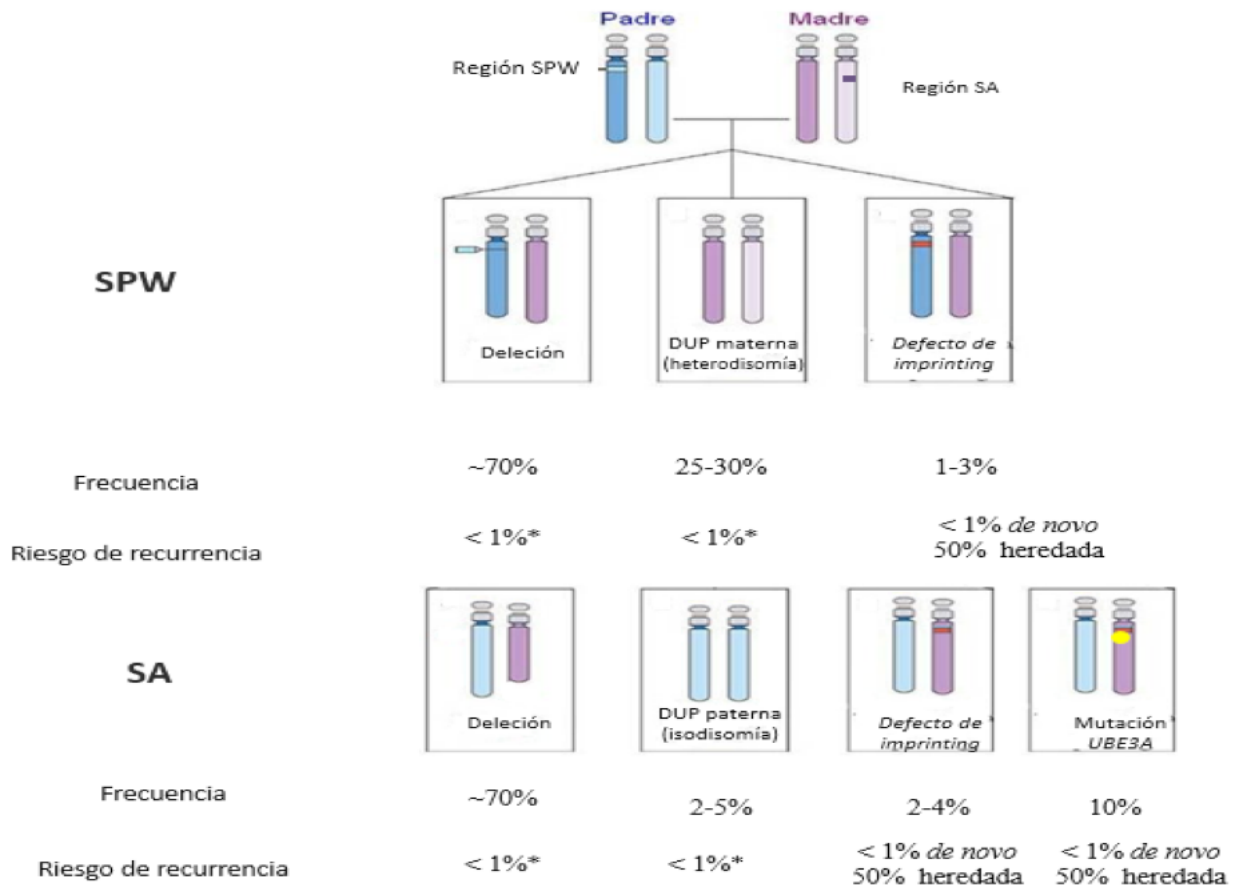


Figura 2: Defectos moleculares en SPW y SA. Se indica la frecuencia y el riesgo de recurrencia en cada caso. * El riesgo de recurrencia para la delección de la región 15q11-q13 y para la DUP es < 1 % sino son consecuencia de la presencia de algún reordenamiento cromosómico en alguno de los progenitores.

Con respecto a las mutaciones que afectan a los centros de *imprinting*, hay que tener en cuenta que la mayoría de las epimutaciones (un 85 %) y que la mitad de las microdelecciones de los centros de *imprinting* se producen *de novo*. En estos casos el riesgo es también mínimo (<1 %).

Sin embargo, para las epimutaciones heredadas o para las microdelecciones familiares el riesgo varía. El riesgo para el progenitor portador sano de una de estas mutaciones de *imprinting* es bien del 50 % de hijos enfermos o bien del 50 % de hijos portadores, según el sexo del progenitor y el origen paterno o materno del cromosoma en el que porta la mutación. Los padres con la mutación en el cromosoma heredado de su madre y las madres con mutación en el cromosoma heredado de su padre tienen un 50 % de riesgo de hijos afectados de SPW en el primer caso y de SA en el segundo. Los padres portadores de la mutación en el cromosoma heredado de su padre y las madres con la mutación en el cromosoma heredado de su madre tienen un 50 % de riesgo de hijos portadores, que podrán transmitir, a su vez, la enfermedad a sus hijos.

1.4. Estrategia diagnóstica.

Aunque el diagnóstico del SPW y del SA depende la disponibilidad de una u otra técnica en el laboratorio, lo recomendable es comenzar con el estudio del patrón de metilación de la región 15q11-q13, que permite detectar deleciones, DUP y defectos de *imprinting*. Las técnicas con mayor sensibilidad para estudiar la metilación de esta región son el test de metilación mediante PCR y la técnica MS-MLPA.

- El test de metilación mediante PCR se basa en la capacidad del ADN para modificar su secuencia de bases cuando se trata con bisulfito. Este tratamiento consigue convertir las citosinas en uracilos, excepto las que se encuentren metiladas, que permanecerán inalteradas. De este modo, variará la secuencia nucleotídica, pudiéndose diferenciar el ADN que se encuentra metilado del que no lo está. Esta diferencia en la secuencia permite realizar mediante PCR amplificaciones específicas para cada alelo. Normalmente, se utilizan cebadores específicos para la región entre el promotor y el exón 1 del gen *SNURF-SNRPN* (Figura 3).

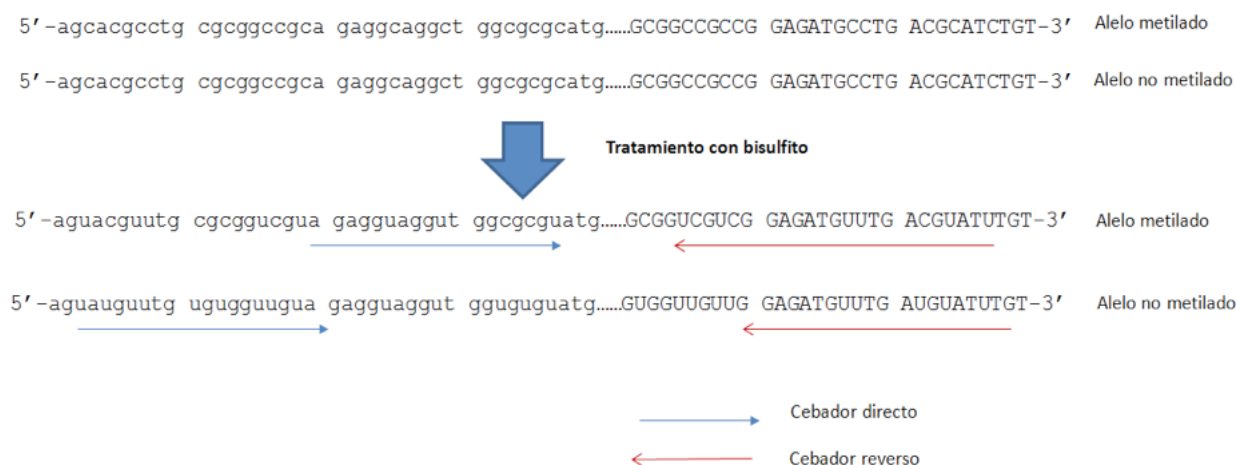


Figura 3: Representación esquemática del tratamiento con bisulfito, en el que las citosinas no metiladas se convierten en uracilos. Los cebadores utilizados en la PCR son específicos de las secuencias modificadas de los alelos materno y paterno de una región del gen *SNURF-SNRPN*, que se encuentra metilada (es decir, silenciada) en el alelo materno y no metilada (activa) en el alelo paterno.

Con este test se puede establecer el diagnóstico clínico de la enfermedad, pero son necesarios estudios adicionales (FISH o análisis de microsatélites) para conocer el mecanismo molecular por el que se produce.

- **MS-MLPA** (*Methylation Specific-Multiple Ligation Probe Amplification*) es una modificación de la técnica de MLPA y permite identificar alteraciones en el número de copias al mismo tiempo que modificaciones en la metilación. Por tanto, en caso de deleciones, DUP o defectos de *imprinting*, también permite establecer el diagnóstico de estos dos síndromes, pero además identifica si la causa es una deleción en la región 15q11-q13. Si se observa

alteración en la metilación pero no hay delección en dicha región, deben realizarse otros estudios para saber si el patrón de metilación alterado se debe a DUP o a una mutación epigenética (el MS-MLPA también detecta delecciones en el centro de *imprinting* de esta región).

El MS-MLPA utiliza sondas que reconocen secuencias específicas de ADN que contienen dianas de restricción para el enzima HhaI sensible a la metilación. Cuando estas sondas se unen a zonas no metiladas del genoma, los híbridos que se generan son digeridos con la enzima de restricción. Las sondas digeridas no podrán ser amplificadas mediante PCR y por tanto, no se observará señal cuando se realice la electroforesis capilar. Por el contrario, si el ADN de la muestra está metilado, los grupos metilo protegen contra la digestión de HhaI y se generará señal en la electroforesis.

La mayoría de laboratorios que realizan esta técnica utilizan el kit de MRC-Holland (SALSA ME028).

- **FISH** (Hibridación *in situ* fluorescente). Esta técnica permite analizar la presencia de delección en la región 15q11-q13 en ambos cromosomas 15, empleando sondas de ADN específicas de dicha región marcadas con fluorocromos. La observación se realiza mediante un microscopio óptico de fluorescencia (se puede consultar un ejemplo de delección detectada mediante FISH en la página http://genetik-praxis.de/leistungen_2.html)

- **Análisis de microsatélites**. Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de nucleótidos de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un número determinado de veces. Se trata de secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos, con un número diferente de repeticiones en cada caso, lo que da lugar a diferencias en la longitud de los alelos del mismo locus.

Su detección se realiza mediante amplificación por PCR de la región que los contiene, empleando cebadores marcados con fluorocromos complementarios a las regiones flanqueantes. Posteriormente, se visualiza la diferencia de tamaño de estos amplicones mediante electroforesis capilar.

El estudio de microsatélites permite diferenciar si el origen de ambos cromosomas es biparental (un cromosoma proviene del padre y el otro de la madre) o provienen del mismo origen parental. En este último caso podemos confirmar que se trata de una DUP y en caso de obtener un resultado que confirme herencia biparental, el diagnóstico será, por exclusión, un defecto en la impronta.

En la Figura 4 se muestra la estrategia diagnóstica a seguir en el SPW y en el SA.

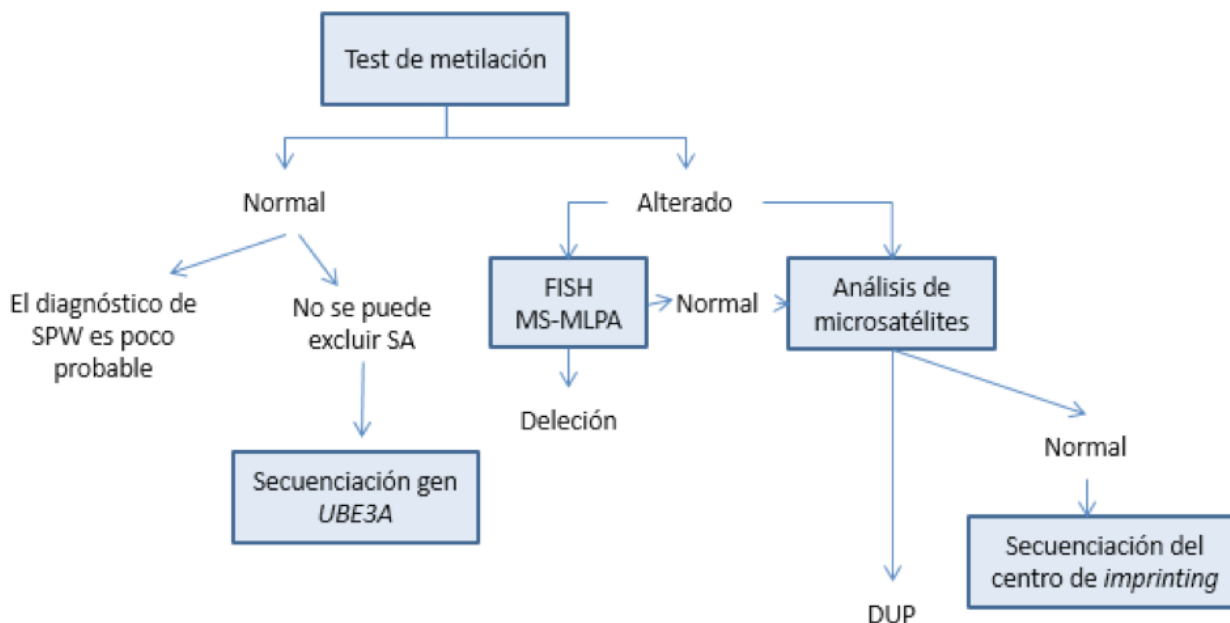


Figura 4: Algoritmo diagnóstico en el SPW y en el SA. En caso de iniciar el estudio de metilación mediante MS-MLPA y observar un patrón alterado, no sería necesario realizar el estudio de deleciones.

RESULTADOS DEL CASO CLÍNICO

Las ecografías no mostraron hallazgos patológicos. El cariotipo convencional y el estudio FISH para la deleción del 22q11 responsable del síndrome de Di George también fueron normales. Los estudios metabólicos no presentaron alteraciones.

Sin embargo, el estudio molecular del SPW mostró un patrón alterado. En gel de agarosa se observó, al realizar el test de metilación mediante PCR, la ausencia del alelo paterno del gen *SNURF-SNRPN*, sólo fue posible amplificar el alelo metilado de dicho gen (Figura 5).

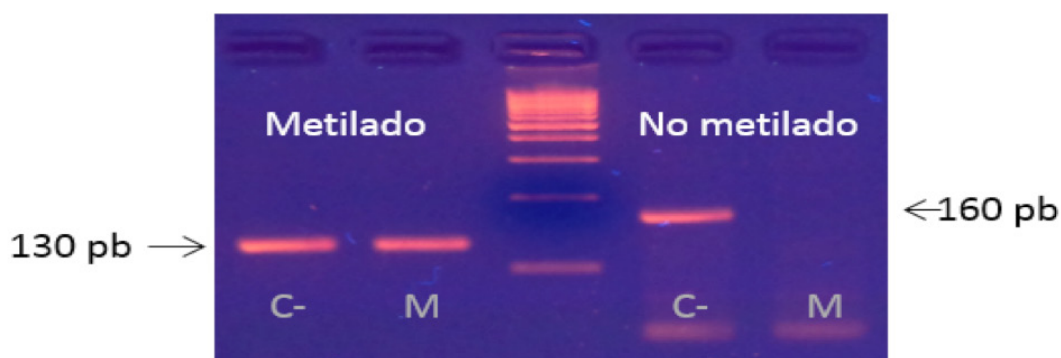


Figura 5: Visualización en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR obtenidos con cebadores específicos de los alelos metilado y no metilados del gen *SNURF-SNRPN*. C-: Control negativo, M: Muestra del caso índice. El fragmento de la cadena metilada tiene un tamaño de 130 pares de bases (pb), mientras que el tamaño de la cadena no metilada es de 160 pb.

Este patrón de metilación anormal era compatible con SPW. Para realizar un consejo genético adecuado, era importante conocer el mecanismo molecular por el que se había producido la falta de contribución paterna en esta región.

Para ello, y dado que en la mayoría de los pacientes con SPW (un 70 % aproximadamente), la ausencia del alelo paterno se debe a una deleción en la región 15q11-q13, se llevó a cabo, siguiendo las instrucciones del fabricante, la técnica MS-MLPA con el kit ME028 (MRC Holland), disponible en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Coffalyser.Net.

Este análisis mediante MS-MLPA consta de dos partes: 1) Test de copias (para detectar la presencia de deleciones) y 2) determinación del patrón de metilación comparando la señal de cada sonda sensible a la metilación antes y después de digerir con la endonucleasa. En individuos sanos, se observa un 50 % de reducción en la señal de estas sondas al añadir la enzima (el alelo paterno no está metilado, y no produce señal, mientras que el alelo materno sí).

En el caso que nos ocupa, se confirmó que había un patrón alterado de metilación en la región 15q11-q13, pero no se detectaron deleciones en dicha región (Figura 6).

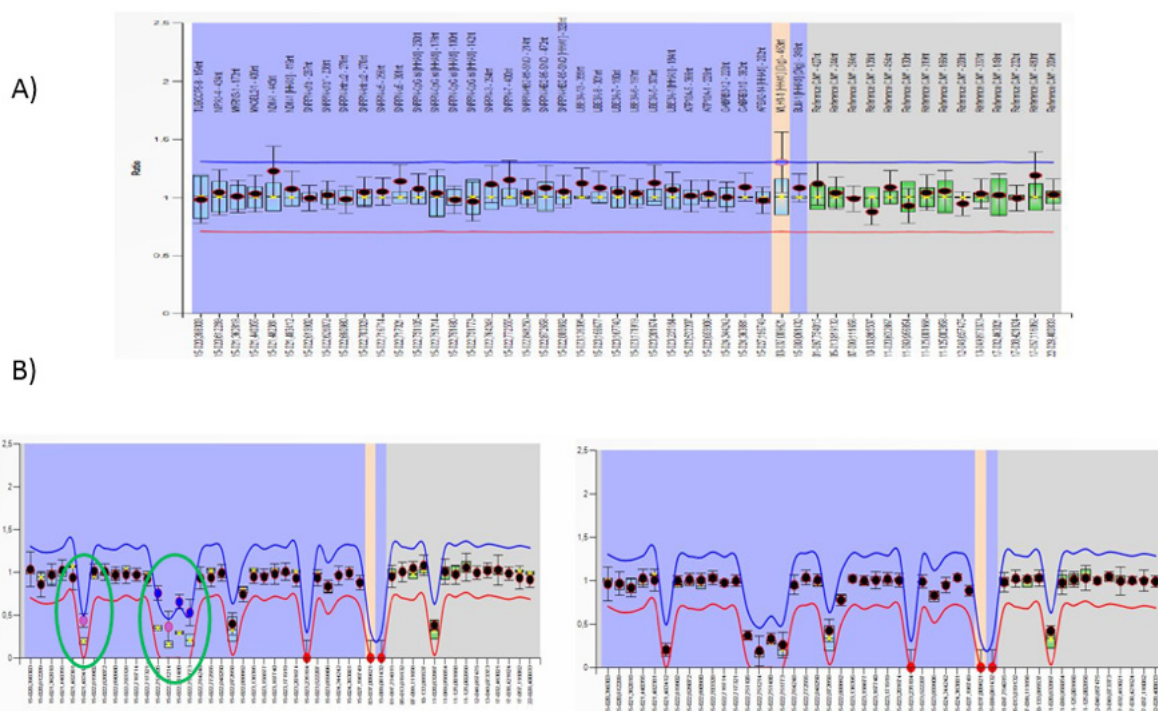
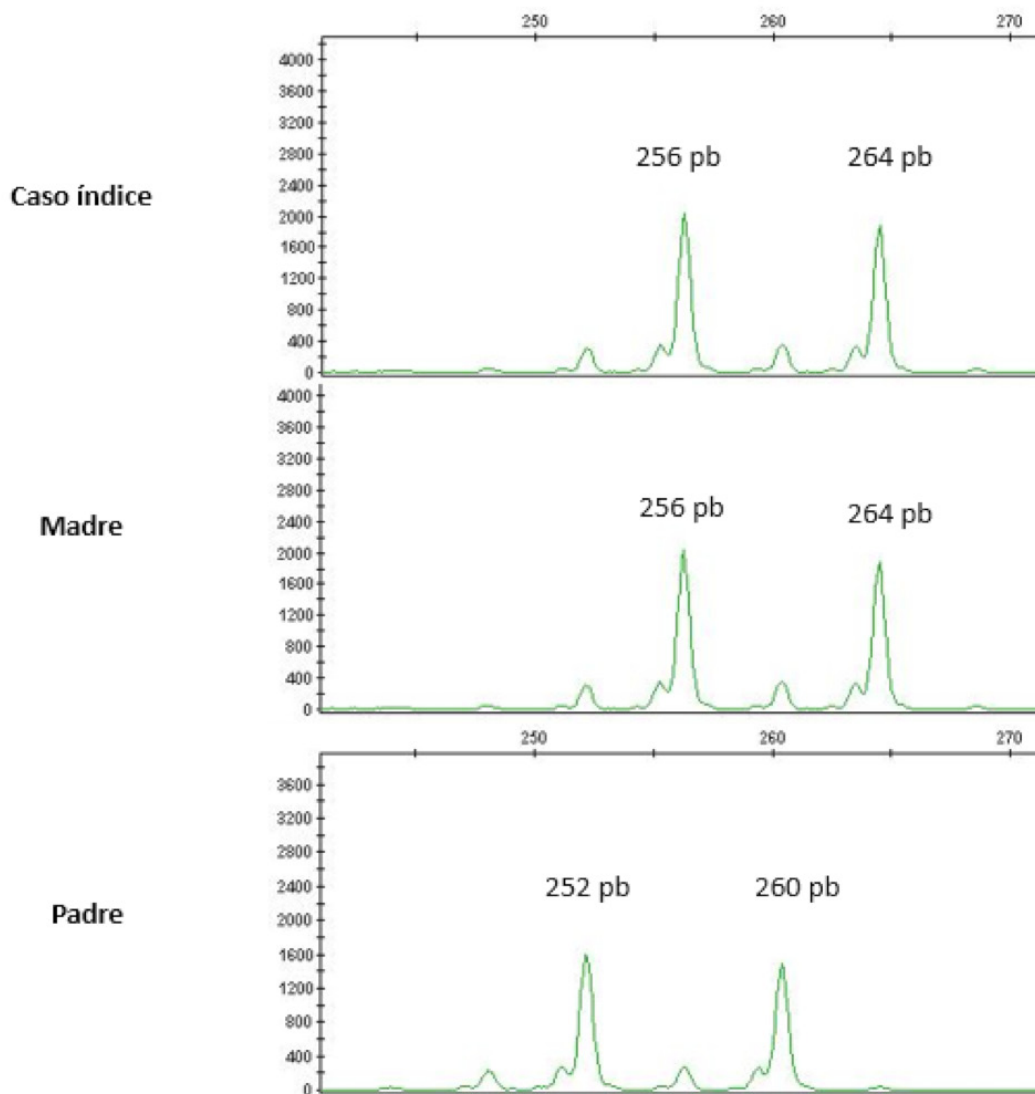


Figura 6: A) Test de copias del MS-MLPA (para detectar la presencia de deleciones). Los resultados de la muestra para cada una de las sondas incluidas en este estudio se indican mediante puntos. Rango normal: línea azul y roja. Los diagramas de caja representan el rango de valores (intervalo de confianza 95%) estimados en función de los resultados de los controles utilizados. B) Estudio del patrón de metilación. Se observa que la señal de las sondas sensibles a la metilación (círculos verdes) disminuye en menor proporción en el paciente (izquierda) que en un individuo sano (derecha). Esto es compatible también con la ausencia de alelo paterno.

Dada la negatividad del estudio de deleciones, se solicitó muestra de los progenitores para continuar con el análisis de microsatélites de la región 15q11-q13. Se amplificaron mediante PCR con cebadores marcados con fluorocromos cinco fragmentos de dicha región que contienen microsatélites, conocidos como TK4, GABRB3, IR4-3R, 196 y D15S128. En la Figura 7 se muestra las pares de bases de los fragmentos amplificados para cada uno de estos marcadores tras realizar la electroforesis capilar. Se observa que en el niño los tamaños de los alelos amplificados para cada uno de los marcadores son iguales que los de la madre.



Marcador analizado	Caso índice	Padre	Madre
TK4	166-171	159-167	166-171
GABRB3	183-196	179-180	183-196
IR4-3R	240-247	242-245	240-247
196	256-264	252-260	256-264
D15S128	190-200	190-204	190-200

Figura 7: Arriba: Imagen obtenida con el software GeneMapper (Applied Biosystems) de la amplificación del microsatélite 196 en el caso índice y en sus padres. Abajo: Resultados del estudio de microsatélites para el resto de marcadores.

Según los resultados obtenidos, la ausencia de alelo paterno en el paciente se debe a que ha heredado los dos cromosomas homólogos de la madre (heterodisomía). La heterodisomía ocurre normalmente *de novo* y el riesgo de recurrencia es inferior al 1 %, excepto si hay alguna translocación robertsoniana en la madre, en cuyo caso, el riesgo es teóricamente mayor. Dado que, según el cariotipo realizado, los dos cromosomas 15 del probando son normales, puede asumirse que la madre no presenta este tipo de translocaciones, y por tanto el riesgo de recurrencia en esta familia es mínimo.

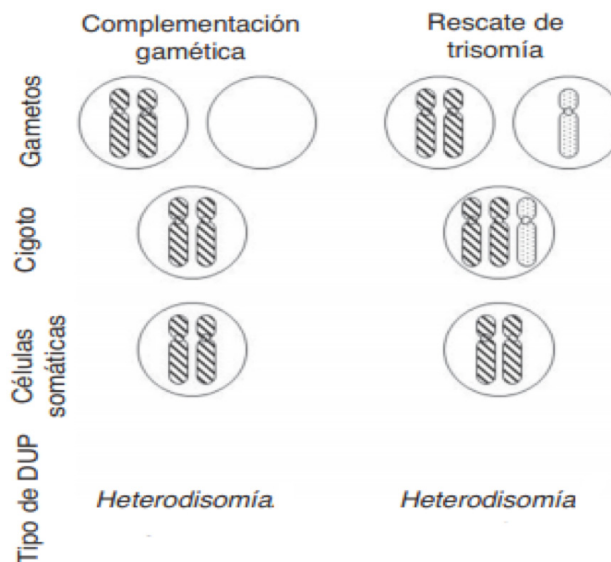


Figura 8: . Mecanismos de formación de heterodisomía de cromosomas enteros: complementación gamética o corrección poscigótica de una trisomía inicial. Modificado de Soler A y cols, Diagn prenatal.201 3; 24 (3):108–116.

RESUMEN

El desarrollo de la genética y de las técnicas de biología molecular ha sido de gran utilidad en la evaluación de neonatos con hipotonía. Hay numerosas enfermedades del recién nacido que pueden presentarse con este signo, por lo que el proceso diagnóstico que hay que realizar para encontrar la etiología es complejo.

El SPW es una causa frecuente de hipotonía neonatal. Se produce por anomalías en los genes improntados del brazo largo del cromosoma 15. El SA, otra enfermedad neurogénica diferente, se produce por una alteración molecular en esa misma región. La diferencia estriba en el origen paterno o materno del material genético alterado o ausente.

Son varias las alteraciones moleculares que pueden producir SPW o SA: deleción *de novo* de esa región (en la mayoría de los casos), DUP, defecto de *imprinting* o mutación en el *UBE3A*, en el caso del SA. En la actualidad, las técnicas de laboratorio de mayor sensibilidad para el diagnóstico de estas patologías son el test de metilación mediante PCR y el MS-MLPA. En la mayoría de los casos, es necesario realizar estudios moleculares adicionales para establecer el mecanismo implicado y para poder realizar un consejo genético adecuado.

REFERENCIAS

Tycko B. DNA methylation in genomic imprinting. *Mutat Res* 1997; 386:131-140.

Lindgren V. Genomic imprinting in disorders of growth. *Endocr Metab Clin North Am* 1996; 25:503-521.

Chamberlain SJ¹, Lalande M. Angelman syndrome, a genomic imprinting disorder of the brain. *J Neurosci.* 2010 Jul 28;30 (30):9958-63.

Clayton-Smith <http://jmg.bmj.com/content/40/2/87.full> - aff-1 J, Laan<http://jmg.bmj.com/content/40/2/87.full> - aff-2 L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* 2003;40:87-95

Buiting K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010 Aug 15;154C(3):365-76.

Buiting K, Groß S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, El-Maarri O, Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndrome: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* 2003, 72:571-577.

Ramsden SC¹, Clayton-Smith J, Birch R, Buiting K. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet.* 2010 May 11;11:70.

Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinnis WJ, Jones KL. Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am J Med Genet.* 1997 Dec 19;73(3):308-13.

Soler A, Sánchez A, Margarit E, Badenas C, Milà M. Diagnóstico prenatal de disomía uniparental . *Diagn prenatal.* 201 3;24(3):108–116

GENÉTICA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS

Josep Oriola Ambrós (*presidente*), Ana M^a Sánchez de Abajo (*coordinadora*), Atocha Romero, Begoña Ezquieta, Carmen Cañadas, Concha Alonso, Cristina Torreira Banzas, Jesús Molano, María Arruebo Muñio, María Santamaría González, Orland Diez, Pilar Carrasco Salas.

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (*Residente*), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, A. Peña (*Residente*), N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà

ISSN 1887-6463 – Octubre 2015 (recibido para publicación Junio 2015).