

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Análisis genómico global en los Síndromes de Sobrecrecimiento: Evaluación de la dosis genómica mediante el uso de *microarrays* personalizados y estudio de genes candidatos mediante el uso de secuenciación masiva de nueva generación

Jair Antonio Tenorio Castaño

Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM)

Madrid, enero 2017

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Análisis genómico global en los Síndromes de Sobrecrecimiento: Evaluación de la dosis genómica mediante el uso de *microarrays* personalizados y estudio de genes candidatos mediante el uso de secuenciación masiva de nueva generación

Jair Antonio Tenorio Castaño
Licenciatura en Biología

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Pablo Lapunzina Badía

Madrid, Enero 2017

Agradecimientos

El trabajo bien hecho tiene detrás el esfuerzo de mucha gente. Por eso, me gustaría aprovechar estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que participaron en mi formación y crecimiento personal y profesional.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis y amigo, el Dr. Pablo Lapunzina porque gracias a él empecé en esto de hacer ciencia. Una de las principales lecciones que he aprendido de él es la forma afrontar los problemas con sencillez y criterio científico, a optimizar el tiempo y a trabajar en equipo. Gracias por enseñarme el valor del trabajo duro, del esfuerzo y la motivación (y por las pipetas para zurdos).

A la Dra. Valeria Romanelli, que me enseñó el mundo de la epigenética, imprinting, sobrecrecimiento y el trabajo de laboratorio. Entre risas e italiano (*Alora...*), me enseñó la organización en el trabajo de laboratorio y a tener una buena actitud frente a cualquier situación. A Peter, porque poner un técnico en tu vida te la facilita, y mucho! Gracias por darme otro punto de vista de tantas cosas y por enseñarme todos esos trucos de laboratorio. Todos los días de estrés, pruebas urgentes, fines de semana trabajando y tantos momentos! Espero que sean muchos (buenos) más. A mis compis y amigas de mi lab, la rubia (Gema), la morena (Irene) y la canaria (Eva). Todas ellas con sus puntos de vista, siempre me aportan cosas buenas, me animan y son mi apoyo en el INGEMM. Gracias por estar siempre ahí chicas! A la rubia y la morena decirles que les espera una carrera científica llena de éxitos y que sigan trabajando duro!. A Evita por dar esa alegría al lab, intercambiar opiniones y ayudarme en la revisión de esta tesis. A todo el resto de compis del INGEMM, que son muchos y (muy) muy buenos y de los que he aprendido millones de cosas: Juli, Luis, Elena, María, Víctor, Javi, Rubén², Vicky, Karen, Ángel, Carol, Alf, Alberta, Ana G, Angela, Kris, Juan Carlos, las chicas de prenatalítica, las secres! Gracias!!! (Seguro que me olvido de alguien, disculpadme). A todos los estudiantes que han pasado por el lab, porque aprendíamos juntos y me enseñaron a valorar la dinámica de las ideas.

También quiero agradecer al grupo colaborador del IIB liderado por el Dr. Víctor Ruiz, el Dr. José A. Caparrós y especialmente la Dra. María Valencia, porque gracias a ellos aprendí a realizar estudios funcionales, entre otras cosas, y porque siempre estuvieron dispuestos a echarme una mano. A la Dra. Elena Mansilla por su colaboración científica en la realización de ensayos funcionales.

A mi familia, pilar fundamental y los responsables de que hoy sea quien soy, gracias por perseguir vuestros sueños y hacerlos extensibles a vuestros hijos, por ser valientes y emigrar para buscar un mejor futuro. Mamá, papá y hermana, gracias por apoyarme siempre, comprenderme y tenerme paciencia.

A mi princesita, la persona que más sufre mi día a día, mis horas de trabajo y mi estrés! Gracias por aguantarme, darme muchos consejos y por ser tan especial, por estar ahí incondicionalmente y por todo.

Resumen

El crecimiento humano es un proceso biológico complejo en el que influyen muchos factores y en el que podemos destacar la herencia (genética) y el ambiente. Por ello, las alteraciones que se producen en el genoma humano pueden dar lugar a la aparición de desórdenes del crecimiento que se pueden manifestar desde la etapa prenatal y/o a lo largo de toda la vida. Estos defectos pueden provocar, entre otras cosas, un crecimiento excesivo generalizado del cuerpo o de algunos órganos específicos, denominándose a este fenómeno sobrecrecimiento. El sobrecrecimiento, puede ser parcial o total e incluir un órgano o varios, además de otras características clínicas específicas. Así pues, la suma de estas características clínicas específicas y diferenciales dará lugar a la descripción de los diferentes síndromes de sobrecrecimiento que se conocen actualmente. Estos síndromes de sobrecrecimiento se pueden clasificar según su etiología y sus características clínicas. Además, existe un grupo de pacientes en los cuales el sobrecrecimiento no se asocia a ninguna entidad nosológica conocida.

La hipótesis de partida es que aquellos pacientes con un sobrecrecimiento no asociado a ninguna entidad conocida, es posible que tengan alteraciones genómicas no conocidas que puedan explicar tanto el sobrecrecimiento como las características clínicas adicionales que presentan.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar pacientes con sobrecrecimiento, sindrómico y no sindrómico, con el fin de caracterizar el defecto molecular y, en aquellos en los que no se encuentre, realizar una búsqueda de genes candidatos mediante el uso de microarrays y secuenciación masiva de nueva generación.

Los resultados que se derivan de este trabajo nos han permitido, por un lado, caracterizar un nuevo síndrome de sobrecrecimiento, tanto a nivel molecular como a nivel clínico, el síndrome de Tenorio. Los pacientes con este síndrome se caracterizan clínicamente por presentar un sobrecrecimiento postnatal, macrocefalia, ventrículos alargados, hipoglucemia, enfermedades inflamatorias, hidrocefalia, y una discapacidad intelectual de moderada a severa. Los estudios moleculares nos permitieron encontrar el gen responsable de este síndrome, el gen *RNF125*. Los estudios funcionales demostraron que la haploinsuficiencia de *RNF125* afecta a la vía de señalización de RIG-I y además, podría estar interaccionando también con la vía de crecimiento PI3K-AKT.

Por otro lado, se han podido estudiar clínica y molecularmente, los síndromes de sobrecrecimiento más frecuentes y publicar reportes en guías clínicas parados de ellos. De uno de estos síndromes, el síndrome de Beckwith-Wiedemann, además se estudió en profundidad la relación entre las características clínicas y moleculares del mismo con la reproducción asistida, un factor que se ha relacionado con el incremento en la frecuencia de aparición de estos síndromes, asociados a desórdenes del imprinting genómico.

En definitiva, en esta tesis se describe un nuevo síndrome de sobrecrecimiento, el Síndrome de Tenorio, causado por mutaciones en un nuevo gen, el *RNF125*. También se describe un nuevo síndrome de microduplicación/microdelección en el cromosoma 19p13.3. Además, se han publicado dos guías clínicas de dos de los síndromes de sobrecrecimiento más frecuentes que no habían sido publicadas hasta la fecha: El Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel y el Síndrome de Beckwith-Wiedemann y se ha estudiado de este último su correlación con la reproducción asistida y la frecuencia de mutaciones en pacientes con tumores de Wilms.

Summary

Human growth is a complex biological process that is influenced by many factors and in which are involve both heredity (genetics) and the environment. Therefore, alterations in the genome may lead to growth disorders which may manifest from prenatal and along lifetime. These defects can cause excessive growth of body or what is known as overgrowth. Overgrowth can be partial or total and include an organ or several and another specific clinical features. Overgrowth syndromes can be classified according to their etiology and according to their clinical characteristics. There is also a group of patients in which overgrowth is not associated with any known disease entity.

The hypothesis is that patients with an overgrowth not associated with any known entity, may have not known genomic alterations that can explain both the overgrowth as additional clinical features they present.

The objective of this work was to study patients with syndromic and non-syndromic overgrowth, in order to characterize the molecular defect, and in those that are not found, search for candidate genes using microarrays and next generation sequencing

The results derived from this work have allowed us on the one hand: characterize a new overgrowth syndrome, both at the molecular level and at the clinical level, the Tenorio

Syndrome. This syndrome is clinically characterized by an overgrowth, macrocephaly, enlarged ventricles, hypoglycemia, inflammatory diseases, hydrocephalus, and mild to moderate intellectual disability. Molecular studies allowed us to find the gene responsible for this syndrome, *RNF125*. Functional studies showed haploinsufficiency of *RNF125* in the signaling pathway of RIG-I and its possible interaction with the growth path PI3K-AKT.

On the other hand, it has been studied clinically and molecularly, the most common overgrowth syndromes and publish in two of them, their clinical guidelines.

This thesis adds a thorough study of overgrowth syndromes, and described for the first time, a genetic syndrome due to mutations in *RNF125*. In addition, two guides have been published of two of the most frequency overgrowth syndromes: Simpson Syndrome Golabi-Behmel and Beckwith-Wiedemann syndrome, which are very helpful for clinical management, diagnosis and follow up of the patients.

Índice

Resumen.....	4
Summary	5
Abreviaturas.....	10
Introducción	12
El crecimiento humano	12
Hemihiperplasia y mosaicismo somático	14
Cáncer y crecimiento.....	16
Síndromes de Sobrecrecimiento	18
Síndrome de Beckwith-Wiedemann	18
Centros de imprinting asociados al síndrome de Beckwith-Wiedemann	22
<i>IGF2</i>	22
Síndrome de Sotos	23
Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel	27
Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba.....	29
Objetivos	32
Materiales, Métodos y Resultados.....	33
Artículo 1. A new overgrowth Syndrome is due to mutations in RNF125	33
Resumen del artículo 1.....	33
Artículo 2. Clinical and Molecular Analyses of Beckwith–Wiedemann Syndrome: Comparison Between Spontaneous Conception and Assisted Reproduction Techniques	63
Resumen del artículo 2.....	63
Artículo 3. Prenatal molecular testing for Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: A challenge for molecular analysis and genetic counseling	83
Resumen del artículo 3.....	83
Artículo 4. A Novel Mutation in CDKN1C in Sibs with Beckwith–Wiedemann Syndrome and Cleft Palate, Sensorineural Hearing Loss, and Supernumerary Flexion Creases.....	94
Resumen del artículo 4.....	94
Artículo 5. Simpson-Golabi-Behmel Syndrome types I and II	102
Resumen del artículo 5.....	102
Artículo 6. PIAS4 is associated with macro/microcephaly in the novel interstitial 19p13.3 microdeletion/microduplication syndrome	112
Resumen del artículo 6.....	112

Artículo 7. Constitutional and somatic methylation status of DMRH19 and KvDMR in Wilms tumor patients	137
Resumen del artículo 7.....	137
Discusión	149
Síndrome de Tenorio: un nuevo síndrome de sobrecrecimiento	149
Síndrome de Beckwith-Wiedemann: fisiopatología y relación con la reproducción asistida.....	157
Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel	161
Estado de la metilación en los locus DMR19H y KvDMR en pacientes con tumores de Wilms.....	163
Regiones asociadas a sobrecrecimiento y discapacidad intelectual.....	164
Conclusiones	166
Bibliografía	168

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BBS	Síndrome de Birk-Barel
CLOVES	Síndrome de CLOVES ("Congenital Lipomatous, Overgrowth, Vascular malformation and Epidermal Nevi and Spinal/Skeletal Anomalies and/or Scoliosis")
CNV	Variación en el número de copias ("Copy Number Variation")
COLS	Colaboradores
DMR	Región diferencialmente metilada ("Differentially Methylated Region")
Hh	Ruta de señalización de "Hedgehog"
HPO	Código de ontología del fenotipo humano ("Human Phenotype Ontology")
HRM	"High Resolution Melting"
IC1	Centro de imprinting 1 del locus 11p15.5 ("Imprinting Center 1")
IC2	Centro de imprinting 2 del locus 11p15.5 ("Imprinting Center 2")
IS	Síndrome IMAGE ("Intrauterine growth restriction, Metaphyseal dysplasia, Adrenal hypoplasia congenita and Genital anomalies")
KOS	Síndrome de Kagami-Ogata
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MCAP	Síndrome de megalencefalia y malformación capilar ("Megalencephaly Capillary Malformation syndrome")
MS-MLPA	Técnica de ligación múltiple específica de metilación ("Methylation-Specific Multiplex Ligation Probe Amplification")
NGS	Secuenciación de nueva generación ("Next Generation Sequencing")
PHP-IB	Pseudohipoparatiroidismo de tipo IB
PPCB2	Síndrome de Pubertad Precoz Central
PROS	Síndromes de sobrecrecimiento asociados a PIK3CA ("PIK3CA Related Overgrowth Syndromes")
PWS	Síndrome de Prader-Willi
RESSC	Registro Español de Síndromes de Sobrecrecimiento
BRRS	Síndrome de Bannayan Riley Ruvalcaba ("Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome")
BWS	Síndrome de Beckwith-Wiedemann ("Beckwith-Wiedemann Syndrome")
SC	Síndrome de Cowden

SHFYNG	Síndrome de Schaaf-Yang ("Schaaf-Yang Syndrome")
SNC	Sistema Nervioso Central
SNPs	Polimorfismo de nucleótido único ("Single Nucleotide Polymorphism")
SNV	Variación de un nucleótido único ("Single Nucleotide Variation")
SPONT	Reproducción espontánea
SRS	Síndrome de Silver-Russell ("Silver-Russell Syndrome")
SGBS	Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel ("Simpson-Golabi-Behmel Syndrome")
SSo	Síndrome de Sotos
STRs	Repeticiones cortas en tándem ("Short Tandem Repeats")
TLR	Receptor de tipo Toll ("Toll-Like Receptor")
TNDM	Diabetes mellitus transitoria neonatal ("Transient Neonatal Diabetes Mellitus")
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
TS	Síndrome de Temple ("Temple Syndrome")
UIM	Motivo de interacción ubiquitina ("Ubiquitin Interacting Motif")
UPD	Disomía Uniparental Paterna ("Uniparental Disomy")
WAGR	"Wilms, Aniridia, Genitourinary congenital anomalies, Retarded development"

Introducción

El crecimiento humano

El crecimiento humano es un proceso biológico que comienza desde el momento en que se produce la fecundación hasta el punto en el que el cuerpo alcanza el desarrollo físico completo. Este crecimiento incluye una serie de procesos complejos que van a depender, entre otros factores, de la genética de los padres, que es lo que se conoce como la herencia, así como por factores ambientales o modificadores del fenotipo.

Este proceso de crecimiento fetal incluye numerosas rutas moleculares en las que participan más de un centenar de proteínas, cada una de ellas codificadas por un gen específico. Cuando se produce una alteración en la secuencia de estos genes, tanto a nivel genético como epigenético, si ésta es lo suficientemente fuerte, se producirá una alteración del desarrollo. De entre las posibles consecuencias de este fenómeno, se puede producir un crecimiento acelerado del cuerpo, lo que se conoce como sobrecrecimiento. En el sobrecrecimiento el peso, la talla, el perímetro cefálico, o una combinación de las mismas, tienen valores superiores a lo que cabría esperar para la edad gestacional y sexo calculado en la población de estudio. Este sobrecrecimiento se puede mantener después del nacimiento del feto e incluso a lo largo de la vida y, además, puede llevar asociadas otras características clínicas, principalmente relacionadas con este sobrecrecimiento. Este conjunto de características clínicas específicas es lo que se conoce como síndromes de sobrecrecimiento, que incluye todos aquellos síndromes en los que se produce un crecimiento acelerado y es reconocible y distinguible clínicamente de otros síndromes de sobrecrecimiento. En la tabla 1 de la página siguiente se presenta una clasificación en función de la frecuencia y del tipo de crecimiento que se produzca (generalizado o parcial) que se han descrito hasta la fecha. Además, en la mayoría de los síndromes de sobrecrecimiento se aprecian características faciales dismórficas (Figura 1), aunque en muchos casos existe un elevado solapamiento clínico de estas características entre diferentes síndromes, lo que hace fundamental un abordaje multidisciplinar que incluya un diagnóstico genético que permita la confirmación del diagnóstico clínico inicial o por el contrario, sugiera un diagnóstico diferencial.

Tabla 1. Clasificación actualizada de los Síndromes de Sobrecrecimiento.

<p>1. Síndromes de sobrecrecimiento verdaderos</p> <p><u>1.1. Síndromes de Sobrecrecimiento frecuentes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Bannayan-Riley Rubalcaba – Beckwith-Wiedemann – Perlman – Simpson-Golabi-Behmel – Sotos <p><u>1.2 Síndromes de Sobrecrecimiento infrecuentes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Cantú – Costello – Displasia epifisaria hemimélica – Elejalde – Enamel-Renal – Esclerosteosis 1 – Fryer – Macrocefalia-Malformación capilar – Malan (Sotos tipo 2) – Marshal-Smith – MOMO – Mutaciones en la familia de genes PP2A – Mutaciones en MTOR – Neurofibromatosis tipo I – Richieri-Costa – Síndrome 15q26 – Síndrome de delección 17q11.2, 1.4-Mb – Síndrome de microdelección 19p13.13 – Sobrecrecimiento no sindrómico (con/sin DI) – Tatton-Brown-Rahman – Tenorio – Weaver <p><u>2. Síndromes de sobrecrecimiento parciales</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> – CLAPO – CLOVES – Hemihiperplasia – Klippel-Trenaunay-Weber – Proteus <p><u>3. Otros</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Diabetes materna infantil – Gigantismo y acromegalia (mutaciones en GPR101) – Hiperplasia congénita adrenal – Hipoglicemia hipoinsulémica con hemihipertrofia – Homocistinuria – Klinefelter, 47,XXY and 47,XYY – Macrocefalia, macrosomia y dismorfismo facial (RNF135) – Marfan – Pallister-Kilian – Sobrecrecimiento, remodelado metafiseal y displasia espondilar – Talla alta idiopática – X-Frágil
---	--



Figura 1. Apariencia facial de los síndromes de sobrecrecimiento. *Gestalt* de 28 síndromes con sobrecrecimiento en los que se aprecian tipologías faciales dismórficas características de cada uno, aunque existe un elevado solapamiento entre algunos de ellos (p.e. síndrome de Sotos versus síndrome de Weaver). Se incluyen también aquellos síndromes de microduplicación/microdelección en los que se aprecian características faciales dismórficas además del sobrecrecimiento (1-12).

Hemihiperplasia y mosaicismo somático

El sobrecrecimiento parcial o desproporcionado puede estar causado por un aumento en el número de células del tejido afectado o un aumento del tamaño de las mismas, lo que se conoce como hemihiperplasia o hemihipertrofia, respectivamente. Durante muchos años el término hemihipertrofia se utilizó de manera errónea debido a que lo que se está produciendo realmente es un aumento en el número de células (hemihiperplasia) y no en el tamaño de las mismas, como demostraron varios estudios (13, 14). La hemihiperplasia puede ser patente en un órgano (p.e. hemihiperplasia hemifacial) e incluso puede incluir la mitad del cuerpo

pudiendo ser ipsilateral (incluye órganos de la misma región del cuerpo) o contralateral (incluye lados opuestos).

Como se ha indicado, esta hemihiperplasia puede afectar distintas partes del cuerpo, por lo que en 1998 el grupo de Hoyme y col. (15) decidieron clasificar la hemihiperplasia en compleja, si la afección incluía la mitad del cuerpo incluyendo al menos una extremidad superior e inferior (ipsilateral o contralateral), o simple, si sólo afecta a una extremidad.

La hemihiperplasia puede encontrarse de manera aislada o en conjunción con otras características clínicas propias de varios síndromes de sobrecrecimiento, tales como el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Proteus, el síndrome de Sotos, síndrome de Klippel-Trenaunay, síndrome de McCune-Albright, Nevus Epidérmico, síndrome de Langer-Giedon, exostosis múltiple, síndrome de Maffucci y la osteocondromatosis.

Hasta el momento se desconoce la causa subyacente de la hemihiperplasia aislada, cuya incidencia se ha estimado en 1:86.000 y cuyos pacientes, además, presentan un incremento del riesgo de tumores, principalmente el tumor de Wilms (16). Esta mayor frecuencia de tumores de Wilms relacionados con la hemihiperplasia, claramente refleja una vez más la estrecha relación entre la aparición de neoplasias y el desarrollo de anomalías del crecimiento causados por alteraciones en las mismas rutas moleculares. Es posible, por tanto, que el mecanismo desconocido hasta la fecha por el que un paciente desarrolla una hemihiperplasia pueda estar ligado a la alteración de alguno de los genes implicados en la regulación de vías de crecimiento celular (p.e. protooncogenes, factores de transcripción, reguladores de la expresión, ubiquitinación, etc...).

El mosaicismo somático se refiere al fenómeno por el que una célula no germinal desarrolla una mutación que produce una alteración en el funcionamiento de esa célula, cuya división clonal generará un grupo de células con esa alteración, pudiendo manifestar un fenotipo asociado en la región donde se localiza el mosaico de células con una variante determinada. Esto ocurre con mucha frecuencia en cáncer, en el cual el tejido afectado presenta mutaciones somáticas que alterarán muchos de los procesos biológicos en los que está implicado ese tejido. Muchos de los tejidos afectados presentan más de un tipo de variante (o clones) con mutaciones diferentes, lo que explica la elevada variabilidad fenotípica y respuesta a los tratamientos en el mismo tipo de cáncer en dos individuos diferentes.

En el caso del crecimiento desproporcionado, se sabe que muchos síndromes que afectan al este crecimiento de manera parcial o totalmente, están causados por mutaciones

somáticas que se detectan en los tejidos afectados pero que por el contrario, no están presentes de manera constitutiva en todo el cuerpo. Este el caso de síndromes tales como el Síndrome de CLOVES, MCAP, Proteus y Klippel-Trenaunay-Weber. Este grupo de patologías manifiestan, entre otras cosas, alteraciones localizadas en órganos específicos en forma de mosaicismo somático. Uno de los genes relacionados con el desarrollo de estas patologías es el gen *PIK3CA*, cuyas mutaciones somáticas están relacionadas con la aparición de síndromes como CLOVES o MCAP, cuyas características clínicas son muy similares, incluyendo ambos sobrecrecimiento, macrocefalia y anomalías vasculares como principales rasgos distintivos. Recientemente, un grupo de trabajo en mosaicismo somático decidió acuñar el término de *PROS* ("*PIK3CA Related Overgrowth Syndromes*") (17) para designar a todos aquellos síndromes con sobrecrecimiento causados por mutaciones somáticas en el gen *PIK3CA*.

Cáncer y crecimiento

Existe una estrecha vinculación entre las vías de señalización relacionadas con cáncer, desarrollo y crecimiento humano, quedando patente la implicación de mutaciones somáticas en diferentes tipos de cáncer y cuyas mutaciones germinales en esos mismos genes pueden causar un crecimiento constitucional excesivo aislado o el desarrollo de un síndrome de sobrecrecimiento (18). Entre otras características, muchos de estos síndromes de sobrecrecimiento presentan una frecuencia mayor de desarrollo de tumores respecto a la población general, siendo un factor muy importante a tener en cuenta durante el manejo y seguimiento de este grupo de pacientes. Además, este es uno de los factores fundamentales que determinan la supervivencia de los pacientes que padecen algún tipo de sobrecrecimiento. Un ejemplo de la elevada frecuencia de aparición de tumores en síndromes de sobrecrecimiento es el síndrome de Perlman, cuyos pacientes tienen un 32% de frecuencia de desarrollo de tumores de Wilms (19) comparado con el 6% aproximadamente del total de tumores pediátricos esporádicos (20, 21).

Otro de los síndromes de sobrecrecimiento en el que los pacientes desarrollan tumores de Wilms es el síndrome de Beckwith-Wiedemann, pero en este caso el porcentaje es menor, aproximadamente entre un 5 y un 7% del total y, además, desarrollan otros tipos de tumores tales como hepatoblastoma, rhabdomiocarcinoma y neuroblastoma, siendo uno de los factores más importantes de supervivencia a tener en cuenta durante el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes (22-27). Esta alta frecuencia de desarrollo de tumores se reduce exponencialmente a medida que el sujeto crece, por lo que la etapa crucial de

seguimiento y control es la infancia, principalmente en los 4 primeros años de vida, en los que aparecen más del 90% de los tumores descritos en estos pacientes (23, 24).

En el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel que, además de los tumores de Wilms y hepatoblastoma, se han descrito pacientes con neuroblastoma adrenal, gonadoblastoma y carcinoma hepatocelular. En un caso de un paciente con SGBS y hepatoblastoma se describió una mutación somática en un gen implicado en control de la proliferación celular (*CTNNB1*) además de una mutación en el gen canónico del síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (*GPC3*).

En el síndrome de sotos también ocurre este fenómeno, en el cual los pacientes, con una frecuencia menor, también pueden desarrollar tumores en la edad infantil, aunque en este caso los más frecuentes son extra-abdominales, principalmente linfo-hematológicos e incluso pueden desarrollar tumores en la edad adulta a diferencia de otros síndromes de sobrecrecimiento (28).

Una de las rutas moleculares más estudiadas en el cáncer es la vía de PI3K/AKT, ya que muchos tumores presentan alteraciones, tanto somáticas como constitucionales, en alguno de los miembros de esta ruta. Algunos ejemplos de cánceres relacionados con alteraciones moleculares en la vía de PI3K/AKT son: leucemia mieloide aguda (LMA), cáncer de colon, glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer gástrico, carcinoma pancreático, cáncer de pulmón, entre otros (29-34). En esta vía participan muchas proteínas cuya haploinsuficiencia a nivel constitutivo está relacionada con la aparición de fenómenos de crecimiento anormal, tales como: los síndromes con hamartoma asociados a *PTEN* (síndrome de Cowden, síndrome de Bannayan-Riley Ruvalcaba, síndrome de Proteus asociado a *PTEN* y síndrome de Proteus-Like), síndrome de CLOVES o Macrocefalia-Malformación capilar asociado a alteraciones en *PIK3CA*, *PIK3R2* y *AKT3*, hemihiperplasia asociada a hipoglucemia por mutaciones en *AKT2*, síndrome de Tenorio causado por alteraciones en el gen *RNF125* (sin neoplasia), esclerosis tuberosa tipo I y II causada por alteraciones en *TCS1* y *TCS2*, respectivamente, mutaciones en *KRAS* asociadas al Síndrome cardiofaceocutáneo y de Noonan, mutaciones en *HRAS* relacionadas con el síndrome de Costello y mutaciones en *NF1* asociada a neurofibromatosis tipo I. La mayoría de estos síndromes cursan con neoplasias en diferentes órganos e incluso en todo el cuerpo, lo que pone de manifiesto que la desregulación de esta ruta molecular, tanto a nivel somático como constitucional, puede conducir al desarrollo de cáncer con una frecuencia más elevada que la de la población general.

Síndromes de Sobrecrecimiento

Los Síndromes de sobrecrecimiento son un grupo de enfermedades caracterizadas por un aumento excesivo del crecimiento, tanto a nivel prenatal como postnatal e incluso a lo largo de la vida (14). Como se ha mencionado anteriormente, este crecimiento puede ser generalizado o localizado, e incluso puede afectar a una mitad del cuerpo, lo que se conoce como hemihiperplasia. Este crecimiento excesivo está causado por una proliferación excesiva de las células de los tejidos asociados (hiperplasia), a diferencia de lo que se pensaba hasta hace poco tiempo, que estaba causado por una hipertrofia de las células de los órganos afectados. Además, estos síndromes suelen llevar asociadas otras características clínicas que serán las que nos permitan inferir clínicamente el tipo de síndrome de sobrecrecimiento y diferenciarlos entre sí. Normalmente, los parámetros que se utilizan para inferir este sobrecrecimiento son el peso, la talla y el perímetro cefálico, que se ha estimado que en este grupo de paciente está por encima del percentil 97 de crecimiento o con una desviación estándar de +2 respecto a la población general para edad y sexo (35-37).

Estos síndromes tienen una base genética específica para cada uno de ellos, mecanismos de acción que son distintos, características clínicas específicas, y un manejo clínico diferencial. Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 38 entidades en las que el crecimiento excesivo forma parte de sus características clínicas. Éstas, aparecen clasificadas y nombradas en la Tabla 1. En ella, se clasificaron los síndromes de sobrecrecimiento según su frecuencia de aparición y si afectan o no a todo el cuerpo. A su vez, los sobrecrecimientos denominados verdaderos, se subdividieron en frecuentes e infrecuentes según el número de casos descritos hasta la fecha.

A continuación se van a describir brevemente los aspectos clínicos y moleculares de aquellos síndromes de sobrecrecimiento más frecuentes, clasificados dentro de la Tabla 1 en el grupo 1.1.

Síndrome de Beckwith-Wiedemann

El síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (MIM #130650) es un síndrome genético de sobrecrecimiento caracterizado principalmente por un crecimiento prenatal excesivo o macrosomía, polihidramnios y un crecimiento postnatal acelerado durante la infancia temprana (23, 38). Además de estas características, también pueden presentar onfalocelo, macroglosia, anomalías en el lóbulo de las orejas y una frecuencia mayor de desarrollar

tumores respecto a la población general, ya que en ésta, el riesgo de desarrollar tumores es de aproximadamente 1:15.000 niños y en el BWS es, globalmente, de entre un 3-5% (39). Se ha descrito que, aproximadamente, el 50% de los pacientes con BWS nacen de forma prematura (40-42). La prevalencia de esta enfermedad se ha estimado en aproximadamente 1:14.000 individuos (41, 43-45). Todas las características clínicas que se manifiestan en el BWS aparecen detalladas en la Tabla 2 según su frecuencia de aparición. Además, se incluye el código de codificación de características clínicas conocido como HPO (*“Human Phenotype Ontology”*) creado en el Hospital Charité de Berlín. Muchos grupos han sugerido los criterios diagnósticos del BWS aunque no hay un consenso actual respecto a los mismos.

Las anomalías del crecimiento, tales como la macroglosia y la macrosomia, suelen estar presentes desde el nacimiento, aunque existen casos de aparición más tardía. Existen pacientes que manifiestan hemihiperplasia. Las alteraciones metabólicas incluyen la hipoglucemia neonatal, que aparece con una frecuencia bastante alta, siendo normalmente, leves y transitorias, pero que en algunos casos puede prolongarse en el tiempo (46, 47) haciendo necesario el tratamiento para su normalización por las posibles implicaciones neurológicas que podría tener en el desarrollo del neonato. Además de la hipoglucemia, otros defectos metabólicos que pueden aparecer incluyen el hipotiroidismo, hiperlipidemia/hipercolesterolemia, policitemia, hipercalciuria y nefrocalcinosis (41, 48-50). En cuanto a las anomalías estructurales, además del onfalocele, se puede observar hernia umbilical y diástasis de rectos con diferente frecuencia (Tabla 2).

Existen también casos aislados de cardiomegalia e incluso algunos casos de cardiomiopatía. Las anomalías renales incluyen displasia medular, sistema colector duplicado, nefrocalcinosis, nefrolitiasis, riñón esponjoso medular, quistes y nefromegalia. Otras características menos frecuentes y con una clara correlación genotipo-fenotipo son las alteraciones de la fosa cerebral y paladar hendido (51, 52). Las características fenotípicas menos frecuentes incluyen: prominencia de la metópica, fontanela grande, occipucio prominente, cara algo tosca, pliegues y surcos en las orejas, indentaciones posteriores del hélix de la oreja, ojos prominentes, hepatomegalia, hiperplasia pancreática, genitales externos grandes, criptorquidia, edad ósea avanzada, displasia medular renal, malformación de Dandy Walker y citomegalia adrenocortical(25), entre otros.

En el BWS, uno de los mayores riesgos para la supervivencia es el desarrollo de tumores, siendo los más frecuentes el tumor de Wilms (3%), hepatoblastoma (1,6%), neuroblastoma (1,3%), carcinoma adrenocortical (<1%) y, en menor medida, el

rabdomiosarcoma (0,3%) y otros tumores tanto benignos como malignos (43). Este riesgo de desarrollo de tumores es mayor en los primeros años de vida, aproximadamente hasta los ocho años, después el porcentaje se reduce drásticamente.

Tabla 2. Clasificación de las características clínicas observadas en el Síndrome de Beckwith-Wiedemann según su frecuencia de aparición

Muy Frecuentes	Poco frecuentes
HP:0001520 Macrosomía HP:0011039 Pliegues en lóbulos de la oreja HP:0009908 Fosetas en hélix posterior HP:0000158 Macroglosia HP:0001539 Onfalocele HP:0001537 Hernia umbilical HP:0008947 Hipotonía HP:0001548 Hipercrecimiento en la infancia HP:0000105 Nefromegalia HP:0001433 Hepatoesplenomegalia HP:0001528 Hemihiperplasia HP:0001998 Hipoglucemia	HP:0001540 Diástasis de rectos HP:0001999 Facies característica HP:0001762 Pie equinovaro HP:0000639 Nistagmo y estrabismo HP:0002898 Tumores embrionarios HP:0007018 Déficit de atención con hiperactividad
Frecuentes	Ocasionales
HP:0008186 Citomegalia adrenocortical HP:0001561 Polihidramnios HP:0005616 Edad ósea avanzada HP:0006337 Erupción prematura de los dientes HP:0001622 Prematuridad HP:0005306 Malformación capilar (hemangioma plano)	HP:0002538 Malformación anatómica cerebral HP:0002373 Convulsiones HP:0001249 Retraso mental leve/Fracaso escolar HP:0002650 Escoliosis HP:0001638 Cardiopatía congénita o arritmias HP:0008255 Diabetes o prediabetes

Genéticamente, el BWS se caracteriza por alteraciones complejas: mecanismos epigenéticos que alteran el *imprinting*, pequeñas deleciones y duplicaciones, mutaciones puntuales en genes de la región 11p, disomía uniparental, traslocación y reordenamientos cromosómicos. Principalmente, las alteraciones que incluyen alguno de los genes localizados en la región 11p15 son los que van a dar lugar a un fenotipo de BWS. Los genes responsables de BWS localizados en esta región son: *IGF2*, *H19*, *CDKN1C*, *KCNQ1* y *KCNQ1OT1*. Estos genes se localizan en dos regiones o dominios, una telomérica (*H19* e *IGF2*) y una centromérica (*CDKN1C*, *KCNQ1* y *KCNQ1OT1*), cuya expresión está regulada mediante un mecanismo conocido como *imprinting* genómico, que regula la expresión de los genes mediante modificaciones químicas de grupos metilo (CH₃) que bloquearán/activarán la expresión de estos genes según la herencia parental del alelo. Así pues, se puede definir el *imprinting* genómico como el fenómeno por el cual, sin alterar la secuencia de ADN, se regula la expresión génica mediante la adición de grupos metilo (-CH₃) a los residuos de citosina que

están formados por dinucleótidos citosina-guanina (CpG). Estos dinucleótidos están localizados normalmente en regiones específicas del genoma, y mayoritariamente asociados a los promotores de genes formando grupos de dinucleótidos CpG o lo que se conoce como “islas CpG”. Este proceso de establecimiento de las marcas de la imprinting genómico empieza en la formación de los gametos masculinos y femeninos, para luego mantenerse sin cambios a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal. Esto quiere decir que habrá genes inactivos en un alelo pero activos en el otro alelo, según su herencia parental, implicando que, una alteración en la regulación de este patrón de metilación provocará alteraciones en la expresión génica que potencialmente podrían tener un efecto sobre el desarrollo y fenotipo de una persona.

También se ha visto una mayor frecuencia de aparición del BWS en aquellos pacientes que nacen gracias a técnicas de reproducción asistida (40, 53-56). A partir del año 2003 se empezaron a publicar los primeros trabajos estableciendo esta relación y posteriormente se han publicado muchos estudios tratando de elucidar el mecanismo por el cual se produce esta alteración epigenética que conlleva al aumento de estas enfermedades de *imprinting*, estableciéndose varias las teorías que explicarían este fenómeno.

Además del BWS existen otras 11 enfermedades cuya base genética se comporta de la misma manera a como ocurre en BWS (57) mediante *imprinting* genómico, por lo que a este grupo de enfermedades causadas por alteraciones epigenéticas o de *imprinting* se les conoce como enfermedades de *imprinting* genómico. Así pues, a este grupo de enfermedades pertenecen los siguientes síndromes: Prader-Willi (15q11-13) (PWS, MIM# 176270), Schaaf-Yang (SHFYNG) (15q11.2, MIM# 615547), Angelman (15q11-13) (AS, MIM# 105830), Silver-Russell (11p15) (SRS, MIM# 180860), Temple (14q32) (Síndrome UPD14 materna) (TS, MIM# 616222), Kagami-Ogata (14q32) (Síndrome UPD14 paterna) (KOS, MIM# 608149), UPD materna del cromosoma 20, pubertad precoz central (15q11) (PPCB2, MIM# 615346), Birk Barel (8q24) (BBS, MIM# 612292), IMAGE (11p15) (IS, MIM# 614732) y desórdenes tales como la diabetes transitoria neonatal (6q24) (TNDM, MIM# 601410), pseudohipoparatiroidismo tipo Ib (20q13) (PHP-IB, MIM# 603233) y mola hidatiforme recurrente familiar (19q13.4) (MHR, MIM#231090) (58, 59). Este grupo de enfermedades afectan principalmente al crecimiento, desarrollo y metabolismo con un alto impacto sobre la calidad de vida de los pacientes (60). A nivel molecular, las enfermedades de *imprinting* pueden estar causadas por varios mecanismos: mutación genética, variaciones/mutaciones epigenéticas, delección o duplicación cromosómica y disomía uniparental (UDP).

Centros de imprinting asociados al síndrome de Beckwith-Wiedemann

Como hemos comentado, la principal causa molecular asociada al BWS se debe a alteraciones en la regulación de la expresión de genes que se localizan en la región 11p15. En esta región se localizan dos dominios específicos, en los que se regula la expresión génica de manera diferencial según el alelo. Estos dos dominios reciben el nombre de H19/IGF2-IG-DMR o centro de *imprinting* 1 y KCNQ1OT1-TSS-DMR o centro de *imprinting* 2. En la Figura 1 del artículo 2 se describe de manera esquemática la organización de estos centros de *imprinting* de regulación epigenética y a continuación se detallará más cada uno de los mismos.

Centro de imprinting 1 o H19/IGF- IG-DMR

En el centro de *imprinting* 1 (IC1), también se conoce como centro de *imprinting* paterno ya que la metilación se localiza en el alelo paterno impidiendo la unión del promotor de la expresión de *H19*, por lo que este gen no se expresará y si se expresará *IGF2*. En el alelo materno, al no estar metilado, el promotor es capaz de unirse al activador, activando la expresión de *H19* y reprimiendo la expresión de *IGF2*.

IGF2

El gen *IGF2* (“*Insulin-like Growth Factor 2*”) codifica un factor de crecimiento fetal que está involucrado tanto en el crecimiento, como en el desarrollo fetal. Parece que está influenciado por el lactógeno placentario y posee actividad osteogénica, ya que induce la actividad mitótica de los osteoblastos a través de la fosfoactivación de *MAPK1* y *MAPK2*. Se expresa únicamente en el alelo paterno y su patrón de expresión coincide con los tejidos afectados en el BWS (61).

H19

Este gen codifica un RNA no codificante que parece actuar como supresor tumoral, cuyas mutaciones parecen relacionadas, además de con el desarrollo de BWS, con el desarrollo de los tumores de Wilms característicos de este síndrome. *H19* se expresa únicamente en el alelo materno debido a que es el alelo que no está metilado.

Centro de imprinting 2 o KCNQ1OT1-TSS-DMR

En el centro de *imprinting* 2 se localizan tres genes: *CDKN1C*, *KCNQ1* y *KCNQ1OT1*, los dos primeros se expresan en el alelo materno, siendo *KCNQ1OT1* el único de expresión paterna.

CDKN1C

Este gen codifica una proteína denominada p57^{kip2} que pertenece a la familia de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, cuya función es la de regular negativamente la proliferación celular a través de la inhibición del complejo ciclina G1/Cdk. Las mutaciones en este gen también se correlacionan con la aparición de cánceres esporádicos en el BWS por lo que se cree que actúa también como supresor tumoral.

KCNQ1

El gen *KCNQ1* codifica un canal de potasio dependiente de voltaje implicado en la repolarización del potencial de acción cardiaco, por lo que sus mutaciones se relacionan con cardiopatías tales como el síndrome de QT largo, síndrome de Jervell y Lange-Nielsen y la fibrilación auricular.

KCNQ1OT1

Este gen codifica un RNA mensajero no codificante, cuya función parece ser la de regular la expresión de otros genes a través de modificaciones epigenéticas. Se transcribe en anti-sentido respecto a *KCNQ1*.

Síndrome de Sotos

El Síndrome de Sotos (SSo) es otro de los síndromes de sobrecrecimiento más frecuentes. Fue descrito inicialmente en el año 1964 por el doctor Juan Sotos (62) como un gigantismo cerebral con acromegalia y desórdenes neurológicos. Actualmente se caracteriza principalmente por un sobrecrecimiento prenatal y postnatal, talla alta, edad ósea avanzada, facies características y retraso en el desarrollo (63). Se ha estimado una prevalencia de esta enfermedad de aproximadamente 1:15.000 a 1:20.000 nacimientos (28, 64, 65). Otras características menos frecuentes que también pueden aparecer son: anomalías craneales, ictericia neonatal, hipotonía neonatal, convulsiones, escoliosis, anomalías renales y/o cardíacas, preeclamsia materna y pies planos.

El desarrollo de tumores en esta enfermedad es casi anecdótico y en estudios que se han hecho en grandes cohortes de pacientes que han sido caracterizados molecularmente no se ha visto una gran incidencia de tumores, encontrándose raramente la aparición de tumores de Wilms (66, 67).

Se identificó el gen *NSD1* como el responsable, cuya haploinsuficiencia causa la aparición de este síndrome(68). El gen *NSD1* (“*Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1*”) codifica una proteína nuclear que se une al receptor andrógeno y parece que actúa como un factor de regulación transcripcional a través de la modificación de residuos de lisina metilados de las histonas, aunque no se conoce muy bien su mecanismo de actuación. Posee múltiples dominios funcionales incluyendo dos dominios de interacción con receptores nucleares (NID^{+L} y NID^{-L}), 5 homeodominios zinc-finger (PHD_{I-V}), dos dominios prolina-triptófano-triptófano-prolina, un dominio SET al cual se asocia un dominio rico en cisteína (SAC) y un motivo C5HCH. Se ha visto que en el tándem $PHD_V C5HCH_{NSD1}$, compuesto por el homeodominio v y el motivo C5HCH, aparecen muchas mutaciones patogénicas causantes de la aparición del síndrome de Sotos (69). Este tándem actúa como regulador transcripcional a través de la unión con el dominio C2HR del represor transcripcional Nizp1, reforzando la acción represiva de Nizp1. También parece que este tándem podría estar relacionado con la demetilación de las histonas H3K4 y H3K9 (70). Así pues, estudios estructurales y biofísicos recientes sugieren que las mutaciones localizadas en estas regiones impiden la interacción de $PHD_V C5HCH_{NSD1}$ con el cofactor nizp1, provocando la represión de la expresión de genes de crecimiento, lo que finalmente conducirá al desarrollo de sobrecrecimiento (69).

Los mecanismos mutacionales asociados a la haploinsuficiencia de *NSD1* incluyen: mutaciones de cambio de aminoácido, mutaciones sin sentido, pequeñas deleciones o inserciones, deleciones parciales o completas del gen o genes asociados a la región 5q35, o mutaciones que alteran el *splicing*. Por lo general, todas estas mutaciones serán *de novo* con una incidencia de mosaicismo germinal baja. Se ha estimado que aproximadamente el 90% de los pacientes con un SSo presentan haploinsuficiencia del gen *NSD1*. Existe un efecto poblacional sobre determinados reordenamientos que incluyen *NDS1*. Por ejemplo, en la población japonesa, existe una predisposición genómica relacionada probablemente por la recombinación alélica de secuencias homólogas repetitivas que flanquean *NSD1*, tales como las ALU. Por tanto, en esta población, la alteración más frecuente consiste en una microdelección de 1,9 Mb, debida a un polimorfismo específico de esta población. No se ha visto este mecanismo en otra población y la frecuencia estimada de este polimorfismo fuera de Japón se desconoce.

Hasta el momento no se ha visto una correlación genotipo-fenotipo entre el tipo o localización de las mutaciones y el fenotipo asociado al SSo, aunque parece que aquellos pacientes con microdeleciones suelen tener una discapacidad intelectual mayor y un sobrecrecimiento menos pronunciado (67). Tampoco parece que una microdelección que

incluya genes vecinos a *NSD1* en la región 5q35 estén relacionados con características fenotípicas adicionales respecto a los que tienen únicamente deletado el gen, así como con aquellos que tienen mutaciones intragénicas (66, 67).

El síndrome de Sotos tipo 2, también llamado Síndrome de Malan (MIM #164005), es una variante del síndrome de Sotos tipo 1, causada por un mecanismo molecular distinto, ya que la alteración genética se encuentra en el gen *NFIX* (*Nuclear Factor I/X (CCAAT-Binding Transcription Factor)*). Este gen codifica una proteína que se expresa principalmente en el sistema nervioso central, en hueso y en condrocitos prehipertróficos (1), por lo que su disfunción puede estar relacionada con la desregulación del crecimiento de estas estructuras, lo que finalmente conllevará la aparición del fenotipo asociado. Debido a la similitud del fenotipo entre el síndrome de Malan y el síndrome de Marshall-Smith (MIM #602535), se demostró que estos pacientes también presentaban alteraciones en *NFIX*, todas ellas de novo y probablemente relacionadas con la aparición de las características clínicas asociadas. Todo ello hace posible que estos dos síndromes sean uno solo con expresividad y clínica variable, pero en ambos casos con la misma base molecular.

En la tabla 3 se anotan las características clínicas que se han descrito en pacientes con síndrome de Sotos junto con el código HPO asociado.

Tabla 3. Características clínicas descritas en pacientes con un fenotipo compatible con el síndrome de Sotos.

HP:0003272	Anomalía del hueso de la cadera
HP:0000280	Rasgos faciales toscos
HP:0000639	Nistagmo
HP:0000405	Discapacidad auditiva/hipoacusia bilateral de conducción
HP:0000400	Macrotia
HP:0005616	Maduración esquelética acelerada
HP:0001338	Agenesia parcial del cuerpo calloso
HP:0000006	Herencia autosómica dominante
HP:0002667	Nefroblastoma (Tumor de Wilms)
HP:0002389	Tabique pelúcido cavum
HP:0000486	Estrabismo
HP:0009890	Inserción anterior del cabello posterior
HP:0001250	Convulsiones
HP:0001176	Manos grandes
HP:0000218	Paladar alto
HP:0001347	Hiperreflexia
HP:0100543	Deterioro cognitivo
HP:0001943	Hipoglicemia
HP:0000457	Cresta nasal deprimida
HP:0001388	Laxitud articular
HP:0100627	Desplazamiento del meato uretral externo
HP:0002353	Anomalía EEG
HP:0002474	Retraso en el lenguaje expresivo
HP:0000098	Estatura alta
HP:0000494	Hendiduras palpebrales de oblicuidad descendente
HP:0004375	Neoplasias del sistema nervioso
HP:0001263	Retardo global del desarrollo
HP:0002280	Cisterna magna ampliada
HP:0001629	Defecto septal ventricular

HP:0000307	Mentón afilado, barbilla puntiaguda
HP:0001319	Hipotonía neonatal
HP:0001952	Tolerancia anormal a la glucosa
HP:0000268	Dolicocefalia
HP:0000348	Frente alta
HP:0001833	Dedos del pie largos
HP:0000028	Criptorquidia
HP:0000303	Prognatismo mandibular
HP:0000347	Micrognatia
HP:0001513	Obesidad
HP:0002007	Frente prominente
HP:0000463	Narinas antevertidas
HP:0000540	Hipermetropía
HP:0000069	Anormalidad del uréter
HP:0000388	Otitis media
HP:0001631	Defecto en el tabique auricular
HP:0000189	Paladar estrecho
HP:0009793	Teratoma presacral
HP:0001231	Anormalidad de las uñas
HP:0001792	Uña pequeña
HP:0006288	Erupción dental acelerada
HP:0002370	Falta de coordinación
HP:0000826	Pubertad precoz
HP:0000316	Hipertelorismo
HP:0002857	Genu valgo
HP:0001643	Ductus arterioso permeable
HP:0001249	Discapacidad intelectual
HP:0003745	Caso aislado
HP:0000113	Displasia poliquística renal
HP:0001763	Pie plano
HP:0002970	Genu varo
HP:0002650	Escoliosis
HP:0001363	Craneosinostosis

Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel

El síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) (MIM #312870) es un síndrome de sobrecrecimiento menos frecuente que el BWS y el SSo, con una prevalencia desconocida debido al bajo número de casos descritos (~250 casos descritos hasta la fecha). Las características clínicas de los pacientes con SGBS incluyen: sobrecrecimiento pre y postnatal, macrocefalia, características faciales típicas que incluyen una cara tosca y cuadrada muy característica, macroglosia, anomalías en algunos órganos internos y, en algunos casos, discapacidad intelectual (tabla 4)

El SGBS está clasificado en tipo I (clásico) y tipo II (letal asociado a *hydrops fetalis*). El SGBS tipo I está causado por mutaciones en el gen *GPC3*, que se localiza en el cromosoma X (Xq26), por lo que tiene un tipo de herencia ligado al X, con penetrancia completa en varones, siendo la penetrancia desconocida en mujeres heterocigotas. La mayoría de alteraciones descritas son heredadas, aunque también se han descrito alteraciones *de novo*, así como algún caso de mosaicismo germinal.

Este gen codifica un glicoproteína, una proteína que pertenece a la familia de los proteoglicanos de heparán sulfato. Este grupo de proteínas se anclan a la membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol y participan en diferentes vías de señalización.

En mamíferos se han descrito 6 tipos de glicoproteínas (GPC1 a GPC6), y en el caso del GPC3 actúa como un regulador de la vía de *hegdehog*, por lo que las alteraciones que afecten a la función de la proteína estarán relacionadas con el aumento de la actividad en la vía de *hegdehog*. En la revisión realizada en unos de los artículos aquí descritos (Artículo 4), se detallan los aspectos clínicos, moleculares y de manejo de los pacientes con este síndrome, incluyendo un profundo análisis de las bases moleculares y toda la literatura descrita hasta la fecha en relación a este síndrome.

Tabla 4. Rasgos clínicos asociados al síndrome de Simpson-Golabi-Behmel con su código de codificación HPO.

HP:0000280	Rasgos faciales toscos
HP:0001537	Hernia umbilical
HP:0001419	Herencia recesiva ligada al X
HP:0002869	Alas ilíacas en forma de campana
HP:0005616	Maduración esquelética acelerada
HP:0000689	Maloclusión dental
HP:0000204	Labio superior hendido
HP:0000286	Epicanto

HP:0000047	Hypospadias
HP:0001773	Pie corto
HP:0003312	Anomalía de los cuerpos vertebrales
HP:0001250	Convulsiones
HP:0001770	Sindactilia del dedo gordo o Hallux
HP:0001252	Hipotonía muscular

HP:0005580	Duplicación de la pelvis renal
HP:0008736	Hipoplasia del pene
HP:0001669	Transposición de las grandes arterias
HP:0000216	Reborde alveolar secundario ancho
HP:0001305	Malformación de Dandy-Walker
HP:0001943	Hipoglucemia
HP:0001540	Diástasis de rectos
HP:0100627	Desplazamiento del meato uretral externo
HP:0000175	Paladar hendido
HP:0000107	Quistes renales
HP:0001837	Hallux ancho
HP:0001831	Dedo corto
HP:0000105	Riñones agrandados
HP:0000463	Narinas antevertidas
HP:0002884	Hepatoblastoma
HP:0007370	Aplasia / hipoplasia del cuerpo calloso
HP:0000069	Anormalidad del uréter
HP:0000465	Cuello alado
HP:0002245	Divertículo de Meckel
HP:0001792	Uña pequeña
HP:0002240	Hepatomegalia
HP:0001274	Agenesia de cuerpo calloso
HP:0003185	Pequeñas muescas sacroilíacas
HP:0006176	Dos centros de osificación del carpo presentes al nacer
HP:0009602	Anomalía de la falange del pulgar
HP:0010318	Aplasia / hipoplasia de la musculatura de la pared abdominal
HP:0000238	Hidrocefalia
HP:0001320	Hipoplasia de la vermis cerebelosa
HP:0001169	Palma de la mano ancha
HP:0004279	Palma de la mano corta
HP:0000470	Cuello corto
HP:0001162	Polidactilia pos axial de la mano
HP:0002650	Escoliosis
HP:0001561	Polihidramnios
HP:0003196	Nariz corta
HP:0008803	Muesca sacroilíaca estrecha
HP:0001608	Anomalía de la voz
HP:0100490	Camptodactilia del dedo de la mano
HP:0000767	Pectus excavatum

HP:0003517	Longitud al nacer superior al percentil 97
HP:0000368	Orejas de implantación baja y con aumento de la rotación posterior
HP:0001732	Anormalidad del páncreas
HP:0004209	Clinodactilia del quinto dedo
HP:0002667	Nefroblastoma. (tumor de Wilms)
HP:0000003	Displasia poliquística de los riñones
HP:0000365	Deficiencia auditiva/hipoacusia neurosensorial congénita
HP:0006101	Sindactilia de dedos
HP:0011304	Pulgar ancho
HP:0008416	Seis vértebras lumbares
HP:0001748	Poliesplenia
HP:0002558	Pezones supernumerarios
HP:0100543	Deterioro cognitivo
HP:0000776	Hernia diafragmática congénita
HP:0001744	Esplenomegalia
HP:0000891	Costillas cervicales
HP:0003006	Neuroblastoma
HP:0000256	Macrocefalia
HP:0000772	Anomalía de las costillas
HP:0009101	Hendidura submucosa de labio
HP:0000098	Estatura alta
HP:0000494	Hendiduras palpebrales de oblicuidad descendente
HP:0011039	Anomalía en la hélice de la oreja
HP:0011675	Arritmia
HP:0001629	Defecto septal ventricular
HP:0001639	Miocardiopatía hipertrófica
HP:0001638	Cardiomiopatía
HP:0000028	Criptorquidia
HP:0000303	Prognatismo mandibular
HP:0000023	Hernia inguinal
HP:0001233	Sindactilia de dedos 2-3 de la mano
HP:0002566	Malrotación intestinal
HP:0006525	Defectos de la segmentación pulmonar
HP:0001631	Defecto en el tabique auricular
HP:0002167	Impedimento del habla
HP:0004467	Foseta cutánea preauricular
HP:0000384	Apéndice cutáneo preauricular
HP:0001231	Anormalidad de las uñas
HP:0005280	Puente nasal deprimido
HP:0001769	Pies anchos

HP:0000316	Hipertelorismo
HP:0000158	Macroglosia
HP:0001643	Ductus arterioso permeable
HP:0000154	Boca ancha
HP:0000157	Anomalía de la lengua
HP:0001642	Estenosis pulmonar
HP:0000431	Puente nasal ancho

HP:0001762	Talipes equinovaro
HP:0001883	Talipes
HP:0003422	Defecto de segmentación vertebral
HP:0004510	Hiperplasia de células de los islotes pancreáticos
HP:0009882	Falange distal del dedo Corto

Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba

El Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS) es un síndrome de sobrecrecimiento cuyas características principales son: macrocefalia, crecimiento prenatal acelerado con una desaceleración postnatal, pólipos intestinales, lipomas y máculas pigmentadas en el pene. Fue descrito en principio en 1960 por el grupo de Riley y col., en una familia en la que varios miembros presentaban macrocefalia, pseudopapiledema y múltiples hemangiomas. Posteriormente, se describieron más pacientes con todas las características clínicas que se reconocen actualmente como parte del BRRS, tales como macrocefalia, lipomatosis, poliposis intestinal y máculas pigmentadas en el pene (71, 72). En la tabla 5 aparecen anotadas todas las características clínicas adicionales que se han descrito en pacientes con BRRS aunque con una menor frecuencia de aparición. Además, algunos autores han sugerido una relación entre el BRRS y la aparición de tumores intracraneales (73, 74). La prevalencia de este síndrome es desconocida hasta la fecha debido al bajo número de casos publicados (~80 casos).

Tabla 5. Características clínicas descritas en pacientes con el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba asociadas a su código HPO respectivo.

Bannayan-Riley-Ruvalcaba	
HP:0003196	Nariz corta
HP:0007873	Línea de Schwalbe anormalmente prominente
HP:0000717	Autismo
HP:0001928	Alteración de la coagulación
HP:0000646	Ambliopía
HP:0000767	Pectus excavatum
HP:0000965	Piel marmórea
HP:0003517	Longitud al nacer superior a los 97 percentil
HP:0000648	Atrofia óptica
HP:0100013	Neoplasia de mama
HP:0000400	Macrotia
HP:0000006	Herencia autosómica dominante
HP:0001012	Lipomas múltiples

HP:0002027	Dolor abdominal
HP:0004325	Disminución del peso corporal
HP:0007074	Cuerpo calloso grueso
HP:0000486	Estrabismo
HP:0001014	Angioqueratoma
HP:0005214	Obstrucción intestinal
HP:0004322	Estatura baja proporcional
HP:0000040	Pene alargado
HP:0001250	Convulsiones
HP:0001252	Hipotonía muscular
HP:0003198	Miopatía
HP:0002194	Desarrollo motor grueso retardado
HP:0008897	Retraso en el crecimiento postnatal
HP:0200008	Poliposis intestinal

HP:0012032	Lipomas
HP:0000218	Paladar alto
HP:0000538	Pseudopapiedema
HP:0001028	Hemangioma
HP:0002239	Hemorragia gastrointestinal
HP:0002558	Pezón supernumerario
HP:0100543	deterioro cognitivo
HP:0001943	Hipoglucemia
HP:0100026	Malformación arteriovenosa
HP:0100585	Teleangiectasia de la piel
HP:0000256	Macrocefalia
HP:0001382	Hiperlaxitud articular
HP:0000098	Estatura alta
HP:0000494	Hendiduras palpebrales de oblicuidad descendente
HP:0004099	Macroactilia
HP:0000174	Anomalía del paladar
HP:0010784	Neoplasia uterina
HP:0100031	Neoplasia del tiroides
HP:0000505	Deficiencia visual
HP:0001677	Enfermedad de la arteria coronaria
HP:0000268	Dolicocefalia
HP:0000347	Micrognatia
HP:0001513	Obesidad
HP:0002007	Frente prominente
HP:0000463	Narinas antevertidas
HP:0001034	Mácula hipermelanótica
HP:0002167	Impedimento del habla
HP:0000343	Filtro largo
HP:0002170	Hemorragia intracraneal
HP:0009602	Anomalía de la falange del pulgar
HP:0004390	Pólipos hamartomatosos
HP:0009726	Neoplasia renal
HP:0001724	Dilatación aórtica
HP:0000957	Manchas "café con leche"
HP:0000956	Acantosis pigmentaria
HP:0002858	Meningioma

HP:0100641	Neoplasia del cortex adrenal
HP:0001324	Debilidad muscular
HP:0001249	Discapacidad intelectual
HP:0100761	Angiomatosis visceral
HP:0002576	Intususcepción
HP:0003621	Edad de aparición juvenil
HP:0100646	Tiroiditis
HP:0000036	Anomalía del pene
HP:0000872	Tiroiditis de Hashimoto
HP:0001004	Linfedema
HP:0001048	Hemangioma cavernoso
HP:0000750	Retraso del habla y del lenguaje
HP:0002652	Displasia esquelética
HP:0001163	Anomalía de los huesos metacarpianos
HP:0002573	Hematemesis
HP:0002650	Escoliosis

El BRRS está causado por mutaciones con un patrón de herencia autosómico dominante en el gen *PTEN* (“*Phosphatase and Tensin Homolog*”). La proteína codificada por *PTEN* pertenece a la familia de las proteínas supresoras de tumores y está formada por un dominio de tipo tensina y un dominio catalítico similar al de las proteínas tirosinas fosfatasas. Su acción de supresión de tumores la lleva a cabo a través de la regulación de la vía de señalización molecular PI3K-AKT/PKB, una conocida ruta de crecimiento y supervivencia celular cuya afectación está relacionada con la aparición de diferentes tipos de tumores. Además, participa durante la neurogénesis en el adulto, lo que podría explicar la aparición de tumores intracraneales en pacientes con mutaciones en este gen. Las mutaciones descritas en el BRRS incluyen mutaciones puntuales, translocaciones y deleciones tanto esporádicas como familiares. Existe una cierta correlación genotipo-fenotipo para mutaciones sin sentido en *PTEN*, que se asocian a un mayor riesgo de desarrollo de cáncer y fibroadenoma de mama, así como la presencia de lipomas en pacientes con BRRS y mutaciones en *PTEN* (75), aunque estudios posteriores no lo confirmaron (76).

Existe una amplia controversia respecto al BRRS, ya que tiene muchas características clínicas que se solapan tanto clínica como molecularmente, con el síndrome de Cowden (SC) (MIM #158350), por lo que algunos autores sugieren que el BRRS y el SC son una misma entidad con una expresividad variable y una penetrancia dependiente de la edad (76).

Objetivos

1. Realizar un rastreo mutacional por microarray de SNPs en pacientes con sobrecrecimiento (talla, peso y perímetro cefálico, o una combinación de los tres) y discapacidad intelectual no asociada a ningún síndrome, con el fin de buscar nuevos reordenamientos cromosómicos que pudieran estar relacionados con estas características clínicas.
2. Estudiar una cohorte de pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) y analizar tanto los aspectos clínicos como moleculares. Además, comparar los defectos clínicos y moleculares en aquellos pacientes con BWS nacidos por reproducción asistida y reproducción espontánea.
3. Revisar las características clínicas de nuestros pacientes y los de la bibliografía relacionada con el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel. Realizar una revisión tanto de las características clínicas como moleculares.
4. Estudiar los niveles de metilación del locus 11p15.5 a nivel somático y constitutivo en pacientes con tumores de Wilms.

Materiales, Métodos y Resultados

Artículo 1. A new overgrowth Syndrome is due to mutations in RNF125

Resumen del artículo 1

En este artículo se realizó un estudio de 270 pacientes que presentaban sobrecrecimiento y otras características clínicas no relacionadas claramente con alguno de los síndromes de sobrecrecimiento conocidos hasta ese momento. Se realizó, por tanto, un estudio para encontrar la causa subyacente que explicara las manifestaciones fenotípicas que presentaban estos pacientes y, para ello, se realizó un rastreo de grandes reordenamientos genómicos utilizando la técnica de Array-CGH, a través de un diseño propio conocido como Karyoarray®.

Tras el análisis de los resultados, se detectó en un paciente una delección de aproximadamente 9 Mb localizada en el cromosoma 18 y que contenía 35 genes. Tras un análisis bibliográfico exhaustivo, analizando los genes de la delección, pareció interesante centrar el estudio en profundidad en dos de estos genes: *RNF125* y *RNF138* ya que en el año 2007 se había publicado un estudio en el que se habían encontrado mutaciones en el gen *RNF135* en pacientes con sobrecrecimiento, por lo que se hipotetizó que mutaciones en genes de esa misma familia podrían explicar las características que presentaban los pacientes de la cohorte de estudio.

El siguiente paso fue la búsqueda de mutaciones puntuales en ambos genes, tras lo cual se encontraron cinco pacientes de tres familias que presentaban mutaciones en el gen *RNF125*, dos de las cuales cosegregaban con el fenotipo. No se encontró ninguna mutación patogénica en el gen *RNF138*. Estas mutaciones se confirmaron mediante “High Resolution Melting” (HRM), pirosecuenciación, SNP-Array y un MLPA de diseño propio. Además, se estudió si en estos pacientes podían existir otras alteraciones que pudieran influir en el fenotipo, y para ello se hizo una secuenciación completa del exoma y un microarray de metilación del genoma, no encontrando otras alteraciones susceptibles de estar implicadas en las características clínicas de los pacientes.

Las características clínicas comunes a los 6 pacientes que presentaban mutaciones en *RNF125* son: sobrecrecimiento, macrocefalia, hipoglicemia, características faciales dismórficas, ventrículos alargados, enfermedades autoinmunes inflamatorias recurrentes y discapacidad intelectual en rango variable.

Para poder comprobar el efecto patogénico de las mutaciones encontradas en *RNF125* se aplicaron herramientas bioinformáticas que permitieron predecir el efecto de estos cambios sobre la función de la proteína, si los aminoácidos que se alteraban estaban conservados en la evolución (indicador de la importancia biológica del aminoácido en la función de la proteína) y si esos cambios se encontraban en población control. Los análisis sugirieron que los cambios detectados alteraban potencialmente la función de la proteína.

Con el fin profundizar en la función de la proteína para la que codifica *RNF125* se realizaron varios experimentos funcionales para determinar la capacidad de ubiquitinización de *RNF125* sobre sus proteínas dianas. *RNF125* codifica una proteína que actúa marcando (mediante ubiquitinización) otras proteínas para que sean degradadas en el proteasoma y así regular su expresión. Los experimentos funcionales realizados consistieron en la extracción de células de los pacientes afectados y la evaluación de los niveles de la principal diana proteica de *RNF125*, *RIG-I*, así como su cinética de degradación. Con ello, se evidenció claramente que los niveles de *RIG-I* eran mayores en las células de los pacientes comparados con células control. Además, la cinética de degradación era más lenta en los pacientes con mutación en *RNF125* comparada con los controles utilizados.

Estos dos experimentos confirmaban la primera aproximación mediante *microarrays* de expresión, en los que se observó que se alteraba la vía de *RIG-I*, al haber una mayor cantidad de ARNm de *RIG-I* y además, se alteraba la expresión de otras proteínas de esta ruta y de la ruta de *PI3K-AKT*, una ruta ampliamente conocida por participar en crecimiento humano, lo que podría explicar la alteración en el crecimiento que presentan los pacientes de la cohorte.

En resumen, con el presente trabajo se han identificado seis pacientes de 4 familias con mutaciones en el gen *RNF125*, tres mutaciones puntuales y una delección amplia. Asimismo se demostró que las mutaciones en este gen causan una haploinsuficiencia del mismo afectando a la expresión de las proteínas de la vía de *RIG-I* y *PI3K-AKT*. Es la primera vez que se correlacionan las mutaciones en este gen con la aparición de un síndrome de sobrecrecimiento.

Artículo 2. Clinical and Molecular Analyses of Beckwith–Wiedemann Syndrome: Comparison Between Spontaneous Conception and Assisted Reproduction Techniques

Resumen del artículo 2

Este artículo se centró en el estudio de uno de los síndromes de Sobrecrecimiento más frecuentes, el síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) y su relación con la reproducción asistida. Aproximadamente, el 60-70% de los pacientes con BWS presentan alteraciones en la metilación en estos IC, el 15% están causados por disomía uniparental en mosaico y la presencia de reordenamientos cromosómicos representa entre un 2-3%. Una pequeña proporción de pacientes con BWS esporádico pueden presentar mutaciones en el gen *CDKN1C* localizado en el IC2 (5-10%), pero este valor se incrementa hasta el 40-50% si existe una historia familiar positiva.

Existe un grupo de enfermedades conocidas como enfermedades de *imprinting*, dentro de las que se incluye el BWS, que están causadas por alteraciones en regiones genómicas que tienen una expresión diferencial y están reguladas por marcas de metilación. Este grupo de enfermedades tiene una mayor frecuencia de aparición en niños nacidos mediante técnicas de reproducción asistida (TRA) en comparación con aquellos que nacen por reproducción espontánea (SPONT)

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar tanto las características clínicas como las características moleculares de todos los pacientes con BWS procedentes del Registro Español de Síndromes de Sobrecrecimiento (RESSC), comparando aquellos que nacieron por SPONT frente a los que nacieron gracias a TRA. Se partió de una cohorte inicial de 187 pacientes, obteniendo los datos de concepción de 156 de ellos. De estos, 139 nacieron por reproducción espontánea y 17 por técnicas de reproducción asistida. Se recogió toda la información clínica de los mismos y se realizaron los estudios de metilación mediante las técnicas de MS-MLPA, microarray de metilación y pirosecuenciación. Además, se realizó la secuenciación del gen *CDKN1C* mediante secuenciación Sanger.

En cuanto a los datos clínicos, se observó que los nacimientos múltiples eran más frecuentes en aquellos pacientes nacidos por TRA comparado con los que nacieron por SPONT, y además, los datos antropométricos mostraban la existencia de diferencias significativas en la edad gestacional y el peso al nacimiento ya que aquellos que nacían por TRA tenían una edad gestacional y peso inferiores.

Otro de los datos a destacar fue la existencia de diferencias significativas en la edad ósea, las anomalías de la oreja típicas del BWS y la enfermedad congénita cardiaca entre ambos grupos. Así pues, sólo un 5,8% de los pacientes con BWS+TRA presentaban la anomalía típica de la oreja del BWS en comparación con el 33% que manifestaban los pacientes con BWS+SPONT. Por el contrario, la frecuencia en el desarrollo de una edad ósea avanzada para la edad biológica y para el desarrollo de enfermedad congénita cardiaca es un 10% mayor. Para el resto de parámetros clínicos analizados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Posteriormente se realizó este mismo análisis pero teniendo sólo en cuenta aquellos pacientes que presentaban una hipometilación del IC2 (HipoIC2), la causa más frecuente del BWS. Se pudo ver que las anomalías en la oreja y la enfermedad cardiaca congénita eran más frecuentes en el grupo con SPONT+HipoIC2 en comparación con el grupo de TRA+HipoIC2, algo que se correlacionaba con el análisis previo, pero no así la edad ósea avanzada, que puede tener relación con la base molecular subyacente y no con el tipo de reproducción.

Además, sólo aquellos pacientes que tienen mutaciones en el gen *CDKN1C* presentan hendidura de paladar, un hecho importante a la hora de realizar un diagnóstico preciso y un consejo genético de la enfermedad.

Los pacientes con enfermedades que afectan al *imprinting* pueden tener potencialmente afectados otros loci de *imprinting* en otras regiones cromosómicas. Por ello, se realizó un análisis multilocus de *imprinting* genómico entre pacientes con BWS+TRA y BWS+SPONT mediante *microarray* de metilación, tras lo cual no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que implica que no hay una mayor probabilidad de desarrollar fenómenos de desregulación del *imprinting* genómico generalizados en los pacientes nacidos por TRA en comparación con el grupo de pacientes nacidos por reproducción espontánea. Hay que tener en cuenta que la cohorte de pacientes analizada no es muy grande (sólo 17 pacientes con BWS+TRA) lo que podría estar sesgando estos resultados, por lo que sería muy recomendable validar estos resultados con una cohorte de pacientes mayor, incluso en otras poblaciones, con el fin de determinar si este comportamiento se mantiene.

Artículo 3. Prenatal molecular testing for Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: A challenge for molecular analysis and genetic counseling

Resumen del artículo 3

Los síndromes de Beckwith-Wiedemann (BWS) y Silver-Russell (SRS) están causados por alteraciones en la región 11p15.5, aunque en el caso del SRS también pueden existir casos con disomía uniparental (UPD) en el cromosoma 7. En este artículo se ha realizado una guía de diagnóstico prenatal de ambos síndromes. Así, se han analizado en total 160 casos de diagnóstico de fetos (122 de BWS y 38 de SRS) referidos de 5 centros diferentes.

Uno de los objetivos fue el análisis y la comparación de las diferentes metodologías que se utilizan para realizar el diagnóstico de ambos síndromes. En total, de las 11 técnicas seleccionadas se compararon los siguientes parámetros: El nº de loci analizados por test, si detecta UPD, epimutaciones (una alteración genómica que genera un patrón de metilación alterado pero que no está causado por una alteración en el residuo CpG de metilación), detección de variaciones en el número de copias (CNV), detección de variaciones de un nucleótido (SNV), si el método es adecuado para realizar diagnóstico prenatal y finalmente la cantidad media de ADN que es necesario para la realización de la prueba. Por último, también se tuvieron en cuenta las limitaciones de todas las técnicas.

Otros puntos importantes a tener en cuenta cuando se realiza una prueba prenatal para el diagnóstico de BWS y SRS son: la indicación de la prueba, el tejido en el que realizar el test, la interpretación de los resultados, y las consecuencias éticas y legales que van a derivar de los resultados.

En cuanto a las indicaciones, se puede decir que el test está indicado en aquellos casos en que exista una historia familiar positiva, una CNV (*“Copy Number Variation”*) heredada, una traslocación o una mutación en la región 11p. También en aquellos casos en los cuales existan aberraciones cromosómicas (tales como trisomías) o reordenamientos genómicos que incluyan genes relacionados con BWS o SRS (en el cromosoma 11) y en el cromosoma 7 para SRS. Por último, estaría indicado también en aquellos casos en los que se aprecien anomalías en la prueba del ultrasonido, para el caso de BWS que incluya: onfalocele, macroglosia, visceromegalia, glándulas adrenales hipertróficas, macrosomía sin filiación clara. Para SRS: el crecimiento intrauterino restringido puede ser un parámetro sugestivo, pero debe estar

acompañado de otras características, ya que por sí solo no se considera que esté indicada la realización de la prueba.

El tejido que se debe utilizar depende del tipo de test y alteración que estemos buscando. Las vellosidades coriales y amniocitos cultivados se pueden utilizar para estudiar CNV, rastreo de mutaciones y UPD materna del cromosoma 7 para SRS. En el caso de UPD del cromosoma 11 y epimutaciones, el líquido amniótico se considera el tejido de preferencia. Los amniocitos pueden mostrar unas características clonales que no siempre se correlacionan con el estado biológico real del feto/placenta. En el caso de vellosidades coriales en estadios tempranos, los niveles de las marcas de metilación podrían no ser los definitivos. Para descartar la contaminación materna, se debería realizar un test por microsatélites (STRs) que la permita excluir.

Antes de realizar cualquier prueba prenatal es aconsejable tener en cuenta una serie de cuestiones con el fin de determinar si se está eligiendo la metodología óptima en cada caso, y si los resultados se obtendrán en un tiempo razonable (en el caso de pruebas prenatales se estima entre 3-5 días). Hay que asegurarse de que esa metodología nos permitirá encontrar la alteración de interés, teniendo en cuenta que en este tipo de patologías es posible la existencia de fetos con diferentes niveles de mosaicismo, por lo que pueden existir límites superiores e inferiores de detección (sensibilidad de la técnica). Por último, es muy recomendable que la técnica aplicada haya sido validada en el laboratorio.

La interpretación de los resultados es otro punto a tener en cuenta, después de determinar el tipo de alteración que presenta el feto (CNV, SNV, epimutación, etc...). En el caso de mosaicismos, si el test es positivo se puede confirmar el diagnóstico pero no se puede predecir la evolución clínica, y en el caso de ser negativa la presencia de mosaicismo o UPD nunca se puede excluir. Se debe saber cómo interpretar los resultados en caso de embarazos múltiples (la mayoría de gemelos monocigóticos son clínicamente discordantes).

Las consecuencias y los aspectos éticos derivados de estos test prenatales deber ser analizados con precaución, ya que, por ejemplo, tras la realización y confirmación de un estudio genético, no se puede predecir la evolución clínica del paciente y para ello es necesario analizar los resultados de las ecografías. Además, hay que saber asesorar en cuanto a las futuras estrategias reproductivas e implicaciones de pacientes con un resultado positivo. Por último, se debe considerar si el hecho de obtener un resultado positivo para BWS o SRS es un motivo directo o indirecto para la inducción de un aborto.

Artículo 4. A Novel Mutation in CDKN1C in Sibs with Beckwith-Wiedemann Syndrome and Cleft Palate, Sensorineural Hearing Loss, and Supernumerary Flexion Creases

Resumen del artículo 4

En los anteriores artículos ya ha quedado patente la elevada heterogeneidad clínica y genética del síndrome de Beckwith-Wiedemann, su difícil diagnóstico y lo complicado que es predecir cómo será la evolución clínica de los pacientes. Por ello, este artículo es especialmente importante para ayudar a elucidar y aportar una mayor información clínica y molecular al BWS. En este estudio, el análisis se centró en una familia procedente de Asia, en la cual se diagnosticaron dos hermanas y un hermano con BWS. Clínicamente, los hermanos presentaban: hendidura de paladar, onfalocele, pliegues en el lóbulo anterior de las orejas, lesiones dentales, macroglosia, mordida cruzada posterior, adaquia y pliegues supernumerarios en los dedos de las manos.

La hermana más pequeña y el hermano presentaron además de todas las características descritas anteriormente, pérdida auditiva, una característica clínica de baja frecuencia que aparece aproximadamente en el 12% de los casos de BWS. Sin embargo, la pérdida de audición neurosensorial descrita en estos dos pacientes no se había descrito previamente en pacientes con BWS. Esta característica podría deberse a la presencia de una segunda alteración en uno de los genes de las conexinas, aunque no se pudo comprobar esta hipótesis.

En todos ellos se encontró una mutación en el gen *CDKN1C*, localizado en el cromosoma 11, en la región donde se encuentra el locus relacionado con el BWS, que no había sido descrita previamente y que además, había sido heredada por vía materna, ya que la madre era portadora de la mutación. Esta mutación (c.579delT; p.A193AfsX46) provoca una deleción de un nucleótido que afecta al marco de lectura de los codones de la proteína, causando finalmente la aparición de un codón de parada prematuro. Esta mutación se localiza en uno de los dominios de la proteína que codifica *CDKN1C* y que se conoce como “*PAPA-Domain*” por la repetición de los aminoácidos Prolina y Alanina. Este dominio está implicado en fosforilación, por lo que la mutación probablemente está afectando a la función de fosforilación de la proteína. Como se comentaba en el artículo 2, la hendidura de paladar sólo aparece en pacientes con BWS que tienen mutaciones en el gen *CDKN1C*, hecho que se

confirma en este caso, y parece que está relacionado con la alteración del dominio de inhibición independiente de *CDKN1C*.

Con este artículo se resalta la importancia de la secuenciación del gen *CDKN1C* en aquellos casos de pacientes con BWS que manifiesten hendidura de paladar ya que si presentan características clínicas de BWS junto con este defecto en el paladar, lo más probable es que presenten una mutación en el gen *CDKN1C*. Gracias a la realización de este artículo, se ha ampliado el número de alteraciones molecular en BWS ya que es la primera vez que se describe la mutación c.579delT; p.A193AfsX46. Además, dos de los tres pacientes presentaron pérdida auditiva neurosensorial, una característica que no había sido descrita previamente en pacientes con BWS y que, por tanto, ayudará en el consejo genético y diagnóstico de estos pacientes.

Artículo 5. Simpson-Golabi-Behmel Syndrome types I and II

Resumen del artículo 5

Al igual que el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) es un síndrome de sobrecrecimiento de baja prevalencia, que se caracteriza clínicamente por múltiples anomalías congénitas, sobrecrecimiento pre y post natal, rasgos craneofaciales distintivos, macrocefalia y organomegalia. Otras características que pueden presentar estos pacientes incluyen anomalías en el aparato esquelético, el corazón, el sistema nervioso central, el riñón y el tracto gastrointestinal.

Aunque se ha descrito una forma letal de este síndrome (denominada SGBS tipo II) en esta revisión sólo se analizó la forma clásica de este síndrome y simplemente se describieron algunos aspectos del SGBS tipo II.

El 70% de los pacientes con SGBS presentan macrocefalia y en menor medida algunos pueden manifestar craneosinostosis. La cara suele ser cuadrada y tosca con una frente ancha, así como unos labios y nariz ancha y grueso. El 13% de los pacientes presentan hendidura de paladar, y suelen tener una lengua ancha con una ranura media desde la punta hasta la parte posterior de la lengua. Las anomalías cardiovasculares suelen aparecer en aproximadamente un tercio de los casos de SGBS e incluyen: malformaciones cardiovasculares, cardiomiopatías y anomalías en el ritmo o la conducción detectables mediante electrocardiograma. Aproximadamente, en un 23% de las muertes se asocia un factor cardiaco, por lo que estas anomalías cardíacas se consideran relativamente comunes en el SGBS.

Al igual que el resto de síndromes de sobrecrecimiento, en el SSBG la frecuencia de aparición de tumores suele estar incrementada en comparación con la población general siendo el tumor de Wilms el más frecuente aunque también se han descrito hepatoblastoma, neuroblastoma adrenal, gonadoblastoma y carcinoma hepatocelular.

En la región abdominal suelen aparecer visceromegalias, tales como: nefromegalia, esplenomegalia y hepatomegalia. También se han observado casos de hernia diafragmática congénita (<10% de los casos) e incluso algún caso con una enfermedad hepática neonatal que derivó finalmente en una cirrosis hepática. En cuanto a los genitales, la frecuencia de aparición de defectos es muy baja, aunque se han detectado casos de hipospadias, criptorquidismo y transposición penoescrotal.

Las características esqueléticas de estos pacientes incluyen: hipoplasia del dedo índice, anomalía congénita de la falange proximal, sindactilia del 2^a y 3^{er} dedo y malformaciones en las costillas, principalmente. En cuanto al Sistema Nervioso Central (SNC) se han descrito pacientes con hidrocefalia, epilepsia y síndrome de apnea obstructiva del sueño. También pueden presentar discapacidad intelectual, retraso motor precoz y retraso en el habla, aunque en su mayoría estos individuos presentan una inteligencia dentro de los límites normales. La articulación del habla en estos pacientes está distorsionada y con poca fluidez.

Los reordenamientos genómicos y las mutaciones puntuales que incluyen el gen *GPC3* ("Glypican-3 gene") localizado en la región cromosómica Xq26, se han asociado con la aparición del SGBS. Ocasionalmente, estos reordenamientos genómicos pueden incluir el gen *GPC4*. Los glipicanos son proteoglicanos de heparán sulfato que actúan controlando el crecimiento y división celular. La familia de los glipicanos en mamíferos está formada por seis proteínas (GPC1 a GPC6). Después de varios estudios, se pudo comprobar que el mecanismo de acción de GPC3 que afectaba al crecimiento estaba relacionado con la vía de señalización de Hedgehog (Hh). Así, GPC3 actúa como inhibidor de la vía de señalización de Hh, por lo que la haploinsuficiencia de esta proteína provocará una hiperactivación de esta vía, lo que finalmente conducirá al sobrecrecimiento típico del SGBS.

El método de diagnóstico genético más utilizado en el SGBS consiste en la búsqueda de mutaciones puntuales en el gen *GPC3* mediante secuenciación completa de los exones y las regiones flanqueantes. Además, con las nuevas técnicas de secuenciación masiva se pueden estudiar muchos genes relacionados con síndromes de sobrecrecimiento a la vez. Para la búsqueda de grandes reordenamientos, se utilizan técnicas tales como microarray o MLPA.

En cuanto al diagnóstico clínico, aparte de los rasgos faciales dismórficos y el sobrecrecimiento, se pueden aplicar técnicas de imagen de resonancia magnética que permitan detectar algunas anomalías que aparecen en esta enfermedad tales como: anomalía del cuerpo calloso, lipomas en el SNC e incluso hidrocefalia. Los estudios por rayos-X podrían ayudar a la identificación de hipoplasia de los dedos, una anomalía de la falange proximal o incluso malformaciones en las costillas, como se ha descrito en algunos casos.

La penetrancia de la enfermedad es del 100% en hombres con mutaciones en *GPC3*, presentando las manifestaciones clínicas típicas del SGBS. En cuanto a las mujeres con mutaciones en heterocigosis, la penetrancia es desconocida aunque se han descrito al menos cuatro mujeres heterocigotas con fenotipo de SGBS.

Artículo 6. *PIAS4* is associated with macro/microcephaly in the novel interstitial 19p13.3 microdeletion/microduplication syndrome

Resumen del artículo 6

Dentro del marco de estudio de los síndromes de sobrecrecimiento, algunas de las características clínicas más estudiadas incluyen el perímetro cefálico, la discapacidad intelectual y los desórdenes del espectro autista. Así pues, el objetivo principal de este trabajo fue el de estudiar pacientes que presentaran estas características clínicas, con el fin de estudiar la posible causa subyacente a todos estos pacientes. Para ello, se utilizó la técnica conocida como Array-CGH en 13 pacientes no relacionados entre sí. Se realizó, además, una revisión de la literatura con el fin de identificar nuevos casos similares a los descritos.

En los 37 pacientes analizados (13 pacientes propios + 14 de revisión de literatura y 10 de bases de datos ISCA y DECIPHER), se detectaron microduplicaciones y microdeleciones en una región intersticial localizada en el cromosoma 19 (19p13.3). La región mínima de solapamiento de todos los pacientes fue de 113,5 Kb y en ella se localizan tres genes: *ZBTB7A*, *MAP2K2* y *PIAS4*.

Parece que las características clínicas que manifiestan los pacientes va a depender del tamaño, la localización y el número de copias de los reordenamientos en esta región intersticial 19p13.3. Así pues, parece que la región que va desde el gen *TLE2* hasta *CREB3L3* (~1.1 Mb) es la que está implicada en la mayor parte de las características clínicas de este síndrome de microduplicación/microdelección, debido a que es una región altamente conservada y con una gran cantidad de genes haploinsuficientes, lo que la hace especialmente susceptible. Genes que podrían participar parcialmente en el fenotipo de los pacientes incluyen: *EEF2*, *DAPK3*, *NMRK2*, *ATCAY*, *NFIC* y *PIAS4*.

PIAS4 es un gen que codifica una proteína ubiquitina ligasa E3 de tipo “RING finger” que interacciona con el receptor de andrógeno. Las proteínas ubiquitina ligasas E3 se encargan de marcar a otras proteínas para que sean degradadas en el proteasoma y así regular su expresión.

Una de las características clínicas que aparece con una mayor frecuencia en muchos de los síndromes de sobrecrecimiento es el aumento del diámetro del perímetro cefálico. En este caso, parece que *PIAS4* es un candidato a explicar estas diferencias en el perímetro cefálico, ya que aparece duplicado en todos los pacientes con microcefalia, delecionado en todos los que

tienen macrocefalia y normal en aquellos que son normocefálicos. Además, estudios funcionales previos realizados en ranas demostraron que la inyección de elevadas dosis de PIAS en embriones provocaba una reducción considerable no sólo en el tamaño de las estructurales cefálicas sino también en el tamaño en general de los embriones. Ya se ha visto cómo la alteración de otras proteínas de tipo ubiquitina ligasas (p.e. *RNF125* en el caso del síndrome de Tenorio) están implicadas en síndromes dentro de los cuales aparece la macrocefalia como una de sus características típicas. Incluso, en bases de datos genómicas que recogen datos de reordenamientos cromosómicos conocidos como CNVs, se ha descrito un paciente con macrocefalia que presentaba una delección localizada en el cromosoma 7 (7p13-p12.3) que incluye al gen *ZMIZ2*, un gen de similar a los genes de tipo PIAS, ya que posee el mismo dominio “*ring finger*” y también interacciona con el receptor de andrógeno al igual que *PIAS4*.

Las características clínicas comunes a todos los pacientes, además de las mencionadas anteriormente, incluían: retraso en el desarrollo, hipotonía, retraso en el habla y características faciales dismórficas tales como filtro corto, labio superior fino, anomalías en la oreja, puente nasal ancho, nariz deprimida e hipertelorismo. También se han visto pacientes que presentan anomalías oculares como estrabismo, ambliopía, astigmatismo y miopía. En cuanto a las características cardiovasculares, se han visto pacientes con enfermedades congénitas cardiacas siendo, la más frecuente el defecto en el septo atrial, aunque también se ha visto dilatación aórtica, tetralogía de Fallot, válvula aórtica bicúspide, raíz aórtica prominente y pacientes con *ductus arteriosus*. Nueve de los 13 pacientes presentaron además alteraciones en el crecimiento, 6 de ellos manifestaron talla baja y los otros 3 sobrecrecimiento con diferencias de ± 2 desviaciones estándar.

En resumen, en este artículo se describe por primera vez un síndrome de microduplicación/microdelección en el cromosoma 19p13.3. Las características de los pacientes son muy variadas pero suelen compartir la macro/microcefalia, desórdenes del crecimiento, anomalías cardiacas, características faciales dismórficas y discapacidad intelectual. Se postuló al gen *PIAS4* como el posible responsable de las alteraciones en el perímetro cefálico, aunque es necesario realizar más estudios para confirmar esta correlación. Toda esta información será de gran utilidad a la hora de realizar el diagnóstico de pacientes con características fenotípicas similares y que presenten reordenamientos genómicos en esta región.

Artículo 7. Constitutional and somatic methylation status of DMRH19 and KvDMR in Wilms tumor patients

Resumen del artículo 7

Como se ha comentado en artículos previos, la frecuencia de aparición de tumores en pacientes con algún síndrome de sobrecrecimiento, en general, está elevada en comparación con la población general. Este hecho es muy importante, ya que este es uno de los factores más importante a seguir en estos pacientes debido a la implicación que tiene respecto a su supervivencia, principalmente durante los periodos neonatal e infantil. De entre los tumores que pueden aparecer, el tumor de Wilms se estima como el de mayor frecuencia de aparición, por lo que su estudio se hace especialmente importante. Además, el tumor de Wilms es el cáncer sólido extra-craneal más frecuente en niños, comprendiendo entre el 6-7% de todos los tumores infantiles.

En la mayoría de casos, el tumor de Wilms aparece de manera esporádica y aislada, aunque también puede formar parte de un cuadro sindrómico más complejo, dentro de los cuales se incluyen: el síndrome de WAGR (“Wilms, Aniridia, Genitourinary congenital anomalies, Retarded development”), el síndrome de Denys-Drash (pseudohipoparatiroidismo con esclerosis mesangial renal) y el síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), principalmente.

Así pues, el defecto epigenético más frecuente en pacientes con tumores de Wilms se localiza en la región 11p15 característica del BWS, donde se localizan los centros de *imprinting* 1 y 2, respectivamente. Es posible que estos defectos epigenéticos aparezcan en mosaico y no en línea germinal, por lo que es bastante útil estudiar el tejido afectado en estos casos. Por todo ello, se decidió estudiar 40 pacientes (24 hombres y 16 mujeres) con tumor de Wilms diagnosticados de media a los 44 meses de vida, tanto en muestra de sangre periférica como en muestra obtenida de biopsia de tumor. Aproximadamente, el 20% de los pacientes (8/40) presentaron características de una forma sindrómica de tumor de Wilms, el resto fueron casos espontáneos y aislados. En cuanto a la histopatología, 4 pacientes presentaban anaplasia focal o difusa, 2 pacientes con resto perilobular nefrogénico y 1 paciente resto intralobar.

Las técnicas con las que se llevaron a cabo el estudio fueron la pirosecuenciación y el MLPA específico de metilación (MS-MLPA), dos de las técnicas más utilizadas para estudiar defectos de la metilación, tal y como se comentó en detalle en el artículo 3.

El estudio de metilación en las muestras de sangre (n=31) permitió detectar hipermetilación en el centro de *imprinting* 1 (IC1) en dos pacientes que habían sido diagnosticados con BWS. Por otra parte, en relación al centro de *imprinting* 2 (IC2), no se encontraron diferencias en los niveles de metilación en las muestras analizadas.

En cuanto a las muestras tumorales, de los 34 tumores que se analizaron, 28 presentaron hipermetilación en el IC1, lo que representa un 82,35% del total y 12 presentaron disomía uniparental (UPD) (35,29%), lo que se traduce en hipometilación del IC2 e hipermetilación del IC1. Los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación y MS-MLPA se correlacionaron perfectamente, excepto en una muestra tumoral, hecho que puede deberse a una de las limitaciones técnicas en cuanto a la sensibilidad de detección de variaciones en los niveles de metilación.

En el momento de la publicación de este artículo, no se había publicado ningún estudio en el cual se analizaran la sensibilidad y especificidad de dos de las técnicas de diagnóstico de defectos en la metilación más conocidas. Este estudio aportó la comparativa entre muestras tumorales y constitutivas de pacientes diagnosticados con tumor de Wilms. Es importante tener en cuenta que estos estudios han ayudado a una mejor comprensión de las alteraciones del *imprinting*, ya que vemos claramente que el defecto molecular más frecuente que encontramos en pacientes con tumores de Wilms consiste en una hipermetilación del IC1. Este hecho es muy importante, dado que permitirá seleccionar un subgrupo de pacientes con BWS (los que tienen hipermetilación del IC1) con mayor riesgo de desarrollar tumor de Wilms. Además, tras la comparativa entre pirosecuenciación y MS-MLPA, se ha llegado a la conclusión que la técnica de MS-MLPA, gracias a su trazabilidad, sencillez y coste-efectividad, es la técnica más adecuada para llevar a cabo estos análisis en la rutina diagnóstica diaria.

Discusión

Síndrome de Tenorio: un nuevo síndrome de sobrecrecimiento

Los síndromes de sobrecrecimiento son un grupo de patologías que afectan al crecimiento humano en diferente grado, y que además incluyen otras características clínicas específicas de cada uno de los síndromes que se engloban dentro de este grupo. Muchos de estos síndromes presentan un solapamiento de las características clínicas entre sí, lo que hace difícil su diagnóstico y hace imprescindible la confirmación de este diagnóstico inicial mediante una prueba molecular. También es posible que algunos pacientes presenten un sobrecrecimiento con características clínicas que no coinciden con ninguno de los síndromes de sobrecrecimiento reconocibles hasta la fecha, lo que sugiere la existencia de otros síndromes de sobrecrecimiento con características específicas o incluso variaciones de un síndrome debido a la elevada heterogeneidad clínica. Es por ello, que se hace fundamental realizar un estudio molecular en aquellos pacientes sin una entidad clínica y molecular reconocible, ya que es muy posible que existan regiones genómicas que aún no están descritas y cuyas alteraciones están relacionadas con patologías que alteran el crecimiento. El conocimiento que se genere de estos estudios, permitirán por un lado, entender el fenotipo que manifiesta el paciente, y por otro lado, ampliar el espectro y reducir la incertidumbre molecular acerca de los síndromes de sobrecrecimiento.

Es por ello que esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la base clínica y molecular de los síndromes de sobrecrecimiento, así como en la búsqueda de genes candidatos a través de tecnologías tales como *microarray*-CGH y secuenciación masiva (NGS) en aquellos pacientes con un sobrecrecimiento no asociado a ningún síndrome reconocible.

En primer lugar, se realizó un estudio, mediante *microarray*-CGH, de una cohorte de 270 pacientes con sobrecrecimiento no sindrómico que habían sido remitidos al servicio de genética del Hospital Universitario La Paz desde el año 2005, siendo capaces de identificar una deleción localizada en el cromosoma 18 (chr18:24,658,770-34,038,769) que incluía 34 genes (Artículo 1, Tabla suplementaria 2), de los cuales se seleccionó el gen *RNF125* para estudiarlo con mayor profundidad, ya que en el año 2007, el grupo de Douglas y col., (77) publicaron un artículo en el que describían una cohorte de seis familias, todas ellas caracterizadas por sobrecrecimiento, discapacidad intelectual y características faciales dismórficas que

presentaban mutaciones en el gen *RNF135*, un gen de la misma familia de *RNF125*, lo que sugería la posibilidad de encontrar mutaciones puntuales en este gen.

Tras el análisis de mutaciones puntuales en la cohorte de pacientes seleccionada, se encontraron tres mutaciones adicionales (p.Met112Ile; p.Ser163Leu; p.Arg174Cys) en tres familias no relacionadas entre sí. En dos de las tres familias esta variante también aparecía en algún familiar y además el fenotipo cosegregaba con la alteración, lo que claramente sugería una correlación entre estas alteraciones y el desarrollo del sobrecrecimiento y las características adicionales de los pacientes.

El gen *RNF125* no había sido relacionado hasta la fecha con sobrecrecimiento y lo único que se conocía sobre su función era la de participar y regular la expresión de otras proteínas en procesos de respuesta inmune a través de la vía de señalización de RIG-I activada por ARN de cadena simple o doble (78, 79). De hecho, varios estudios han relacionado la activación de la vía de señalización de RIG-I después de una infección, como por ejemplo el estudio desarrollado por Luo et al (80), en el que estudian el mecanismo a través del cual, un virus como el bocavirus, regula la sobreexpresión de la vía de RIG-I y la sobreexpresión final del interferón- β mediante la regulación de la expresión de *RNF125*, reduciendo su actividad y por tanto, su ubiquitinización sobre RIG-I, lo que finalmente ocasionará una sobre activación de esta ruta molecular.

Recientemente, otro estudio realizado en células neuronales humanas demostró que la activación de la vía de inmunidad innata mediada por la activación de receptores de tipo TLR (“*Toll-Like receptor*”) está regulada por la vía de señalización de PI3K (81). Esta vía de activación a través de receptores de tipo TLR actúa a través de la vía de RIG-I y MDA5, entre otros, provocando la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B y el factor 3 regulador de la expresión de interferón (IRF3) que inducirán la activación de las proteínas de la vía de interferón que finalmente serán los efectores sobre la infección primaria. Para poder estudiar el mecanismo a través del cual PI3K regula la expresión y la respuesta de esta vía de señalización, los autores utilizaron un compuesto homólogo a un ARN de doble cadena (dsRNA), conocido como poly(I:C), capaz de imitar la activación de la vía por una infección de un virus de ARN de doble cadena. Tras los estudios funcionales, fueron capaces de demostrar cómo la vía de PI3K, específicamente la subunidad p110 α , era capaz de regular positivamente la respuesta inmune a través del receptor TLR3 y muy probablemente de MDA5. MDA5 es otra proteína activadora de la respuesta inmune que, además, está regulada por la expresión de *RNF125*.

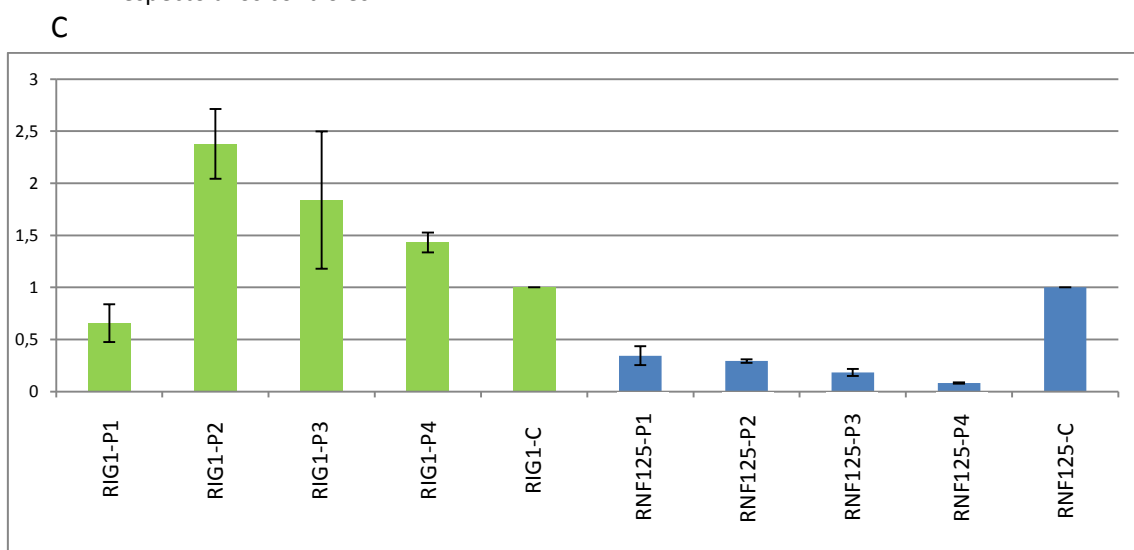
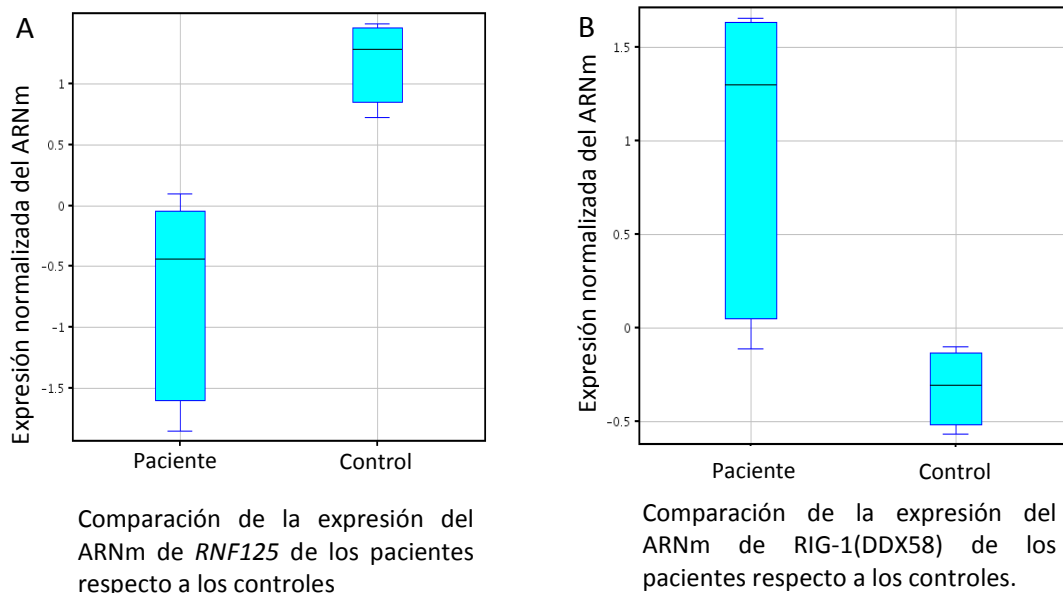


Figura 2. Comparación de la expresión del ARNm de *RNF125* y *RIG-I* en los pacientes respecto a los controles, mediante microarrays de expresión y posterior confirmación por RT-qPCR. A y B) Representación gráfica de la expresión normalizada de *RNF125* y *RIG-I*, respectivamente. C) Representación del cálculo del ddCT, tras tres réplicas independientes de los niveles de expresión del ARNm de *RNF125* y *RIG-I* de los pacientes respecto a un control normal. Vemos como la expresión de *RNF125* está significativamente disminuida en los pacientes y la de *RIG-I* significativamente aumentada respecto a los controles. Como gen de expresión endógena de control se utilizó β -actina.

Éste, al igual que con *RIG-I*, actúa ubiquitinando a *MDA5* para su posterior degradación en el proteasoma y así regular su expresión celular. Este artículo nos permitió correlacionar *RNF125* y la vía de *PI3K*, específicamente en células neuronales, por lo que se hipotetizó que una desregulación a nivel constitucional de este gen está relacionada con la aparición de defectos fenotípicos en la cabeza, como así observamos en nuestros pacientes con mutaciones constitutivas en *RNF125*.

Por ello, se quiso estudiar más en profundidad el mecanismo molecular que subyacía tras la alteración de este gen, por lo que se desarrollaron varios estudios funcionales, que permitieran demostrar el papel patogénico de la alteración de este gen.

Los genes de la familia de *RNF* se caracterizan por tener una estructura y función similar. Las proteínas RNF están formadas por uno o varios dominios “RING FINGER” cuya función está relacionada con la ubiquitinización de otras proteínas para su posterior degradación, un dominio “UIM” (*ubiquitin-interacting-motif*) de autorregulación y uno o varios dominios de unión a ADN o proteínas (C2H2, C2HC) (78, 82, 83). Es por su función de ubiquitinas por lo que también se conoce a estas proteínas como ubiquitinas ligasas E3.

El objetivo en este punto fue el de estudiar la función de ubiquitinización de RNF125 en la vía en la que principalmente actúa, la vía de RIG-I. Se decidió estudiar los niveles de expresión del ARNm de varios de los genes implicados en la vía de RIG-I y que pudieran estar alterados debido a la haploinsuficiencia de *RNF125*, encontrando que existía una clara diferencia en los niveles de ARNm en varios de los genes de la vía de RIG-I, entre el paciente y los controles utilizados (que coincidían en edad, sexo y se habían extraído a la vez, para reducir las variaciones interindividuales, intersexuales y por pipeteo). Se vio además, que los niveles de ARNm de *RIG-I* eran mucho mayores en los pacientes respecto a los controles, lo que claramente demostraba que RNF125 no estaba actuando correctamente marcando a RIG-I para su degradación en el proteasoma, lo que hacía que se estuviera acumulado en el citoplasma y por ende sus niveles fueran superiores a lo que cabría esperar.

Estos datos fueron obtenidos a través de un *microarray* de expresión y se validaron a través una RT-qPCR (Figura 2). Esto suponía que, en los pacientes, en los cuales RNF125 no funcionaba correctamente, la ubiquitinización de RIG-I era menos eficiente y por tanto, RIG-I se estaba ubiquitinando en menor medida, acumulándose una mayor cantidad de ARNm, tal y como se hipotetizó.

El siguiente paso consistía en corroborar estos resultados a nivel proteico, por lo que se diseñó y desarrolló un estudio de proteínas en linfocitos de los pacientes para compararlos con linfocitos de pacientes control. Para ello, tras obtener las células se trataron con poly I:C, un compuesto sintético análogo a un ARN de doble cadena que activa la vía de RIG-I al promover la respuesta inmune mediada por RIG-I (82), y se vio que en las células de los pacientes, este incremento en la respuesta era casi el doble de lo que se veía en las células control (Artículo 1, Figura 2C). También se analizaron las posibles diferencias en la curva de degradación de RIG-I, por lo que tratamos las células con cicloheximida. Claramente se

observó que la tasa de degradación de RIG-I era menor en los pacientes en comparación con los controles (Artículo 1, Figura 2E).

Todos estos resultados concordaban con las observaciones a nivel de ARNm y apoyaban la hipótesis planteada. Tanto la vía de inmunidad mediada por RIG-I como los niveles propiamente dichos de RIG-I estaban alterados en las células de linfocitos de los pacientes, lo que demostró que las mutaciones en *RNF125* provocaban una alteración en la vía molecular de RIG-I en un grado diferente dependiendo de la mutación. El cambio de metionina a isoleucina en la posición 112 genera una haploinsuficiencia mayor en RNF125 respecto a las otras mutaciones. Este cambio se localiza en el dominio C2HC de RNF125, por lo que es posible que esta variación esté impidiendo a la proteína unirse con la molécula de Zinc, necesaria para conferir la funcionalidad de la proteína.

En el caso del cambio p.Ser163Leu, localizado en medio de dos dominios C2H2, su alteración parece afectar únicamente a la posible estructura de la proteína sin alterar un dominio concreto, algo que estaría relacionado con un menor efecto sobre la desregulación de la expresión de RIG-I. La mutación p.Arg174Cys se localiza en el último dominio C2H2 de RNF125, uno de los dos dominios C2H2 de la proteína, y que participan en la unión a DNA, por lo que, al existir dos dominios C2H2, la alteración de uno de ellos afectará en menor medida a la función de la proteína, respecto a alteraciones que puedan ocurrir en dominios únicos, como la p.Met112Ile, que tienen un efecto mayor en la función de la proteína, tal y como han demostrado nuestros estudios funcionales realizados en ARN y proteína.

Estudios recientes han demostrado la importancia de los dominios C2HC y la región comprendida entre los aminoácidos 120-128 es esencial para la actividad de RNF125, tanto en la unión a proteínas de tipo E2 como la potenciación de la actividad de la proteína, respectivamente. Los estudios de mutagénesis dirigida demostraron que la mutación p.M112I (localizado en el dominio C2HC de RNF125), provocaba la pérdida de la actividad ubiquitina ligasa de la proteína. Esto se vio en estudios realizados *in vitro* en los que se comparaba los niveles de actividad ubiquitina ligasa de RNF125 salvaje y diferentes mutantes, dentro de los cuales se incluyó el cambio de metionina en la posición 112 por isoleucina (84).

Así, queda patente la importancia, no sólo del dominio RING, sino del dominio C2HC en la actividad ubiquitina ligasa de esta proteína, ya que la mutación de un solo aminoácido en este dominio provoca una reducción drástica en la ubiquitinización mediada por RNF125.

El siguiente objetivo fue estudiar la relación entre esta vía de RIG-I y el mecanismo molecular por el que los pacientes desarrollaban sobrecrecimiento. Para ello, se revisó la literatura y se vió que, RIG-I, además de activar la vía de respuesta inmune, actúa de inhibidor de HER2, una proteína que forma un complejo con PI3K y AKT, en la vía de crecimiento de PI3K-AKT(85). Además, en células de cáncer de ovario RIG-I regula la expresión de PI3K y MTOR, dos proteínas que participan en vías de crecimiento celular y que han sido ya ampliamente descritas y relacionadas con alteración del crecimiento (6, 86, 87). En el caso de PI3K, el Síndrome de CLOVES (MIM #612918) está causado por alteraciones en el gen *PIK3CA*, un gen de la familia de las quinasas de inositol-fosfato. Además, recientemente se ha visto que una familia aborigen australiana con mutaciones germinales en *MTOR* padecía discapacidad intelectual, dimorfismo facial, macrocefalia y crecimiento acelerado (6). Estas vías también han sido ampliamente estudiadas en cánceres de diferentes órganos, debido a que, muchos de estos cánceres presentan mutaciones somáticas en estas vías de crecimiento celular, lo que pone de manifiesto la estrecha relación entre las vías de crecimiento celular y el desarrollo de tumores. De hecho, en varios tipos de sarcomas se ha observado una desregulación de la vía de AKT/MTOR, tanto en estudios de muestras de pacientes como en estudios *in vitro*, que ponen de manifiesto la hiperactivación de esta ruta molecular en sarcomas tales como liposarcoma (88). Muchos de estos síndromes de sobrecrecimiento tienen una especial predisposición al desarrollo de tumores (89), principalmente localizados en la región abdominal, tales como el tumor de Wilms, el hepatoblastoma o el carcinoma hepatocelular, pero también en cualquier parte del cuerpo como el rhabdomyosarcoma, el linfo-hematológico, el neuroblastoma y el gonadoblastoma, como los más representativos.

Además, estas vías también se han estudiado ampliamente en otros síndromes de sobrecrecimiento que están causados por mutaciones en genes de estas rutas, tales como el síndrome de Weaver (causado por mutaciones en el gen *EZH2*), el síndrome de Proteus (Causado por mutaciones en el gen *AKT1* y el Síndrome de hipoglucemia hiperinsulinémica con hemihipertrofia (causado por mutaciones en el gen *AKT2*). Por ello, decidimos medir los niveles de ARNm de varios de los genes que participan en esta vía, mediante RT-qPCR, SuperArray (Figura. 3) y *microarray* de expresión. Los resultados mostraron claramente una desregulación en la vía de PI3K-AKT, ya que muchos de los genes tenían alterados sus niveles de expresión comparado con los controles (*PIK3R2*, *HSBP1*, *BTK*, *MTOR*, *RIG-I*, *PTEN* y *EIF4G1*) (Artículo 1, Figura suplementaria S4).

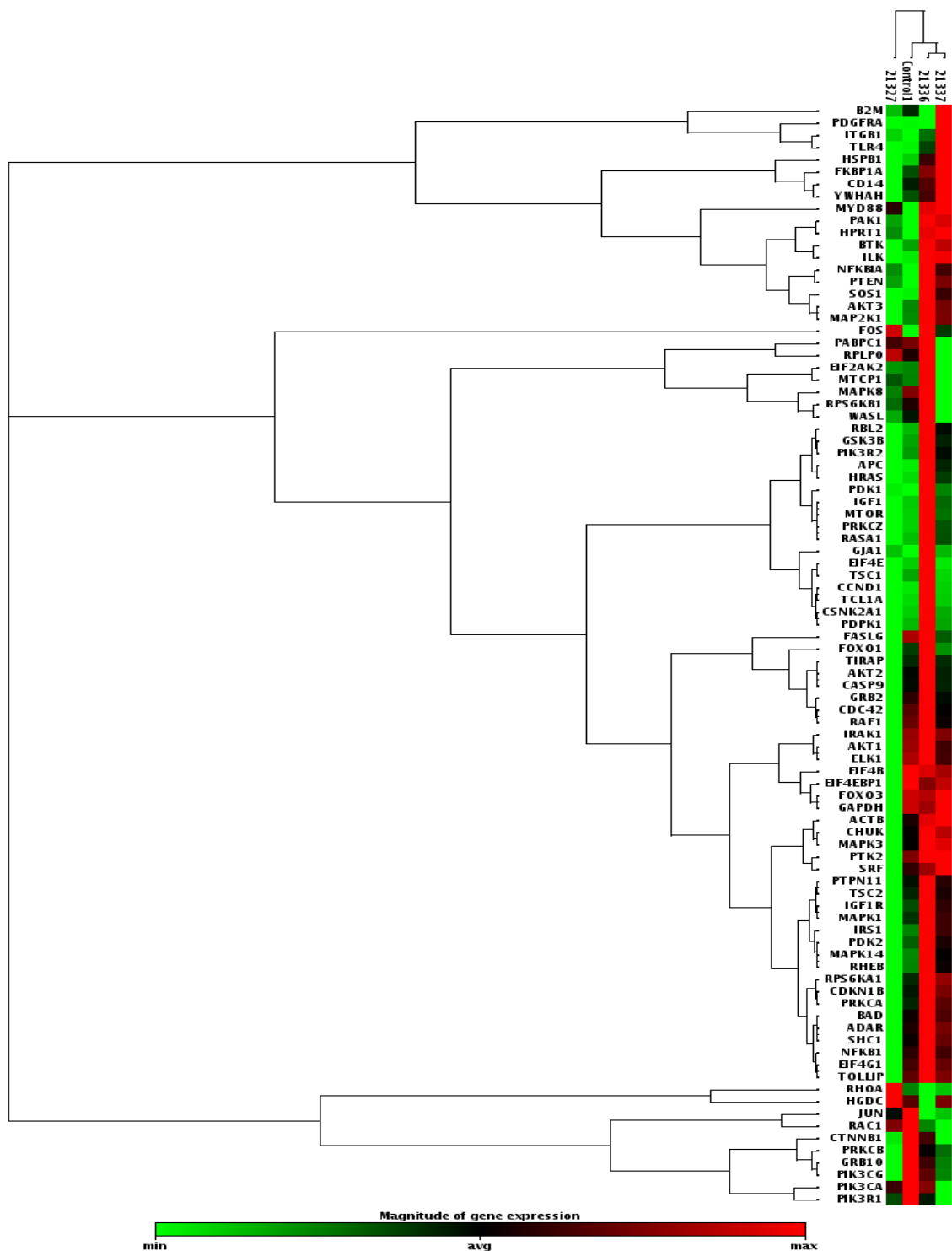


Figura 3. Resultados del SuperArray de expresión de los genes de la vía de PI3K-AKT. Expresión diferencial del ARNm de los genes de la vía de PI3K-AKT. La escala de menor a mayor expresión está representada por colores (verde claro a rojo), respectivamente. Están agrupados en clústeres según sus niveles de expresión comparados con el control.

Estos resultados apoyan nuestra hipótesis y abre un nuevo campo de estudio del sobrecrecimiento y las alteraciones en ubiquitinas. Además, se añadió una clara evidencia en la relación entre el sobrecrecimiento y la vía de PI3K-AKT. Tras la publicación de los resultados, este grupo de pacientes con mutaciones en *RNF125* recibieron el nombre de **síndrome de Tenorio** (MIM #616260) por el Instituto de Medicina Genética McKusick-Nathans a través del OMIM (“Online Mendelian Inheritance in Man”). El resumen de las características clínicas de este síndrome está recogido en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen de las características clínicas del Síndrome de Tenorio asociadas a su código de HPO.

Código HPO	Característica clínica
HP:0000739	Ansiedad
HP:0000938	Osteopenia
HP:0000506	Telecanto
HP:0000445	Nariz ancha
HP:0000303	Prognatismo mandibular
HP:0000463	Narinas antevertidas
HP:0002104	Apnea
HP:0001279	Síncope
HP:0002003	Frente amplia
HP:0001097	Queratoconjuntivitis seca
HP:0001250	Convulsiones
HP:0002020	Reflujo gastroesofágico
HP:0001252	Hipotonía muscular
HP:0002120	Atrofia cerebral cortical
HP:0000270	Retraso del cierre de la sutura craneal
HP:0002090	Neumonía
HP:0000998	Hipertricosis
HP:0100021	Parálisis cerebral
HP:0000158	Macroglosia
HP:0002119	Ventriculomegalia
HP:0000238	Hidrocefalia
HP:0001943	Hipoglucemia
HP:0001249	Discapacidad intelectual
HP:0001288	Alteración en la marcha
HP:0002312	Torpeza
HP:0000256	Macrocefalia
HP:0000574	Ceja gruesa
HP:0000750	Retraso del lenguaje y la comunicación
HP:0002650	Escoliosis

Síndrome de Beckwith-Wiedemann: fisiopatología y relación con la reproducción asistida

Como se ha explicado ampliamente, el BWS es uno de los síndromes de sobrecrecimiento más frecuentes, por lo que ha centrado gran parte del estudio de esta tesis. Está causado principalmente por alteraciones que se localizan en la región 11p15.5. En primer lugar, se recopilaron todos los datos de los 187 pacientes con BWS derivados al servicio de genética desde el año 2005 hasta la actualidad. En ellos se realizó un estudio molecular de las regiones alteradas tanto a nivel genético como a nivel epigenético. La evidencia de la relación entre la reproducción asistida y los defectos epigenéticos ha sido ampliamente detallada por grupos previos (40, 53-56, 90-94), por lo que el presente estudio se centró en comparar, a nivel clínico, molecular y epidemiológico, los pacientes con BWS nacidos por reproducción asistida frente a aquellos que nacieron por reproducción natural.

Aproximadamente se diagnosticaron el 88% (BWS+TRA) y el 74% (BWS+SPONT) de los casos con BWS de ambos grupos, lo que está en concordancia con lo descrito previamente en la literatura, y se ajusta mucho a lo esperado para el diagnóstico de este síndrome.

Claramente observamos un aumento en la frecuencia de reproducción asistida y BWS en nuestra cohorte de pacientes (11% aproximadamente) comparado con la frecuencia de reproducción asistida en la población general (3%). Además, 15 de los 17 pacientes nacidos por reproducción asistida presentaron una hipometilación de la región KCNQ1OT1-TSS-DMR, la causa más frecuente de BWS. En este caso, con una frecuencia mayor de lo que se esperaría (88% frente a un 50% en aquellos pacientes nacidos por reproducción natural), lo que está evidenciando la relación entre los defectos de metilación, con una susceptibilidad mayor del KCNQ1OT1-TSS-DMR, y la reproducción asistida. En el grupo de pacientes con BWS nacidos por reproducción natural, el porcentaje de hipometilación del KCNQ1OT1 TSS DMR fue de 51,43%, un valor que se ajusta a lo descrito previamente (23, 95).

Ninguno de los pacientes con BWS y reproducción asistida presentaron hipermetilación del H19/IGF2 IG DMR, disomía uniparental (UPD) o mutaciones en *CDKN1C*, lo que va en contra de las frecuencias descritas hasta la fecha, pero evidencia el comportamiento diferencial en este grupo.

El estudio global de la metilación, que se realizó por pirosecuenciación y *microarrays* de metilación mediante la plataforma de Illumina conocida como HM450K, demostraron que, aquellos pacientes que nacen por reproducción asistida en comparación con aquellos que

nacieron por una reproducción natural, no tienen una mayor frecuencia de padecer defectos epigenéticos, tanto en locus específicos con una metilación diferencial, como a nivel de metilación genómica global. Por ello, este tema sigue siendo bastante controvertido y todavía no se conoce específicamente si el modo de reproducción podría alterar realmente el patrón de metilación global del genoma (91, 96, 97). Este hecho puede deberse a varios factores, uno de ellos es la posibilidad de que la manipulación de los ovocitos durante el tratamiento de reproducción asistida pueda alterar este patrón de metilación o incluso que el defecto de metilación ya esté presente antes de llevar a cabo la reproducción asistida, pudiendo tener relación con los problemas de fertilidad de la pareja, junto a otros factores (53, 54, 56, 94, 98).

Clínicamente se compararon los parámetros principales observados en este síndrome (Tabla 2 del artículo 2) entre los dos grupos de estudio, incluyendo el estudio de: onfalocele, macroglosia, hemihiperplasia, anomalías en las orejas (pliegue en el lóbulo), defectos abdominales, hipoglucemia postnatal, tumores, *nevus* facial, paladar hendido, defectos genitourinarios, edad ósea avanzada, características faciales dismórficas (tales como hipoplasia mediofacial, estrabismo, proptosis, micrognatia, frente amplia, fisuras palpebrales y rasgos faciales toscos), escoliosis, hipotonía y enfermedad cardíaca congénita. De este análisis se dedujo que aquellos pacientes con reproducción asistida tenían un incremento significativo en la frecuencia de aparición de edad ósea avanzada y de enfermedad cardíaca congénita respecto al grupo de pacientes con reproducción natural. Además, este grupo de pacientes tiene una frecuencia significativamente menor de desarrollar anomalías en las orejas, algo muy característico y representativo de este síndrome, pero que sólo aparece en el 6% de los pacientes con BWS y reproducción asistida, en comparación con el 30% de frecuencia de aparición en aquellos que tienen BWS y reproducción natural.

Además, existen cuatro parámetros al nacimiento que son muy importantes para el diagnóstico en general de los síndromes de sobrecrecimiento y en particular del BWS y son: edad y peso gestacional, longitud y perímetro cefálico. Así pues, al comparar estos valores en los dos grupos de análisis, se pudo concluir que la edad gestacional es menor en aquellos pacientes que nacen por reproducción asistida que en aquellos que nacen por reproducción natural, y que además el peso al nacimiento también es inferior en el grupo nacido por reproducción asistida. Esto se puede explicar porque en el caso de los pacientes nacidos por reproducción asistida muchas veces nos encontramos con embarazos múltiples, hecho que hace que el peso de los fetos durante el embarazo y al nacimiento sea normalmente menor, por lo que parece no tener relación con el tipo de reproducción propiamente.

Tabla 7. Criterios diagnósticos sugeridos por varios autores para el Síndrome de Beckwith-Wiedemann.

Características	Referencias		
	Elliott y cols (41)	DeBaun y Tucker (24)	Weksberg y cols (38)
Criterios mayores	Defecto de pared abdominal anterior -Crecimiento pre o postnatal > p90	-Macroglosia -Peso nacimiento > p90 -Hipoglucemia en el período neonatal -Pliegues o foseas en orejas -Defecto de la pared abdominal (onfalocele, diastasis recti o hernia umbilical)	-Macroglosia -Macrosomía -Hemihiperplasia -Pliegues o foseas en orejas -Defecto de la pared abdominal (onfalocele, diastasis <i>recti</i> o hernia umbilical)
Criterios menores	-Pliegues o foseas en orejas - <i>Nevus flammeus</i> facial -Hipoglucemia -Nefromegalia -Hemihiperplasia		-Tumor embrionario -Visceromegalia abdominal -Malformación renal
Definición de BWS	Al menos 3 criterios mayores o 2 mayores y 3 o más menores	Diagnóstico clínico hecho por un médico con al menos 2 de los 5 criterios	Al menos 3 criterios mayores o 2 mayores y 1 o más menores

Durante el estudio de este grupo de pacientes, se describió una mutación no descrita previamente en *CDKN1C* (c.579delT; p.A193AfsX46) en una familia con varios miembros afectados que presentaban, además de muchas de las características típicas del síndrome, otras que no habían sido descritas hasta la fecha y que se deben tener en cuenta en el diagnóstico de la enfermedad. En concreto, se detectó una delección de una timina en el exón 1 de *CDKN1C*, que codifica el dominio de fosforilación de la proteína. Del estudio bioinformático de esta variante se concluyó que esta alteración era causal de BWS. Estos pacientes presentaban, de modo específico, pérdida neurosensorial de la audición y pliegues supernumerarios en los dedos de las manos, dos características nunca antes descritas en pacientes con mutaciones en *CDKN1C*. También presentaban un crecimiento superior a la media para edad y sexo, paladar hendido, onfalocele, pliegues en el lóbulo de la oreja, lesiones dentales y macroglosia. Estos resultados aparecen ampliamente detallados en el artículo 4.

Otro de los objetivos del estudio del BWS, fue el de crear una guía de consulta del síndrome que pudiera ayudar a todos los profesionales que se dedican al diagnóstico prenatal

de la enfermedad, los puntos a tener en cuenta, las técnicas moleculares de elección y la experiencia en varios centros de diagnóstico prenatal de BWS.

Por ello, en colaboración con grupos europeos de diagnóstico de enfermedades de *imprinting* que realizan el diagnóstico del BWS, se desarrolló una guía de consulta que incluye todos los aspectos necesarios para el diagnóstico, seguimiento y consejo genético de la enfermedad. Esta guía incluyó también al síndrome de Silver-Russell, considerado como el síndrome antagónico del BWS, ya que los pacientes poseen características clínicas y moleculares contrarias al BWS, pero cuyas alteraciones están localizadas en las mismas regiones.

En el artículo 3 se describieron las alteraciones moleculares que podemos encontrar en el BWS, así como el mosaicismo de las mismas, un factor muy importante para la detección de defectos de *imprinting* en mosaico. Este fenómeno de mosaicismo hace fundamental la elección de una técnica molecular robusta que permita detectar niveles de mosaico bajos, ya que ésta es una de las limitaciones a la hora de detectar falsos negativos, que puedan ser debidos a mosaicismos bajos no detectados por la técnica aplicada. En la guía de diagnóstico prenatal publicada, el MS-MLPA es la técnica de primera elección en la mayoría de laboratorios que se dedican al diagnóstico de enfermedades de *imprinting*. Esto es debido a que el MS-MLPA permite estudiar la dosis génica y los patrones de metilación de varias regiones genómicas a la vez, con una fiabilidad muy alta y con un coste relativamente asequible para cualquier laboratorio. De hecho, de los 122 diagnósticos prenatales que se han hecho en los centros participantes de la publicación, 66 (más del 50%) realizaron este diagnóstico a través de MS-MLPA, seguido del *Southern-blot*.

Se estimó el riesgo de recurrencia del BWS, que va a depender del tipo de alteración que se produzca, ya que la recurrencia no será la misma para alteraciones genéticas o epigenéticas. Normalmente, las alteraciones epigenéticas ocurren de manera esporádica, por lo que el riesgo de recurrencia será bajo, a diferencia de las alteraciones genéticas (mutaciones puntuales en *CDKN1C*, reordenamientos, etc...) cuyo riesgo de recurrencia dependerá del alelo afectado. Esto tiene una elevada importancia a la hora de decidir una estrategia reproductiva y de asesoramiento a las familias.

Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel

El Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) es una de las entidades más conocidas dentro del espectro de síndromes de sobrecrecimiento, aunque hasta la fecha no se han descrito más de 250 casos en todo el mundo. Es por ello que no hay mucha información relativa al diagnóstico, seguimiento, detección precoz, recurrencia, implicaciones clínicas, etc... Por ello, decidimos realizar una guía de este síndrome. Hasta la fecha no se había publicado ninguna guía de este tipo para el SGBS, por lo que parecía fundamental desarrollar una. En ella, se describe la nomenclatura adoptada, con todas las variaciones que ha tenido desde que se describió por primera vez en 1975, así como la subdivisión entre el SGBS tipo I y tipo II, que se diferencian tanto en el diagnóstico molecular (no está clara la causa del SGBS tipo II) como en la supervivencia, ya que los pacientes con SGBS tipo II suelen fallecer muy pronto después de nacer debido principalmente a hidropesía fetal.

El SGBS está causado por mutaciones en el gen *GPC3*, aunque el mecanismo molecular a través del cual se supo cómo podía estar causado este sobrecrecimiento fue un tema controvertido. En un principio se creía que el defecto fenotípico estaba causado por una alteración de la vía de IGF-II (99-101), debido a que se creía que *GPC3* se unía a IGF-II inhibiendo su acción, hipótesis que fue posteriormente desmontada ya que experimentos en ratones *knockout* para *GPC3* no presentaban incrementos en los niveles de IGF-II. Por tanto, quedaba claro que el mecanismo de crecimiento y la ruta molecular a través de la cual actuaba *GPC3* no tenía relación con el factor de crecimiento tipo-insulina. Hasta el 2008 no se elucidó el papel específico de *GPC3* cuya alteración causaba un defecto en el crecimiento, a través de un grupo que postuló que *GPC3* actúa como inhibidor de la vía de señalización de *hedgehog* por inhibición competitiva, hecho que confirmaron a través de un experimento en ratones que tenían suprimida la expresión de *GPC3* y en los cuales se apreciaba claramente un aumento de la expresión de la señalización de *hedgehog* (102).

Aunque en el momento de la publicación del artículo 5 se mencionaba que la causa del SGBS tipo II era desconocida, un artículo reciente sugiere que el gen *PIGA* podría ser la causa de la aparición de este síndrome (103). Este gen está localizado en el cromosoma X al igual que el gen *GPC3*, lo que apoyaría que también tenga una herencia ligada al X al igual que el SGBS tipo I. Los autores encontraron una mutación recurrente en el gen *PIGA* (c.1234C>T; p.Arg412*) en tres miembros de dos familias no relacionadas y cuyas manifestaciones clínicas recordaban mucho a los pocos pacientes descritos con SGBS tipo II, ya que, como se ha

mencionado, es un síndrome que suele ser letal. Además, varios estudios parecen sugerir el efecto embrionario letal de las mutaciones germinales del gen *PIGA* (104-107). Así pues, los pacientes con mutaciones en el gen *PIGA* presentan: macrocefalia, elevado peso al nacimiento, hipotonía muscular generalizada severa sin movimientos espontáneos, encefalopatía epiléptica mioclónica resistente a terapia, contracturas en las articulaciones, anomalías cerebrales, características faciales dismórficas tales como cara cuadrada tosca, hipertelorismo, nariz corta con narinas antevertidas, sobrecrecimiento gingival, boca grande, extremidades cortas con falanges cortas, y un pene pequeño. Ninguno de estos pacientes presentaba hemoglobinuria paroxística nocturna, un desorden reconocido por estar causado por mutaciones somáticas en *PIGA*. El gen *PIGA* ("phosphatidylinositol glycan class A") codifica una subunidad catalítica de la enzima GPI-N-acetilglucosamina transferasa que cataliza el primer paso en la en anclaje mediado por GPI. Las proteínas GPI ("Glicosilfosfatidilinositol") son proteínas encargadas de anclar otras proteínas a la membrana plasmática. Además de la mutación recurrente c.1234C>T; p.Arg412*, se han descrito otras 7 mutaciones germinales en *PIGA* (108-110), estableciendo una relación entre la severidad de las manifestaciones clínicas y el efecto funcional de las mutaciones, ya que parece que algunas mutaciones mantienen una función residual de la proteína, lo que reduce el impacto fenotípico a diferencia de las que tienen una menor función residual, en las que el efecto fenotípico es mayor (110). La relación entre el SGBS tipo I y II podría ser el efecto que tendría el no anclaje de la proteína GPC3 a la membrana plasmática mediado por *PIGA*, lo que produce un efecto aguas arriba en la vía de señalización. Hay que tener en cuenta que la deficiencia de *PIGA* afectaría al anclaje de otras muchas proteínas a la membrana plasmática, lo que explicaría la diferencia en las características clínicas y el amplio espectro fenotípico que se encuentra en estos pacientes con mutaciones en *PIGA*.

Tal y como se comenta en el artículo 5, los pacientes con SGBS se caracterizan principalmente por tener un crecimiento acelerado tanto prenatal como postnatalmente, características craneofaciales específicas, incremento en la frecuencia de tumores y anomalías cardíacas y abdominales. La supervivencia de estos pacientes estará principalmente afectada por la aparición temprana de tumores tales como hepatoblastoma, gonadoblastoma y tumor de Wilms, por lo que en los primeros años de vida se deben realizar ecografías abdominales regulares, ya que en los primeros años en cuando la frecuencia de aparición de estos tumores es mayor. Otros parámetros que se deben tener en cuenta en el seguimiento de estos pacientes son las hipoglucemias postnatales, que pueden ocasionar alteraciones del sistema

nervioso, y finalmente las anomalías cardíacas que, aunque en menor medida, también se han descrito en varios casos de SGBS.

El SGBS tiene una herencia recesiva ligada al X, por lo que la penetrancia en hombres es del 100%, siendo desconocida en el caso de las mujeres portadoras de una alteración en *GPC3* (cuatro casos publicados) (111), debido al mecanismo de inactivación del cromosoma X. Entre un 20-30% de las alteraciones que encontramos en el SGBS están causadas por alteraciones *de novo*, y en aquellas en las que existen varios miembros afectados de una misma familia, la madre suele ser portadora de una mutación en *GPC3*.

De los 38 síndromes de sobrecrecimiento o con crecimiento acelerado reconocibles descritos en la introducción de esta tesis, sólo tres tienen una herencia ligada al X: X-frágil, hipoplasia adrenal congénita y el SGBS. Por ello, se deben considerar estas posibilidades a la hora de realizar un diagnóstico diferencial de una genealogía familiar en la que el patrón de herencia sea susceptible de estar ligado al cromosoma X, ya que clínicamente, estos tres síndromes tienen un elevado solapamiento fenotípico; sobre todo entre el SGBS y el X-frágil que comparten las siguientes características clínicas: *pectus excavatum*, escoliosis, deterioro neurológico para el habla, convulsiones, rasgos faciales toscos, macrocefalia, prognatismo mandibular e hipotonía muscular.

Estado de la metilación en los locus DMR19H y KvDMR en pacientes con tumores de Wilms

Como se ha comentado anteriormente, la frecuencia de tumores en pacientes con algún síndrome de sobrecrecimiento está incrementada respecto a la población general. Además, el tumor de Wilms es uno de los tumores más frecuentes en estos síndromes de sobrecrecimiento y específicamente en el síndrome de Beckwith-Wiedemann, por lo que otro de los objetivos que nos planteamos en el artículo 7 fue estudiar la metilación en los loci relacionados con el BWS en aquellos pacientes que presentan tumores de Wilms.

Para ello, se estudiaron mediante pirosecuenciación y MS-MLPA 40 muestras de sangre y tejido tumoral de 40 pacientes con tumor de Wilms, 4 bilaterales y 36 unilaterales. Como sabemos, la mayor frecuencia de tumores en pacientes con BWS se encuentra en el grupo de pacientes que tienen una hipermetilación del centro de *imprinting* 1 (H19/IGF2 IG DMR) o una disomía uniparental paterna del cromosoma 15 (patUPD), con una frecuencia del

30% aproximadamente (22, 27, 112-116), y los que menos frecuencia de aparición tienen son aquellos con hipometilación del centro de *imprinting* 2 (KCNQ1OT1-TSS-DMR) y aquellos que presentan mutaciones en *CDKN1C*, siendo el porcentaje prácticamente anecdótico. Es por ello que de los 34 tumores en los que fuimos capaces de analizar la metilación, el 82% (28/34) presentaban hipermetilación del centro de *imprinting* H19/IGF2 IG DMR, dos pacientes con BWS además, presentaban esta hipermetilación de manera constitucional. De estos 28 pacientes, 16 presentaban hipermetilación aislada y 12 asociada a hipometilación del centro de *imprinting* KCNQ1OT1-TSS-DMR, lo que claramente reflejaba un estado de disomía uniparental. Aproximadamente el 5% de las muestras analizadas presentaron anomalías constitucionales en la metilación de la región 11p15.

Estos resultados concuerdan claramente con lo descrito en la bibliografía previa respecto a la frecuencia de tumores en pacientes con BWS e hipermetilación del centro de *imprinting* 1 y la disomía uniparental. Una explicación plausible para este fenómeno puede deberse a que en el centro de *imprinting* 1 sabemos que *H19* es un gen supresor de tumores que se expresa únicamente en el alelo materno en condiciones normales, a diferencia de *IGF2* que se expresa sólo en el alelo paterno, lo que explicaría que, en los tumores de Wilms con una hipermetilación del centro de *imprinting* 1 (H19/IGF2 IG DMR), ninguna de las dos copias está expresando el RNA supresor de tumores para el que codifica *H19* y además se está expresando en doble dosis el gen que codifica *IGF2*, favoreciendo la vía de crecimiento asociada a Insulina, factores que claramente se pueden relacionar con la aparición de neoplasias. Algunos autores correlacionan la actividad de H19 con la activación del micro RNA mir-675, cuyo complejo parece estar interaccionando con SOX9 que activará la expresión de COL2A1 en condrocitos de cartílago mediante la inhibición del represor de COL2A1 (117).

Regiones asociadas a sobrecrecimiento y discapacidad intelectual

El artículo 6 se centró en el estudio mediante *microarray*-CGH de un grupo de pacientes que presentan alteraciones dismórficas, discapacidad intelectual, hipotonía, retraso en el habla, y principalmente alteraciones en la longitud de la circunferencia de la cabeza, encontrando en todos ellos alteraciones de dosis en la región 19p13.3. Además se realizó una revisión de la bibliografía y de los 14 casos descritos hasta la fecha. Los resultados de este estudio sugieren que la duplicación de esta región está relacionada con la aparición de microcefalia (2 pacientes propios), y por el contrario, la macrocefalia aparece con la delección de esta región (11 pacientes propios). En esta región mínima de solapamiento de 113,5 Kb de

tamaño se localizan tres genes que podrían ser potencialmente causales de estas características clínicas observadas: *MAP2K2*, *ZBTB7A* y *PIAS4*. De entre todos estos candidatos se decidió estudiar más en profundidad el gen *PIAS4*, ya que es una ubiquitina ligasa E3 involucrada en el marcaje mediante ubiquitina de otras proteínas para su degradación en el proteasoma. Ya sabemos, por el artículo 1, que existen otras ubiquitinas ligasas E3 involucradas en el desarrollo de patologías del crecimiento, como ocurre con el gen *RNF125* en el síndrome de Tenorio, por lo que este parece un buen candidato al ser de la misma familia y estar alterado en la región mínima de solapamiento de todos estos pacientes. No obstante, no se encontraron mutaciones puntuales intragénicas en *PIAS4* en pacientes con un fenotipo similar que pueda confirmar nuestra hipótesis. En estudios recientes (118) realizados en pacientes con discapacidad intelectual, retraso en el desarrollo y el habla, macrocefalia, criptorquidismo y anomalías cardíacas se ha visto que presentan una duplicación en la región 7p22.1 que incluye varios genes y entre ellos un gen de la familia de los RNF, en concreto el *RNF216*, una ubiquitina E3 ligasa que actúa de la misma manera que lo hace *RNF125*. Este hecho claramente apoyaría la clara relación entre los defectos moleculares de genes pertenecientes a esta familia de ubiquitina ligasa E3 con los desórdenes del crecimiento y la discapacidad intelectual.

Conclusiones

1. Los síndromes de sobrecrecimiento comprenden un grupo amplio y heterogéneo de patologías cuyas características clínicas pueden solaparse, haciendo fundamental el uso de técnicas molecular para confirmar el diagnóstico. Este diagnóstico molecular, que además de confirmar la sospecha clínica, permite un mejor seguimiento de los pacientes según la patología.
2. Por primera vez se ha descrito un nuevo síndrome de sobrecrecimiento asociado a mutaciones en el gen *RNF125*, que codifica una ubiquitina de tipo E3 ligasa, que actúa principalmente regulando la vía de RIG-I y PI3K-AKT. El fenotipo asociado ha recibido el nombre de Síndrome de Tenorio. Los pacientes con ese síndrome se caracterizan por presentar un crecimiento pre y postnatal por encima de la media para edad, sexo y grupo poblacional, ventrículos alargados, macrocefalia, enfermedades inflamatorias autoinmunes recurrentes, hipoglucemia postnatal y discapacidad intelectual.
3. Los estudios funcionales demostraron que las mutaciones en *RNF125* alteran en diferente medida la función de la proteína codificada por *RNF125*, lo que provoca el aumento de los niveles de RIG-I y la sobre activación de esta vía. Además, también se pudo comprobar a nivel de ARNm que la expresión de muchos genes que participan en la vía de PI3K-AKT está alterada, lo que sugiere un posible efecto fenotípico asociado a la desregulación de esta vía.
4. Se ha estimado que la frecuencia de aparición de una epimutación en la región 11p15.5 en individuos con síndrome de Beckwith-Wiedemann nacidos por reproducción asistida es aproximadamente 7,18 veces mayor que aquellos individuos con síndrome de Beckwith-Wiedemann nacidos por reproducción espontánea. Para la realización de un diagnóstico prenatal del síndrome de Beckwith-Wiedemann, así como del síndrome de Silver-Russell, se deben seguir una serie de recomendaciones que incluyen tener en cuenta la indicación del test, el tejido donde realizar el test, los métodos que se van a utilizar, la interpretación de los hallazgos moleculares, así como las consecuencias y el aspecto ético de los mismos.

5. Se ha descrito una nueva mutación en el gen *CDKN1C* (c.579delT; p.A193AfsX46) en pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann que presentaban, además de características comunes a la enfermedad, pérdida auditiva neurosensorial y pliegues supernumerarios en los dedos de la mano. Estas dos características clínicas tampoco habían sido descritas previamente en pacientes con esta enfermedad, lo que permite mejorar la identificación y el seguimiento clínico de este grupo de pacientes con BWS.
6. Se ha publicado una revisión de todos los aspectos clínicos y moleculares del síndrome de Simpson-Golabi-Behmel, actualizando todos aquellos aspectos descritos recientemente y además se ha sugerido una guía de diagnóstico, seguimiento y consejo genético para este síndrome. Esta guía permitirá no sólo a genetistas clínicos y moleculares, sino a todos los especialistas que tratan a este grupo de pacientes (endocrinólogos, pediatras, oncólogos, cirujanos maxilofaciales, etc..) conocer y mejorar la atención de los mismos.
7. En un grupo de pacientes con una clínica variable que incluye microcefalia/macrocefalia, discapacidad intelectual, desórdenes del espectro autista, retraso en el desarrollo, hipotonía, anomalías cardíacas, retraso en el habla y características faciales dismórficas, se describió un nuevo síndrome de microduplicación/microdelección asociado a la región 19p13.3. En esta región se localizan una elevada cantidad de genes, dentro de los cuales se seleccionó al gen *PIAS4*. Este gen está relacionado con las alteraciones del perímetro cefálico de estos pacientes debido a su función como ubiquitina ligasa de tipo E3. Ésta participa en procesos similares a otras proteínas de la misma familia de las cuales se sabe que sus defectos moleculares causan la aparición de defectos en el perímetro cefálico, entre otros.
8. Tras el estudio molecular de una cohorte de pacientes que presentaban tumor de Wilms, se observó que el defecto molecular más frecuente consistía en una hipermetilación del centro de imprinting 1 (IC1) localizado en la región 11p15.5. Además, el estudio tejido tumoral demostró que el 82% de los tumores presentaban hipermetilación en el IC1, el 12% disomía uniparental paterna, que se traduce en una hipometilación del IC2 e hipermetilación de IC1 y en el 6% restante no se detectaron alteraciones en la metilación de la región 11p15.5.

Bibliografia

1. Malan V, Rajan D, Thomas S, Shaw AC, Louis Dit Picard H, Layet V, et al. Distinct effects of allelic NFIX mutations on nonsense-mediated mRNA decay engender either a Sotos-like or a Marshall-Smith syndrome. *American journal of human genetics*. 2010;87(2):189-98.
2. Kantaputra PN, Kunachaichote J, Patikulsila P. Mental retardation, obesity, mandibular prognathism with eye and skin anomalies (MOMES syndrome): a newly recognized autosomal recessive syndrome. *American journal of medical genetics*. 2001;103(4):283-8.
3. Ivanovich J, Mallory S, Storer T, Ciske D, Hing A. 12-year-old male with Elejalde syndrome (neuroectodermal melanolyosomal disease). *American journal of medical genetics*. 2001;98(4):313-6.
4. Tatton-Brown K, Seal S, Ruark E, Harmer J, Ramsay E, Del Vecchio Duarte S, et al. Mutations in the DNA methyltransferase gene DNMT3A cause an overgrowth syndrome with intellectual disability. *Nature genetics*. 2014;46(4):385-8.
5. Loveday C, Tatton-Brown K, Clarke M, Westwood I, Renwick A, Ramsay E, et al. Mutations in the PP2A regulatory subunit B family genes PPP2R5B, PPP2R5C and PPP2R5D cause human overgrowth. *Human molecular genetics*. 2015;24(17):4775-9.
6. Baynam G, Overkov A, Davis M, Mina K, Schofield L, Allcock R, et al. A germline MTOR mutation in Aboriginal Australian siblings with intellectual disability, dysmorphism, macrocephaly, and small thoraces. *American journal of medical genetics Part A*. 2015;167(7):1659-67.
7. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *American journal of human genetics*. 2001;68(3):577-89.
8. Cohen MM, Jr. Proteus syndrome review: molecular, clinical, and pathologic features. *Clinical genetics*. 2014;85(2):111-9.
9. Costa LS, Zandona-Teixeira AC, Montenegro MM, Dias AT, Dutra RL, Honjo RS, et al. Cytogenomic delineation and clinical follow-up of 10 Brazilian patients with Pallister-Killian syndrome. *Mol Cytogenet*. 2015;8:43.
10. Gray JR, Davies SJ. Marfan syndrome. *Journal of medical genetics*. 1996;33(5):403-8.
11. Levy B, Tegay D, Papenhausen P, Tepperberg J, Nahum O, Tsuchida T, et al. Tetrasomy 15q26: a distinct syndrome or Shprintzen-Goldberg syndrome phenocopy? *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2012;14(9):811-8.
12. Lopez-Gutierrez JC, Lapunzina P. Capillary malformation of the lower lip, lymphatic malformation of the face and neck, asymmetry and partial/generalized overgrowth (CLAPO): report of six cases of a new syndrome/association. *American journal of medical genetics Part A*. 2008;146A(20):2583-8.
13. Spranger J. [Clinical aspects of inborn errors of metabolism. Prenatal diagnosis]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*. 1982;66:254-7.
14. Cohen MM, Jr. A comprehensive and critical assessment of overgrowth and overgrowth syndromes. *Advances in human genetics*. 1989;18:181-303, 73-6.
15. Hoyme HE, Seaver LH, Jones KL, Procopio F, Crooks W, Feingold M. Isolated hemihyperplasia (hemihypertrophy): report of a prospective multicenter study of the incidence of neoplasia and review. *American journal of medical genetics*. 1998;79(4):274-8.
16. Shuman C, Smith AC, Steele L, Ray PN, Clericuzio C, Zackai E, et al. Constitutional UPD for chromosome 11p15 in individuals with isolated hemihyperplasia is associated with high tumor risk and occurs following assisted reproductive technologies. *American journal of medical genetics Part A*. 2006;140(14):1497-503.

17. Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VE, Semple RK, Lindhurst MJ, Sapp JC, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *American journal of medical genetics Part A*. 2015;167A(2):287-95.
18. Kashyap M. Role of insulin-like growth factor-binding proteins in the pathophysiology and tumorigenesis of gastroesophageal cancers. *Tumor Biol*. 2015:1-11.
19. Alessandri JL, Cuillier F, Ramful D, Ernould S, Robin S, de Napoli-Cocci S, et al. Perlman syndrome: report, prenatal findings and review. *American journal of medical genetics Part A*. 2008;146A(19):2532-7.
20. Pastore G, Znaor A, Spreafico F, Graf N, Pritchard-Jones K, Steliarova-Foucher E. Malignant renal tumours incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European journal of cancer*. 2006;42(13):2103-14.
21. Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, Green DM. Epidemiology of Wilms tumor. *Medical and pediatric oncology*. 1993;21(3):172-81.
22. Bliiek J, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, et al. Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Human molecular genetics*. 2001;10(5):467-76.
23. Brioude F, Lacoste A, Netchine I, Vazquez MP, Auber F, Audry G, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome: growth pattern and tumor risk according to molecular mechanism, and guidelines for tumor surveillance. *Hormone research in paediatrics*. 2013;80(6):457-65.
24. DeBaun MR, Tucker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *The Journal of pediatrics*. 1998;132(3 Pt 1):398-400.
25. Lapunzina Badia P, del Campo Casanelles M, Delicado Navarro A, Fernandez-Toral J, Garcia-Alix A, Garcia-Guereta L, et al. [Clinical guide to the management of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome]. *Anales de pediatria*. 2006;64(3):252-9.
26. Tan TY, Amor DJ. Tumour surveillance in Beckwith-Wiedemann syndrome and hemihyperplasia: a critical review of the evidence and suggested guidelines for local practice. *Journal of paediatrics and child health*. 2006;42(9):486-90.
27. Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, Wei C, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Human molecular genetics*. 2001;10(26):2989-3000.
28. Lapunzina P. Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. 2005;137C(1):53-71.
29. Hauge M, Bruserud O, Hatfield KJ. Targeting of cell metabolism in human acute myeloid leukemia - more than targeting of IDH mutations and PI3K-AKT-mTOR signaling? *European journal of haematology*. 2015.
30. Ramasamy TS, Ayob AZ, Myint HH, Thiagarajah S, Amini F. Targeting colorectal cancer stem cells using curcumin and curcumin analogues: insights into the mechanism of the therapeutic efficacy. *Cancer cell international*. 2015;15:96.
31. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(9):22976-88.
32. Duzgun Z, Eroglu Z, Biray Avci C. Role of mTOR in glioblastoma. *Gene*. 2015.
33. Li XY, Wang X. The role of human cervical cancer oncogene in cancer progression. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(6):8363-8.

34. Chang L, Graham PH, Ni J, Hao J, Bucci J, Cozzi PJ, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2015.
35. Yachelevich N. Generalized overgrowth syndromes with prenatal onset. *Current problems in pediatric and adolescent health care*. 2015;45(4):97-111.
36. Fierman AH. Foreword: overgrowth syndromes. *Current problems in pediatric and adolescent health care*. 2015;45(4):95-6.
37. Neylon OM, Werther GA, Sabin MA. Overgrowth syndromes. *Current opinion in pediatrics*. 2012;24(4):505-11.
38. Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith-Wiedemann syndrome. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. 2005;137C(1):12-23.
39. Tenorio J, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Fernandez GM, Segovia M, Perandones C, et al. Clinical and molecular analyses of Beckwith-Wiedemann syndrome: Comparison between spontaneous conception and assisted reproduction techniques. *American journal of medical genetics Part A*. 2016.
40. Chang AS, Moley KH, Wangler M, Feinberg AP, Debaun MR. Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertility and sterility*. 2005;83(2):349-54.
41. Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clinical genetics*. 1994;46(2):168-74.
42. Engstrom W, Lindham S, Schofield P. Wiedemann-Beckwith syndrome. *European journal of pediatrics*. 1988;147(5):450-7.
43. Cohen MM, Jr. Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2005;8(3):287-304.
44. Schneid H, Vazquez MP, Vacher C, Gourmelen M, Cabrol S, Le Bouc Y. The Beckwith-Wiedemann syndrome phenotype and the risk of cancer. *Medical and pediatric oncology*. 1997;28(6):411-5.
45. Pettenati MJ, Haines JL, Higgins RR, Wappner RS, Palmer CG, Weaver DD. Wiedemann-Beckwith syndrome: presentation of clinical and cytogenetic data on 22 new cases and review of the literature. *Human genetics*. 1986;74(2):143-54.
46. Santucci S, Tosi M, Marazzini P, Barp S, Bertoletti A. [Long-term diazoxide therapy of the Beckwith-Wiedemann syndrome with persistent hypoglycemia]. *Minerva pediatrica*. 1982;34(17):721-3.
47. Julien M, Demarquez JL, Vital C. A case of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1982;106(3):154.
48. Goldman M, Shuman C, Weksberg R, Rosenblum ND. Hypercalciuria in Beckwith-Wiedemann syndrome. *The Journal of pediatrics*. 2003;142(2):206-8.
49. Borer JG, Kaefer M, Barnewolt CE, Elias ER, Hobbs N, Retik AB, et al. Renal findings on radiological followup of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *The Journal of urology*. 1999;161(1):235-9.
50. Choyke PL, Siegel MJ, Oz O, Sotelo-Avila C, DeBaun MR. Nonmalignant renal disease in pediatric patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *AJR American journal of roentgenology*. 1998;171(3):733-7.
51. Gardiner K, Chitayat D, Choufani S, Shuman C, Blaser S, Terespolsky D, et al. Brain abnormalities in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;158A(6):1388-94.
52. Romanelli V, Belinchon A, Benito-Sanz S, Martinez-Glez V, Gracia-Bouthelie R, Heath KE, et al. CDKN1C (p57(Kip2)) analysis in Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) patients:

- Genotype-phenotype correlations, novel mutations, and polymorphisms. *American journal of medical genetics Part A*. 2010;152A(6):1390-7.
53. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *American journal of human genetics*. 2003;72(1):156-60.
 54. Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *American journal of human genetics*. 2003;72(5):1338-41.
 55. Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, et al. Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Human reproduction*. 2009;24(3):741-7.
 56. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *Journal of medical genetics*. 2003;40(1):62-4.
 57. Soellner L, Begemann M, Mackay DJ, Gronskov K, Tumer Z, Maher ER, et al. Recent Advances in Imprinting Disorders. *Clinical genetics*. 2016.
 58. Eggermann T, Netchine I, Temple IK, Tumer Z, Monk D, Mackay D, et al. Congenital imprinting disorders: EUCID.net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. *Clinical epigenetics*. 2015;7(1):23.
 59. Kalish JM, Jiang C, Bartolomei MS. Epigenetics and imprinting in human disease. *The International journal of developmental biology*. 2014;58(2-4):291-8.
 60. Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(4):826-40.
 61. Ohlsson R, Nystrom A, Pfeifer-Ohlsson S, Tohonen V, Hedborg F, Schofield P, et al. IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature genetics*. 1993;4(1):94-7.
 62. Sotos JF, Dodge PR, Muirhead D, Crawford JD, Talbot NB. Cerebral Gigantism in Childhood. A Syndrome of Excessively Rapid Growth and Acromegalic Features and a Nonprogressive Neurologic Disorder. *The New England journal of medicine*. 1964;271:109-16.
 63. Cole TR, Hughes HE. Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history. *Journal of medical genetics*. 1994;31(1):20-32.
 64. Ko JM. Genetic syndromes associated with overgrowth in childhood. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*. 2013;18(3):101-5.
 65. Tatton-Brown K, Rahman N. Sotos syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*. 2007;15(3):264-71.
 66. Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Chandler K, Clarke A, et al. Multiple mechanisms are implicated in the generation of 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. *Journal of medical genetics*. 2005;42(4):307-13.
 67. Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Cole TR, Das S, et al. Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *American journal of human genetics*. 2005;77(2):193-204.
 68. Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, et al. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nature genetics*. 2002;30(4):365-6.
 69. Berardi A, Quilici G, Spiliotopoulos D, Corral-Rodriguez MA, Martin-Garcia F, Degano M, et al. Structural basis for PHDVC5HCHNSD1-C2HRN1zp1 interaction: implications for Sotos syndrome. *Nucleic acids research*. 2016;44(7):3448-63.
 70. Pasillas MP, Shah M, Kamps MP. NSD1 PHD domains bind methylated H3K4 and H3K9 using interactions disrupted by point mutations in human sotos syndrome. *Human mutation*. 2011;32(3):292-8.
 71. Bannayan GA. Lipomatosis, angiomatosis, and macrencephalia. A previously undescribed congenital syndrome. *Archives of pathology*. 1971;92(1):1-5.

72. Ruvalcaba RH, Myhre S, Smith DW. Sotos syndrome with intestinal polyposis and pigmentary changes of the genitalia. *Clinical genetics*. 1980;18(6):413-6.
73. Higginbottom MC, Schultz P. The Bannayan syndrome: an autosomal dominant disorder consisting of macrocephaly, lipomas, hemangiomas, and risk for intracranial tumors. *Pediatrics*. 1982;69(5):632-4.
74. Faisal Ahmed S, Marsh DJ, Weremowicz S, Morton CC, Williams DM, Eng C. Balanced translocation of 10q and 13q, including the PTEN gene, in a boy with a human chorionic gonadotropin-secreting tumor and the Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(12):4665-70.
75. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, et al. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Human molecular genetics*. 1999;8(8):1461-72.
76. Lachlan KL, Lucassen AM, Bunyan D, Temple IK. Cowden syndrome and Bannayan Riley Ruvalcaba syndrome represent one condition with variable expression and age-related penetrance: results of a clinical study of PTEN mutation carriers. *Journal of medical genetics*. 2007;44(9):579-85.
77. Douglas J, Cilliers D, Coleman K, Tatton-Brown K, Barker K, Bernhard B, et al. Mutations in RNF135, a gene within the NF1 microdeletion region, cause phenotypic abnormalities including overgrowth. *Nature genetics*. 2007;39(8):963-5.
78. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(18):7500-5.
79. Yang L, Zhou B, Li X, Lu Z, Li W, Huo X, et al. RNF125 is a ubiquitin-protein ligase that promotes p53 degradation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;35(1):237-45.
80. Luo H, Zhang Z, Zheng Z, Ke X, Zhang X, Li Q, et al. Human bocavirus VP2 upregulates IFN-beta pathway by inhibiting ring finger protein 125-mediated ubiquitination of retinoic acid-inducible gene-1. *Journal of immunology*. 2013;191(2):660-9.
81. Peltier DC, Simms A, Farmer JR, Miller DJ. Human neuronal cells possess functional cytoplasmic and TLR-mediated innate immune pathways influenced by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. *Journal of immunology*. 2010;184(12):7010-21.
82. Giannini AL, Gao Y, Bijlmakers MJ. T-cell regulator RNF125/TRAC-1 belongs to a novel family of ubiquitin ligases with zinc fingers and a ubiquitin-binding domain. *Biochem J*. 2008;410(1):101-11.
83. Shoji-Kawata S, Zhong Q, Kameoka M, Iwabu Y, Sapsutthipas S, Luftig RB, et al. The RING finger ubiquitin ligase RNF125/TRAC-1 down-modulates HIV-1 replication in primary human peripheral blood mononuclear cells. *Virology*. 2007;368(1):191-204.
84. Bijlmakers MJ, Teixeira JM, Boer R, Mayzel M, Puig-Sarries P, Karlsson G, et al. A C2HC zinc finger is essential for the RING-E2 interaction of the ubiquitin ligase RNF125. *Scientific reports*. 2016;6:29232.
85. Ou CC, Hsu SC, Hsieh YH, Tsou WL, Chuang TC, Liu JY, et al. Downregulation of HER2 by RIG1 involves the PI3K/Akt pathway in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(2):299-306.
86. Emrick LT, Murphy L, Shamshirsaz AA, Ruano R, Cassady CI, Liu L, et al. Prenatal diagnosis of CLOVES syndrome confirmed by detection of a mosaic PIK3CA mutation in cultured amniocytes. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164A(10):2633-7.
87. Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, Alomari AI, Fishman SJ, Spencer SA, et al. Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. *American journal of human genetics*. 2012;90(6):1108-15.

88. Ishii T, Kohashi K, Iura K, Maekawa A, Bekki H, Yamada Y, et al. Activation of the Akt-mTOR and MAPK pathways in dedifferentiated liposarcomas. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
89. Cardoso LC, Tenorio Castano JA, Pereira HS, Lima MA, Dos Santos AC, de Faria PS, et al. Constitutional and somatic methylation status of DMRH19 and KvDMR in Wilms tumor patients. *Genetics and molecular biology*. 2012;35(4):714-24.
90. Gomes MV, Gomes CC, Pinto W, Jr., Ramos ES. Methylation pattern at the KvDMR in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome conceived by ICSI. *American journal of medical genetics Part A*. 2007;143A(6):625-9.
91. Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, Vermeiden JP, Hennekam RC. Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Human reproduction*. 2007;22(9):2476-80.
92. Rossignol S, Steunou V, Chalas C, Kerjean A, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, et al. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *Journal of medical genetics*. 2006;43(12):902-7.
93. Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN. Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study. *Human reproduction*. 2005;20(4):950-4.
94. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, D JA. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *American journal of human genetics*. 2004;75(3):526-8.
95. Ibrahim A, Kirby G, Hardy C, Dias RP, Tee L, Lim D, et al. Methylation analysis and diagnostics of Beckwith-Wiedemann syndrome in 1,000 subjects. *Clinical epigenetics*. 2014;6(1):11.
96. Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, Hartmann C, Kramer N, Janssen B, et al. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Molecular and cellular probes*. 2007;21(3):208-15.
97. Ehrich M, Zoll S, Sur S, van den Boom D. A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. *Nucleic acids research*. 2007;35(5):e29.
98. Maher ER, Afnan M, Barratt CL. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Human reproduction*. 2003;18(12):2508-11.
99. Budny B, Chen W, Omran H, Fliegau M, Tzschach A, Wisniewska M, et al. A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Human genetics*. 2006;120(2):171-8.
100. Filmus J, Capurro M. The role of glypicans in Hedgehog signaling. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2014;35:248-52.
101. Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, et al. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *The Journal of cell biology*. 1999;146(1):255-64.
102. Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Developmental cell*. 2008;14(5):700-11.
103. Fauth C, Steindl K, Toutain A, Farrell S, Witsch-Baumgartner M, Karall D, et al. A recurrent germline mutation in the PIGA gene causes Simpson-Golabi-Behmel syndrome type 2. *American journal of medical genetics Part A*. 2016;170A(2):392-402.
104. Chen G, Ye Z, Yu X, Zou J, Mali P, Brodsky RA, et al. Trophoblast differentiation defect in human embryonic stem cells lacking PIG-A and GPI-anchored cell-surface proteins. *Cell stem cell*. 2008;2(4):345-55.
105. Keller P, Tremml G, Rosti V, Bessler M. X inactivation and somatic cell selection rescue female mice carrying a Piga-null mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(13):7479-83.

106. Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, Taniuchi I, Ikawa M, Watanabe T, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996;87(9):3600-6.
107. Dunn DE, Yu J, Nagarajan S, Devetten M, Weichold FF, Medof ME, et al. A knock-out model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pig-a(-) hematopoiesis is reconstituted following intercellular transfer of GPI-anchored proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(15):7938-43.
108. Tarailo-Graovac M, Sinclair G, Stockler-Ipsiroglu S, Van Allen M, Rozmus J, Shyr C, et al. The genotypic and phenotypic spectrum of PIGA deficiency. *Orphanet journal of rare diseases*. 2015;10:23.
109. van der Crabben SN, Harakalova M, Brilstra EH, van Berkestijn FM, Hofstede FC, van Vught AJ, et al. Expanding the spectrum of phenotypes associated with germline PIGA mutations: a child with developmental delay, accelerated linear growth, facial dysmorphisms, elevated alkaline phosphatase, and progressive CNS abnormalities. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164A(1):29-35.
110. Kato M, Saito H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, et al. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology*. 2014;82(18):1587-96.
111. Golabi M, Leung A, Lopez C. Simpson-Golabi-Behmel Syndrome Type 1. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
112. Bliet J, Gicquel C, Maas S, Gaston V, Le Bouc Y, Mannens M. Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *The Journal of pediatrics*. 2004;145(6):796-9.
113. Cooper WN, Luharia A, Evans GA, Raza H, Haire AC, Grundy R, et al. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*. 2005;13(9):1025-32.
114. DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *American journal of human genetics*. 2002;70(3):604-11.
115. Engel JR, Smallwood A, Harper A, Higgins MJ, Oshimura M, Reik W, et al. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of medical genetics*. 2000;37(12):921-6.
116. Kuroiwa M, Sakamoto J, Shimada A, Suzuki N, Hirato J, Park MJ, et al. Manifestation of alveolar rhabdomyosarcoma as primary cutaneous lesions in a neonate with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of pediatric surgery*. 2009;44(3):e31-5.
117. Dudek KA, Lafont JE, Martinez-Sanchez A, Murphy CL. Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(32):24381-7.
118. Caselli R, Ballarati L, Vignoli A, Peron A, Recalcati MP, Catusi I, et al. 7p22.1 microduplication syndrome: Clinical and molecular characterization of an adult case and review of the literature. *European journal of medical genetics*. 2015;58(11):578-83.