



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO.**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO.**

**T E S I S**

**ESTUDIO DE METILACIÓN ALELO ESPECÍFICA DE  
SNRPN EN PACIENTES CON HIPOTONÍA CENTRAL  
NEONATAL.**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA.

PRESENTA

**DRA. MARIA DE LOURDES GONZÁLEZ DEL RINCÓN.**

TUTOR:

DRA. GLORIA E. QUEIPO GARCÍA.



MEXICO DF, NOVIEMBRE DEL 2008.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

T E S I S

ESTUDIO DE METILACIÓN ALELO ESPECÍFICA DE *SNRPN* EN PACIENTES  
CON HIPOTONÍA CENTRAL NEONATAL.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA.

PRESENTA

DRA. MARIA DE LOURDES GONZÁLEZ DEL RINCÓN.

---

**D en C. GLORIA QUEIPO GARCIA**  
TUTOR DE TESIS  
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

---

**DRA. SUSANA KOFMAN ALFARO**  
JEFE DE SERVICIO DE GENÉTICA  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Susana Kofman, por todo su apoyo a lo largo de estos tres años, con mucho, mucho cariño.

A la Dra. Gloria Queipo, por tu enorme apoyo cada día, por todas las enseñanzas y sobre todo por tu amistad.

A Javier Pérez Durán, por toda tu ayuda y paciencia, gracias por todas las enseñanzas y todas las horas que dedicaste a éste trabajo, no lo hubiera podido hacer sin ti.

A la Dra. Durán, al Dr. Barragán y a la Dra. Aguinaga, por toda su ayuda con la valoración y referencia de los pacientes.

A la Dra. Garibay por ayudarnos con el seguimiento de los pacientes positivos y con el inicio del tratamiento, que es la verdadera finalidad de todo esto.

A mis papás y a mi hermana: todo lo que soy se lo debo a ustedes, gracias por todo! Los quiero con todo mi corazón.

A Carlos, por tu apoyo incondicional en las buenas y en las malas, te amo.

A los pacientes por su cooperación, a Gaby por su dedicación y apoyo para poder conseguirles el tratamiento a los pacientes, a mis compañeros residentes por toda su ayuda.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
ANTECEDENTES	1
I.    Síndrome de Prader Willi	1
Historia natural	1
Criterios diagnósticos	5
Etiología	6
Opciones terapéuticas	10
II.    Epigenética, impronta genómica y metilación del ADN	11
III.   Pruebas diagnósticas para el síndrome de Prader Willi	13
Hibridación in-situ con fluorescencia (FISH)	13
Genescan para detección de UPD	13
PCR sensible a metilación alelo específica de <i>SNRPN</i>	14
IV.   El niño hipotónico	15
V.    Síndrome de Prader Willi en el niño hipotónico	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Criterios de inclusión	25
Sujetos	25
Método	27
Extracción de DNA de sangre periférica	27
Análisis de pureza y concentración del DNA	27
Técnica de electroforesis	28
PCR metilación específica (ms-PCR)	29
RESULTADOS	34
RESULTADOS MOLECULARES	35
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	41
ANEXO 1: Hoja de llenado de datos	47

## **ANTECEDENTES**

### **I. SÍNDROME DE PRADER WILLI**

El síndrome de Prader Willi (PWS) fue descrito inicialmente en 1956 por Labhart y Willi, los cuales reportaron un síndrome caracterizado por obesidad, talla baja y acromicria que generalmente estaba precedido por hipotonía infantil. En niños y jóvenes se observó hipoplasia escrotal y testículos criptorquídicos. Como antecedente se describió llanto débil, dificultad para la succión y retraso psicomotor, esto aunado a la aparición temprana de Diabetes Mellitus y otras complicaciones relacionadas a obesidad.

Estudios epidemiológicos de individuos con PWS indican una incidencia de aproximadamente 1 en 25,000 (Burd y cols., 1990; Whittington y col., 2001; Butler y cols., 2002; Smith y cols., 2003). Es probable que estos valores se encuentren subestimados, ya que muchos pacientes no son diagnosticados en edades tempranas. Se estima que la incidencia real sea de aproximadamente 1/10,000 a 1/15,000, con una prevalencia de 350,000 a 400,000 a nivel mundial, ocurriendo en ambos sexos y en todos los grupos étnicos. (Goldstone., 2004)

### **HISTORIA NATURAL**

Los pacientes con PWS presentan hipotonía desde el periodo prenatal, la cual se traduce en disminución de la motilidad fetal, presentación anormal durante el parto, un incremento en la necesidad de utilizar técnicas especiales como fórceps e incremento en la necesidad de realizar cesárea.

La hipotonía infantil en el PWS es un hallazgo prácticamente universal, y condiciona disminución en los movimientos espontáneos y letargia, con decremento en el despertar autónomo, llanto débil, disminución en los reflejos y dificultad o debilidad en la succión. La hipotonía en PWS es de origen central y

los estudios neuromusculares, incluyendo la biopsia muscular generalmente se reportan normales o con un patrón inespecífico.

El PWS se caracteriza por hipotonía severa con dificultad en la succión durante el periodo neonatal. Aproximadamente entre los 1 y 6 años de edad la mayoría de los niños desarrollan un apetito insaciable y se vuelven obesos al menos que se les imponga un estricto control dietético. La adquisición de habilidades motoras y del lenguaje están retrasadas. Casi todos los individuos con PWS tienen cierto grado de retraso intelectual que puede variar de limítrofe a retraso mental moderado. La adquisición de nuevo vocabulario puede ser buena, aunque la estructuración de frases suele ser simple y poco compleja.

La hipotonía mejora con el tiempo. Los adultos continúan con una leve hipotonía con disminución de la masa muscular así como del tono muscular. (Cassidy SB y col., 2006)

En ambos sexos existen datos de hipogonadismo, que se manifiesta con hipoplasia genital, desarrollo puberal incompleto, e infertilidad en la gran mayoría de los casos. La hipoplasia genital es evidente desde el nacimiento y se mantiene durante toda la vida. En los varones, el pene puede ser pequeño, y de manera muy característica el escroto es pequeño e hipoplásico, poco rugoso y poco pigmentado. La criptorquidia uni o bilateral se presenta en un 80 a 90% de los varones con PWS. Aunque la hipoplasia genital en mujeres es menos evidente y puede pasar desapercibida, los labios menores y el clítoris generalmente son pequeños desde el nacimiento. El hipogonadismo es de origen hipotalámico y causa un desarrollo puberal incompleto, retrasado y en ocasiones desordenado. En el 20% de los casos se presenta adrenarca precoz. Casi todos los pacientes son infértiles, aunque se han reportado en la literatura dos casos de mujeres con PWS que se han reproducido. (Akefeldt y cols., 1999; Schulze y cols., 2001). Recientemente se ha observado que el hipogonadismo en los niños con PWS es debido a una combinación entre hipogonadismo hipotalámico (baja LH) y periférico (Inhibina B baja y FSH elevada) lo que sugiere un defecto primario en las células de Sertoli y en las células germinales. Se ha demostrado que en pacientes masculinos con PWS

la terapia con hormona de crecimiento estimula la producción de testosterona y por lo tanto la virilización. (Eiholzer Urs y cols., 2006)

En el 90 a 100% de los pacientes se presenta un retraso en el desarrollo psicomotor, adquieren la mayoría de las habilidades, en promedio, al doble de la edad normal (ej. sentarse a los 12 meses, caminar a los 24 meses etc).

Las anomalías cognitivas se hacen muy evidentes para cuando el niño ingresa a la edad escolar. La mayoría de los casos caen dentro de la categoría de retraso mental leve (IQ 60 a 70), 40% tienen retraso mental limítrofe o inteligencia normal disminuida y 20% tienen retraso mental moderado.

Entre el primer y sexto año de vida inicia la hiperfagia, se cree que ésta está condicionada por anomalías a nivel hipotalámico que condicionan una falta de saciedad. Es característica una conducta de búsqueda constante de comida, por lo que es frecuente que los pacientes roben o mientan para conseguirla o conseguir dinero para comprarla, o ingieran productos no comestibles o caducos. La obesidad es producto de este comportamiento aunado a que los pacientes con PWS tienen una tasa metabólica lenta y por lo tanto un requerimiento calórico muy bajo. (Cassidy y col., 2006)

Se han detectado niveles altos de grelina en estos pacientes, que es un secretagogo de la hormona de crecimiento que generalmente se eleva en estados de ayuno prolongado y disminuye con la ingesta de alimentos. ( Butler, Bittel, Talebizadeh et al 2004).

Los problemas del comportamiento son comunes y varían con la edad. Niños entre 3 a 4 años, no manifiestan problemas de conducta, se caracterizan por ser niños risueños, afables y fácilmente confortables.

Entre los 4 a 5 años y hasta aproximadamente los 10 años, en el 70-90% de los casos, aparecen las rabietas, la terquedad, las discusiones. Son niños muy argumentativos, con buena memoria a largo plazo (jamás olvidan algo que se les haya prometido) y de una estructura mental muy rígida (raramente se les hará cambiar de opinión o ceder). En esta edad las



conductas hiperfágicas se agravan a medida que el individuo adquiere mayor independencia, y por lo tanto tienen acceso a la comida con más facilidad.

A partir de los 10 años los principales problemas de conducta se relacionan con la obtención de comida. En la adolescencia los problemas de tozudez se añaden los problemas de hipersensibilidad a las críticas del entorno y una tendencia muy marcada a la baja autoestima. También es frecuente la poca energía (agravada por la obesidad) a menudo estas características propician cuadros depresivos.

Un 5 a 10% de los pacientes adultos presentan cuadros psicóticos.

Para la segunda década de la vida es evidente la talla baja en casi todos los casos, el promedio de talla final sin tratamiento es de 155 cm para varones y 148 cm para mujeres. Las manos y pies generalmente se mantienen por debajo de la percentila 5, con un promedio en la talla del pie en las mujeres de 20.3 cm y para hombres de 22.3.

Las características faciales no suelen estar presentes al nacimiento pero se desarrollan con el tiempo, es frecuente la hipopigmentación generalizada asociada a la delección del gen *P* (las mutaciones homocigotas de este gen se asocian a albinismo oculocutáneo tipo 2) localizado en la región de PWS. Un 60 a 70% de los pacientes presentan estrabismo y 40 a 80% escoliosis.

La calidad de vida depende de los problemas médicos asociados, de los trastornos conductuales y psicóticos que se puedan desarrollar. Las complicaciones de la obesidad son la principal causa de morbilidad y mortalidad. (Camprubí-Sánchez y cols., 2006).

El PWS es considerado como el síndrome genético más común que lleva a la obesidad.

Hay una relación bien documentada de la morbi-mortalidad y la presencia de complicaciones relacionadas con la obesidad en los pacientes con PWS. Las complicaciones más graves incluyen, insuficiencia cardiorrespiratoria, diabetes mellitus (en aproximadamente un 25% de los adultos, con una edad promedio de inicio as los 20 años) y apnea obstructiva

del sueño. Recientemente se reportó que el índice de mortalidad en el PWS es del 3% (Schrandt-Stumpel y cols., 2004; Stevenson y cols., 2004; Butler y cols., 2002) y la causa más frecuente son las complicaciones cardiorrespiratorias.

## CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Los criterios diagnósticos clínicos fueron desarrollados por un consenso antes de la disponibilidad de una prueba de laboratorio sensible y específica (Holm y cols., 1993):

<b>**</b>	<b>Mayores</b>
	Hipotonía neonatal e infantil con dificultad para succión.
	Dificultad para la alimentación y pobre ganancia de peso en la infancia (técnicas especiales de alimentación).
	Ganancia rápida de peso que inicia entre 1 y 6 años, obesidad central.
	Facies característica: diámetro bifrontal estrecho, ojos almendrados, boca en carpa.
	Hipogonadismo / Hipogenitalismo: hipoplasia genital (labios menores y clítoris pequeños / escroto hipoplásico o criptorquidia), pubertad retardada o incompleta, infertilidad.
	Retraso en el desarrollo / retraso mental leve a moderado / dificultad para el aprendizaje.
	Hiperfagia / obsesión por la comida.
	Alteraciones cromosómicas en 15q11-q13.
<b>*</b>	<b>Menores</b>
	Reducción en movimientos fetales y letargia infantil.
	Problemas conductuales característicos: rabietas, terquedad, rigidez, comportamiento obsesivo-compulsivo, robar, mentir.
	Alteraciones del sueño / apneas.
	Talla baja para talla blanco familiar a los 15 años.
	Hipopigmentación.
	Manos y pies pequeñas para talla y edad.
	Patología ocular: esotropía y miopía
	Saliva viscosa.
	Defecto de articulación del lenguaje.
	Pellizcarse, "picarse" la piel.
<b>--</b>	<b>Adicionales</b>
	Umbral para el dolor alto.
	Vómito disminuido.
	Alteración en la sensibilidad a la temperatura.
	Escoliosis o Xifosis.

	Adrenarca temprana.
	Osteoporosis.
	Habilidad inusual con rompecabezas.
	Estudios neuromusculares normales (biopsia muscular, electromiografía)
<b>Criterios mayores = 1 punto.</b> <b>Criterios menores = ½ punto.</b> Se requieren para el diagnóstico: <b>&lt;3 años: 5 puntos</b> , de los cuales 4 deben ser criterios mayores <b>&gt;3 años: 8 puntos</b> , 5 de los cuales deben ser criterios mayores. Adicionales solo incrementan o disminuyen la sospecha diagnóstica.	

**Tabla 1: Criterios diagnósticos de Holm.**

## ETIOLOGÍA

El brazo largo del cromosoma 15 (15q11-q13) contiene un grupo de genes que tienen expresión diferencial dependiendo del origen parental. (Figura 1) Este patrón peculiar de expresión es consecuencia de un proceso llamado impronta genómica (como se comentará más adelante)

La mayoría de estos genes son expresados únicamente en la copia paterna, aunque se han reconocido dos genes que tienen solamente expresión en la copia materna.

La pérdida de expresión de los alelos paterno o materno se traducirá en PWS o Síndrome de Angelman respectivamente.

Los mecanismos moleculares que conducen a PWS son heterogéneos (Figura 2), el 70% de los pacientes son portadores de deleciones en el cromosoma paterno, las cuales son de novo. El segundo hallazgo más frecuente en el PWS es la disomía uniparental (UDP) materna, La minoría de pacientes con PWS tienen 2 cromosomas 15 de origen biparental, pero en realidad, estos son portadores de la misma impronta. Todos estos mecanismos pueden ser detectados por estudios de metilación.

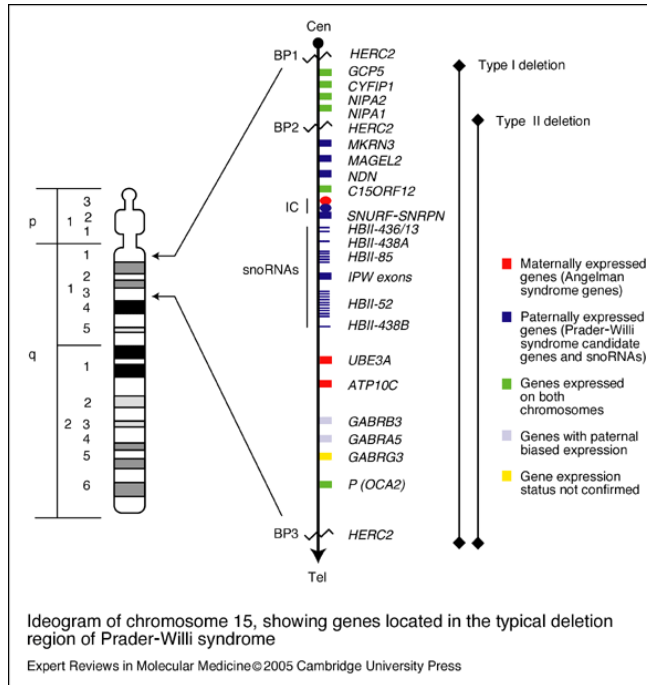


Figura 1: Ideograma del cromosoma 15 mostrando los genes localizados en 15q11-q13 y su expresión diferencial.

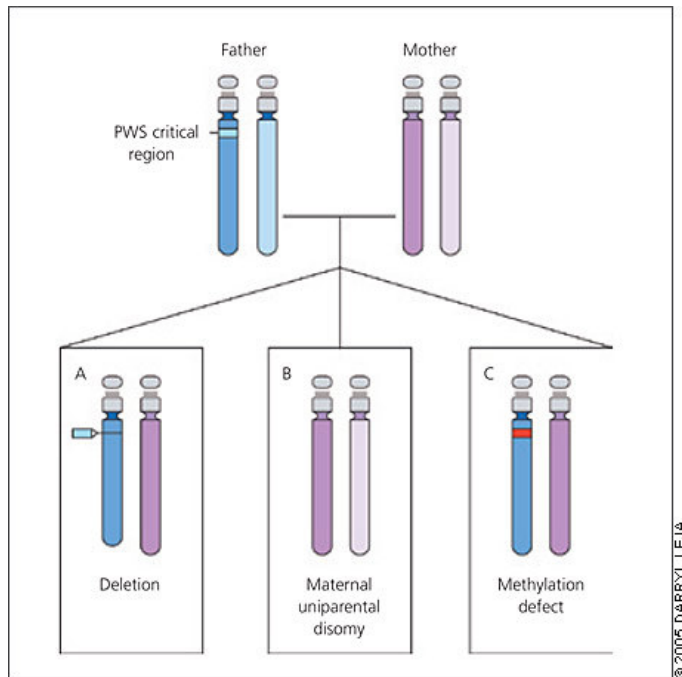


Figura 2: Mecanismos moleculares del Síndrome de Prader-Willi

Las deleciones *de novo* de 15q11-q13 ocurren en aproximadamente 70-75% de los pacientes con PWS; comprenden aproximadamente 4 Mb. La mayoría de estas deleciones ocurren como consecuencia del entrecruzamiento no homólogo entre secuencias de DNA duplicadas que flanquean esta región.

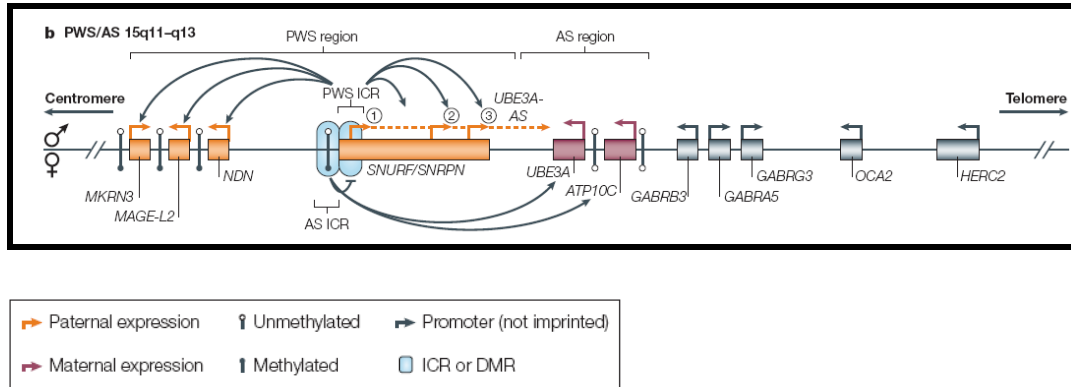
En el 95% de los pacientes con PWS y AS típicamente se han descrito 2 tipos de deleciones las que abarcan la región BP1 (DI5S541) hasta BP3 (DI5S1002) la deleción tipo I se extienden desde BP1 hasta BP3 y la deleción tipo II tiene una extensión de BP2 hasta BP3 (Christian SL, y cols., 1999).

La deleción tipo I es de aproximadamente 5Mb, la deleción tipo II es más pequeña y abarca aproximadamente 500 Kb.

El segundo hallazgo en frecuencia en el síndrome de PWS es la disomía uniparental materna (matUPD). La UPD ocurre cuando un producto recibe ambas copias de un cromosoma o un segmento cromosómico de sólo alguno de los padres. La disomía puede constar de dos copias del mismo cromosoma (isodisomía) o un par de cromosomas homólogos derivados de un mismo progenitor (heterodisomía). En dos tercios de los casos, se debe a un evento primario de no disyunción meiótica seguida por una rescate trisómico, los cuales parecen vincularse a la edad materna avanzada, estos pueden detectarse en un principio como mosaicos trisómicos durante el diagnóstico prenatal, ya sea por estudio citogenético en amniocentesis o en la muestra de biopsia de vellosidades coriales (Horsthemke, 2005).

Algunos pacientes con PWS y AS tienen aparentemente dos cromosomas 15 normales de origen biparental, pero uno de ellos es portador de la misma impronta (marcaje epigenético del genoma de un organismo diploide con respecto a su origen parental). Esto puede ocurrir *de novo* sin mutaciones en el DNA o como consecuencia de una mutación que afecta el centro de control impronta. El 95% de los defectos en el centro de control de impronta (CI) son microdeleciones dentro de *SNRPN*. (Arabella Smith y cols., 2002). La región del CI es una estructura bipartita, el primero es requerido para el mantenimiento de la impronta paterna durante la embriogénesis temprana.

El segundo elemento es requerido para la impronta materna en la línea germinal femenina. (Horsthemke, 2005) (Figura 3).



**Figura 3: estructura bipartita del centro de control de impronta.**

Existen algunas diferencias clínicas entre individuos con PWS con deleción 15q y aquellos con UDP materna. Los individuos con UDP materna, son menos susceptibles a tener una apariencia facial típica, hipopigmentación o habilidades con los rompecabezas (Cassidy y cols., 1995; Gillissen-Kaesbach y cols., 1995); por lo contrario tienen IQ más alto y leves problemas del comportamiento, sin embargo, la psicosis y el autismo son más comunes en estos pacientes. Un reporte sugiere que, individuos con deleciones tipo I, tienen más problemas de comportamiento que aquellos con deleciones tipo II. (Butler y cols., 2004). Datos más recientes sugieren que los pacientes con PWS con deleciones tipo I, tienen un fenotipo más severo que aquellos pacientes que muestran deleciones tipo II, donde se incluyen: comportamiento auto-agresivo, déficits de atención, comportamiento obsesivo compulsivo, dificultades para leer.

Habiéndose realizado el diagnóstico de Síndrome de Prader Willi se recomienda un manejo multidisciplinario. El reconocimiento y la intervención temprana sin embargo, mejoran importantemente el pronóstico y la evolución. (Eiholzar y Whitman 2004; Cassidy y col., 2006).

## OPCIONES TERAPÉUTICAS

TRATAMIENTO	BENEFICIOS	ADVERSOS
<b>Técnicas de alimentación especial</b>	Mejoramiento de la nutrición	
<b>Hormona de crecimiento en la niñez</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Velocidad de crecimiento y talla final</li> <li>↑ Lipólisis</li> <li>↑ Densidad mineral ósea</li> <li>↑ Desarrollo cerebral e IQ</li> </ul>	<b>Intolerancia a la glucosa</b>  <b>Muerte súbita y apneas??</b>
<b>Orquidopexia/ orquidectomía</b>	Prevención del carcinoma testicular	
<b>Modificación de la dieta</b>	Prevención de la obesidad y complicaciones	
<b>Ejercicio</b>	Prevención de obesidad ↑ Fuerza muscular	
<b>Inhibidores de la recaptura de serotonina</b>	Compulsividad por el grataje de piel Depresión o comportamiento agresivo	
<b>Antipsicóticos</b>	Comportamiento agresivo	
<b>Esteroides sexuales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Densidad mineral ósea</li> <li>↑ Índice de fracturas</li> <li>↑ Fuerza muscular</li> </ul>	<b>Estrógenos: riesgo de trombosis</b> <b>Testosterona: comportamiento agresivo e hipertrofia prostática</b>
<b>Topiramato</b>	↓ Grataje de piel	<b>Efectos colaterales neurológicos</b>
<b>Análogos de la Somatostatina</b>	↓ Obesidad	<b>Intolerancia a la glucosa</b> <b>Litos vesiculares</b>
<b>Antagonistas de la gerlina</b>	↓ Disminución de la ingesta de alimentos y obesidad	<b>Efecto incierto</b>
<b>Hormonas intestinales anorexicas (PYY3-36 y polipéptido pancreático)</b>	↓ Disminución de la ingesta de alimentos y obesidad	<b>Efecto incierto</b>
<b>Drogas anoréxigénicas de origen central</b>	↓ Disminución de la ingesta de alimentos y obesidad	<b>Efecto incierto</b>

Tabla 2: Opciones terapéuticas para PWS (Cassidy y cols., genereviews, 2006)

## II. EPIGENÉTICA, IMPRONTA GENÓMICA Y METILACIÓN DEL ADN.

La impronta se ha definido como el marcaje epigenético del genoma de un organismo diploide con respecto a su origen parental. La impronta es un mecanismo epigenético particularmente importante en los mamíferos y parecería estar relacionado en la regulación de la transferencia de nutrientes de la madre al feto y al recién nacido.

El término epigenética se ha definido como “los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN). Así un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. Las modificaciones epigenéticas pueden implicar la metilación de residuos de citosina en el ADN y/o cambios en la estructura de la cromatina que regula la expresión génica.

En el genoma de los vertebrados la única modificación epigenética en la molécula del ADN se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. La mayoría de las 5-metil citosinas (5mC) en el ADN de los mamíferos están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' y en la cadena complementaria en el dinucleótido 3'-GpC-5'.

En las células humanas somáticas humanas, la 5mC constituye el 1% del total de las bases del ADN. La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN, lo cual podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica.

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano. En 98% del genoma, los CpG están presentes en promedio una vez por cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de 200 pb a varias kilobases que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (>60% de CG), denominadas “islas CpG”. Aproximadamente 60 a 90% de



todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG que se localizan en el promotor de la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están.

Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación de *novo* particularmente activa en estos estadios. La metilación de *novo* también puede ocurrir en las células somáticas adultas, un número significativo de las islas CpG son susceptibles de metilación progresiva en ciertos tejidos durante el proceso de envejecimiento o en los procesos neoplásicos. (Camprubí-Sanchez y cols., 2006).

La metilación del ADN constituye un marcador epigenético que identifica la cadena molde durante la replicación del ADN y el origen parental de las regiones improntadas, regula a los transposones, la impronta genómica y la expresión génica. Generalmente la metilación en elementos reguladores de los genes tales como promotores, potenciadores, aislantes y represores suprimen su función. La metilación en regiones no codificantes, como la heterocromatina centromérica, parece ser crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas. También se ha sugerido que la metilación constituya un mecanismo de defensa del genoma contra elementos genéticos móviles (Rodríguez Dorantes y col., 2004).

Los genes improntados presentan características genéticas y epigenéticas comunes, frecuentemente son ricos en islas CpG y cerca o incluso dentro de ellas contienen grupos de secuencias repetidas directas. La modificación epigenética más importante en la impronta es la metilación de dinucleótidos CpG que define regiones con metilación diferencial (DMR las cuales son específicas para cada alelo parental. Los genes improntados también pueden diferir con respecto a la estructura de la cromatina y al estado de acetilación y metilación de las histonas. (Reik W. y cols., 2001).

Los patrones de metilación del ADN son importantes para regular de manera adecuada la expresión de los genes y asegurar un desarrollo normal

del ser humano, por lo que su alteración se relaciona con enfermedad. Algunas enfermedades humanas, como los síndromes de Beckwith Wiedemann y de Prader Willi/Angelman, están asociados con cambios en la dosis funcional de genes sujetos a impronta genómica, y pueden originarse por diferentes mecanismos que incluyen microdelecciones o duplicaciones de la región imprintada, disomia uniparental y alteraciones en los mecanismos de regulación epigenética.

### **III. PRUEBAS DIAGNOSTICAS PARA EL SINDROME DE PRADER-WILLI**

#### **HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)**

Con este estudio se puede detectar el 70% de los pacientes con PWS. El uso de una sonda que hibrida en la región a estudiar permite detectar presencia o ausencia de la región crítica permitiendo detectar los casos originados por delección intersticial o secundaria a una traslocación desbalanceada.

El análisis por FISH es una herramienta sensible y específica para la detección de las delecciones 15q11-q13, encontradas en los pacientes de PWS (Delach y cols., 1994). Sin embargo no detecta aproximadamente un 30% de los casos que no son secundarios a delecciones.

#### **GENESCAN PARA DETECCIÓN DE UPD**

El estudio detecta aproximadamente 20% de los casos. En esta técnica se usan marcadores informativos, para investigar la transmisión del cromosoma 15 de cada padre al niño y determinar si este demuestra herencia biparental o existe UPD.

## PCR SENSIBLE A METILACIÓN ALELO ESPECÍFICA DE *SNRPN* (MS-PCR)

Este estudio es capaz de detectar 99% de los pacientes con PWS. Como ya se mencionó anteriormente existe un estado de metilación diferencial en varios sitios de la región crítica de PWS/AS, en la cual el homólogo materno está metilado, mientras que el homólogo paterno no lo está y por lo tanto se encuentra transcripcionalmente activo. Independiente del mecanismo molecular por el cual se da la enfermedad, existe un sitio diferencialmente metilado en la isla CpG del gen *SNRPN* localizado en la región crítica. Se ha observado que más del 96% de todos los dinucleótidos CpG están metilados en el cromosoma materno, mientras que ninguno, en el cromosoma paterno, esta característica permite realizar un ensayo de PCR metilación específica (MS-PCR) para la detección de PWS y AS.

Con esta técnica, el ADN tratado con bisulfito, induce una modificación química de las citosinas a uracilos excepto cuando las citosinas están metiladas. La 5-metilcitosina es resistente al bisulfito y por lo tanto permanece sin cambios. Esto permite que después del estudio con PCR utilizando primers específicos para la región se observe un patrón de bandas características.

Por consiguiente, un individuo normal mostrará un alelo metilado y otro no metilado, uno producto del cromosoma materno metilado y otro producto del cromosoma paterno no metilado. Los pacientes con PWS, mostrarán únicamente la banda materna y los pacientes con AS mostrarán la banda paterna (Takeo Kubota y cols., 1997; Zeschnick y cols., 1997).

METODO DIAGNOSTICO	ALTERACIÓN DETECTADA	SENSIBILIDAD
Análisis de metilación	Metilación anormal	99%
FISH/ PCR cuantitativa	Delección de PWCR	70%
Disomia uniparental	Disomia uniparental de PWCR	25%
Secuenciación	Defecto en el centro improntador	< 1%

**Tabla 3. Estudios moleculares utilizados para el diagnóstico de PWS. PWCR: Región crítica de Prader-Willi**

#### **IV. EL NIÑO HIPOTÓNICO.**

Con el nombre de lactante hipotónico se identifica sindrónicamente a un grupo de niños cuyos signos dominantes son su escasa motilidad, debilidad muscular e hipotonía generalizadas y evidentes desde el período neonatal. El tono muscular se evalúa valorando la resistencia muscular al estiramiento pasivo. (Bruce O. Berg. *Child Neurology*. 1994). El tono muscular en un neonato o lactante incluye no solo las extremidades sino también el tronco, cuello, espalda y cintura escapular y pélvica.

Clínicamente el tono muscular se divide en dos: fásico (estructuras apendiculares) y postural (estructuras axiales como cuello, espalda y tronco). En un paciente puede existir discrepancia entre el tono fásico y postural, un ejemplo claro es el caso de un lactante que sufrió hipoxia severa, a los 3 – 4 meses de edad presentará hipotonía postural con hipertonía fásica y eventualmente desarrollará espasticidad en músculos tanto apendicularles como axiales. (Bodensteiner, 2008)

La hipotonía es relativamente frecuente y puede reflejar una gran variedad de procesos que afecten el cerebro o cualquier estructura de la unidad motora. Es importante distinguir la hipotonía de la debilidad muscular, ya que en algunos procesos puede existir hipotonía con fuerza muscular conservada.

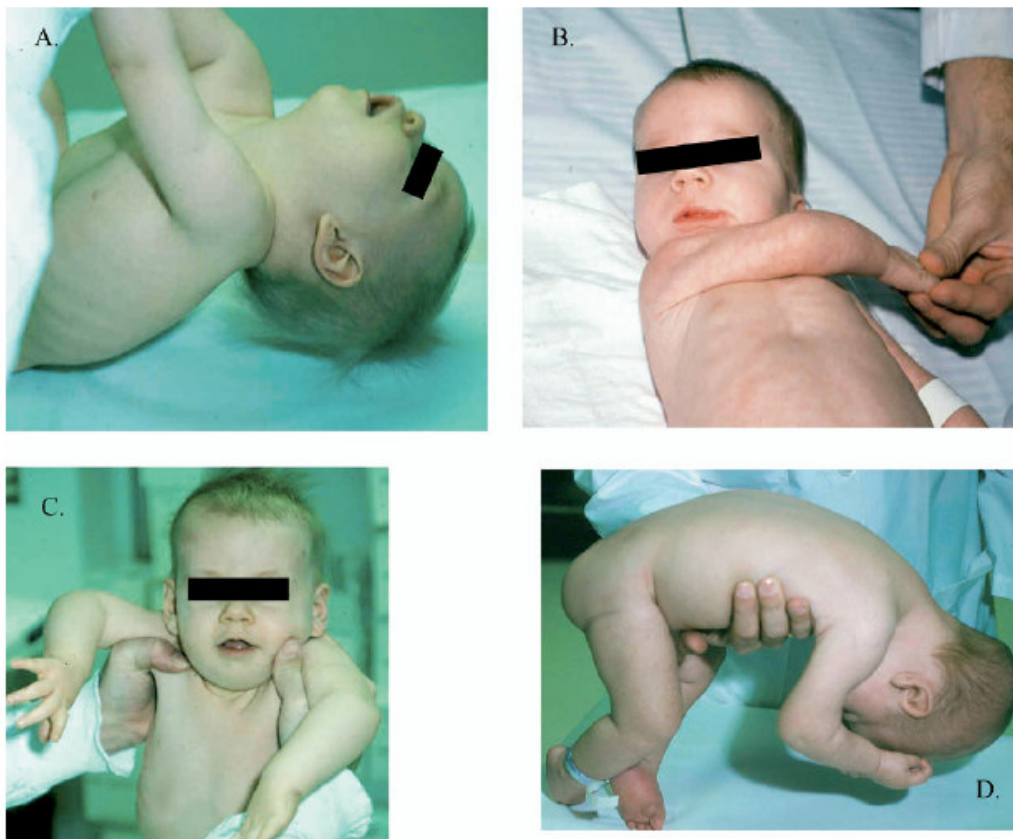
Se puede clasificar en central y periférica. Los desórdenes con hipotonía central son aquellos en los que el sistema nervioso central, incluyendo la médula espinal, están predominantemente afectados; y abarcan principalmente la encefalopatía hipóxico-isquémica, mielodisplasias, desórdenes cromosómicos, desórdenes neurometabólicos y síndromes congénitos, siendo el más frecuente de ellos el síndrome de Prader-Willi. Los desórdenes con hipotonía periférica son aquellos en los que el efecto predominante se encuentra en la unidad motora, e incluyen los siguientes: células del asta anterior, nervio periférico, unión neuromuscular y alteraciones del tono muscular (Laurence P Richer y cols.,2001).

El daño en estructuras centrales como en el cerebro ejerce influencia tanto en estructuras apendiculares como axiales, sin embargo es más evidente en la porción apendicular del sistema motor. Por otro lado las lesiones a nivel de la unidad motora generalmente se acompañan de hiporreflexia o arreflexia.

La evaluación del niño hipotónico es subjetiva y requiere de experiencia en la interpretación de los hallazgos. El niño debe estar en reposo con la cabeza en posición media.

Existen varias maniobras que se ha comprobado que son útiles para evaluar el tono muscular:

- Suspensión ventral: Para evaluar el tono truncal se suspende al bebé deteniéndolo del abdomen con la mano del examinador, los neonatos normales asumen una postura con los miembros en flexión, la espalda rígida y la cabeza viendo hacia el frente, los niños hipotónicos se dejan caer suspendidos de la mano del examinador (Ver Figura 4-D).
- Jalar a sentarse: es una maniobra útil para evaluar el tono axial del cuello y espalda y el tono apendicular de los brazos. Consiste en jalar al niño de las manos de la posición de descanso a la de sentado. La respuesta normal es oponer resistencia, lo cual no sucede en los niños hipotónicos. (Ver Figura 4-A).
- Signo de la bufanda: consiste en tomar la mano del niño en posición supina y cruzarla hacia el hombro del lado opuesto, normalmente el codo llega a la línea media, sin embargo en los niños con hipotonía sobrepasa ésta sin resistencia. (Ver Figura 4-B)
- Suspensión de los hombros: consiste en levantar al niño deteniéndolo por debajo de los brazos, los niños hipotónicos tienden a “resbalar” entre las manos del examinador. (Ver Figura 4-C)



**Figura 4. Maniobras para evaluar hipotonía.**

Habiendo evaluado lo anterior, el siguiente paso en caso de encontrar hipotónico al paciente es evaluar otras dos características (Bodensteiner, 2008):

- Si hay fuerza muscular conservada o disminuida. (Se define fuerza muscular como la resistencia voluntaria máxima al movimiento)
- Reflejos miotáticos, los cuales están presentes en la hipotonía de origen central o supraspinal y disminuidos o ausentes en la hipotonía de origen periférico o segmental con excepción de los síndromes miasténicos.

En base a lo anterior podemos clasificar a los pacientes de acuerdo a si la hipotonía es de origen central o periférico y por lo tanto enfocar las sospechas diagnósticas y el abordaje del paciente. (Ver Tabla)

<b>Origen de la hipotonía</b>	<b>Localización estructural</b>	<b>Condiciones Clínico Patológicas</b>
<b>Supraspinal/ Suprasegmental / Central (ROT's conservados)</b>	Cerebro, Tallo cerebral	Enfermedad sistémica (sepsis, ICC, EHI)
		Hipotonía sindrómica
		Disgenesia cerebral
		Cerebro normal
<b>Segmental o de unidad motora (ROT's disminuidos o ausentes)</b>	Unión craneovertebral	Daño a médula espinal
	Células de asta anterior	Atrofia muscular espinal
	Nervio periférico	Neuropatía sensorial y motora hereditaria.
	Unión neuromuscular	Miastenia gravis, síndromes miasténicos congénitos, botulismo.
	Músculo	Miopatías congénitas, miopatías metabólicas, distrofias musculares de presentación neonatal.

**Tabla 4: Localización de la hipotonía. ROTs: reflejos osteotendinosos, ICC: insuficiencia cardiaca congestiva, EHI: encefalopatía hipóxico isquémica.**

La hipotonía central es por mucho la mas frecuente, y dentro de ella, la causa mas importante son los insultos que afectan al sistema nerviosos central de manera difusa como la sepsis o insuficiencia cardiaca.

Los pacientes que presentan hipoxia perinatal tendrán alteración de la conciencia en el periodo neonatal temprano, pero la hipotonía persiste durante meses, generalmente seguida de espasticidad.

Otra causa de hipotonía central son los errores innatos del metabolismo en los que generalmente se observa una alteración importante del estado de alerta.

Dentro de las causas sindrómicas de hipotonía se encuentran el síndrome de Down, Smith-Lemli-Opitz, el Síndrome de Prader Willi, Coffin-Lowry, Síndrome de Angelman, Marfán y osteogénesis imperfecta entre otros. Es importante buscar de manera intencionada dismorfias asociadas a la hipotonía, en la mayoría de estos síndromes se observará al menos un dato dismorfológico o malformaciones asociadas en algún órgano o sistema (Bodensteiner, 2008), la excepción es el PWS en el que generalmente no se encuentran dismorfias ni malformaciones durante el periodo neonatal sino que suelen desarrollarse con el tiempo.

En la siguiente tabla se muestran las causas más importantes de hipotonía central:

<b>Hipotonía central sindrómica</b>		<b>No sindrómica.</b>
<b>Características</b>	<b>dismórficas,</b>	No dismorfias, ROTs pueden estar disminuidos pero siempre presentes, MRI en los primeros 6 a 8 meses puede demostrar retraso en la mielinización o disgenesia cerebral.
<b>confirmación genética</b>		
<b>Prader Willi, Smith-Lemli-Opitz, Angelman, Down, Sotos, cerebro-oculo-facioesquelético, múltiples síndromes de microdelección, entre otros.</b>		Disgenesia cerebral ( anomalías en el desarrollo cerebral, la mayoría no se consideran malformaciones pero representan alteraciones francas de la formación del SNC)  Cerebro normal: con o sin retraso en la mielinización.

Tabla 5: Hipotonía central. ROTs: reflejos osteotendinosos, SNC: sistema nervioso central.



La hipotonía periférica puede ser causada por múltiples alteraciones a nivel de nervio, unión neuromuscular o músculo. Para evaluarla generalmente es necesario realizar una electromiografía y velocidades de conducción nerviosa y en algunas ocasiones una biopsia muscular, a continuación se resumen las causas mas frecuentes de hipotonía periférica de acuerdo al nivel en donde se presenta a la alteración (Bruce O Berg, 1994):

Médula espinal: Atrofia muscular espinal progresiva, angiomas, hemorragias.

Nervio periférico: Polineuropatía congénita, disautonomía familiar, síndrome de Guillain-Barré.

Unión neuromuscular: Miastenia gravis, síndromes miasténicos, botulismo.

Músculo: distrofias musculares congénitas, miopatías congénitas e inflamatorias.

## **V. SINDROME DE PRADER WILLI EN EL NIÑO HIPOTÓNICO.**

Como se mencionó anteriormente, el síndrome de Prader Willi (PWS) es un complejo síndrome genético causado por la pérdida de expresión del alelo paterno un grupo de genes que tienen expresión diferencial dependiendo del origen parental (impronta) localizados en 15q11-q13. Todos los diferentes mecanismos productores de PWS pueden ser detectados por estudios de metilación alelo específica.

La presentación neonatal del SPW es muy variable, existe fuerte controversia acerca de qué criterios pueden apoyar el diagnóstico en los primeros meses de edad. En neonatos, el PWS es difícil de diagnosticar, dado que la presentación clínica a esta edad difiere de la que se observa posteriormente y las características faciales son muy ligeras y evolucionan con el tiempo, sin embargo la hipotonía siempre está presente (Trifiro G y cols, 2003).

Algunos autores aseguran que se deben realizar estudios genéticos diagnósticos para SPW en todos los niños con hipotonía central sin diagnóstico aun si no cuentan con ninguna otra característica del síndrome (Miller Steven P y cols., 1999; Trifiro G y cols., 2003), sin embargo otros autores consideran que el estudio molecular debe realizarse en pacientes con hipotonía y dificultad para la succión asociada a retraso en el desarrollo (Meral-Gunay-Aygun y cols., 2001), o hipotonía asociada a otros hallazgos como características faciales, falla de medro, poco interés por la comida, termolabilidad, etc. (Fridman y cols., 2000; Oiglane y cols., 2006)

La importancia del diagnóstico temprano (en los primeros meses de vida) radica en evitar otros procedimientos invasivos para el diagnóstico (electromiografía, biopsia muscular, etc), y principalmente para asegurar un manejo temprano y apropiado de estos pacientes (fisioterapia, dieta, asesoramiento genético, grupos de apoyo, tratamiento con hormona de crecimiento, etc) y prevenir importantes complicaciones (Trifiro G y cols., 2003).

Habiéndose realizado el diagnóstico de Síndrome de Prader Willi se recomienda un manejo multidisciplinario. El reconocimiento y la intervención temprana sin embargo, mejoran importantemente el pronóstico y la evolución. (Eiholzar y Whitman 2004; Cassidy 2005).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

El PWS es la entidad genética más frecuente que conduce a obesidad en la infancia, es un padecimiento que se observa frecuentemente en las clínicas de Genética, Pediatría general, Endocrinología y Neurología Pediátrica. Debido a la historia natural, las complicaciones que se presentan y a la oportunidad de poder realizar un tratamiento oportuno, es necesario llegar al diagnóstico preciso de manera temprana, lo que permitirá no solo conocer el comportamiento de la enfermedad en nuestra población sino ofrecer a los pacientes un mejor pronóstico a largo plazo.

La presentación neonatal del PWS es muy variable, la hipotonía neonatal es la única característica constante y todos los demás criterios clínicos se desarrollan posteriormente lo que dificulta mucho el diagnóstico temprano de estos pacientes y por lo tanto rara vez se otorga tratamiento oportuno y prevención de las complicaciones en pacientes con PWS.

## **HIPÓTESIS**

El estudio de metilación alelo específica del gen SNRP en pacientes pediátricos menores de 2 años con hipotonía de causa desconocida, mostrará que un porcentaje importante tienen alteraciones en la metilación de SNRPN y se elaborará un diagnóstico temprano modificando radicalmente los índices de morbi-mortalidad de estos niños. Se mostrará que el tamizaje o “*screening*” en estos casos está indicado para poder establecer un diagnóstico temprano y un manejo adecuado con prevención de complicaciones severas como obesidad y Diabetes Mellitus.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Realizar diagnóstico temprano y de certeza en pacientes con Síndrome de Prader Willi mediante MS-PCR del gen SNRP en niños con hipotonía central de causa desconocida.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Estandarizar el abordaje diagnóstico de los pacientes con síndrome de niño hipotónico.

Comparar lo reportado en la literatura en cuanto al fenotipo neonatal de los pacientes con PWS y los niños mexicanos.

Realizar detección oportuna de SPW con la finalidad de establecer tratamiento oportuno y prevenir las complicaciones asociadas como la obesidad y Diabetes Mellitus tipo II.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes con hipotonía de moderada a severa, de 0 a 2.6 años de edad, que no hayan sido diagnosticados con una patología que pudiera ser causal de la hipotonía.

### SUJETOS:

Las características de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la siguiente tabla:

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	
1.	<p>SEXO: FEMENINO EDAD: 9 MESES</p> 
2.	<p>SEXO: FEMENINO EDAD: 1 MES</p> 
3.	<p>SEXO: FEMENINO EDAD: 7 MESES</p> 

4.	<p>SEXO: FEMENINO EDAD: 10 MESES</p>	
5.	<p>SEXO: MASCULINO EDAD: 2 AÑOS</p>	
6.	<p>SEXO: FEMENINO EDAD: 1 AÑO 7 MESES</p>	<p>No se cuenta con fotografías clínicas de esta paciente</p>
7.	<p>SEXO: MASCULINO EDAD: 1 AÑO 3 MESES</p>	
8.	<p>SEXO: FEMENINO EDAD: 7 MESES</p>	
9.	<p>SEXO: FEMENINO EDAD: 1 AÑO 1 MES</p>	

10.	SEXO: FEMENINO EDAD: 8 MESES		
11.	SEXO: FEMENINO EDAD: 2 MESES		
12.	SEXO: FEMENINO EDAD: 3 MESES		

### **MÉTODO:**

#### **EXTRACCION DE DNA DE SANGRE PERIFERICA**

- Se obtuvo asépticamente 3 ml de sangre periférica.
- Se colocó la sangre en un tubo de ensaye con EDTA.
- Se realizó extracción de DNA con *PerfectPure™ DNA Blood Kit*.

#### **ANÁLISIS DE LA PUREZA Y CONCENTACIÓN DEL DNA.**

- Éste se realizó por medio de análisis espectrofotométrico en el que se determinó la absorbancia de las muestras a dos longitudes de onda (260nm y 280nm).



La lectura de 280 corresponde a las proteínas, y la relación 260/280 nos da la pureza de la muestra. A partir de la lectura a 260nm (correspondiente a los ácidos nucleicos) el equipo (Eppendorf) calcula de manera automática la concentración de la muestra.

Las alícuotas de DNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## **TECNICA DE ELECTROFORESIS**

La electroforesis del DNA es la migración de éste, en base a su carga y al peso al aplicarse un campo eléctrico. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite visualizar la calidad de la muestra (con el uso de tinción con bromuro de etidio), así como la presencia o ausencia de RNA contaminante y para el análisis de productos de PCR por visualización de la banda deseada.

Se realizó bajo el siguiente procedimiento:

Volumen 50ml.

Para calidad de DNA-gel al 1% agarosa.

Para productos de PCR-gel al 1.5% de agarosa.

1. En un matraz Erlenmeyer se disuelve la agarosa en 50 ml de TAE 1X (Tris, Acido acético glacial y EDTA), calentando la mezcla en un horno de microondas (restituir el agua que se pierde por evaporación), dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50°C, colocar 1 gota de bromuro de etidio (0.625 mg / ml) y vaciar en el porta gel.
2. Dejar solidificar en el portagel colocando el peine.

3. Preparar TAE 1X para llenar la cámara.
4. Retirar el peine cuidadosamente para evitar romper los pozos.
5. Colocar el portagel en la cámara de electroforesis y añadir TAE 1X hasta cubrir el gel aproximadamente un milímetro por encima.
6. Mezclar 7ml de producto de PCR con 3 ml de amortiguador de carga.
7. Colocar la muestra en el pozo y utilizar una escalera de 100pb como referencia.
8. Conectar los electrodos a la cámara y encender la fuente de poder a 70 volts.
9. Dejar correr la muestra durante 1 hora (aproximadamente 2/3 del largo del gel de agarosa).
10. Observar en el transluminador de luz ultravioleta.

### **PCR METILACIÓN ESPECÍFICA (MS- PCR).**

**Se realizó ms-PCR siguiendo el protocolo que se muestra a continuación:**

2 mg de DNA. Nota: Se prefiere con buen grado de pureza (libre de proteínas y RNA).

#### **TRATAMIENTO CON BISULFITO**

- Ajustar los 2 mg a un volumen de 20ml. Nota. Ajustar la concentración en el menor volumen posible.
- Adicionar NaOH 3N a una concentración final de 0.3 N.
- 50 °C 20 minutos.
- 95 °C 5 minutos.

- Hielo con agua 3 minutos.
- Solución de Bisulfito pH = 5.

**Nota. Todas las soluciones deben ser de elaboración reciente. Excepto el acetato de amonio.**

1. NaOH 10 N 400 ml
  2. Hidroxiquinoleina 10mM 500 ml
  3. 5.41 gr de bisulfito de sodio se disuelven en 8 ml agua, temperatura de 50 °C
- Adicionar 280 ml de solución de bisulfito.
  - Incubación de 4 horas a 50 – 55 °C.

## DESALINIZACIÓN

- Utilización de QIAEX II. Protocolo de desalinización y concentración de DNA en soluciones.
  - Adicionar 3 volúmenes (reacción de bisulfito) de amortiguador QX1(QIAGEN, 1018326), 2 volúmenes agua y 5 ml QIAX II (perlas). Homogenizar.
  - Centrifugar 1 minuto a 10,000 – 12,000 x g.
  - Decantar, centrifugar y eliminar exceso.
  - Lavar 2 veces con 500 ml de amortiguador PE Wash buffer.
  - Centrifugar 1 minuto a 10,000 – 12,000 x g.
  - Decantar, centrifugar y eliminar exceso.
  - Evaporar por 5 minutos a 50 °C o hasta que el botan este blanco.

- Eluir con 112 ml de H<sub>2</sub>O (50 °C) por 10 minutos.
- Centrifugar 2 minutos a 10,000 – 12,000 x g.

## DESULFONACIÓN

- Recuperar 110 ml del sobrenadante y ajustar a una concentración de 0.3 N de NaOH. Nota: el volumen final de la desalinización debe ser de 111 ml, adicionando 11 ml de NaOH 3 N.
- Incubar a 37 °C por 20 minutos.
- Adicionar 47 µl de Acetato de Amonio 10 M, 1 mg de acarreador y 600 ml de etanol absoluto.

## PRECIPITACIÓN

- Precipitar de 1hr a 16 hrs A –80 °C
- Centrifugar por 30 minutos de 10,000 – 12,000 x g, a 4 °C .
- Lavar con solución de etanol al 75%, 500 ml.
- Centrifugar por 15 minutos de 10,000 – 12,000 x g, a 4 °C.
- Decantar y eliminar el exceso.
- Evaporar por 10 minutos a temperatura ambiente.

NOTA: Todos los reactivos y DNA modificado son fotosensibles, por lo que es necesario protegerlos de la luz.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se amplifican reacciones multiplex del gen de interés (SNRPN materno y paterno) y PCR para un control interno de metilación (promotor de un gen ubicuo, *ABL*).

Cada muestra se realiza por duplicado.

Cada análisis se realiza corriendo:

Control normal

Control positivo (PW, FISH +)

Control blanco

<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer PCR 10X	Buffer PCR 1X
MgCl <sub>2</sub> 25Mm	MgCl <sub>2</sub> 1.5 Mm
dNTPs 0.25 Mm	dNTPs 0.2 mM
Primers 1 Mm	Primers 0.08 mM
BSA 2 mg/ml	BSA 0.2 mg/ml
Tritón 1%	Tritón 0.1%
Taq pololimerasa Gold 5U/ml	0.02 U/ml
H <sub>2</sub> O	---- reacción de 25 ml

DNA para la reacción: 5ml.



## **RESULTADOS**

Se incluyeron 23 pacientes referidos a nuestro servicio con el diagnóstico de hipotonía central neonatal. Todos ellos se volvieron a evaluar detalladamente, se realizó una historia clínica y exploración física dirigida, con especial énfasis en los aspectos que se muestran en el anexo 1 (hoja de llenado de datos).

El segundo estudio clínico eliminó 11 casos, las causas se muestran en la siguiente tabla:

<b>Motivo de exclusión</b>	<b>Número de pacientes</b>
<b>No presentaban hipotonía,</b>	<b>3</b>
<b>Antecedente franco de hipoxia perinatal</b>	<b>3</b>
<b>Hidrocefalia</b>	<b>2</b>
<b>Craneosinostosis</b>	<b>1</b>
<b>Sepsis</b>	<b>1</b>
<b>Atrofia muscular Espinal tipo 1</b>	<b>1</b>

Se estudiaron 12 pacientes de ambos sexos, de 0 a 2.6 años, con hipotonía moderada o severa de origen central y de causa desconocida. Todos ellos mexicanos, referidos de las clínicas de Pediatría, Neurología pediátrica o neonatología del Hospital General de México, el Hospital Infantil de México Federico Gomez y el Instituto Nacional de Perinatología.

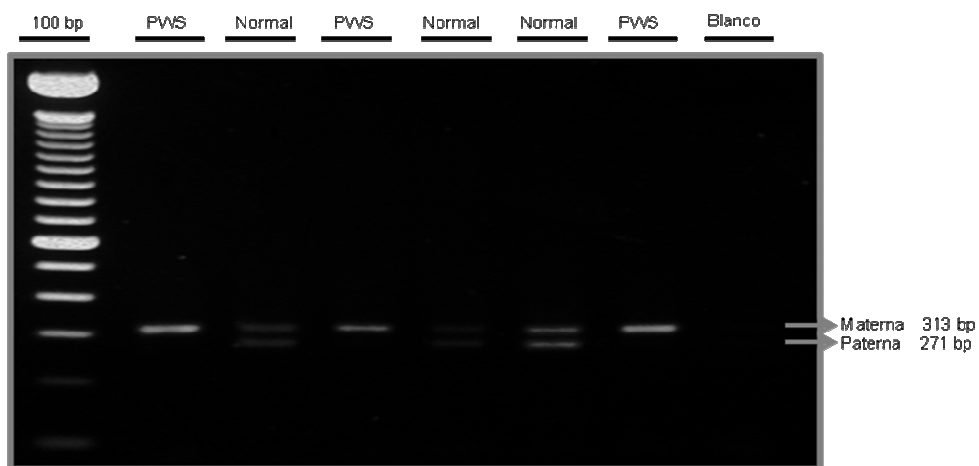
Todos los pacientes fueron evaluados por el servicio de genética, se realizó historia clínica completa, una minuciosa exploración física aplicando los criterios de Holm para diagnóstico de síndrome de Prader Willi.

## RESULTADOS MOLECULARES.

Para determinar el patrón de metilación alelo específica del gen *SNRPN* se realizó estudio de metilación mediante la técnica de modificación de bisulfito de sodio.

Se amplificaron secuencias alelo específicas de *SNRPN* y de *Abl* como control de expresión ubicua.

Se realizó estudio molecular a los 12 pacientes incluidos en la serie. En 5/12 pacientes con hipotonía central se observó únicamente la banda materna de 313 pb, lo que representa un patrón de metilación anormal y compatible con diagnóstico de PWS como se muestra en la siguiente figura:



**Análisis de metilación por modificación con bisulfito de sodio de la región promotora del gen *SNRPN*: gel de agarosa al 1.5%. carril 1:** marcador de peso molecular (escala 100 pb) . **carriles 2, 4 y 7:** pacientes sometidos a MS-PCR en los que solo se observa amplificación del alelo materno (metilado, 313 bp) con un patrón compatible con el diagnóstico de Síndrome de Prader Willi; **carriles 3, 5 y 6:** MS-PCR en los que se observa un patrón de metilación normal, caracterizado por la amplificación del alelo materno (metilado, 313 bp) y paterno (no metilado, 271 bp) ; **carril 8:** blanco.

5 DE 12 (41.6%) DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS HASTA EL MOMENTO FUERON DIAGNOSTICADOS CON SÍNDROME DE PRADER WILLI.

Las características clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio, así como el resultado del estudio molecular se muestran en la siguiente tabla:



<b>CRITERIOS DE HOLM PARA DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE PRADER WILLI</b>													
<b>INICIALES</b>		SDJS	PCA	AAV	RRM	RMT	CMR	SZZ	CMMR	LSV	EVG	EGM	MNMV
<b>SEXO</b>		FEM	FEM	FEM	FEM	MASC	FEM	MASC	FEM	FEM	FEM	FEM	FEM
<b>EDAD</b>		9M	1M	7M	11M	2A	1A7M	1A3M	7M	1A	8M	2M	3M
<b>NUMERO</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>**</b>	<b>Mayores (1 punto)</b>												
	Hipotonía neonatal e infantil con dificultad para succión.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dificultad para la alimentación y pobre ganancia de peso en la infancia (técnicas especiales de alimentación).	+	+			+	+		+	+			
	Ganancia rápida de peso que inicia entre 1 y 6 años, obesidad central.					+				+			
	Facies característica: diámetro bifrontal estrecho, ojos almendrados, boca en carpa.	+		+	+	+	+						+
	Hipogonadismo / Hipogenitalismo: hipoplasia genital (labios menores y clítoris pequeños / escroto hipoplásico o criptorquidia), pubertad retardada o incompleta, infertilidad.					+							
	Retraso en el desarrollo / retraso mental leve a moderado / dificultad para el aprendizaje.	+			+	+	+			+	+		
	Hiperfagia / obsesión por la comida.					+				+			
	Alteraciones cromosómicas en 15q11-q13.												
<b>*</b>	<b>Menores (1/2 punto)</b>												
	Reducción en movimientos fetales y letargia	+	+	+	+	+		+	+	+			

	Problemas conductuales característicos: rabieta, terquedad, rigidez, comportamiento obsesivo-compulsivo, robar, mentir.							+					
	Alteraciones del sueño / apneas.	+		+	+		+						
	Talla baja para talla blanco familiar a los 15 años.												
	Hipopigmentación.		+										
	Manos y pies pequeñas para talla y edad.	+				+	+			+			
	Patología ocular: esotropía y miopía	+	+		+	+	+		+			+	
	Saliva viscosa.				+								
	Defecto de articulación del lenguaje.												
	Pellizcarse, "picarse" la piel.												
--	<b>Adicionales</b>												
	Umbral para el dolor alto.					+							
	Vómito disminuido.	+		+	+	+		+					
	Alteración en la sensibilidad a la temperatura.					+							
	Escoliosis o Xifosis.												
	Adrenarca temprana.												
	Osteoporosis.												
	Habilidad inusual con rompecabezas.												
	Estudios neuromusculares normales (biopsia muscular, electromiografía)					+							
<b>TOTAL</b>		6.5	3.5	3	5	8.5	5.5	2	3	6	2	1.5	2
<b>DX. MOLEC</b>		PW +	PW-	PW-	PW -	PW +	PW -	PW -	PW -	PW+	PW-	PW+	PW +

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:**

El PWS constituye la causa más frecuente de obesidad de origen genético. Esta compleja patología con frecuencia presenta un diagnóstico clínico difícil, con bases genéticas y moleculares muy heterogéneas. Esta enfermedad ha servido como un modelo interesante para poder describir y entender varios aspectos moleculares como la disomía uniparental y la impronta genómica. Se calcula que a nivel mundial hay 350,000 a 400,000 afectados (Bittel y cols., 2005). El PWS se considera, una de las afecciones genéticas y uno de los síndromes de microdelección más frecuentes; fue la primera patología en la que se reconoció la microdelección, UDP y la impronta genómica. La participación y la importancia de la impronta y de la UPD se estableció al demostrar que una afección genética con un fenotipo completamente diferente como el Síndrome de Angelman, se producía con la presencia de una microdelección que también comprometía al segmento 15q11-q13, pero en el cromosoma de origen materno o bien cuando existía una UDP paterna.

Durante los últimos dos años se han referido al servicio de genética un total de 23 pacientes por hipotonía de causa desconocida, sin embargo 3 de ellos en realidad no estaban hipotónicos y 9 presentaban una causa franca para el cuadro de hipotonía por lo que se excluyeron del estudio. Es importante realizar una evaluación clínica detallada de estos pacientes para poder determinar si realmente existe hipotonía o solo fuerza muscular disminuida, si es central o periférica y si puede ser explicado por algún antecedente como hipoxia perinatal o sepsis.

Finalmente incluimos en el estudio un total de 12 pacientes con hipotonía moderada a severa de origen central y de causa desconocida, 10 de sexo femenino (83%) y 2 de sexo masculino (17%), todos entre cero y 24 meses de edad y de grupo étnico mestizo-mexicano. A todos ellos se les realizó estudio molecular para diagnóstico de PWS, 5 pacientes (41.6%) presentaron un patrón de metilación anormal, compatible con PWS; 4 de ellos de sexo femenino y uno de sexo masculino.

Las edades de los pacientes al momento de la valoración y diagnóstico fueron: 9 meses, 2 años, 1 año 1 mes, 2 meses y 3 meses, con un promedio de 10.2 meses al diagnóstico.

Sus puntajes en los criterios de Holm fueron: 6.5, 8.5, 6, 1.5 y 2, con un promedio de 4.9 comparado con un promedio de 3.43 en el grupo de los pacientes cuyo estudio molecular no fue compatible con PWS. Cabe señalar que los pacientes que presentaron los puntajes mas altos dentro del grupo de PWS fueron aquellos de mas edad: 6.5 puntos – 9 meses, 8.5 puntos – 2 años, 6 puntos – 1 año 1 mes, 1.5 puntos – 2 meses y 2 puntos – 3 meses, lo cual concuerda con lo reportado, ya que los pacientes desarrollan las características asociadas con el tiempo, pero en los primeros meses de vida solo presentan hipotonía con o sin dificultad para la succión.

En base a lo anterior podemos concluir que los criterios de Holm no son útiles para el diagnóstico durante los primeros meses de vida, observamos que la diferencia en puntaje entre el grupo de pacientes con PWS y sin PWS es bajo, y en ambos grupos el puntaje promedio es por debajo de 5 que es lo que se requiere para realizar al diagnóstico clínico en menores de 3 años; esto se explica ya que como se ha mencionado los pacientes con PWS no presentarán otros signos de la enfermedad además de la hipotonía; por otro lado, dada la importancia de poder realizar un diagnostico temprano como ya mencionamos para poder prevenir complicaciones y otorgar tratamiento oportuno es importante contar con el diagnóstico molecular para poderlo realizar en éstos pacientes antes de que desarrollen una clínica franca de la enfermedad.

Previamente se había reportado en la literatura que aproximadamente un 30 – 45% (Richer y cols., 2001, Fridman y cols., 2000) de los pacientes con hipotonía central de causa desconocida tienen PWS, en ésta serie nosotros encontramos un 41 % de pacientes positivos, lo que nos indica que el beneficio de realizar esta prueba a manera de *screening* en pacientes hipotónicos es alto y sobrepasa el costo de la prueba.

Consideramos que es de suma importancia realizar diagnóstico molecular para síndrome de Prader Willi en pacientes con hipotonía neonatal como prueba de *screening* ya que es el único modo de establecer el diagnóstico a tiempo para iniciar el tratamiento como el reemplazo con Hormona de Crecimiento y prevenir complicaciones como la obesidad, diabetes, hipertensión, etc.

Se ha reportado que el tratamiento con hormona de crecimiento (GH) en pacientes con PWS mejora el IQ, los patrones de comportamiento, la talla final, y aumenta la masa magra disminuyendo la masa grasa, incluso algunos reportes refieren que mejora la hipotonía.

Existen pocos reportes de tratamiento temprano con GH, sin embargo, dado que los que existen son muy prometedores, consideramos que mientras mas temprano sea el diagnóstico y mas temprano el inicio del tratamiento el pronostico de éstos pacientes mejorara de manera franca.

Es necesario estudiar a un número mayor de pacientes para poder evaluar de manera certera la frecuencia de presentación de éste síndrome en el grupo de los neonatos hipotónicos.

## **REFERENCIAS**

**Akefeldt A**, Tornhage CJ, Gilbert C (1999) A woman with Prader-Willi syndrome gives birth to a healthy baby girl. *Dev Med Child Neurol* 41:789-90

**American College of Medical Genetics** (1997) Diagnostic testing for Prader-Willi and Angelman syndromes: Report of the ASHG/ACMG test and technology transfer committee

**Bittel Douglas**, Butler Merlin G (2005) Prader-Willi syndrome: Clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expertreviews in molecular medicine*: 7(14); 1-19

**Bodensteiner JB** (2008) The evaluation of hypotonic infant. *Semin Pediatr Neurol* 15:10-20

**Bruce O Berg** Ed. *Child Neurology: A clinical manual*, second edition. Lippincott. 1994: 279- 287.

**Burd L**, Vesely B, Martsolf J, Kerbeshian J (1990) Prevalence study of Prader-Willi syndrome in North Dakota. *Am J Med Genet* 37:97-99

**Butler JV**, Whittington JE, Holland AJ, Boer H, Clarke D, Webb T (2002) Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi syndrome: a population- based study. *Dev Med Child Neurol* 44:248-55

**Butler MG**, Bittel DC, Kibiryeveva N, Talebizadeh Z, Thompson (2004) Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics* 113:565-73

**Butler MG**, Bittel DC, Talebizadeh Z (2004) Plasma peptide YY and ghrelin levels in infants and children with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 17:1177-84

**Butler MG**, Fischer W, Kibiryeve N, Bittel D (2008) Array comparative genomic hybridization analysis in Prader Willi syndrome. *Am J Med Gen Part A* 146A: 854-860

**Camprubí-Sanchez C.** Gabau-Vila E, Artigas-Palleres J (2006) Del diagnóstico clínico al diagnóstico genético de los síndromes de Prader Willi y Angelman. *Rev Neurol*; 42 (Supl 1): S61-67

**Cassidy SB**, Forsythe M, Heeger S, etc (1995) Phenotypic differences between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am J Hum Genet* 57 Suppl:A20

**Cassidy SB**, Schwartz S (2006) Prader-Willi syndrome. *Genereviews.* [www.Genetests.org](http://www.Genetests.org)

**Christian SL**, Robinson WPP, Huang B et al (1995) Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome Patients. *Am J Hum Genet*:57; 40-48

**Eiholzar U**, l'Allemand D, Rousson V, Schlumpf M, Gasser T (2006) Hypotalamic and gonadal components of hypogonadism in boys with Prader Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:892-898

**Eiholzer U**, Whitman B (2004) A comprehensive team approach to the management of patients with Prader-Willi syndrome. *J. Pediatr Endocrinol Metab* 17:1153-75

**Eiholzer Urs**, Meinhardt U, Rousson V, Petrovic N (2008) Developmental profiles in young children with Prader-Labhart-Willi syndrome: effects of weight and therapy with growth hormone and coenzyme Q10. *Am J Med Gen Part A* 146A: 873-880

**Fridman Cintia**, Kok Fernando, Koiffmann Célia (2000) Hypotonic infants and the Prader-Willi syndrome. *J Pediatr*; 76(3): 246-50

**Goldstone Anthony P.** (2004) Prader Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends in endocrinology and metabolism*; 15; 1 : 12-19

**Guillessen-Kaesbach G**, Gros S, Kaya-Weterloch S, Passarge E, Horsthemke B (1995) DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 32: 88-92

**Gunay-Aygun M**, Schwartz S, Heeger S, O'Riordon MA, Cassidy SB. (2001) The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics*; 108:E92

**Holm VA**, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswang LR, Whitman BY (1993) Prader-Willi syndrome: Consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 91:398-402

**Horsthemke Bernhard** (2005): Prader-Willi Syndrome and Angelman Syndrome. *Encyclopedia on life sciences* 1-4

**Hoybe C** (2004) Endocrine and metabolic aspects of adult Prader-Willi syndrome with special emphasis on the effect of growth hormone treatment. *Growth Horm IGF Res* 14:1-15



**Ledbetter, D. H.;** Riccardi, V. M.; Airhart, S. D.; Strobel, R. J.; Keenan, B. S.; Crawford, J. D. (1981) : Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *New Eng. J. Med.* 304: 325-329.

**Li E,** Beard C, Jaenisch R (1993): Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366; 362-365

**Meral-Gunay-Aygun,** Stuart Schwartz, Shauna Heeger, Suzanne B Cassidy. (2001) The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics*; 108(5):E92

**Miller Steven P,** Riley Patricia, Shevel M I (1999) The neonatal presentation of Prader Willi syndrome: revisited. *J Pediatr*; 134:226-228

**Oiglone- Shlik Eve,** Zordania Riina, Varendi Heili, Anston Anne (2006) The neonatal phenotype of Prader-Willi syndrome. *An J Med Genet Part A* 140A:1241-1244

**Ozcelik T,** Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* 2:265-9

**Prader, A.;** Labhart, A.; Willi, H. (1956): Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach Myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz. Med. Wschr.* 86: 1260-1261

**Reik W,** Walter J. (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Rev. Genet.* 2 ,21-32

**Richer Laurence P,** Michael I Shevell, Miller Steven P (2001) Diagnostic Profile of neonatal hypotonia: an 11 year study. *Pediatr Neurol*; 25:32-37

**Robertson Keith D.** (2005): DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*: 6; 597-610

**Rodríguez Dorantes Mauricio**, Nelly Téllez Ascencio, et al (2004) Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev invest Clin* : 56(1):56-71

**Schrander-Stumpel CT**, Curfs L, Sastrowijoto P, Cassidy SB (2004) Prader-Willi syndrome: Causes of death in an international series of cases. *Am J Med Genet* 124A:333-338

**Schulze A**, Mogensen H, Hamborg-Petersen B, Graem N, Ostergaars JR, Brondum-Nielsen K (2001) Fertility in Prader-Willi syndrome: a case report with Angelman syndrome in the offspring. *Acta Paediatrica* 90:455-9

**Smith A**, Egan J, Ridley G, Haan E, Montgomery P, Williams K, Elliott E (2003) Birth prevalence of Prader-Willi syndrome in Australia. *Arch Dis Child* 88: 263-264

**Stafler P**, Wallis C (2008) Prader Willi syndrome: who can have growth hormone?. *Arch Dis Child*; 93: 341-345

**Stevenson DA**, Anaya TM, Clayton-Smith J, Hall BD, van Allen MI, Zori RT, Zackai E, Frank G (2004) Unexpected death and critical illness in Prader-Willi syndrome .Report of ten individuals. *AmJ Med Genet* 124A:158-164

**Tauber M**, Diene G, Molinas C, Hebert M (2008) Review of 64 cases of death in children with Prader Willi syndrome. *Am J Med Gen Part A* 146A: 881-887

**Takeo Kubota**, Soma Das, Susan L Christian, Stephen B. Baylin.(1997)  
Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet*: 16; 16-17

**Trifiro G**, Livieri C, Bosio L, Gargantini L, Corrias A (2003) Neonatal hypotonia:  
don't forget the Prader Willi síndrome. *Acta Paediatr* 92:1085-1089

**Whittington J**, Holland A, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H (2002)  
Relationship between clinical and genetic diagnosis of Prader-Willi syndrome. *J Med Genet*; 39: 926-932

**Whittington JE**, Holland AJ, Webb T, Butler J (2001) Population prevalence  
and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi  
syndrome in one UK Health Region. *J Med Genet* 38:792-798

**Zeschnigk M**, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997) A single-  
tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based  
on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet*: 5; 94-  
98.

**ANEXO 1: HOJA DE LLENADO DE DATOS.**

Fecha: \_\_\_\_\_

NOMBRE: \_\_\_\_\_

No expediente: \_\_\_\_\_

No caso: \_\_\_\_\_

Familiar responsable: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

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

**ANTECEDENTES PERINATALES:**

No. gesta:

Amenaza/intento aborto:

Patologías durante el embarazo:

Exposición a teratógenos:

Percepción de movimientos fetales:

Edad gestacional al término del embarazo:

Tipo de parto:

Lloró y respiró al nacer:

APGAR:

Malformaciones congénitas:

Manejo neonatal:

Tono muscular subjetivo:

Alimentación / succión:

Antecedentes personales patológicos:

**DESARROLLO PSICOMOTOR:**

Sonrisa social:

Sostén cefálico:

Sedestación:

Bipedestación:

Gateo:

Marcha:

Pinza gruesa:

Pinza fina:

Monosílabos:

Frases:

	Nacimiento	P	sdg	1ª valoración	P	Edad	2ª valoración	P	Edad
PESO									
TALLA									
PC									

### EXPLORACIÓN FÍSICA:

Cabeza:

Cara:

Cuello:

Tórax:

Abdomen:

Miembros torácicos:

Manos:

Miembros pélvicos:

Pies:

Genitales:

Postura:

Tono cervical:

Reflejo moro:

Succión:

Preensión:

Búsqueda:

Movimiento:

Resistencia y tono muscular:

**CRITERIOS DE HOLM  
PARA DIAGNÓSTICO DE  
SÍNDROME DE PRADER WILLI**

<b>**</b>	<b>Mayores</b>
	Hipotonía neonatal e infantil con dificultad para succión.
	Dificultad para la alimentación y pobre ganancia de peso en la infancia (técnicas especiales de alimentación).
	Ganancia rápida de peso que inicia entre 1 y 6 años, obesidad central.
	Facies característica: diámetro bifrontal estrecho, ojos almendrados, boca en carpa.
	Hipogonadismo / Hipogenitalismo: hipoplasia genital (labios menores y clítoris pequeños / escroto hipoplásico o criptorquidia), pubertad retardada o incompleta, infertilidad.
	Retraso en el desarrollo / retraso mental leve a moderado / dificultad para el aprendizaje.
	Hiperfagia / obsesión por la comida.
	Alteraciones cromosómicas en 15q11-q13.
<b>*</b>	<b>Menores</b>
	Reducción en movimientos fetales y letargia infantil.
	Problemas conductuales característicos: rabietas, terquedad, rigidez, comportamiento obsesivo-compulsivo, robar, mentir.
	Alteraciones del sueño / apneas.
	Talla baja para talla blanco familiar a los 15 años.
	Hipopigmentación.
	Manos y pies pequeñas para talla y edad.
	Patología ocular: esotropía y miopía
	Saliva viscosa.
	Defecto de articulación del lenguaje.
	Pellizcarse, "picarse" la piel.
<b>--</b>	<b>Adicionales</b>
	Umbral para el dolor alto.
	Vómito disminuido.
	Alteración en la sensibilidad a la temperatura.
	Escoliosis o Xifosis.
	Adrenarca temprana.
	Osteoporosis.
	Habilidad inusual con rompecabezas.
	Estudios neuromusculares normales (biopsia muscular, electromiografía)
<p><b>Criterios mayores = 1 punto.                      Criterios menores = ½ punto.</b>  Se requieren para el diagnóstico:  <b>&lt;3 años: 5 puntos</b>, de los cuales 4 deben ser criterios mayores  <b>&gt;3 años: 8 puntos</b>, 5 de los cuales deben ser criterios mayores.  Adicionales solo incrementan o disminuyen la sospecha diagnóstica.</p>	