

Fundação Oswaldo Cruz

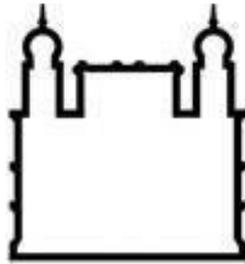
**Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira**

**Correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes com a
Síndrome de Prader – Willi**

Hiago Azevedo Cintra

Rio de Janeiro

Setembro de 2021



Fundação Oswaldo Cruz

**Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira**

**Correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes
com a Síndrome de Prader – Willi**

Hiago Azevedo Cintra

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Pesquisa Aplicada à
Saúde da Criança e da Mulher, como parte
do requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Letícia da Cunha Guida

Co-orientador: Dr. Leonardo Henrique Ferreira Gomes

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Cintra, Hiago Azevedo.

Correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes com a Síndrome de Prader – Willi / Hiago Azevedo Cintra. - Rio de Janeiro, 2021.

80 f.; il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2021.

Orientadora: Letícia da Cunha Guida.

Co-orientador: Leonardo Henrique Ferreira Gomes.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Síndrome de Prader-Willi. 2. Imprinting Genético. 3. Epigenética. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra Letícia da Cunha Guida pela oportunidade e orientação. Pelos ensinamentos valiosos, e por toda confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Leonardo Henrique Ferreira Gomes pelo apoio, amizade e pela colaboração enriquecedora deste trabalho.

Aos meus pais Graziela Camilo de Azevedo e Rodrigo Santos Cavadas, por não medirem esforços pela minha felicidade. Pelo imenso suporte que vocês me doaram.

Aos integrantes da comissão examinadora os Prof. Dr. Fernando Regla Vargas, Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos e as suplentes Profa. Dra. Melissa Pontes Pereira e Profa. Dra. Maria Lúcia Costa Monteiro, que doaram seu tempo e conhecimento para ler, entender e julgar com seus olhares críticos a minha pesquisa acadêmica.

À todos os docentes do departamento de ensino do Instituto Fernandes Figueira que contribuíram com a minha formação.

À todos os funcionários e secretárias do Instituto Fernandes Figueira por seu carinho e atenção com os alunos.

Aos amigos do Laboratório de Alta Complexidade: Christiane, Sanny, Celma, Danielle, Daniela, Luiza, Gabriel.

Aos assistidos e responsáveis legais que doaram amostras como voluntários, em benefício da ciência.

Aos amigos da Pós- graduação: Flávia, Luísa e Laura, pelo convívio harmonioso, pelos ensinamentos e incentivo.

À Dra. Latife Salomão Tyszler e todos os médicos integrantes do ambulatório da Síndrome de Prader-Willi do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione que contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos: Victor Hugo, Gabriel, Tiago, Juliana, Guilherme, Ewerthon, Eduarda, Felipe, Lucas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superiores (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Instituto Fernandes Figueira e a Fiocruz por concederem seu espaço e serviços para o meu aperfeiçoamento pessoal como profissional de saúde e pesquisador.

E a todos aqueles que acreditam e investem na ciência brasileira.

RESUMO

A síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma doença multissistêmica, cujas manifestações principais incluem hipotonia, obesidade, leve atraso mental, hipogonadismo e insuficiência do hormônio de crescimento. A SPW foi a primeira desordem genética descrita envolvida com o *imprinting* genômico. O *imprinting* genômico é uma modificação epigenética do DNA responsável por metilar as ilhas CpG, presentes em regiões promotoras dos genes, inativando a expressão deste gene. Na SPW, o indivíduo possui o alelo materno quimicamente inativado através do *imprinting*, além disso, o indivíduo perde a função dos mesmos genes no alelo paterno devido a 3 possíveis mecanismos genéticos: Deleção, dissomia uniparental materna (DUM), e microdeleções ou defeitos no centro de controle do *imprinting*. Ainda há muito a se entender sobre as bases genéticas da SPW e sua correlação com os fenótipos clínicos vistos nestes pacientes, e esta comparação entre o perfil molecular e os sintomas clínicos vistos em pacientes com a SPW vem sendo um tema muito discutido dentro da literatura. Muitos achados suportam uma possível correlação entre o genótipo e o fenótipo destes pacientes. Estabelecendo uma possível correlação entre genótipo e fenótipo irá trazer uma maior compreensão da SPW, provendo um melhor aconselhamento genético e consequentemente melhorando o prognóstico para estes indivíduos e suas famílias. Este estudo tem como objetivo identificar a associação dos diferentes mecanismos genéticos da SPW com os diversos sintomas clínicos, contribuindo para um melhor prognóstico da doença. Um estudo descritivo de pesquisa básica e quantitativa a partir de amostras de sangue periférico de 45 pacientes com padrão de metilação compatível com a SPW acompanhados no Centro de Genética Médica do IFF/FIOCRUZ e pelo Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia do Estado do rio de Janeiro (IEDE/RJ). O estudo vem sendo desenvolvido no Laboratório de Alta Complexidade do IFF (LACIFF). A abordagem metodológica consistiu no rastreamento destes 45 pacientes utilizando a técnica de MS-HRM; MS-MLPA visando identificar as deleções nos pacientes; e o sequenciamento de Sanger visando identificar as dissomias uniparentais maternas e os defeitos no centro de controle do *imprinting*. Posteriormente foi realizado a coleta de dados fenotípicos dos pacientes que apresentaram alterações compatíveis com a SPW. O trabalho em questão tem como resultados esperados encontrar uma correlação genótipo – fenótipo, visando um melhor entendimento sobre as bases genéticas da síndrome e um melhor prognóstico para estes pacientes e suas famílias.

Palavras-chave: Síndrome de Prader-Willi, *Imprinting*, Epigenética, Sequenciamento, Genótipo, Manifestações clínicas.

ABSTRACT

Prader-Willi syndrome (PWS) is a multisystemic disease, the main manifestations of which include hypotonia, obesity, mild mental retardation, hypogonadism, and insufficient growth hormone. PWS was the first described genetic disorder involved with genomic imprinting. Genomic imprinting is an epigenetic modification of the DNA responsible for the methylation of the CpG islands, present in promoter regions of the genes, inactivating the expression of this gene. In PWS, the individual has the maternally allele chemically inactivated through imprinting, in addition, the individual loses the function of the same genes in the paternal allele due to 3 possible genetic mechanisms: Deletion, maternal uniparental disomy (matUPD), and micro deletions or defects in the imprinting control center. There is still a lot to understand about the genetic bases of PWS and its correlation with the clinical phenotypes seen in these patients, and this parallel between the molecular profile and the clinical symptoms seen in patients with PWS has been a very discussed topic in the literature. Many findings support a possible correlation between the genotype and phenotype of these patients. Establishing a possible correlation between genotype and phenotype, will bring a greater understanding of PWS, providing better genetic counseling and consequently improving the prognosis for these individuals and their families. This study aims to identify the association of the different genetic mechanisms of PWS with the different clinical symptoms, contributing to a better prognosis of the disease. A descriptive study of basic and quantitative research based on peripheral blood samples from 45 patients with methylation status compatible with PWS followed at the Medical Genetics Center of IFF / FIOCRUZ and by the State Institute of Diabetes and Endocrinology of the State of Rio de Janeiro (IEDE / RJ). The study has been developed at the IFF High Complexity Laboratory (LACIFF). The methodological approach consisted of tracking these 45 patients using the MS-HRM technique; MS-MLPA to identify deletions in patients; and the Sanger sequencing aiming to identify maternal uniparental disomies and defects in the imprinting control center. Subsequently, phenotypic data were collected from patients who presented changes compatible with PWS. The work in question has as expected results to find this genotype - phenotype correlation, aiming at a better understanding about the genetic bases of the syndrome and a better prognosis for these patients and their families.

Key words: Prader-Willi syndrome, Imprinting, Epigenetics, Sequencing, Genotype, Clinical manifestations.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1. Características clínicas da SPW.....	14
3.2. <i>Imprinting</i> genômico.....	18
3.4. Região 15q11.2-q13.....	22
3.5. Correlações genótipo-fenótipo.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Caracterização da pesquisa.....	25
4.2. Amostra.....	25
4.3. Critérios de inclusão.....	25
4.4. Aspectos éticos.....	26
4.5. Coleta de amostras e extração de DNA.....	26
4.6. Quantificação e padronização das amostras.....	27
4.7. Conversão bissulfito.....	28
4.8. Análise da curva de dissociação.....	29
4.9. Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação Metilação específico (<i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification MS- MLPA</i>) ...	31
4.9.1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas.....	31
4.9.2. Reação de ligação e reação de digestão/ligação.....	34
4.9.3. Reação de PCR.....	35
4.9.4. Separação e visualização dos produtos de amplificação.....	35
4.10. Sequenciamento de Sanger.....	36
4.11. Coleta de dados clínicos.....	38
4.12. Análise estatística dos dados.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Análise de metilação (MS – HRM).....	41
5.2 Amplificação de sondas multiplex específica de metilação (MS-MLPA).....	43
5.3 Testes realizados em conjunto ao IEDE/RJ.....	46
5.4 Sequenciamento de Sanger.....	47
5.5 Análise estatística dos dados.....	47
6. DISCUSSÃO.....	52

7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS	66
9. ANEXOS	73

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µl – Microlitro

AG – Grelina acilada

CGH – Hibridizao Genmica Comparativa

CI – Centro de Imprinting

CT – *Cycle threshold* (ciclo que a fluorescência ultrapassa o limiar de deteco)

ddNTPs – Didesoxirribonucleosdeos trifosfatados

DNA – cido desoxirribonucléico

DNMTs - Enzima DNA metiltransferase

DRS - Distúrbios respiratórios do sono

DUM – Dissomia uniparental materna

FISH – Hibridizao *in situ* com fluorescência

G – Acelerao da gravidade

GH – Hormônio do crescimento

HrGH - Hormônio de crescimento recombinante humano

IEDE – Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione

IFF – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

LACIFF – Laboratório de Alta Complexidade do IFF

min – Minutos

ml – Mililitro

nm – Milimolar

MS-HRM – *Methylation-sensitive High Resolution Melting*

MS-MLPA – Amplificao de sondas multiplex específica de metilao

ng/ μ l – Nanograma por microlitro

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pmol – Picomoles

PQ – Ponto de quebra

Primers – Oligonucleotídeos iniciadores

QI - Quociente de inteligência

qPCR – *Real time Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

R\$ - Reais brasileiros

rpm – Rotações por minuto

SA – Síndrome de Angelman

seg – Segundos

SPW – Síndrome de Prader-Willi

TE – Tampão Tris-EDTA

UAG – Grelina não acilada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os três mecanismos genéticos da SPW	20
Figura 2. Sumário da região cromossômica 15q11.2-q13 adaptado de (DRISCOLL; MILLER; CASSIDY,)	22
Figura 3: Discriminação alélica a partir da curva de dissociação do DNA amplificado.....	42
Figura 4: Ct relativo à amplificação de cada triplicata	42
Figura 5 Caracterização do status de metilação por MS-MLPA.....	44
Figura 6 Caracterização por MS-MLPA do status de número de cópias de indivíduos SPW	45
Figura 7: Eletroferograma representativo da região 15q11.2-q13 derivada do sequenciamento do paciente PWS 13.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes para extração	26
Tabela 2: Componentes para conversão	28
Tabela 3: Parâmetros do termociclador para conversão	28
Tabela 4: Oligo nucleotídeos para MS-HRM.....	30
Tabela 5: Componentes para preparo de cada reação de MS-HRM.....	30
Tabela 6: Componentes da reação de hibridização	31
Tabela 7: Tabela de sondas presentes no kit SALSA MS-MLPA ME028.....	32
Tabela 8: Componentes do Mix Ligase A.....	34
Tabela 9: Componentes do Mix de Ligase 65	34
Tabela 10: Componentes do Mix de Ligação - Digestão	34
Tabela 11: Componentes para reação de PCR.....	35
Tabela 12: Condições de ciclagem para reação de PCR	35
Tabela 13: Oligo nucleotídeos utilizados no sequenciamento de sanger	36
Tabela 14: Dados fenotípicos. Adaptado de McCandless, Shawn E, and Committee on Genetics. “Clinical report—health supervision for children with Prader-Willi syndrome.” Pediatrics vol. 127,1 (2011): 195-204. doi:10.1542/peds.2010-2820.....	38
Tabela 15: Resultados de MS-MLPA de indivíduos com a Síndrome de Prader Willi agrupados por subtipo genético	46
Tabela 16: Resultados dos exames realizados em conjunto ao IEDE/RJ agrupados por subtipo genético	46
Tabela 17: Achados clínicos em pacientes com a SPW divididos pelos subgrupos genéticos.....	50
Tabela 18: Ficha de pontuação para diagnóstico clínico da SPW. Adaptado de HOLM et al., (1993)	63

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma síndrome genética caracterizada por sintomas neurocomportamentais que foi descrita em 1956 e hoje é uma das mais frequentes síndromes com microdeleções cromossômicas, além de ser a forma mais comum de obesidade com causa genética (CASSIDY, 1997). A incidência da SPW é de aproximadamente 1/15.000 - 1/30.000 nascimentos e é geralmente esporádica, tendo sido relatados poucos casos familiares.

A SPW é caracterizada clinicamente por duas fases de evolução distintas (BUTLER et al., 1986; BUTLER, 1990). A primeira fase caracteriza-se por diferentes graus de hipotonia durante o período neonatal e a primeira infância. Dependendo do grau da síndrome, a hipotonia pode se apresentar ainda na gestação, com uma baixa do movimento fetal. Este sintoma não é progressivo e começa a apresentar melhoras em média, entre 8 e 11 meses. Caracteriza-se também por hipogenitalismo, dificuldade de sucção, mãos e pés pequenos e anomalias faciais como frente estreita, olhos amendoados e estrabismo. No momento em que a hipotonia começa a ser um sintoma mais ameno, esta criança se torna mais alerta e sua disfunção do hipotálamo acaba se tornando mais evidente, acarretando em uma hiperfagia para esta criança. O início da obesidade pode ocorrer entre 1 a 6 anos de idade, com uma média de 2 anos, e é considerado um marco para o reconhecimento da segunda fase da SPW. Esta é caracterizada por um atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, onde a criança apresenta dificuldade para aprender atividades básicas como se sentar, andar e aquisição da fala. Vemos também uma hipopigmentação do cabelo, pele e retina em alguns casos.

A SPW é resultante da ausência de genes paternos que normalmente estão ativos no

segmento cromossômico 15q11-q13. Os alelos maternos herdados estão normalmente inativos em decorrência do mecanismo de *imprinting* genômico (SMITH et al., 1991; YIP, 2014). Esses genes paternos podem estar ausentes como resultado de diferentes mecanismos: próximo de 75% dos casos da SPW apresentam uma deleção paterna do segmento 15q11-q13; cerca de 25% apresentam dissomia uniparental materna (DUM) (herança de dois cromossomos 15 maternos); e perto de 1% apresentam defeitos no centro de *imprinting* (CI) (sub deleções microscópicas do CI, ou por uma epimutação) (OHTA et al., 1999; SMITH; HUNG, 2017a). Aproximadamente 5% dos casos da SPW apresentam translocações ou outra anomalia cromossômica estrutural envolvendo o cromossomo 15. Os rearranjos cromossômicos podem ser balanceados ou não e ocorre ainda translocações Robertsonianas (SMITH et al., 1991; YIP, 2014).

Nos últimos anos as bases genéticas da SPW têm sido intensamente investigadas, sendo o diagnóstico clínico complexo, uma vez que algumas características mudam com a idade e podem ser semelhantes a outras síndromes, necessitando da comprovação da síndrome através de um diagnóstico molecular (MASCARI et al., 1992; CASSIDY, 1997).

O estudo das bases moleculares da síndrome pode proporcionar uma melhor compreensão genética, proporcionando um tratamento precoce dos sintomas. Como a SPW tem uma grande extensão de sintomas que podem variar em graus de intensidade entre os pacientes, o estudo de uma possível correlação entre cada mecanismo molecular e seus sintomas torna-se uma ferramenta útil para o esclarecimento dos mecanismos moleculares da síndrome e sua implicação fenotípica. Isto significa a compreensão da função de cada gene relacionado à SPW.

JUSTIFICATIVA

A busca por uma possível correlação entre os diferentes mecanismos moleculares da SPW e o quadro de sintomas diversos tem uma implicação clínica de extrema importância para a compreensão da doença.

O rastreamento de uma possível correlação entre cada mecanismo molecular com os sintomas existentes da SPW, poderá trazer benefícios no prognóstico, onde será possível caracterizar o sintoma clínico com a sua etiologia molecular, resultando em uma melhor compreensão da SPW

O melhor conhecimento desta correlação implicará diretamente no tratamento e manejo da síndrome, impactando na qualidade de vida dos pacientes e suas famílias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo identificar a associação dos diferentes mecanismos genéticos da SPW com os diversos sintomas clínicos, contribuindo para um melhor prognóstico da doença.

2.2 Objetivos específicos

- Diagnosticar através do teste molecular MS-HRM os pacientes com a SPW encaminhados pelo Centro de Genética Médica (IFF) e Ambulatório GOTA (IEDE).
- Descrever as variáveis referentes ao diagnóstico clínico dos pacientes com SPW;
- Determinar as características clínicas que possam estar relacionadas diretamente à determinada alteração genética.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Características clínicas da SPW

As primeiras características clínicas são encontradas ainda no período neonatal e de primeira infância destes pacientes. Dentre os sintomas encontrados nesta fase, o mais frequente entre os pacientes com SPW, é a hipotonia. Este sintoma é muito visto nos pacientes com a SPW e pode se apresentar ainda na gravidez, com uma baixa do movimento fetal. Já na fase neonatal, a hipotonia pode apresentar graus variados entre os pacientes, variando de uma hipotonia muscular comum, até casos mais graves onde o paciente pode ser comparado com um “boneco de pano” devido a essa baixa de tônus muscular. Com a hipotonia mais grave, podemos ver também um certo grau de letargia, choro fraco e pouco frequente, e uma dificuldade de sucção do leite materno, que consequentemente irá causar uma dificuldade na alimentação e um baixo ganho de peso (CASSIDY et al., 2012).

Tuysuz e colaboradores (2014) estimou a prevalência da SPW entre uma população de paciente hipotônicos (10,7%) (TUYSUZ et al., 2014). Este resultado corrobora com o conhecimento que a hipotonia é um dos sintomas mais frequentes dentro da SPW, e apenas reforçam que todos os recém-nascidos com uma inexplicável e persistente hipotonia, devem ser investigados para a SPW (GUNAY-AYGUN et al., 2001).

Além de todas as complicações causadas pela hipotonia, nesta fase o paciente com a SPW apresenta o hipogonadismo. O hipogonadismo é apresentado em ambos os sexos, e pode se manifestar como hipoplasias genitais, desenvolvimento incompleto da puberdade e infertilidade. O hipogonadismo nesta fase pode ser observado em homens, porém o reconhecimento deste sintoma nas mulheres é mais difícil. A ausência de testículos na

bolsa escrotal (criptorquidia) unilateral ou bilateral é observado em 90% dos casos masculinos de SPW (CRINO et al., 2003).

Infância

A disfunção do hipotálamo, tem início ainda na fase neonatal destes pacientes, porém ao contrário do que vemos na infância, na fase neonatal, a hipotonia é a responsável por dificultar o ganho de peso. No momento em que este paciente começa a apresentar melhoras no tônus muscular, em média entre 8 e 11 meses de idade, a hiperfagia se mostra presente na vida destes causando um aumento do apetite e um possível quadro de obesidade, se não controlado. A disfunção do hipotálamo acarreta diversos problemas endócrinos, e o sistema responsável por causar a fome incontrolável é o sistema da grelina. Estudos mais recentes mostraram que portadores da síndrome possuem níveis altos de grelina no sangue. Conhecido como o hormônio da fome, uma de suas funções é estimular o apetite, que se torna incontrolável nessas pessoas. Em 2015, Kuppens e colaboradores realizou um estudo comparando 138 pacientes com SPW frente os controles obesos e magros, mostrando que os níveis de grelina circulante nos pacientes com SPW eram maiores comparados aos controles, devido ao aumento da grelina acilada (AG) enquanto que a grelina não acilada (UAG) se encontrava em níveis iguais aos controles (AG 129.1 vs 82.4 pg/ml, $p = 0.016$; UAG 135.3 vs 157.3 pg/ml, resp.) (KUPPENS et al., 2015). Com esses dados, podemos concluir que devido aos níveis altos de AG, os níveis totais de grelina circulante nos pacientes com SPW eram maiores, causando o sintoma da hiperfagia.

Juntamente com a hiperfagia, a disfunção do hipotálamo também causa uma baixa na secreção do hormônio de crescimento recombinante humano (hrGH), responsável por

causar uma baixa da massa muscular magra, dificuldade de crescimento durante a puberdade e mãos e pés pequenos (CASSIDY et al., 2012; AYCAN; NIJAT BAŞ, 2014).

Nesta fase, também são encontrados os atrasos neuropsicomotores, características físicas e distúrbios comportamentais e psiquiátricos.

Entre 90-100% dos pacientes com SPW apresentam um atraso no desenvolvimento motor, que possuem dificuldade para o aprendizado de atividades básicas, como se sentar (12 meses) e andar (24 meses). Deficiências intelectuais também são reportadas nestes pacientes, usualmente quando ingressam na escola (Média do quociente de inteligência (QI): 60-70) (CASSIDY et al., 2012).

As características físicas e faciais mais presentes em indivíduos com SPW, são as fontes estreitas, olhos amendoados e estrabismo. Uma característica física muito estudada na SPW é a hipopigmentação da pele, retina e cabelo. A hipopigmentação é mais comum em indivíduos que apresentem deleções, pois mutações por deleção podem em alguns casos abranger genes que estão relacionados a outras funções, como o gene *OCA2* (SPRITZ et al., 1997) que é responsável pela produção da proteína P, essa proteína fica localizada nos melanócitos e está diretamente ligada a produção de melanina no corpo. Já em outros mecanismos da doença, não vemos a hipopigmentação como um achado clínico frequente (BUTLER, 1989).

Adolescência e idade adulta

Na literatura atual sobre a SPW, temos poucas informações sobre a fase adulta destes pacientes, porém a preocupação com as complicações existentes na vida destes deve ser de extrema importância. Estas complicações são derivadas de todos os sintomas discutidos anteriormente, que se não controladas ou tratadas, depreciam muito a qualidade de vida destes adultos.

Estes pacientes lutam com uma fome insaciável que é fisicamente, emocionalmente e socialmente debilitante; funções sexuais limitadas devido ao hipogonadismo, variando de casos com uma hipoplasia das gônadas (em ambos os sexos) até casos de infertilidade; aumento da vulnerabilidade emocional devido aos aspectos da SPW afetarem todo o seu desenvolvimento social e pessoal (GREENSWAG, 1986).

Quando falamos de morbidade e mortalidade na SPW, muito se é discutido, pois as causas de mortalidade destes pacientes são derivadas das complicações dos sintomas, e não diretamente da SPW. Em 2019, foi realizado um estudo de coorte retrospectiva onde foram utilizados dois questionários para avaliar características de indivíduos com diagnóstico da SPW que continuam vivos, daqueles que faleceram. Os seus achados indicam que 70% das mortes, ocorreram na fase adulta, com a falha respiratória como principal causa de morte. Este estudo também adicionou evidências para a hipótese que a obesidade e seus problemas relacionados como diabetes, problemas cardíacos e falha respiratória são as principais causas de morte nestes indivíduos (PROFFITT et al., 2019).

Estas informações apenas corroboram para o fato de que um diagnóstico e tratamento precoce dos sintomas da SPW são os fatores mais importantes para um bom manejo destas complicações, e conseqüentemente uma melhor qualidade de vida.

3.2. *Imprinting* genômico

Durante muitos anos, os estudos genéticos sempre foram voltados a entender o funcionamento do DNA baseado em sua sequência de nucleotídeos e seus fatores transcricionais, porém nos dias de hoje vemos que esse cenário é diferente. A partir de descobertas feitas por pesquisadores, fomos apresentados ao estudo da epigenética, onde “epi” significa acima de ou sobre, logo epigenética: acima da genética, ou seja, além da sequência de nucleotídeos. Em 1942, Conrad Waddington descreveu primeiramente este termo, e ao longo dos anos vem sido muito estudado e alterado até sua definição atual, epigenética é o estudo das mudanças na expressão gênica que ocorrem sem uma mudança na sequência do DNA e que se transmite nas divisões celulares, meióticas e mitóticas (DAXINGER; WHITELOW, 2012)

Dentro da epigenética, um dos mais frequentes mecanismos estudados é o *imprinting* genômico, um mecanismo de regulação da expressão gênica que leva a uma expressão diferencial dos genes dependendo da origem parental deste alelo, um modelo de expressão não-mendeliana (PIRES; GROSSNIKLAUS, 2014). O mecanismo epigenético em questão, ocorre através do processo químico de metilação do DNA.

A metilação do DNA é considerada uma modificação que ocorre principalmente nas regiões promotoras de genes, responsável por inibir a expressão do gene, enquanto a demetilação desta mesma região permite a transcrição deste gene. Nas células de mamíferos é muito bem conhecido que em regiões promotoras de genes, podemos identificar regiões ricas em dinucleotídeos CpG, e estas sequências de cerca de 200 - 500 pb ricas em citosinas e guaninas são nomeadas “ilhas CpG”. Este processo químico ocorre com a atividade da enzima DNA metiltransferase (DNMTs), responsável por transferir um grupamento metil

do cofator S-Adenosilmetionina para o quinto carbono da citosina, formando a molécula 5-Metilcitosina (JIN; LIU, 2018).

Dois modelos foram propostos anteriormente sobre o funcionamento da inibição da transcrição gênica através da metilação. O primeiro é considerado uma inibição direta, onde os fatores de transcrição reconhecem a citosina metilada como uma mutação naquele sítio, e automaticamente são inibidas de se ligar ao sítio em questão, impedindo a tradução deste gene em proteína. O segundo modelo é chamado de inibição indireta, onde o DNA metilado interage com proteínas nucleares, prevenindo a interação do DNA com fatores de transcrição (BOYES; BIRD, 1991).

Nas síndromes de Prader Willi e Angelman (SA), distúrbio genético-neurológico ligado ao cromossomo 15, o processo de *imprinting* genômico estão muito relacionados entre si, essas foram as primeiras doenças humanas reconhecidas como determinadas pelo mecanismo epigenético (NICHOLLS et al., 1989).

No cromossomo 15 dos pacientes com SPW, especificamente na região 15q11.2-q13 do alelo materno temos o processo de *imprinting* genômico, inativando a função de todos os genes localizados nesta região crítica. Essa regulação da expressão gênica nesta região é controlada pelo CI, uma pequena região localizada logo acima do locus gênico *SNURF-SNRPN*, através de vias específicas do sexo, como discutido anteriormente. O que ocorre na SPW é o silenciamento natural desta região no alelo materno, simultaneamente com a perda de expressão destes genes no alelo paterno, podendo ser causada por 3 mecanismos diferentes: deleções, dissomias uniparentais maternas e defeitos no centro de *imprinting* (CASSIDY, 1997).

3.3. Mecanismos moleculares da SPW

O braço longo proximal do cromossomo 15 contém genes que são controlados pelo CI. Alguns destes genes são expressos apenas no alelo paterno ou no alelo materno. A SPW ocorre pela perda de funções destes genes paternos localizados na região 15q11.2-q13. Esta perda pode ser causada por 3 mecanismos diferentes (figura 1), aproximadamente 75% dos indivíduos com a síndrome têm uma deleção na região 15q11.2-q13 no alelo herdado do pai, enquanto 25% têm uma dissomia uniparental materna, cerca de 1% tem uma alteração na sequência do CI. Podemos encontrar em menos de 5% um rearranjo estrutural cromossômico envolvendo a região 15q11.2-q13 (CASSIDY, 1997).

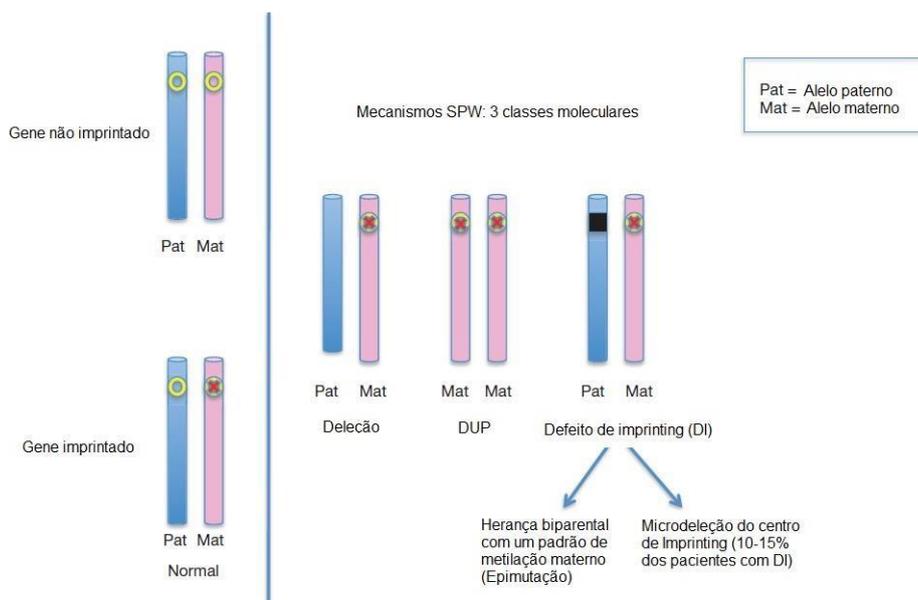


Figura 1: Os três mecanismos genéticos da SPW. O círculo amarelo representa a região crítica da SPW. Os círculos abertos, representam os genes ativado, já a cruz vermelha os genes inativados pelo imprinting. A caixa preta representa um defeito no CI (SMITH; HUNG, 2017)

A grande maioria (~75%) dos casos da síndrome são devidas as deleções *de novo* abrangendo cerca de 4 Mb do 15q11.2-q13 (14). Dentro do mecanismo de deleção, podemos encontrar duas variações (classe 1 e 2) em relação ao seu tamanho (Figura 2). Na região 15q11.2-q13 podemos ter em cerca de 30-40 % deleções de classe 1, onde está deleção se estende do ponto de quebra PQ 1 ao PQ3. A classe 2 de deleções se estende

do PQ 2 ao PQ 3, sendo considerado uma deleção menor, abrangendo menos genes (RAMSDEN et al., 2010). Devido a esta complexidade das deleções, é relativamente comum em deleções estarem presentes sintomas como a hipopigmentação, pois estas deleções englobam o gene *OCA2* (SPRITZ et al., 1997) que é responsável pela produção da proteína P. Essa proteína fica localizada nos melanócitos e está diretamente ligada a produção de melanina no corpo. Já em outros mecanismos da doença, não vemos a hipopigmentação como um achado clínico frequente (BUTLER, 1989).

A segunda alteração genética mais comum (25%) é a dissomia uniparental materna (DUM) que se trata de uma alteração onde o par de cromossomos 15 herdados serão de origem materna, e conseqüentemente todos os genes da região associado a SPW se encontrarão inativados, causando a doença. A DUM possui dois mecanismos mais comuns de se ocorrer no cromossomo 15, podendo ser uma alteração cromossômica heterodissômica, onde ocorrerá um erro na meiose 1, e teremos presentes dois cromossomos homólogos, em outra partida podemos ter também uma alteração cromossômica isodissômica, onde devido a um erro na meiose 2, encontraremos os mesmos 2 cromossomos maternos, devido a um erro na separação das cromátides irmãs (ROBINSON et al., 2001) e com um fenômeno da célula chamado de resgate de trissomia, há perda de uma das três cópias do cromossomo trissômico com objetivo de formar um cromossomo diplóide.

Outras mutações menos comuns na SPW (Até 1% dos casos) são os defeitos no CI. Podemos ter dois tipos diferentes de defeitos de imprinting, tanto por sub deleções microscópicas do CI, tanto por apenas uma impressão anormal nesse CI do cromossomo paterno, tornando a região 15q11-q13 inativada, obtendo o mesmo epigenótipo do alelo materno (Epimutação) (OHTA et al., 1999).

3.4. Região 15q11.2-q13

A região 15q11.2-q13 pode ser dividida em basicamente 4 diferentes regiões (figura 2). A primeira região é localizada logo abaixo do centrômero, é caracterizada por ser uma região sem *imprinting* genômico que entre os dois pontos de quebra PQ1 e PQ2 contém 4 genes que são expressos nos dois alelos parentais. A segunda região é a chamada região crítica de Prader–Willi, um local do cromossomo que contém 5 genes codificantes de proteínas (*MKRN3*, *MAGEL 2*, *NECDIN* e o *SNRPN - SNURF*), um grupo de 5 snoRNA genes (*HBII-436*, *HBII-13*, *HBII-438*, *HBII-85* e *HBII-52*), nesta região também é encontrado o CI, que controla a metilação do cromossomo. A terceira região encontrada é o local dos genes da SA, onde são encontrados os genes que especificamente são expressos no alelo materno (*UBE3A* e *ATP10A*). A quarta região é também uma região de bi expressão dos alelos, contendo genes sem *imprinting* genômico (Figura 02) (CASSIDY; DRISCOLL, 2009).

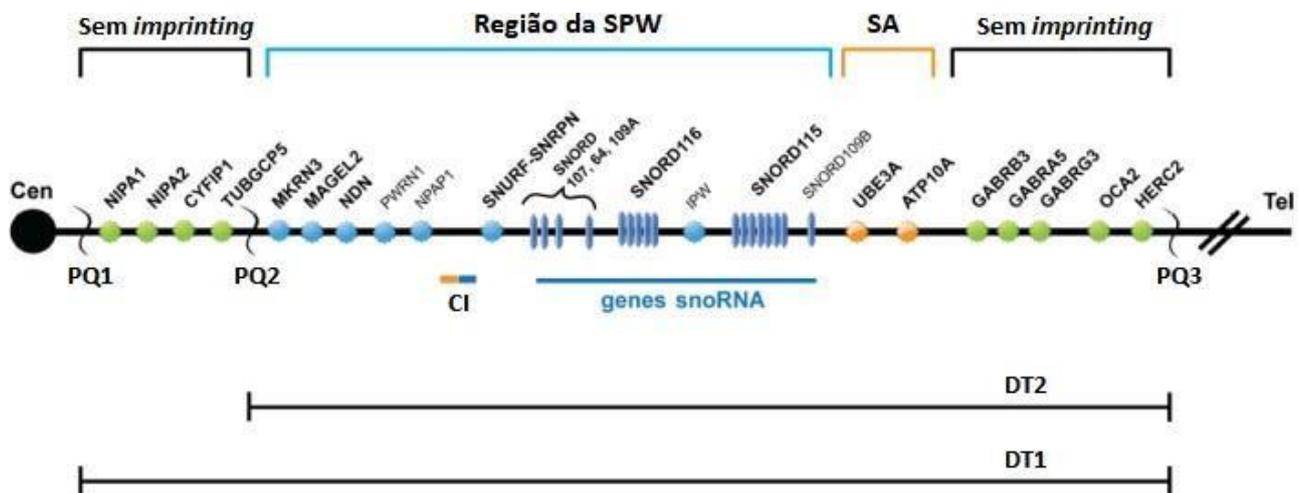


Figura 2. Sumário da região cromossômica 15q11.2-q13 adaptado de (DRISCOLL; MILLER; CASSIDY,). Os círculos verdes representam os genes que não possuem *imprinting* e são expressos nos dois alelos. Os círculos e os ícones ovais azuis representam os genes contidos na região crítica de SPW, sendo apenas expressos no alelo paterno. Os círculos laranjas representam os dois genes (*UBE3A* e *ATP10A*) relacionados com a Síndrome de Angelman (SA), e que apenas são expressos no alelo materno.

3.5. Correlações genótipo-fenótipo

A comparação entre o perfil molecular e os sintomas clínicos vistos em pacientes com a SPW vem sendo um tema muito discutido dentro da literatura. Muitos achados suportam uma possível correlação entre o genótipo e o fenótipo destes pacientes.

Comparações realizadas entre deleções e DUM indicam que a hipopigmentação é mais recorrente em pacientes que possuem deleções da região 15q11.2-q13, enquanto o aumento da idade materna e nascimentos prematuros são mais encontrados em pacientes com DUM (GILLESSEN-KAESBACH et al., 1995; SPRITZ et al., 1997; GE et al., 2019; CASSIDY et al., 2009).

BUTLER et al., foram responsáveis por reportar que sintomas comportamentais e psicológicos tendem a ser apresentados em pacientes com deleções de tipo 1. Problemas comportamentais relacionados a compulsão por comida também foram reportados sendo mais severos em pacientes do sexo masculino que possuíam deleções, em contrapartida pacientes masculinos com DUM tiveram sintomas menos severos (GITO et al., 2015).

Alguns achados mais raros foram também descritos, onde indivíduos que possuem DUM podem desenvolver um resgate da trissomia do 15 incompleto, resultando em um mosaicismo da trissomia do 15. Esse mosaicismo pode levar a uma forma mais severa da SPW, com uma maior incidência de má formações congênitas cardíacas e um atraso mais severo no crescimento e no desenvolvimento (BUTLER; THOMPSON, 2000).

Dimitropoulos e Schultz sugerem que a maior expressão de genes maternos causada pela DUM pode estar associada ao aumento do comprometimento social que estes pacientes possuem em comparação a outros mecanismos da síndrome (DIMITROPOULOS; SCHULTZ, 2007).

Com todas estas informações, estabelecer uma possível correlação entre genótipo e fenótipo irá trazer uma maior compreensão da SPW, provendo um melhor aconselhamento genético e conseqüentemente melhorando o prognóstico para estes indivíduos e suas famílias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização da pesquisa

Estudo descritivo de pesquisa básica e quantitativa a partir de amostras de sangue periférico de pacientes com quadro de metilação compatível com a SPW acompanhados no Centro de Genética Médica do IFF/FIOCRUZ e pelo Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione (IEDE/RJ). O estudo vem sendo desenvolvido no Laboratório de Alta Complexidade do IFF (LACIFF).

4.2. Amostra

166 pacientes com uma suspeita clínica para a SPW foram submetidos ao teste de MS-HRM para confirmação molecular do padrão de metilação compatível com a SPW. O grupo amostral contém o DNA do sangue periférico de 45 pacientes com o diagnóstico molecular confirmado da SPW através do protocolo de MS-HRM, independentemente da idade acompanhados no Centro de Genética Médica do IFF/FIOCRUZ e no IEDE/RJ foram incluídos no estudo

4.3. Critérios de inclusão

Os 45 pacientes selecionados para o estudo tiveram seus materiais genéticos processados e testados no LACIFF, utilizando o protocolo de MS- HRM, os pacientes com suspeita clínica e padrões de metilação compatíveis com a SPW foram inclusos no estudo.

4.4. Aspectos éticos

Este estudo é um subprojeto inserido em um projeto guarda-chuva já em vigência no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da criança e do Adolescente Fernandes Figueira denominado “O papel do hormônio do crescimento na Síndrome de Prader-Willi: estudo da regulação da expressão de GH através da estratégia CRISPR/Cas9, rastreamento neonatal e diagnóstico molecular”, e encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa do IFF/Fiocruz (CAAE: 45767015.0.0000.5269).

Os participantes deste estudo foram orientados quanto à utilização dos dados obtidos através do diagnóstico molecular, tendo sua concordância concedida por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IFF/Fiocruz (ANEXO 1).

4.5. Coleta de amostras e extração de DNA

Aproximadamente 4 ml de sangue periférico foram coletados em tubos EDTA dos 166 pacientes selecionados para o estudo. A extração de DNA foi realizada com o kit PureLinkGenomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Após a coleta sanguínea, um tubo *ependorf* de 1.5 ml foi identificado com o código do paciente e utilizado para adicionar os componentes indicados na tabela 1.

Tabela 1: Componentes para extração

Componentes	Volume
Proteinase K	20 µl
RNase A	20 µl
Sangue total	200 µl
Genomic Lysis/ Binding buffer	200 µl

Após a adição destes componentes, o tubo *ependorf* foi agitado através do equipamento vórtex por cerca de 15 segundos e posteriormente incubado em banho-maria por 10 minutos à 55 °C.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados e então adicionou-se 200 µl de etanol 96%-100% seguidas por uma breve agitação utilizando o vórtex. Este volume total foi transferido para uma coluna “Purelink Spin Collumn” acoplada a um tubo coletor e centrifugado à 10.000 g por 1 minuto em temperatura ambiente. O líquido foi descartado e a coluna inserida em um novo tubo coletor, sendo adicionado 500 µl do Tampão de lavagem 1. Uma nova centrifugação foi realizada com a mesma velocidade e tempo da etapa anterior. Esta etapa foi repetida mais uma vez alterando apenas o Tampão de lavagem 1 pelo Tampão de lavagem 2.

Descartou-se o líquido e centrifugou-se a coluna em um novo tubo coletor à 18.000 g por 3 minutos, este pequeno passo é realizado para retirar o etanol residual.

Novos tubos *ependorf* de 1.5 ml foram identificados e as colunas utilizadas nos passos anteriores foram inseridas nestes novos tubos. Foi adicionado nas colunas 200 µl de Tampão de eluição e incubado em temperatura ambiente por 1 minuto, após esta breve incubação centrifugou-se à 18.000 g por 1 minuto. O material genético extraído suspenso no Tampão de eluição foi submetido a uma dosagem de concentração, utilizando o equipamento de espectrofotometria NanoDrop® 1000 (ThermoFisher Scientific, USA).

4.6. Quantificação e padronização das amostras

Após a extração de DNA, a quantificação do material genômico foi realizada por espectrofotometria ultravioleta no equipamento NanoDrop® 1000, utilizando-se 1µL de amostra e leituras nos comprimentos de onda de 230nm, 260 nm e 280 nm. Amostras que

apresentaram razão de leituras a 260/280 nm entre 1,8- 2,0, indicam uma pureza significativamente sem a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou perto de 280 nm. O grau de pureza de 260/230 é uma segunda medida de pureza do DNA com os valores de um ácido nucléico "puro" em geral na faixa de 1,8-2,2 (MOREY et al., 2013), Após a etapa de quantificação e verificação da qualidade, todas as amostras serão padronizadas em soluções com concentração de 20ng/ μ L.

4.7. Conversão bissulfito

As amostras obtidas no item 4.5, tiveram alíquotas de seu DNA submetidos a conversão bissulfítica, realizada como descrito anteriormente por (FROMMER et al., 1992), este protocolo tem como objetivo converter as citosinas não metiladas em uracilas. A conversão bissulfítica foi realizada utilizando o kit EZ DNA Methylation-Lightning (ZymoResearch,USA).

Em um tubo de PCR de 0,2 ml foi adicionado os componentes descritos na tabela 2 para posterior alocação no termociclador com as condições de ciclagem descritas na tabela 3.

Tabela 2: Componentes para conversão

Componentes	Volume
Lightning Conversion Reagent	130 μ l
DNA	20 μ l

Tabela 3: Parâmetros do termociclador para conversão

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
98°C	8 min	1
54°C	60 min	1

Após a ciclagem das amostras, adicionou-se 600 µl de M-Binding Buffer em uma coluna “Zymo-Spin IC Column” acoplada em um tubo de coleta, o volume de 150 µl referente ao processo da tabela 3 foram transferidos para essa coluna e submetidos a uma centrifugação de 10.000 g por 30 segundos. Descartou-se o líquido no tubo de coleta e adicionou-se 100 µl de M-Wash Buffer a coluna para uma centrifugação à 18.000 g por 30 segundos. O líquido foi novamente descartado e adicionou-se 200 µl de L-Desulphonation Buffer e incubou-se em temperatura ambiente por 20 minutos, esta coluna foi posteriormente centrifugada à 18.000 g por 30 segundos. Após o término da incubação o líquido é novamente descartado e adicionou-se 200 µl de M-Wash Buffer para a centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores, sendo esta etapa de lavagem realizada duas vezes.

A coluna submetida a este protocolo foi alocada em um tubo *eppendorf* de 1.5 ml devidamente identificado. Pipetou-se 10 µl de M-Elution Buffer e uma nova centrifugação foi feita à 18.000 g por 30 segundos.

4.8. Análise da curva de dissociação

Utilizando as amostras de DNA convertido obtidas na etapa 4.7, foram realizadas reações de PCR em tempo Real (qPCR) associado com a análise da curva de dissociação (*melting*) com o objetivo de confirmar suspeitas relacionadas a Síndrome de Prader-Willi, sendo todas as amostras analisadas em triplicatas. A reação de PCR em tempo Real, assim como a análise da curva de dissociação (High Resolution Melting, HRM) foi realizada com o kit Melt Doctor (ThermoFisher Scientific, USA) utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, USA), pertencente a rede de plataformas tecnológicas FIOCRUZ (P04-013 - PCR em Tempo Real-IFF-RJ). Cada amostra foi analisada de acordo com o trabalho desenvolvido por mim e todos os

colaboradores do Laboratório de Alta Complexidade do IFF/ Laboratório de Referência em Doenças Raras (LACIFF) (Ribeiro Ferreira et al, 2009) (Tabela 4).

Tabela 4: Oligo nucleotídeos para MS-HRM

Primers PCR	Sequência
Iniciador Foward (Primer F)	5'-AGGGAGTTGGGATTTTTGTATT-3'
Iniciador Reverse (Primer R)	5'-CCCCAAACTATCTCTTAAAAAAAC-3'

O MS-HRM foi realizado em um volume total por reação de 10 µl utilizando o tampão reagente MeltDoctor (2X). Para o preparo da reação, o processo todo foi feito dentro de um fluxo laminar, para evitar contaminação externa na reação. Em um *ependorf* de 1.5 ml foram adicionados os componentes descritos na tabela 5.

Tabela 5: Componentes para preparo de cada reação de MS-HRM

Componentes	Concentração
Iniciador Foward (200nM)	0,5 µl
Iniciador Reverse (200nM)	0,5 µl
HRM Melt-Doctor (2X)	5 µl
DNA	1 µl
H2O	3 µl

Com a mistura pronta e homogeneizada, adicionou-se em cada poço da placa 9 µl da mistura e 1 µl do DNA convertido na etapa 4.7 e alocado no termociclador. Os passos de ciclagem foram programados de acordo com o protocolo do kit utilizado, sendo assim feita uma primeira etapa de ativação do PCR a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos com uma temperatura de desnaturação de 95°C durante 30 segundos e uma temperatura de anelamento de 60°C durante 60 segundos. Após a amplificação por qPCR, os produtos do PCR serão completamente desnaturados a 95°C, a intensidade da sua fluorescência é monitorada a partir de 73°C continuamente até 85°C com uma taxa de transição térmica de 0,05°C/s. A análise dos dados será realizada no software 7500 Fast Software v2.3 da

ThermoFisher Scientific (USA), com o derivado de alterações de fluorescência sobre o eixo Y e da temperatura (°C) sobre o eixo X.

4.9. Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação Metilação específico (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification MS-MLPA*):

4.9.1. Desnaturação do DNA e hibridização das sondas

Foram diluídas com TE 1X em tubos PCR de 0,2 ml devidamente identificados as amostras de DNA obtidas na etapa 4.7, na proporção de 150 – 300 ng para 5 µL e mantidas no termociclador à uma temperatura de 98°C por 5 minutos para a desnaturação do DNA genômico. Posteriormente, ao atingir 25°C, acrescentou-se os componentes da tabela 6, referentes a reação de hibridização das sondas.

Tabela 6: Componentes da reação de hibridização

Componentes	Volume
SALSA Probe-mix	1,5 µl
MLPA buffer	1,5 µl

Em seguida o tubo foi mantido à 95 °C por 1 minuto e incubada à 60°C durante 16 – 20 horas. Neste período ocorre a hibridização da amostra de DNA à mistura de sondas (Tabela 7) (cada uma específica para a região a ser estudada).

Tabela 7: Tabela de sondas presentes no kit SALSA MS-MLPA ME028

	Sonda SALSA MLPA	Gene/exon	Enzima HhaI	Local de ligação GenBank	Localização MV (hg18)	Alelo imprintado	Distância para a próxima sonda
436	20702-L29063	NIPA1		NM_144599.4; 272-273			214.0 kb
154	02018-L00865	TUBGCP5		NM_052903.4; 897-898			964.5 kb
Fim da região variável de número de cópias							
172	20688-L28510	MKRN3		NM_005664.3; 1296-1297	15-021,362818		77.5 kb
418	11155-L29062	MAGEL2 - Exon 1		NM_019066.4; 3692-3693	15-021,440355		4.1 kb
232	20701-L28529	MAGEL2 - Exon 1	+	NM_019066.4; 369 nt antes do exon 1, anti-senso	15-021,444420	Materno	38.0 kb
427	04026-L29645	NDN		NM_002487.2; 1028-1027, anti-senso	15-021,482490		1137.6 kb
		SNRPN		NM_022807.3 \$			
288	15261-L16736	U1B		175-176 [Exon 1]	15-022,620016		6.1 kb
239	20692-L15415	U1B		271-272 [Exon 2]	15-022,626072		64.9 kb
278	12179-L13382	Intron u2		8.2 kb depois do exon u2 [Exon 3]	15-022,690980		12.3 kb
270	12182-L28519	Intron u2		12.9 kb antes do exon u5 [Exon 4]	15-022,703328		13.4 kb
256	20694-L28518	u5		376 nt depois do exon u5 [Exon 4]	15-022,716714		0.6 kb
391	12477-L13519	u5		986 nt depois do exon u5 [Exon 4]	15-022,717321		33.8 kb
250	11181-L13997	Exon 3 (CpG isl)	+	7.2 kb antes do exon 3 [Exon 5]	15-022,751105	Materno	0.1 kb
178	04106-L13905	Exon 3 (CpG isl)	+	7.1 kb antes do exon 3 [Exon 5]	15-022,751214	Materno	0.3 kb
190	04104-L04294	Exon 3 (CpG isl)	+	6.8 kb antes do exon 3 [Exon 5]	15-022,751480	Materno	0.3 kb
142	20687-L28509	Exon 3 (CpG isl)	+	6.6 kb antes do exon 3 [Exon 5]	15-022,751773	Materno	12.5 kb
294	01318-L13088	Exon 3		726-725 anti-senso [Exon 6]	15-022,764248		8.3 kb
409	11177-L28521	Exon 7		1089-1090 [Exon 9]	15-022,772555		75.7 kb

21 4	12719- L28514	SNORD116-1		NR_003316.1; 474 nt depois do transcrito, anti-senso	15- 022,84825 0		24.4 kb
47 2	12721- L13796	SNORD116- 11		NR_003326.2; 426 nt depois do transcrito	15- 022,87265 8		15.9 kb
32 6	20697- L28525	SNORD116- 23		NR_003337.2; 464 nt depois do transcrito, anti-senso	15- 022,88854 6		247.8 kb
		UBE3A		NM_130838.1			
35 5	02034- L12925	Exon 9		2368-2369	15- 023,13639 5		20.3 kb
30 1	12082- L28520	Exon 4		1640-1641	15- 023,15667 7		11.1 kb
16 0	04620- L00863	Exon 3		614-615	15- 023,16774 0		4.2 kb
19 5	20689- L28513	Exon 2		94-95	15- 023,17191 9		29.8 kb
37 3	10878- L11548	Exon 1		33-34	15- 023,20167 4		33.5 kb
18 4	19804- L28512	A montante (NM_000462. 3, Exon 1)	+	252 kb before exon 1 (53-54)	15- 023,23518 4	N/A	252.8 kb
36 4	20695- L28523	ATP10A - Exon 15		NM_024490.3; 3235-3236	15- 023,48795 7		171.9 kb
22 6	20691- L28515	ATP10A - Exon 1		NM_024490.3; 494 nt antes do exon 1	15- 023,65990 6		684.3 kb
22 0	01315- L00868	GABRB3 - Exon 9		NM_021912.4; 1233-1234	15- 024,34424 2		19.6 kb
38 2	10874- L11544	GABRB3 - Exon 7		NM_021912.4; 796-797	15- 024,36388 1		1399.8 kb
13 7	20700- L28528	OCA2 - Exon 23		NM_000275.2; 2498-2499	15- 025,76370 6		187.1 kb
31 7	20698- L28526	OCA2 - Exon 3		NM_000275.2; 7 nt depois do exon 3, anti-senso	15- 025,95076 5		1246.0 kb
20 2	01314- L00867	APBA2; fora da região comum da SPW/SA		NM_005503.3; 2605-2606	15- 027,19674 9		

4.9.2. Reação de ligação e reação de digestão/ligação

No dia posterior a incubação, declinamos a temperatura do termociclador para 20°C e retiram-se os tubos do termociclador. Em seguida adicionou-se os componentes da tabela 7 em cada tubo de reação.

Tabela 8: Componentes do Mix Ligase A

Componentes	Volume
H2O MilliQ	10 µl
Tampão Ligase A	3 µl

A partir deste tubo de PCR que contém 21 µl, foram realizadas duas reações. Após homogeneizar delicadamente com a pipeta, transferiu-se 10 µl do volume total para um segundo novo tubo, no qual será realizada a reação digerida do experimento. Alocou-se novamente no termociclador os dois tubos, cada um referente a uma reação específica e elevou-se a temperatura do termociclador para 48 °C.

No momento em que a temperatura atingiu 48°C, ainda dentro do termociclador, adicionaram-se os componentes descritos na tabela 8 ao primeiro tubo (Teste de número de cópias) e os componentes da tabela 9 ao segundo tubo (Teste de metilação).

Tabela 9: Componentes do Mix de Ligase 65

Componentes	Volume
H2O MilliQ	8,25 µl
Tampão Ligase B	1,5 µl
Enzima Ligase 65	0,25 µl

Tabela 10: Componentes do Mix de Ligação - Digestão

Componentes	Volume
H2O MilliQ	7,75 µl
Tampão Ligase B	1,5 µl
Enzima Ligase 65	0,25 µl
Enzima Hhal	0,5 µl

Após 30 minutos à 48°C (para ligação e digestão com a enzima HhaI), os tubos mantiveram-se no termociclador por mais 5 minutos à 98°C. Após isso, o termociclador declinou a temperatura para 20 °C, e assim prosseguimos para etapa de PCR.

4.9.3. Reação de PCR

Os componentes para o preparo de cada reação estão descritos na tabela 11.

Tabela 11: Componentes para reação de PCR

Componentes	Volume
H2O MilliQ	3,75 µl
Mix de iniciadores PCR	1 µl
Salsa Polimerase	0,25 µl

Após a adição destes componentes para a reação de PCR, as amostras seguiram no termociclador com as condições de ciclagem descritas na tabela 12.

Tabela 12: Condições de ciclagem para reação de PCR

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
95°C	30 seg	40
60 °C	30 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	20 min	1

4.9.4. Separação e visualização dos produtos de amplificação

Após a reação de PCR, 0,8 µl do produto da reação foram distribuídos em uma placa contendo em cada poço 0,2 µl de LIZ500 e 9 µl Formamida Hi-Di. Estas amostras foram então desnaturadas a 86 °C por 3 minutos e resfriadas em gelo por 4 minutos. Em seguida os produtos de PCR foram separados e identificados utilizando o equipamento ABI-PRISM® 3730 XL DNA Analyser (Applied Biosystems – Applied Biosystems Corporation, Estados Unidos), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido pela

empresa MRC Holland. O LIZ®, utilizado como padrão de tamanho de fragmentos, é composto por 16 fragmentos de fita única, marcados com um corante, que varia entre 35 e 500 pares de bases. Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados e identificados utilizando os programas GeneScan® e Genotyper® (Applied, Biosystems), respectivamente.

4.10. Sequenciamento de Sanger

Para sequenciamento de DNA foram utilizados: os produtos de PCR obtidos como molde, os iniciadores *Forward* e *Reverse* da região crítica da SPW (tabela 13), na concentração de 3.2 pmol e o kit de sequenciamento BigDye 3.1 (Applied Biosystems®). As reações foram analisadas no sequenciador de 96 capilares modelo ABI3730XL na Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT01) do programa PDTIS/FIOCRUZ.

Tabela 13: Oligo nucleotídeos utilizados no sequenciamento de Sanger

Primer	<i>Forward (5' > 3')</i>	<i>Reverse (5' > 3')</i>
SeqPWS	TACTTCCGGTGAGGGAGGG	AATAAAAGTGGCCGCTCCCC

Cada produto purificado de DNA foi lido nos dois sentidos, com cada iniciador senso (em uma mistura) e iniciador antisenso (em outra mistura). O volume de reação foi de 10 µL. Para o volume de 10 µL de reação, foi adicionado 1 µL de BigDye e 1,5 µL de tampão de sequenciamento 5x.

Após a reação de sequenciamento foi realizada uma precipitação das amostras para retirada de ddNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA e formar um precipitado do material a ser analisado. A placa foi centrifugada brevemente; seguido da adição de 35 µl de isopropanol 75% em cada poço. A placa é então agitada utilizando o vórtex por 10 segundos e mantida em temperatura ambiente, por 15 minutos, sob abrigo da luz. Em seguida a etapa de incubação realizou-se uma etapa de centrifugação por 45 minutos, à 4.000 rpm; o sobrenadante foi descartado. O pellet é lavado com a adição de

50 µl de etanol 75% em cada poço da placa; e foi centrifugada por 15 minutos, à 4.000 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado. A placa foi centrifugada invertida deixando chegar até 600 rpm e interrompeu-se a centrifugação. Por fim a placa foi aquecida à 60°C, permanecendo por 10 minutos, sob abrigo da luz.

Após o processo de precipitação, os produtos de sequenciamentos foram preparados para serem submetidos à eletroforese no sequenciador. Para tal procedimento, a desnaturação, utilizou-se a formamida, fator este altamente desnaturador que permitiu a separação da dupla-fita de DNA que foi analisada no sequenciador automático capilar.

Este processo consistiu em: Adicionar 10 µl de formamida em cada poço da placa seca; Centrifugar brevemente para permitir o preenchimento correto de cada poço; Colocar a placa em um bloco aquecido a 95°C, permanecendo por 3 minutos, sob abrigo da luz; Logo após o término do aquecimento, colocou-se a placa num recipiente com gelo com temperatura próxima a 4°C, onde permaneceu por 10 minutos; Centrifugou-se brevemente para permitir que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços concentrem-se ao fundo. Após estes processos a placa foi direcionada para o equipamento de eletroforese.

4.11. Coleta de dados clínicos

Os dados fenotípicos foram decididos em conjunto com o Departamento de Genética Médica do IFF/FIOCRUZ e do IEDE/RJ e coletados em uma ficha clínica com base nos achados clínicos avaliados pelo THE COMMITTEE ON GENETICS, 2011. Os dados vistos na tabela 14 foram coletados no momento da consulta do paciente e registrados em prontuários.

Tabela 14: Dados fenotípicos. Adaptado de McCandless, Shawn E, and Committee on Genetics. “Clinical report—health supervision for children with Prader-Willi syndrome.” Pediatrics vol. 127,1 (2011): 195-204. doi:10.1542/peds.2010-2820

Fetal	Respiratório	Comportamento / saúde mental
Atividade fetal reduzida	Hipoventilação	Transtorno de escuriação
Polidrâmnios	Apneia obstrutiva do sono	Transtorno de escuriação retal
Crescimento	Gastrointestinal	Problemas comportamentais relacionados a comida
Baixa estatura	Problemas de alimentação na infância	Problemas de temperamento
Falha em ganhar peso na infância	Refluxo gastroesofágico	Dificuldade com transições
Obesidade central	Diminuição do vômito	Teimosia
Cabeça e pescoço	Geniturinário	Comportamentos obsessivos
Dolicocefalia	Pênis pequeno	Discurso perseverante
Diâmetro bi temporal estreito	Hipoplasia escrotal	Transtorno obsessiva-compulsivo
Olhos amendoados	Criptorquidismo	Psicose
Estrabismo	Pequenos lábios hipoplásicos	Fuga
Fissuras palpebrais oblíquas	Clitóris hipoplásicos	Sono
Miopia	Esquelético	Ronco / apneia obstrutiva do sono
Lábio superior fino	Escoliose	Sonolência diurna excessiva
Boca de aparência pequena	Cifose	Acordar de manhã cedo
Cantos da boca virados para baixo	Mãos e pés pequenos	Despertar de noite para procurar comida
Saliva (reduzida) grossa e viscosa	Mãos estreitas com borda ulnar reta	Neurológico
Hipoplasia do esmalte dentário	Clinodactilia	Hipotonia neonatal grave que melhora com a idade

Cáries dentárias precoce	Pele, unhas e cabelo	Reflexos neonatais fracos de sugar e engolir
Apinhamento dental e má oclusão	Hipopigmentação	Deficiência da coordenação motora grossa
Ocular	Cabelos loiros para castanhos claros	Deficiência da coordenação motora fina
Estrabismo	Ascensão dos cabelos frontais	Deficiência intelectual leve a moderada
Nistagmo	Endócrino	Dificuldades de aprendizado
Miopia	Hiperinsulinemia	Maior risco de convulsões
Voz	Deficiência de GH	Atraso no desenvolvimento global
Fala hiper nasal	Hipogonadismo hipogonadotrófico	Problemas de fala-articulação
Choro fraco ou estridente na infância	Diabetes mellitus (tipo 2)	Hiperfagia
Diversos		Diversos
		Instabilidade de temperatura corporal
		Limiar de dor alta
		Habilidade incomum com quebra-cabeças

4.12. Análise estatística dos dados

Frequências absolutas e percentuais dos dados fenotípicos vistos na etapa 4.11 foram comparadas pelos subgrupos moleculares dos pacientes utilizando tabelas de contingência 2x2. A relação entre o defeito molecular (Deleção paterna ou DUM) e os dados fenotípicos foi investigado utilizando o teste qui-quadrado (χ^2) de Pearson ou o teste exato de Fisher, nos casos em que se observou pelo menos uma frequência esperada inferior a 5. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS para Windows (Versão 22) e o nível de significância adotado foi 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de metilação (MS – HRM)

De acordo com os objetivos propostos por este estudo, foram inclusos durante o período de setembro de 2016 e setembro de 2020, um total de 166 pacientes para a realização da análise de dissociação em alta resolução e sensível à metilação (MS-HRM). Destes, 45 pacientes tiveram o diagnóstico molecular compatível com o padrão de metilação de SPW.

A técnica de conversão bissulfítica tem como objetivo converter as citosinas não metiladas presentes no alelo paterno em uracilas, enquanto as citosinas que estão metiladas naturalmente nesta região genômica são protegidas contra o tratamento com bissulfito. A partir deste DNA convertido, a técnica de MS-HRM tem como propósito realizar uma análise da temperatura de dissociação da dupla fita deste DNA molde. Em consequência do processo de conversão bissulfítica e a amplificação deste DNA molde pela etapa de qPCR do teste, conseguimos realizar a diferenciação dos alelos, onde após estas duas etapas o alelo materno permaneceu com as suas citosinas intactas, em contrapartida no alelo paterno, onde antes do processo seriam encontradas citosinas não metiladas, durante o processo de qPCR estas citosinas (as quais foram convertidas em uracilas) serão pareadas com timinas, assim ocasionando uma diferença de temperatura entre os alelos. O alelo materno (metilado) terá uma temperatura de dissociação maior que o alelo paterno (não metilado).

O HRM foi realizado em todos os nossos 166 pacientes, confirmando o diagnóstico para a Síndrome de Prader-Willi devido a alteração do padrão de metilação, representado pela presença de um pico único relativo à temperatura de dissociação alélica materna, e ausência do pico relacionado ao alelo paterno (Figura 3).

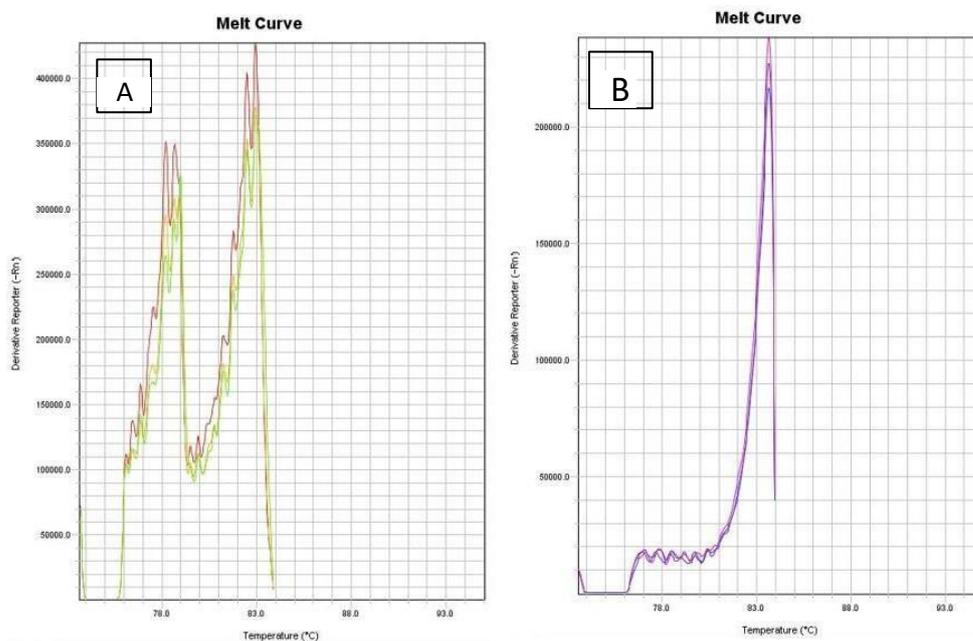


Figura 3: Discriminação alélica a partir da curva de dissociação do DNA amplificado. A: Controle normal, apresenta padrão de metilação normal devido a presença dos picos referentes ao alelo paterno (78 °C) e materno (83 °C); B: Paciente PWS 01 com alteração no perfil de metilação devido à ausência do pico referente ao alelo paterno e presença do alelo materno, caracterizando-se SPW.

As reações de MS-HRM dos 45 indivíduos foram realizadas em triplicatas e demonstraram pouca variação no *ct* de amplificação, mantendo-se constante em 25 (Figura 4).

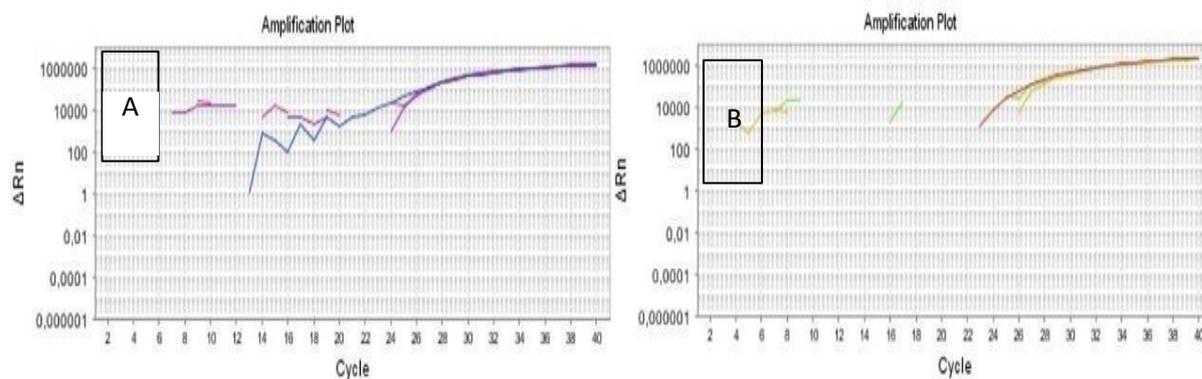


Figura 4: *Ct* relativo à amplificação de cada triplicata. Tanto o controle positivo (A) quanto o indivíduo PWS 01 (B) apresentaram *ct* de amplificação próximo a 25.

5.2 Amplificação de sondas multiplex específica de metilação (MS-MLPA)

O MS-MLPA foi realizado em 33 (73,3%) dos indivíduos, utilizando o kit SALSA MS-MLPA ME028 (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Destes, 18 (54,5%) eram indivíduos do sexo feminino, 15 (45,5%) do sexo masculino.

O processo do teste envolve a desnaturação do DNA, hibridização das sondas, ligação e ligação-digestão em conjunto com uma etapa final de reação de PCR para gerar até 60 fragmentos de DNA com tamanhos diferentes a baixo custo e, portanto, viável para não apenas determinar o status de metilação do cromossomo 15 como também o número de cópias da região 15q11.2-q13. Amostras com um status de metilação em aproximadamente 50% (alcance entre 40-60%) para as sondas específicas da SPW foram identificadas como controles normais e caso este mesmo status apresentar valores próximos de 100% (maior que 80%), estes foram identificados como padrão da SPW (Figura 5). Além disso, o protocolo permite diferenciar os subtipos de deleções encontradas nos pacientes com a SPW, utilizando os dados de número de cópias, aqueles indivíduos que apresentarem apenas um número de cópia da sonda equivalente a região PQ1-PQ2 foram identificados como deleções tipo 1 e pacientes que tiveram dois números de cópias desta mesma região foram identificados como deleções tipo 2 (Figura 6).

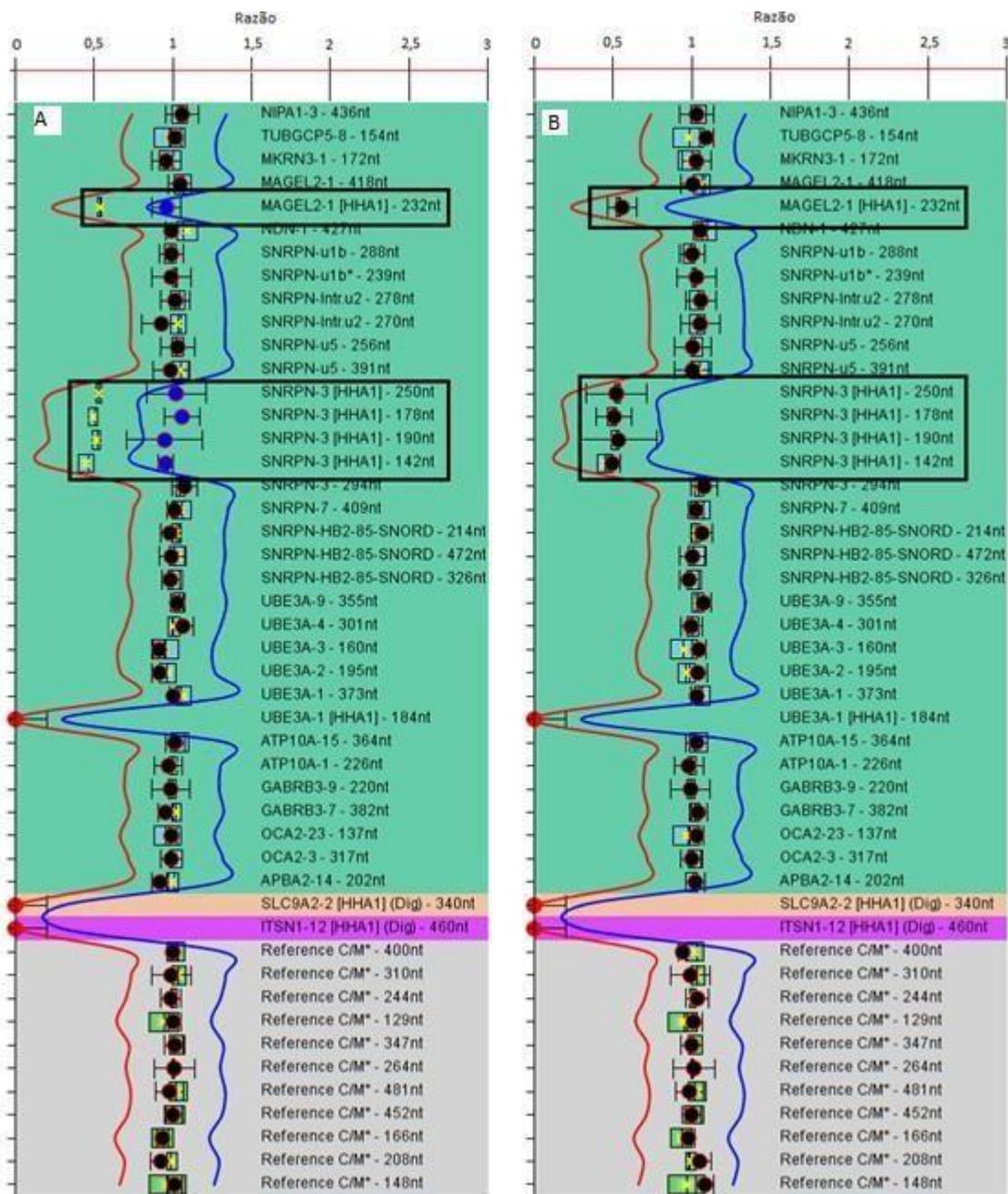


Figura 5 Caracterização do status de metilação por MS-MLPA. (A) Status de metilação de um indivíduo com SPW, onde as 5 sondas (Retângulos pretos) mostram um padrão de metilação anormal (Cerca de 100%). (B) Status de metilação de um indivíduo normal, onde as mesmas 5 sondas mostram um padrão de metilação normal (Cerca de 50%).

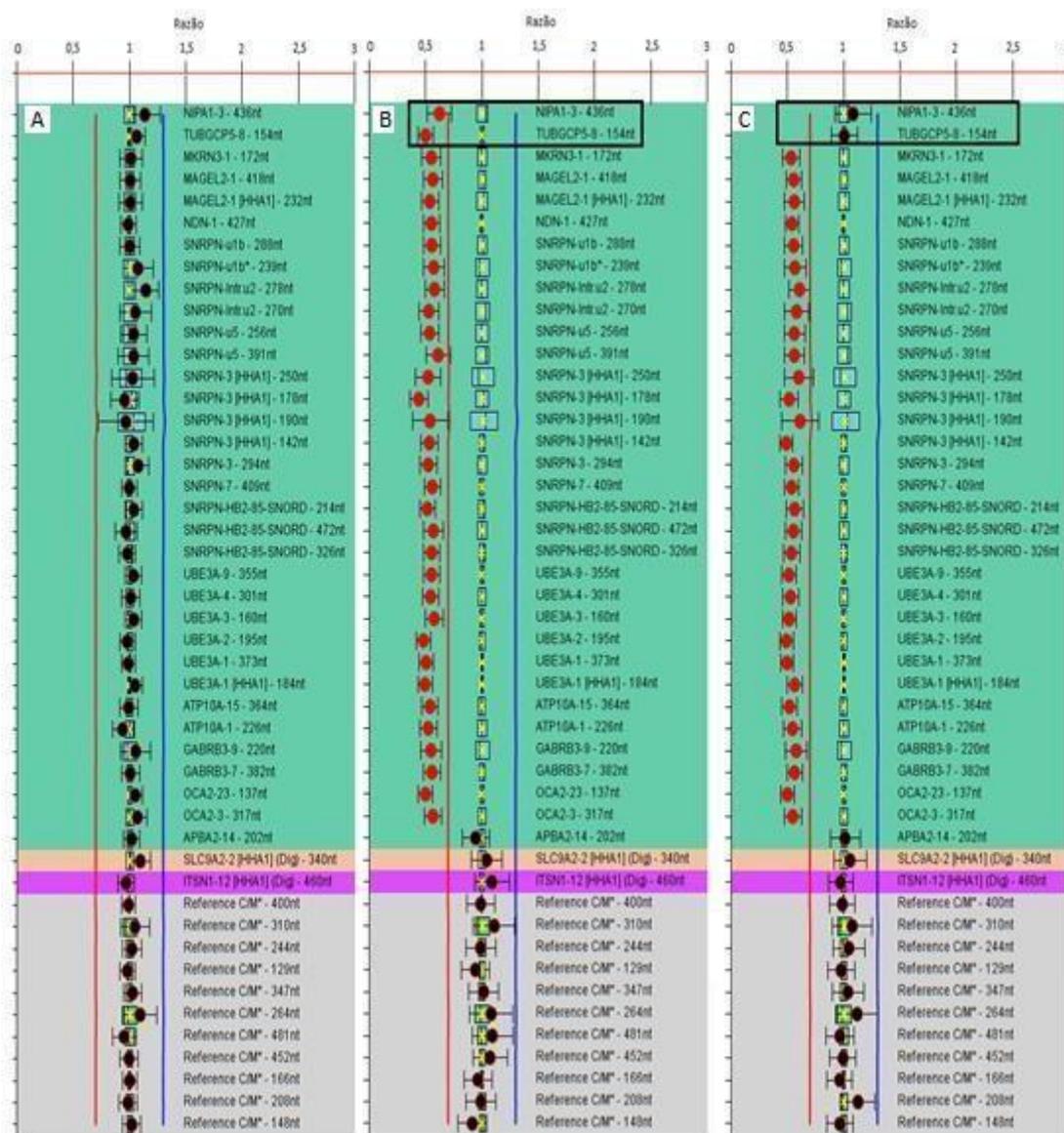


Figura 6 Caracterização por MS-MLPA do status de número de cópias de indivíduos SPW. (A) Indivíduo com Dissomia uniparental materna do 15. Todas as sondas estão, aproximadamente, com uma razão de 1 (Indicando que estas sondas foram encontradas em 100% dos alelos). (B) Indivíduo com uma deleção tipo 1 da região 15q11.2-q13. As sondas de número de cópias encontram-se com uma razão de 0,5 aproximadamente (Indicando um status de deleção, onde em apenas 50% dos alelos são encontrados estes genes) e suas sondas de referência com uma razão de 1. (C) Indivíduo com uma deleção tipo 2 da região 15q11.2-q13. A região de PQ1-PQ2 envolvendo as sondas *TUBGCP5* e *NIPAI* possuem uma razão de 1 (Indicando um status de não deleção desta região), enquanto as outras sondas estão deletadas.

Dos 33 indivíduos analisados no LACIFF com testes MS-MLPA, 27% tiveram deleções tipo 1, 33% tiveram deleções tipo 2 e 40% tiveram dissomias uniparentais maternas do 15 (Tabela 15). Nenhum indivíduo presente no estudo mostrou alguma deleção atípica ou translocações robertsonianas.

Tabela 15: Resultados de MS-MLPA de indivíduos com a Síndrome de Prader Willi agrupados por subtipos genético

Subtipo genético da SPW	Total de indivíduos analisados por MS-MLPA (n=33)
Deleção tipo 1	27% (9)
Deleção tipo 2	33% (11)
Dissomia Uniparental Materna	40% (13)

5.3 Testes realizados em conjunto ao IEDE/RJ

De acordo com o item 4.1 (Materiais e métodos), realizamos uma colaboração com o Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione (IEDE/RJ) onde obtivemos alguns dos resultados genéticos dos indivíduos presentes no estudo.

O IEDE foi responsável por realizar a investigação genética de 12 (26,6%) indivíduos. Destes, 6 (50%) são do sexo masculino e 6 (50%) do sexo feminino. Os dados dos subtipos genéticos se encontram na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados dos exames realizados em conjunto ao IEDE/RJ agrupados por subtipo genético

Subtipo genético da SPW	Total de indivíduos analisados por FISH (n=7)	Total de indivíduos analisados por bandeamento GTG (n=3)	Total de indivíduos analisados por análise de microssatélites (n=2)
Deleção	100% (7)	100% (3)	-
Dissomia Uniparental Materna	-	-	100% (2)

5.4 Sequenciamento de Sanger

De um total de 45 pacientes, em 29 deles foi possível identificar a presença de deleção pela metodologia de MS-MLPA. O método de MS-MLPA não diferencia casos de DUM e defeitos no centro de imprinting. Para investigar a etiologia desses pacientes foi realizado o sequenciamento por Sanger da região promotora do exon 1 do gene *SNRPN-SNURF* no intuito de avaliar mutações no pareamento de bases e do padrão epigenético dessa região. Não foi possível avaliar diferenças entre a sequência referência depositada no GenBank (NG_012958.1)

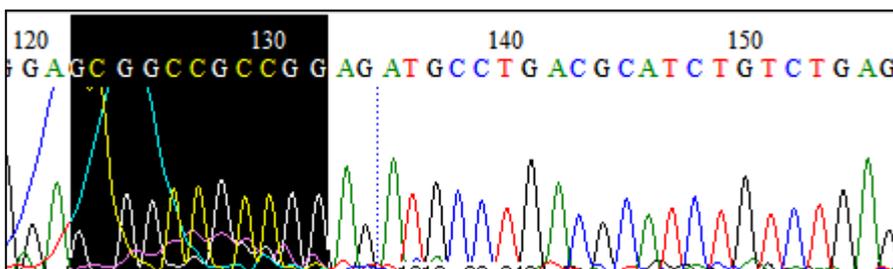


Figura 7: Eletroferograma representativo da região 15q11.2-q13 derivada do sequenciamento do paciente PWS 13. A região da sequência marcada em preto indica a ilha CpG encontrada na região em questão.

5.5 Análise estatística dos dados

Os resultados sobre o histórico clínico, achados físicos e anormalidades neurológicas estão organizados na Tabela 17. Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os dois grupos para os seguintes dados: atividade fetal reduzida, hipotonia neonatal, problemas comportamentais relacionados a comida, cáries dentárias, escoliose, diabetes mellitus tipo 2, saliva grossa e viscosa, criptorquidismo e pequenos lábios hipoplásicos.

Problemas comportamentais como a teimosia, transtorno de escoriação, problemas com o temperamento e relacionados a comida foram encontrados em cerca de 58% dos pacientes com deleção e em 52% dos pacientes com dissomia uniparental materna (DUM). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os dois grupos a respeito da sonolência diurna excessiva e maior risco de convulsões.

Comparado com indivíduos normais, pacientes com a SPW apresentam um atraso do desenvolvimento da coordenação motora, entretanto em nosso estudo, mais de 30% dos pacientes de ambos os grupos tiveram uma deficiência da coordenação motora grossa e fina. Em 24/29 (82,8%) pacientes com deleção e em 11/16 (68,8%) pacientes com DUM, o atraso do desenvolvimento global foi observado, porém sem nenhuma diferença estatística entre os grupos.

Foram avaliados também fenótipos clínicos relacionados ao sistema ocular, em 15/29 (51,7%) dos pacientes com deleção e 4/16 (25%) dos pacientes com DUM apresentaram estrabismo, porém sem diferença estatística significativa entre os dois grupos. Em relação ao quadro clínico de miopia foi observado uma diferença significativa entre os dois grupos. Esse sinal clínico demonstrou uma maior frequência em pacientes com uma deleção do que pacientes com a DUM (31% vs 0%). Em nosso estudo, exclusivamente 1 paciente do grupo de deleções apresentou a hipermetropia, em contrapartida, apenas 1 paciente do grupo de DUM apresentou o nistagmo.

Foi também avaliado a integridade do sono, através da manifestação da apneia central do sono. Esse fenótipo não foi observado em nenhum dos pacientes, porém a apneia obstrutiva do sono demonstrou diferenças significativas entre os grupos. Este distúrbio está presente em 15/29 (51,7%) dos pacientes com uma deleção e 3/16 (18,8%) dos pacientes com DUM.

Em relação a parte cognitiva, observada no sinal clínico que condiz com a habilidade incomum com quebra-cabeças que os pacientes com a SPW podem apresentar. Esta variável apresentou uma diferença significativa entre os grupos, apresentando uma maior frequência em pacientes com uma deleção quando comparado aos pacientes com a DUM (48,3% vs 6,3%).

Como apresentado anteriormente, a SPW possui alguns sinais e sintomas clínicos que são muito característicos para estes pacientes. Em nossa população amostral a hipotonia neonatal grave que melhora com a idade foi detectada em 100% (45 indivíduos) dos casos. Problemas de alimentação na infância, hiperfagia, hipogonadismo e sinais dismórficos leves como olhos amendoados, cantos da boca virados para baixo, lábio superior fino e mãos e pés pequenos não tiveram diferenças significativas em nosso estudo. Esses dados estão resumidos na tabela 17

Tabela 17: Achados clínicos em pacientes com a SPW divididos pelos subgrupos genéticos. P(1)= Teste qui-quadrado de Pearson; P(2)= Teste exato de Fisher; $\alpha=0,05$. Linhas sem valores são variáveis que tiveram uma análise constante

	Pacientes com deleção (n=29)		Pacientes com DUM (n=16)		P/a=0,05
	percentual	n	percentual	n	
Atividade fetal reduzida	82,8%	24	75%	12	P(2)=0,700
Polidramnia	27,6%	8	18,8%	3	P(2)=0,720
Baixa estatura	55,2%	16	37,5%	6	P(1)=0,353
Falha em ganhar peso na infância	89,7%	26	68,8%	11	P(2)=0,111
Obesidade central	51,7%	15	43,8%	7	P(1)=0,758
Dolicocefalia	34,5%	10	12,5%	2	P(2)=0,164
Diâmetro bitemporal estreito	58,6%	17	37,5%	6	P(1)=0,221
Olhos amendoados	86,2%	25	87,5%	14	P(2)=1,000
Fissuras palpebrais oblíquas	34,5%	10	31,3%	5	P(1)=1,000
Lábio superior fino	41,4%	12	18,8%	3	P(1)=0,189
Boca com aparência pequena	48,3%	14	62,5%	10	P(1)=0,533
Cantos da boca virados para baixo	44,8%	13	62,5%	10	P(1)=0,353
Saliva grossa e viscosa	31%	9	18,8%	3	P(2)=0,491
Hipoplasia do esmalte dentário	10,3%	3	6,3%	1	P(2)=1,000
Cáries dentárias precoce	31%	9	25%	4	P(2)=0,743
Apinhamento dental e má oclusão	20,7%	6	12,5%	2	P(2)=0,691
Estrabismo	51,7%	15	25%	4	P(1)=0,118
Nistagmo	0%	0	6,3%	1	P(2)=0,356
Hipopigmentação da retina	0%	0	0%	0	-----
Hipoplasia foveal	0%	0	0%	0	-----
Hipermetropia	3,4%	1	0%	0	P(2)=1,000
Miopia	31%	9	0%	0	P(2)=0,017
Fala hipernasal	41,4%	12	37,5%	6	P(1)=1,000
Choro fraco ou estridente na infância	62,1%	18	62,5%	10	P(1)=1,000
Hipoventilação	3,4%	1	0%	0	P(2)=1,000
Apneia obstrutiva do sono	51,7%	15	18,8%	3	P(1)=0,055
Problemas de alimentação na infância	51,7%	15	31,3%	5	P(1)=0,224
Refluxo gastroesofágico	17,2%	5	31,3%	5	P(2)=0,455
Diminuição do vômito	24,1%	7	31,3%	5	P(2)=0,728
Pênis pequeno	37,5%	6	16,7%	1	P(2)=0,616
Hipoplasia escrotal	56,3%	9	33,3%	2	P(2)=0,635
Criptorquidismo	81,3%	13	66,7%	4	P(2)=0,585
Pequenos lábios hipoplásicos	38,5%	5	20%	2	P(2)=0,405
Clitóris hipoplásicos	23,1%	3	10%	1	P(2)=0,604
Escoliose	27,6%	8	12,5%	2	P(2)=0,292
Cifose	3,4%	1	6,3%	1	P(2)=1,000
Mãos e pés pequenos	75,9%	22	75%	12	P(2)=1,000
Mãos estreitas com borda ulnar reta	20,7%	6	12,5%	2	P(2)=0,691

	Pacientes com deleção (n=29)		Pacientes com DUM (n=26)		P/a=0,05
	percentual	n	percentual	n	
Clinodactilia	24,1%	7	18,8%	3	P(2)=1,000
Hipopigmentação	20,7%	6	0%	0	P(2)=0,075
Cabelos loiros para castanhos claros	41,4%	12	18,8%	3	P(1)=0,189
Ascensão dos cabelos frontais	31%	9	12,5%	2	P(2)=0,279
Hiperinsulinemia	3,4%	1	18,8%	3	P(2)=0,121
Deficiência de GH	69%	20	50%	8	P(1)=0,336
Hipogonadismo hipogonadotrófico	10,3%	3	12,5%	2	P(2)=1,000
Diabetes mellitus (tipo 2)	3,4%	1	12,5%	2	P(2)=0,285
Transtorno de escuriação	62,1%	18	50%	8	P(1)=0,534
Transtorno de escuriação retal	6,9%	2	18,8%	3	P(2)=0,330
Problemas comportamentais relacionados a comida	58,6%	17	43,8%	7	P(1)=0,369
Problemas de temperamento	58,6%	17	56,3%	9	P(1)=1,000
Dificuldade com transições	24,1%	7	31,3%	5	P(2)=0,728
Teimosia	55,2%	16	62,5%	10	P(1)=0,757
Comportamentos obsessivos	34,5%	10	37,5%	6	P(1)=1,000
Discurso perseverante	48,3%	14	43,8%	7	P(1)=1,000
Transtorno obsessivo-compulsivo	34,5%	10	18,8%	3	P(2)=0,322
Psicose	3,4%	1	0%	0	P(2)=1,000
Fuga	13,8%	4	12,5%	2	P(2)=1,000
Sonolência diurna excessiva	13,8%	4	37,5%	6	P(2)=0,131
Acordar de manhã cedo	55,2%	16	37,5%	6	P(1)=0,353
Despertar de noite para procurar comida	6,9%	2	6,1%	1	P(2)=1,000
Hipotonia neonatal grave que melhora com a idade	100%	29	100%	16	-----
Reflexos neonatais fracos de sugar e engolir	96,6%	28	93,8%	15	P(2)=1,000
Deficiência da coordenação motora grossa	31%	9	25%	4	P(2)=0,743
Deficiência da coordenação motora fina	37,9%	11	31,3%	5	P(1)=0,752
Dificuldades de aprendizado	51,7%	15	37,5%	6	P(1)=0,533
Maior risco de convulsões	20,7%	6	18,8%	3	P(2)=1,000
Atraso no desenvolvimento global	82,8%	24	68,8%	11	P(2)=0,455
Problemas de fala-articulação	55,2%	16	62,5%	10	P(1)=0,757
Hiperfagia	51,7%	15	25%	4	P(1)=0,118
Instabilidade de temperatura corporal	27,6%	8	18,8%	3	P(2)=0,720
Limiar de dor alta	48,3%	14	37,5%	6	P(1)=0,544
Apresentação pélvica	37,9%	11	31,3%	5	P(1)=0,752
Habilidade incomum com quebra-cabeças	48,3%	14	6,3%	1	P(1)=0,007

6. DISCUSSÃO

O laboratório de Alta Complexidade (LACIFF) faz parte da Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ sendo o primeiro laboratório de referência membro da rede contemplando o diagnóstico de doenças raras. O LACIFF é referência nacional para o diagnóstico molecular das Síndromes de Prader-Willi e Angelman e integrado ao SUS. A obtenção do diagnóstico molecular apresenta um grande impacto na vida do paciente e de seus familiares (MAKELA et al., 2009). O Serviço prestado desmitifica o diagnóstico molecular, o que para muitos é algo complicado, inacessível e extremamente custoso. Os resultados obtidos nesse trabalho auxiliarão no diagnóstico dos pacientes encaminhados pela rede pública de saúde com suspeita de uma doença genética. A correlação genótipo-fenótipo inicial aqui demonstrada é de extrema importância pois em alguns casos mesmo com uma equipe multidisciplinar e com profissionais experientes, os pacientes podem continuar sem o diagnóstico. Episódios como esse podem ocorrer devido a vários fatores ligados à variabilidade de manifestações fenotípicas dessa doença em si e da heterogeneidade etiológica.

O avanço dos métodos moleculares que auxiliam no diagnóstico e no aconselhamento genético, permite esclarecer casos que por testes convencionais como cariótipo e FISH não seriam esclarecidos (MAKELA et al., 2009). No atual momento, o laboratório dispõe da técnica de MS-HRM como método inicial de exame. Essa técnica, embora apresente uma ótima relação custo-benefício, limita o estudo dos casos para direcionar o aconselhamento genético. Apesar da diminuição dos custos a técnica de NGS ainda apresenta valores altos para a compra de reagentes, uma vez que os preços são cotados em dólar e embora o número de pacientes sequenciados no equipamento S5 seja alto (aproximadamente 30), o que diluí os custos o aporte financeiro inicial ainda é elevado.

Nesse cenário, o MLPA, por motivos econômicos e de conveniência, foi o método de escolha para este estudo para aqueles pacientes que tiveram o padrão de metilação compatível com SPW, através da técnica de MS-HRM. Entre as múltiplas aplicações da análise de MLPA, utilizamos a responsável por identificar ambas as alterações de número de cópias quanto as epigenéticas. Na análise por MS-MLPA a sequência visada por sondas específicas as quais contêm sítios de restrição para a endonuclease HhaI (Tabela 7), capaz de reconhecer as ilhas CpG. Uma das principais vantagens do MLPA é o baixo custo, frente ao NGS e a possibilidade de em apenas um exame, observar a integridade da região da SPW e detectar alterações como deleções, duplicações e níveis de metilação (STUPPIA et al., 2012). Convém ressaltar que do ponto de vista operacional é um teste menos complexo comparado a outros como o NGS e CGH. A diferença de custo entre esses exames é relevante quando se pensa em um laboratório de referência que presta serviço para a população em geral.

Em nosso meio ainda há limitações para o acesso da técnica, realização da técnica e interpretação precisa dos resultados. Altas taxas de diagnósticos errados e intervenção retardada em pacientes SPW neonatos acabam levando a um prognóstico ruim.

Geneticamente a SPW é um distúrbio de *imprinting* causado pela expressão de genes paternos ativos na região crítica no cromossomo 15q11-q13. Mecanismos genéticos moleculares que acarretam a SPW incluem principalmente três tipos: a deleção da região crítica na cópia paterna no cromossomo 15 em aproximadamente 75% dos casos, dissomia uniparental materna em 25% e o silenciamento do alelo paterno devido a um defeito no centro de imprinting no cromossomo paterno 15 em 1% (HORSTHEMKE; WAGSTAFF, 2008). A região crítica da SPW contém muitos genes expressos apenas no

alelo paterno do cromossomo 15. O silenciamento dos genes *MKRN3*, *NDN* e *SNRPN* presente no cromossomo 15 materno está associado com a metilação das ilhas CpG específica para a mãe na região promotora desses genes (JAY et al., 1997), enquanto suas cópias no alelo paterno encontram-se não metilados e expressos. Com base no status diferencial de metilação do *SNRPN*, a associação das técnicas de MS-HRM e MS-MLPA apresentam um bom resultado no diagnóstico e aconselhamento genético, reservando o NGS para casos específicos. Com a maior disponibilidade e oferta do diagnóstico molecular em aplicações clínicas, um maior número de pacientes com SPW estão sendo diagnosticados de forma conclusiva em um estágio inicial. No presente, poucos são os estudos de pesquisa SPW em grandes amostras de recém-nascidos com a constituição genética brasileira. Esse estudo piloto inclui 45 casos de SPW de indivíduos brasileiros o que pode delinear os principais fenótipos clínicos, da população brasileira, dos portadores de SPW. No entanto, uma das principais vantagens desse estudo é a padronização das técnicas de análise no diagnóstico molecular – feitas no mesmo laboratório e por um grupo pequeno de profissionais amplamente treinados. Convém ressaltar que as informações clínicas foram coletadas de maneira a serem mais abrangentes e precisas possíveis. Outro ponto importante a ser considerado é que, como em toda prática médica, os achados laboratoriais foram validados pelos profissionais de saúde levando em conta o quadro clínico dos pacientes.

Nosso grupo tem interesse do estudo do papel dos genes presentes na região da SPW e os fenótipo decorrentes das alterações encontradas. De modo geral nenhum dos erros genéticos da SPW está associado a sintomas exclusivos. No entanto, as classes moleculares mais prevalentes (deleção e DUM) mostram diferenças estatísticas na frequência ou gravidade em algumas características clínicas. Pacientes com deleção paterna foram mais relacionados a problemas de alimentação, distúrbios do sono,

hipopigmentação e déficits de fala e linguagem (TORRADO et al., 2007). Várias outras características são mais comuns em indivíduos com DUM como parto pós-termo, QI verbal mais alto, psicose e transtorno do espectro do autismo (DYKENS, 2002). Por outro lado, os pacientes com DUM são menos propensos a ter a aparência facial típica de PWS ou hipopigmentação. Até agora, nenhuma mutação genética foi descrita para contribuir para este distúrbio genético, nosso grupo escreveu um artigo de revisão propondo revisar genes individualmente e seu papel no desenvolvimento dos fenótipos clínicos (COSTA et al., 2019) (ANEXO 2). O passo natural foi a análise da relação genótipo-fenótipo dos pacientes.

De acordo com as informações básicas dos 45 casos de pacientes com SPW, foi observado que a maioria dos pacientes se encontrava na faixa etária de 1- 28 anos com uma média de idade de 9 anos. A frequência das deleções em 29 (64,4%) e das DUM em 16 (35,6%) dos nossos pacientes obteve uma leve concordância com estudos anteriores (ROBINSON et al., 1991; MASCARI et al., 1992).

Em relação a uma possível diferença de gênero nos pacientes SPW, SANJEEVA e colaboradores (2017) atentaram para o fato que um maior número de meninos era diagnosticado em comparação com meninas. No entanto, GUNAY-AYGUN e colaboradores (2001) haviam relatado uma proporção semelhante de gênero 1: 1. Em nosso estudo, a proporção de gênero (menino / menina) é de aproximadamente 1:1 (22:23). Os achados que apresentam uma proporção maior de meninos frente a meninas podem indicar um viés regional para meninos que estão sendo levados para tratamentos médicos com mais frequência do que meninas nas diferentes culturas e regiões do planeta. Além disso, os meninos com criptorquidia são mais fáceis de identificar.

A maioria dos pacientes recém-nascidos com a SPW são bebês a termo, nos quais hipotonia, fraca capacidade de sucção e choro fraco são prontamente identificados. Neste

estudo, alguns dos principais fenótipos clínicos em recém-nascidos com SPW como a hipotonia neonatal grave que melhora com a idade (100%), olhos amendoados (86,6%), dificuldade de alimentação/ ganho de peso (82,2%), atividade fetal reduzida (80%), o criptoquidismo (77,2%) e choro fraco (62,2%) foram encontrados em nossa população amostral. WANG e colaboradores (2016) demonstraram taxas de hipotonia e choro fraco superiores a 95%, consistente com nossos dados de hipotonia, contudo, a diferença entre os resultados referentes ao choro fraco pode ser explicada pelo fato do julgamento subjetivo dos médicos referente a este sinal clínico. Além disso, o poder de sucção, músculo relaxamento, intensidade do choro e grau de atividade podem refletir indicadores de tônus muscular. Um choro fraco e hipotonia são características gerais da SPW, sem diferenças óbvias entre grupos étnicos. A incidência de dificuldade de alimentação neonatal pode atingir mais de 93% dos casos de acordo com GUNAY-AYGUN e colaboradores (2001) e é principalmente atribuível à fraca capacidade de sucção.

A disfunção do hipotálamo é uma causa por trás dos principais sinais e sintomas apresentados em pacientes afetados pela SPW (JEFFCOATE et al., 1980; SWAAB, 1997). As manifestações de mau desenvolvimento genital incluem a criptorquidia, hipoplasia escrotal e micro pênis em homens, enquanto as mulheres podem exibir órgãos genitais ausentes ou com os pequenos lábios severamente subdesenvolvidos, um pequeno clitóris, ou ambos. Sinais do hipogonadismo podem ser observados já no nascimento de pacientes homens com SPW, porém esses mesmos sinais em pacientes do sexo feminino, exibem um grau de dificuldade maior para serem observados. Esta dificuldade em reconhecer a hipoplasia genital em mulheres deve ser enfatizada, pois contrário ao sexo masculino, se a oportunidade de observar estes sinais no período neonatal for perdida, uma obesidade posterior pode dificultar exames posteriores. (CRINO et al., 2003; STEPHENSON, 2008).

Encontramos uma menor incidência de hipopigmentação da pele (20,7%) em nosso grupo de estudo em comparação com 70-100% de incidência de hipopigmentação cutânea descrita em diferentes estudos (GUNAY-AYGUN et al., 2001; LIN et al., 2007). Uma das possíveis explicações que deve ser por nós investigada é sobre os grupos étnicos dos pacientes uma vez que a hipopigmentação da pele é menos prontamente identificada entre os indivíduos caucasianos; as discrepâncias podem ser explicadas pelos seguintes: (1) pequenos tamanhos de amostra suscetíveis a viés de seleção ou (2) nenhum padrão de avaliação clínica para hipopigmentação da pele que é facilmente esquecido. Assim, para determinar se nossos resultados são consistentes com esses estudos, precisamos aumentar o tamanho da amostra, alinhar os padrões de avaliação e conduta da pesquisa. A análise de 54 casos de pacientes com SPW pediátricos por CASSIDY et al., (1997) relatou que a taxa de ocorrência de hipopigmentação da pele em casos associados à deleção é muito maior em relação a DUM. Analisando a estrutura da região genômica do cromossomo 15 associada a SPW (Figura 2) observamos a presença do gene *OCA2* associado ao albinismo oculocutâneo tipo 2, tirosinase positivo. Esse gene fica dentro dos diferentes pontos de quebra que levam ao aparecimento de dois tamanhos diferentes de deleção. Nesse estudo, todos os casos de hipopigmentação foram observados em pacientes portadores de deleção. No presente estudo não foi possível identificar pacientes com defeitos no centro de *imprinting*, a utilização do MS-MLPA confirmou o diagnóstico por MS-HRM e em alguns casos permitiu a identificação de alguma deleção em 58% dos pacientes. Devido a uma limitação da técnica os indivíduos onde as deleções não foram identificadas (52%) foram analisados indiretamente para DUM e diretamente para o defeito do centro de *imprinting*. A região de centro de *imprinting* dos pacientes foi sequenciada na forma selvagem e após o tratamento com bissulfeto. O sequenciamento sem tratamento foi com o intuito de detectar possíveis alterações na sequência e o procedimento feito após a

conversão tinha o intuito de verificar erros de metilação através das conversões das citosinas não metiladas. Através da não detecção de erros através dos sequenciamentos dos fragmentos pré e pós-tratamento, os pacientes foram classificados como DUM. Esse resultado e classificação são importantes para os pacientes que permaneceriam sem diagnóstico definido e aconselhamento genético, contribuindo assim para uma melhora importante na acuidade diagnóstica. Todos os casos foram avaliados isoladamente, com intuito de confirmar a presença das características clínicas e posterior correlação com os resultados da análise molecular.

Ao contrário da síndrome de Angelman, SPW não é considerada como um fator de risco para epilepsia. Em 2009, FAN e colaboradores (2009) estudaram 56 casos de pacientes pediátricos com SPW e encontraram 10 casos com convulsões. Entre eles, a causa da convulsão em 9 casos foi associada com SPW, e 8 desses 9 eram casos com deleção da região crítica da SPW. A diferença fenotípica pode estar relacionada à redução inibição por receptores GABA-A, várias subunidades das quais são codificados por grupos de genes na região deletada em SPW (VARELA et al., 2004).

Em suma, hipotonia, dificuldade de alimentação e desenvolvimento deficiente da genitália são características clínicas gerais da SPW. Hipopigmentação da pele, mau desenvolvimento das glândulas sexuais e características faciais específicas, deficiência de hormônio de crescimento e demais características descritas na tabela 16 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre deleção e DUM.

SINNEMA e colaboradores (2011) relatam que os pacientes com SPW apresentam taxas mais altas de comportamentos desadaptativos em comparação com outras síndromes que apresentam deficiência intelectual. WEBB e colaboradores (2002) sugeriram que a DUM

tem comportamentos desadaptativos mais brandos em relação aos casos de deleção, mas tem um risco maior de transtornos do espectro do autismo e psicose.

Em nosso estudo, a miopia apresentou uma diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A miopia seguindo os critérios de diagnósticos clínicos estabelecidos por Holm e colaboradores é considerado um critério menor e está associada a deleção. Uma das possíveis explicações moleculares é a perda do gene *HERC2*. Esse gene pertence à família de genes *HERC*, que codifica um grupo de proteínas que apresentam vários domínios estruturais. Todos os membros têm pelo menos 1 cópia de uma região N-terminal mostrando homologia com o regulador do ciclo celular RCC1 e um domínio HECT C-terminal (homólogo ao terminal C de E6-AP) encontrado em uma série de ligases de proteína ubiquitina E3. As variações genéticas neste gene estão associadas à variabilidade da pigmentação da pele, cabelo e olhos. Vários pseudogenes deste gene estão localizados nos cromossomos 15 e 16. Esse gene também está associado ao desenvolvimento de anormalidade de refração caracterizada pela capacidade de ver objetos próximos, associado ao fenótipo de miopia.

As disfunções endócrinas hipotalâmicas podem estar relacionadas por alguns fenótipos clínicos como hiperfagia, que combinada com o baixo metabolismo e a baixa atividade física determinam a obesidade presente nos pacientes SPW. Essas disfunções também podem implicar na deficiência do hormônio do crescimento (GH) observado nesses indivíduos. O GH regula a síntese do fator de crescimento insulina tipo 1 (IGF-I) nos adipócitos tornando um importante fator de estimulação de crescimento da síntese proteica (VAN NIEUWPOORT et al., 2011). Quanto a apneia obstrutiva do sono, foi observado uma diferença significativa com uma frequência maior nos casos de deleção frente os de DUM ($p < 0,05$). Esse quadro pode estar associada a disfunção endócrina hipotalâmica que afeta o controle ventilatório, podendo acarretar os distúrbios

respiratórios do sono (DRS) (GILLETT; PEREZ, 2016), levando à micro despertares, ritmo circadiano anormal, apneia central, apneia obstrutiva, sono de movimento rápido dos olhos (REM), hipercapnia e distúrbios cardiorrespiratórios. Do ponto de vista molecular, a consulta no banco de dados de ontologia do fenótipo humano (*Human Phenotype Ontology* – HPO; disponível em: <https://hpo.jax.org/app/>) tendo como termo chave: apneia obstrutiva do sono, resultou na associação de genes e doenças presentes na região molecular de SPW. Por exemplo uma deleção no gene *MAGEL2*, associado a Magel2-related Prader-willi-like Syndrome (Id ORPHA:398069). As associações desses fenótipos também apresentam casos de DUM, acarretando o quadro da Síndrome de Prader-Willi causada por dissomia uniparental materna (Id ORPHA:98754) relacionando o papel dos genes *SNRPN*, *OCA2*, *MAGEL2* e *NDN*. No caso da deleção existem três saídas associadas a essa etiologia, variando de acordo como o tipo de deleção: Tipo 1 (Id ORPHA:98793); Tipo 2 (Id ORPHA:177901) e Tipo 2 envolvendo os genes *SNORD116-1*, *SNRPN*, *SNORD115-1*, *OCA2*, *MAGEL2* e *NDN*.

O papel desempenhado por esses genes no desenvolvimento no fenótipo de apnéia ainda precisa ser esclarecido. Uma contribuição do nosso grupo será realizada através do sequenciamento NGS desses pacientes assim como a análise do transcriptoma e proteômica para elaboração de redes de interação de células de rato editadas pela tecnologia CRISP/Cas9 onde foram deletadas de maneira integral ou parcial a região SPW.

Apesar de todos os estudos realizados e conhecimentos obtidos sobre a SPW, muito pouco se sabe sobre as características cognitivas associadas com a síndrome. Indivíduos geralmente mostram retardo mental leve a moderado, com uma relativa fraqueza em memórias de curto prazo e uma força relativa em tarefas que utilizam os detalhes visuais da atenção, coordenação visual-motora, planejamento perceptivo e organização espacial

(DYKENS, 2002; CURFS et al., 2008). Pessoas com a SPW são conhecidas por ter um talento especial em montar quebra-cabeças. Comparados com outros indivíduos com algum tipo de retardo mental, os pais destes pacientes relataram um maior prazer que seus filhos tinham com a montagem de quebra-cabeças. HOLM e colaboradores (1993) se basearam em impressões clínicas e incluíram em seus critérios a habilidade incomum com quebra-cabeças como um critério de suporte para o diagnóstico clínico da SPW. Essa habilidade incomum com quebra cabeças pode ser explicada devido as forças visual-motora que muitos destes pacientes apresentam, também como suas tendências obsessiva-compulsiva, necessidades para ter ordem, exatidão e para que as coisas “apenas estejam certas” (DYKENS; LECKMAN; CASSIDY, 1996). DYKENS (2002) foi o primeiro responsável por examinar as impressões clínicas que pessoas com a SPW tem habilidade com quebra-cabeças e busca de palavras. Em nosso estudo, foi observado essa diferença significativa com uma frequência maior nos casos de deleção frente os de DUP ($p < 0,05$). Concordantes com nossos resultados, Dykens demonstrou que pacientes com a DUM que apresentaram piores resultados frente aos pacientes com deleção paterna com as habilidades com quebra-cabeças. Devido à falta de estudos em relação a este achado, pouco ainda se sabe como a falta de informações derivadas do alelo paterno no cromossomo 15 está associada a habilidade com quebra-cabeças, ou o porquê de elas variarem entre os subtipos genéticos.

HOLM e colaboradores (1993) criaram uma ficha pré-clínica com o objetivo de identificar suspeitos para a SPW. A ficha vista na Tabela 18 é baseada em critérios que levam em consideração a idade do paciente e criam um sistema de pontuação para o diagnóstico clínico. Estes critérios foram criados e divididos em 3 grupos: Os critérios maiores (um ponto cada), critérios menores (meio ponto cada) e critérios de suporte (Nenhum ponto, porém aumentam a certeza do diagnóstico). Para crianças menores de 3

anos, um total de cinco pontos (sendo três critérios maiores obrigatórios) e para crianças maiores de 3 anos, a soma de oito pontos (sendo obrigatório quatro critérios maiores). Observando os resultados desses trabalhos observamos que os indivíduos apresentam as características maiores dentro dos critérios e que as diferenças em prol da deleção como miopia e apneia obstrutiva do sono foram observadas nas características menores. Além disso em nossa população vemos estas diferenças no critério de suporte, onde em prol da deleção a habilidade incomum com quebra-cabeças se mostrou um achado estatisticamente significativo. O que faz sentido uma vez que os diagnósticos de triagem molecular (MS-HRM) e clínico foram concordantes.

Tabela 18: Ficha de pontuação para diagnóstico clínico da SPW. Adaptado de *HOLM et al., (1993)*

Critérios maiores	
1.	Hipotonia neonatal e infantil com má sucção, melhorando gradualmente com a idade.
2.	Problemas de alimentação na infância com necessidade de técnicas especiais de alimentação e perda de peso.
3.	Ganho de peso excessivo ou rápido no gráfico de peso relacionado a altura e faixa etária
4.	Características faciais características com dolicocefalia na infância, diâmetro da face estreita ou bifrontal, olhos em forma de amêndoa, boca de aparência pequena com lábio superior fino, cantos da boca virados para baixo.
5.	Hipogonadismo - com qualquer um dos seguintes, dependendo da idade: <ol style="list-style-type: none"> Hipoplasia genital (macho: hipoplasia escrotal, criptorquidismo, pênis pequeno e/ou testículos para idade [$<5^{\circ}$ percentil]; Feminino: ausência ou hipoplasia grave de lábios e/ou clitóris Maturação gonadal retardada ou incompleta com sinais tardios de puberdade na ausência de intervenção após 16 anos de idade (masculino: gônadas pequenas, diminuição facial e corporal, ausência na alteração de voz; Feminino: amenorréia / oligomenorréia após os 16 anos de idade).
6.	Hiperfagia/obsessão por comida.
7.	Deleção 15q11-q13 em alta resolução (> 650 bandas), anormalidade da região cromossômica de Prader-Willi, incluindo DUM.
8.	Leve a moderado retardo mental, atraso ou problemas de aprendizagem em crianças mais velhas.
Critérios menores	
1.	Diminuição do movimento fetal, letargia infantil ou choro fraco na infância, melhorando com a idade.
2.	Problemas de comportamento característicos - crises de raiva, surtos violentos e obsessivos/ comportamento compulsivo; tendência a ser argumentativa, oposicionista, rígida, manipuladora, possessivo e teimoso; perseverando, roubando e mentindo (5 ou mais desses sintomas requeridos)
3.	Perturbação do sono ou apnéia do sono.
4.	Baixa estatura.
5.	Hipopigmentação.
6.	Mãos pequenas ($<$ percentil 25) e / ou pés ($<$ percentil 10) para idade de estatura.
7.	Anormalidades oculares (esotropia, miopia).
8.	Saliva espessa e viscosa com crostas nos cantos da boca.

Critérios de suporte (Aumentam a certeza do diagnóstico porém não são pontuadas)

1. Alto limiar de dor.
2. Diminuição do vômito.
3. Instabilidade de temperatura durante a infância ou sensibilidade de temperatura alterada em crianças mais velhas e adultos.
4. Adrenarca precoce.
5. Escoliose e/ou cifose.
6. Osteoporose.
7. Habilidades incomuns com quebra-cabeças.
8. Estudos neuromusculares normais.

A síndrome de Prader-Willi é uma doença que engloba múltiplos sistemas. Junto de um diagnóstico precoce e intervenção imediata, o crescimento geral e prognóstico destas crianças com a SPW pode ser consideravelmente melhorado. Casos pré-natais e neonatais ainda são em muitas das vezes perdidos, geralmente devido ao não reconhecimento dos primeiros sinais característicos da síndrome ou a prescrição de testes moleculares inapropriados para estes sujeitos. Continuaremos a analisar os pacientes com SPW pela combinação das técnicas de MS-HRM, MS-MLPA e NGS, combinado com o levantamento de dados e inclusão de dados relacionados ao nascimento (tempo de gestação), para traçar um o perfil fenótipo-genótipo da população brasileira dos indivíduos SPW.

7. CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos através da técnica de MS-MLPA foram concordantes com o diagnóstico clínico e com a técnica de MS-HRM.
- O bom desempenho dos testes de MS-HRM, MS-MLPA e sequenciamento de Sanger corroboram com a aplicabilidade de uma estratégia de diagnóstico possibilitando determinar as alterações genéticas presente nos indivíduos com a SPW.
- Nossos achados presentes neste estudo de uma correlação genótipo-fenótipo demonstram que os subtipos genéticos da síndrome são similares no geral. Porém algumas características, os subtipos possuem sim diferenças.
- De acordo com nossos testes e análises estatísticas, vemos algumas correlações genótipo-fenótipo. Os sinais clínicos de miopia, apneia obstrutiva do sono e habilidade incomum com quebra-cabeças tiveram uma diferença significativa a favor das deleções.
- À luz de possíveis diferenças fenotípicas sutis entre pacientes com SPW com base na deleção versus DUM, os pediatras e geneticistas devem mudar seu olhar em relação ao diagnóstico da SPW? Os dados são insuficientes para recomendações claras, entretanto parece que o limite para a suspeita clínica da SPW deve ser menor do que é atualmente.

8. REFERÊNCIAS

AYCAN, Z.; NIJAT BAŞ, V. Prader-Willi Syndrome and Growth Hormone Deficiency. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, p. 62–67, 5 jun. 2014.

BOYES, J.; BIRD, A. DNA Methylation Inhibits Transcription Indirectly via a Methyl-CpG Binding Protein. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1123–1134, mar. 1991.

BUTLER, M. G. et al. Clinical and Cytogenetic Survey of 39 Individuals with Prader-Labhart-Willi Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 23, n. 3, p. 793–809, mar. 1986.

BUTLER, M. G. Hypopigmentation: a common feature of Prader-Labhart-Willi syndrome. **American journal of human genetics**, v. 45, n. 1, p. 140–6, 1989.

BUTLER, M. G. Prader-Willi Syndrome: Current Understanding of Cause and Diagnosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 35, n. 3, p. 319–332, mar. 1990.

BUTLER, M. G. et al. Behavioral Differences Among Subjects With Prader-Willi Syndrome and Type I or Type II Deletion and Maternal Disomy. **PEDIATRICS**, v. 113, n. 3, p. 565–573, 1 mar. 2004.

BUTLER, M. G.; THOMPSON, T. Prader-Willi Syndrome: Clinical and Genetic Findings. **The Endocrinologist**, v. 10, n. 4 Suppl 1, p. 3S-16S, jul. 2000.

CASSIDY, S. B. Prader-Willi syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 34, n. 11, p. 917–23, 1997.

CASSIDY, S. B. et al. Prader-Willi Syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 14, n. 1, p. 10–26, jan. 2012.

CASSIDY, S. B. et al. Comparison of Phenotype between Patients with Prader-Willi Syndrome Due to Deletion 15q and Uniparental Disomy 15. p. 8, [s.d.]

CASSIDY, S. B.; DRISCOLL, D. J. Prader-Willi Syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 1, p. 3–13, jan. 2009.

COSTA, R. A. et al. Genotype-Phenotype Relationships and Endocrine Findings in Prader-Willi Syndrome. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 864, 13 dez. 2019.

CRINO, A. et al. Hypogonadism and Pubertal Development in Prader-Willi Syndrome. v. 162, n. 5, p. 327–333, 2003.

CURFS, L. M. G. et al. Strengths and Weaknesses in the Cognitive Profile of Youngsters with Prader-Willi Syndrome. **Clinical Genetics**, v. 40, n. 6, p. 430–434, 28 jun. 2008.

DAXINGER, L.; WHITELAW, E. Understanding Transgenerational Epigenetic Inheritance via the Gametes in Mammals. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 3, p. 153–162, mar. 2012.

DIMITROPOULOS, A.; SCHULTZ, R. T. Autistic-like Symptomatology in Prader-Willi Syndrome: A Review of Recent Findings. **Current Psychiatry Reports**, v. 9, n. 2, p. 159–164, abr. 2007.

DRISCOLL, D. J.; MILLER, J. L.; CASSIDY, S. B. Prader-Willi Syndrome. p. 38, [s.d.]

DYKENS, E. M. Are Jigsaw Puzzle Skills 'spared' in Persons with Prader-Willi Syndrome? **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 43, n. 3, p. 343–352, mar. 2002.

DYKENS, E. M.; LECKMAN, J. F.; CASSIDY, S. B. Obsessions and Compulsions in Prader-Willi Syndrome. p. 9, [s.d.]

FAN, Z. et al. Characteristics and Frequency of Seizure Disorder in 56 Patients with Prader-Willi Syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149A, n. 7, p. 1581–1584, jul. 2009.

FROMMER, M. et al. A Genomic Sequencing Protocol That Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1827–1831, 1 mar. 1992.

GE, M.-M. et al. Relationship between Phenotype and Genotype of 102 Chinese Newborns with Prader–Willi Syndrome. **Molecular Biology Reports**, 3 jul. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-019-04916-2>>. Acesso em: 26 set. 2019.

GILLESSEN-KAESBACH, G. et al. Genotype-Phenotype Correlation in a Series of 167 Deletion and Non-Deletion Patients with Prader-Willi Syndrome. **Human Genetics**, v. 96, n. 6, p. 638–643, dez. 1995.

GILLETT, E.; PEREZ, I. Disorders of Sleep and Ventilatory Control in Prader-Willi Syndrome. **Diseases**, v. 4, n. 4, p. 23, 8 jul. 2016.

GITO, M. et al. Gender Differences in the Behavioral Symptom Severity of Prader-Willi Syndrome. **Behavioural Neurology**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

GREENSWAG, L. R. ADULTS WITH PRADER-WILLI SYNDROME: A SURVEY OF 232 CASES. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 29, n. 2, p. 145–152, 5 jun. 1986.

GUNAY-AYGUN, M. et al. The Changing Purpose of Prader-Willi Syndrome Clinical Diagnostic Criteria and Proposed Revised Criteria. **PEDIATRICS**, v. 108, n. 5, p. e92–e92, 1 nov. 2001.

HOLM, V. A. et al. Prader-Willi Syndrome: Consensus Diagnostic Criteria. **Pediatrics**, v. 91, n. 2, p. 398–402, fev. 1993.

HORSTHEMKE, B.; WAGSTAFF, J. Mechanisms of Imprinting of the Prader-Willi/Angelman Region. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146A, n. 16, p. 2041–2052, 15 ago. 2008.

JAY, P. et al. The Human Necdin Gene, NDN, Is Maternally Imprinted and Located in the Prader-Willi Syndrome Chromosomal Region. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 357–361, nov. 1997.

JEFFCOATE, W. J. et al. ENDOCRINE FUNCTION IN THE PRADER-WILLI SYNDROME. **Clinical Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 81–89, jan. 1980.

JIN, Z.; LIU, Y. DNA Methylation in Human Diseases. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1–8, mar. 2018.

KUPPENS, R. J. et al. Elevated Ratio of Acylated to Unacylated Ghrelin in Children and Young Adults with Prader–Willi Syndrome. **Endocrine**, v. 50, n. 3, p. 633–642, dez. 2015.

LIN, H.-Y. et al. Genotype and Phenotype in Patients with PraderWilli Syndrome in Taiwan. p. 4, 2007.

MAKELA, N. L. et al. Parental Perceived Value of a Diagnosis for Intellectual Disability (ID): A Qualitative Comparison of Families with and without a Diagnosis for Their Child’s ID. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149A, n. 11, p. 2393–2402, nov. 2009.

MASCARI, M. J. et al. The Frequency of Uniparental Disomy in Prader-Willi Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 24, p. 1599–1607, 11 jun. 1992.

MOREY, M. et al. A Glimpse into Past, Present, and Future DNA Sequencing. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 110, n. 1–2, p. 3–24, set. 2013.

NICHOLLS, R. D. et al. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. **Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome**, v. 342, n. 6246, p. 281–285, 1989.

OHTA, T. et al. Imprinting-Mutation Mechanisms in Prader-Willi Syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 64, n. 2, p. 397–413, fev. 1999.

PIRES, N. D.; GROSSNIKLAUS, U. Different yet Similar: Evolution of Imprinting in Flowering Plants and Mammals. **F1000Prime Reports**, v. 6, 1 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.f1000.com/prime/reports/b/6/63/>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

PROFFITT, J. et al. Contributing Factors of Mortality in Prader-Willi Syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 2, p. 196–205, fev. 2019.

RAMSDEN, S. C. et al. Practice Guidelines for the Molecular Analysis of Prader-Willi and Angelman Syndromes. p. 11, 2010.

ROBINSON, W. P. et al. Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, n. 6, p. 1219–1234, dez. 1991.

ROBINSON, W. P. et al. Somatic Segregation Errors Predominantly Contribute to the Gain or Loss of a Paternal Chromosome Leading to Uniparental Disomy for Chromosome 15: Uniparental Disomy for Chromosome 15. **Clinical Genetics**, v. 57, n. 5, p. 349–358, 24 dez. 2001.

SANJEEVA, G. N. et al. Clinical and Molecular Characterization of Prader-Willi Syndrome. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 84, n. 11, p. 815–821, nov. 2017.

SINNEMA, M. et al. Behavioral Phenotype in Adults with Prader–Willi Syndrome. **Research in Developmental Disabilities**, v. 32, n. 2, p. 604–612, mar. 2011.

SMITH, A. et al. A de Novo Unbalanced Reciprocal Translocation Identified as Paternal in Origin in the Prader-Willi Syndrome. **Human Genetics**, v. 86, n. 5, mar. 1991. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00194651>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

SMITH, A.; HUNG, D. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome.

Translational Pediatrics, v. 5, n. 1, p. 46–56, 2017a.

SMITH, A.; HUNG, D. The Dilemma of Diagnostic Testing for Prader-Willi Syndrome.

Translational Pediatrics, v. 5, n. 1, p. 46–56, jan. 2017b.

SPRITZ, R. A. et al. Hypopigmentation in the Prader-Willi Syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. **American Journal of Medical Genetics**, v. 71, n. 1, p. 57–62, 1997.

STEPHENSON, J. B. P. PRADER-WILLI SYNDROME: NEONATAL PRESENTATION AND LATER DEVELOPMENT. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 22, n. 6, p. 792–795, 12 nov. 2008.

STUPPIA, L. et al. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3245–3276, 8 mar. 2012.

SWAAB, D. Prader-Willi Syndrome and the Hypothalamus. **Acta Paediatrica**, v. 86, n. S423, p. 50–54, nov. 1997.

THE COMMITTEE ON GENETICS. Health Supervision for Children With Prader-Willi Syndrome. **PEDIATRICS**, v. 127, n. 1, p. 195–204, 1 jan. 2011.

TORRADO, M. et al. Clinical-Etiologic Correlation in Children with Prader-Willi Syndrome (PWS): An Interdisciplinary Study. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143A, n. 5, p. 460–468, 1 mar. 2007.

TUYSUZ, B. et al. Prevalence of Prader-Willi Syndrome among Infants with Hypotonia. **The Journal of Pediatrics**, v. 164, n. 5, p. 1064–1067, maio 2014.

VAN NIEUWPOORT, I. C. et al. The GH/IGF-I Axis and Pituitary Function and Size in Adults with Prader-Willi Syndrome. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 75, n. 6, p. 403–411, 2011.

VARELA, M. et al. Impact of Molecular Mechanisms, Including Deletion Size, on Prader-Willi Syndrome Phenotype: Study of 75 Patients: Phenotypic Variability in PWS. **Clinical Genetics**, v. 67, n. 1, p. 47–52, 22 dez. 2004.

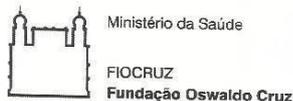
WANG, P. Prader–Willi Syndrome in Neonates: Twenty Cases and Review of the Literature in Southern China. p. 6, 2016.

WEBB, T. et al. A Study of the Influence of Different Genotypes on the Physical and Behavioral Phenotypes of Children and Adults Ascertained Clinically as Having PWS: Genetics and Phenotype in PWS. **Clinical Genetics**, v. 62, n. 4, p. 273–281, out. 2002.

YIP, M.-Y. Uniparental Disomy in Robertsonian Translocations: Strategies for Uniparental Disomy Testing. **Translational Pediatrics**, v. 3, n. 2, p. 10, 2014.

9. ANEXOS

Anexo 1 -



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisador Responsável
 Dra. Letícia da Cunha Guida
 Doutor em Ciências
 Centro de Genética Médica
 Laboratório de Alta Complexidade
 Contatos: (21) 2554-1919
 Email: leticia@iff.fiocruz.br

Médico Responsável
 Dr. Juan Clinton Llerena Jr
 Chefe do Centro de Genética Médica
 Telefone: 21 2554-1751
 Email: llerena@iff.fiocruz.br

Comitê de Ética em Pesquisa CEP-IFF
 Telefone: 21 2552-1730
 Email: cepiff@iff.fiocruz.br

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulado: "O papel do hormônio do crescimento na síndrome de Prader-Willi: estudo da regulação da expressão de GH através da estratégia CRISPR/Cas9, rastreamento neonatal e diagnóstico molecular"

Esta pesquisa pretende desenvolver um exame de laboratório para ajudar no diagnóstico da síndrome de Prader-Willi. Além disso, será desenvolvido um novo exame do teste do pezinho para tentar achar crianças com essa síndrome cada vez mais cedo. Os exames são baseados em testes do DNA do paciente e dos seus pais nas células de sangue.

Para a participação nesta pesquisa você precisa somente permitir o uso do sangue coletado para outros exames diagnósticos, os quais já seriam realizados no seu filho, para essa pesquisa. Desta forma, participar deste estudo não causará nenhum prejuízo ou risco adicional para a saúde dele. Além disso, serão necessárias coletas de sangue seu e do seu cônjuge para comparação do DNA de toda a família. Todos os cuidados para impedir que problemas ocorram durante essas coletas serão tomados, pois a mesma será realizada por profissional treinado e utilizando procedimentos padrões de coleta. É importante também dizer que as amostras enviadas para este estudo não serão utilizadas para nenhuma outra pesquisa. As análises serão realizadas no Laboratório de Alta Complexidade do Instituto Nacional da Criança, da Mulher e do Adolescente Fernandes Figueira/FIOCRUZ (LACIFF).

Os benefícios esperados com esse estudo serão tanto o auxílio no diagnóstico dessa doença com maiores detalhes como a capacidade de identificar cada vez mais cedo, crianças com essa síndrome.

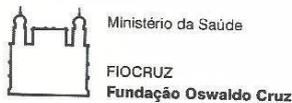
Nesse último ponto, acreditamos que o tratamento correto poderá ser adotado rapidamente, garantindo a qualidade de vida.

Todas as informações referentes a esta pesquisa são confidenciais, estarão guardadas em segurança e só serão utilizados pela equipe de pesquisa. Estas informações estão submetidas às normas de privacidade e confidencialidade do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ que é o setor responsável por assegurar as normas de pesquisa em seres humanos neste

APROVADO
 VALIDADE: 01/08/2017
 INICIO: 03/06/2015 FIM: 01/08/2017
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA-IFF/FIOCRUZ
 Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491
 Email: cepiff@iff.fiocruz.br

[Assinatura]
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

1



hospital, segundo a Resolução 466/2012. As informações só serão divulgadas em eventos e publicações científicas, assim como, para compor relatórios técnicos, sem revelar a sua identidade e/ou da sua família, sendo assegurado, portanto, o sigilo sobre sua participação.

Os resultados dos exames realizados com as amostras poderão ser requisitados, por escrito, por você (ou por algum responsável legal) a qualquer momento, e uma via fará parte do seu prontuário médico no IFF. Esclarecimentos serão fornecidos sempre que solicitados bastando para isso entrar em contato, com o pesquisador responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/IFF-FIOCRUZ). O conteúdo dessas informações não poderá ser usado em nenhum outro estudo ou para qualquer outro propósito sem a autorização por escrito das partes interessadas. Se alguma alteração for detectada você será imediatamente avisado para que a intervenção possa ser instituído junto ao médico responsável pelos cuidados clínicos prestados ao seu filho.

Sua participação nessa pesquisa é voluntária, caso você decida, a qualquer momento, desligar-se deste estudo não haverá nenhum prejuízo a assistência médica dispensada ao seu filho. Não há nenhum custo, a você, relacionado aos procedimentos previstos neste estudo assim como não há pagamento por sua participação. É garantido o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa das quais não foram previamente antecipados ou relatados à vocês.

Se você (ou seu parente) tiver alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contactar o Pesquisador Responsável pelo Projeto ou sua equipe. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional da Criança, da Mulher e do Adolescente Fernandes Figueira/FIOCRUZ.

Sendo assim, após a leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com profissional capacitado, para esclarecer detalhadamente todas as minhas dúvidas, estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades, expresse minha concordância de espontânea vontade em participar do projeto de pesquisa intitulado: "O papel do hormônio do crescimento na síndrome de Prader-Willi: estudo da regulação da expressão de GH através da estratégia CRISPR/Cas9, rastreamento neonatal e diagnóstico molecular". Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

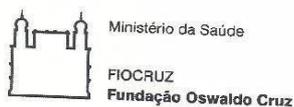
APROVADO

VALIDADE: 01/08/2017
 INÍCIO: 02/08/2015 FIM: 01/08/2017
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA-IFF/FIOCRUZ
 Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491
 Email: cepiff@iff.fiocruz.br

[Assinatura]
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

Declaro que recebi uma cópia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. E permito, os pesquisadores deste projeto, me contatarem por telefone ou através de mensagem de correio

2



se informações adicionais forem necessárias, conforme informações que constam em meu prontuário no IFF-FIOCRUZ.

Nome do Paciente: _____

Prontuário: _____ Código: _____

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Assinatura do Voluntário (ou responsável legal): _____

Nome Completo (em letra legível): _____

Documento de Identidade: _____ Telefone para contato: _____

Assinatura de uma testemunha: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Instituições envolvidas:

Instituto Nacional da Criança, da mulher e do Adolescente Fernandes Figueira
 Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
 Centro de Genética Médica
 Laboratório de Alta Complexidade
 Av. Rui Barbosa, 716 - Flamengo - Rio de Janeiro – Brasil
 Telefone/FAX: (21) 2554-1918

Comitê de Ética em Pesquisa CEP-IFF

Instituto Nacional da Criança, da mulher e do Adolescente Fernandes Figueira
 Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
 Telefone: 21 2552-1730
 Fax: 2552-8491
 Email: cepiff@iff.fiocruz.br

APROVADO

VALIDADE:

INÍCIO 09/02/2015 FIM 01/08/2017
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF-FIOCRUZ
 Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491
 Email: cepiff@iff.fiocruz.br

[Handwritten Signature]
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos:
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF-FIOCRUZ



Genotype-Phenotype Relationships and Endocrine Findings in Prader-Willi Syndrome

Régis Afonso Costa¹, Igor Ribeiro Ferreira¹, Hiago Azevedo Cintra, Leonardo Henrique Ferreira Gomes and Leticia da Cunha Guida^{1*}

Laboratório de Alta Complexidade, Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e Do Adolescente Fernandes Piquini, Focuz, Rio de Janeiro, Brazil

Prader-Willi syndrome (PWS) is a complex imprinting disorder related to genomic errors that inactivate paternally-inherited genes on chromosome 15q11-q13 with severe implications on endocrine, cognitive and neurologic systems, metabolism, and behavior. The absence of expression of one or more genes at the PWS critical region contributes to different phenotypes. There are three molecular mechanisms of occurrence: paternal deletion of the 15q11-q13 region; maternal uniparental disomy 15; or imprinting defects. Although there is a clinical diagnostic consensus criteria, DNA methylation status must be confirmed through genetic testing. The endocrine system can be the most affected in PWS, and growth hormone replacement therapy provides improvement in growth, body composition, and behavioral and physical attributes. A key feature of the syndrome is the hypothalamic dysfunction that may be the basis of several endocrine symptoms. Clinical and molecular complexity in PWS enhances the importance of genetic diagnosis in therapeutic definition and genetic counseling. So far, no single gene mutation has been described to contribute to this genetic disorder or related to any exclusive symptoms. Here we proposed to review individually disrupted genes within the PWS critical region and their reported clinical phenotypes related to the syndrome. While genes such as *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, or *SNORD115* do not address the full spectrum of PWS symptoms and are less likely to have causal implications in PWS major clinical signs, *SNORD115* has emerged as a critical, and possibly, a determinant candidate in PWS, in the recent years. Besides that, the understanding of the biology of the PWS *SNORD* genes is fairly low at the present. These non-coding RNAs exhibit all the hallmarks of RNA methylation guides and can be incorporated into ribonucleoprotein complexes with possible hypothalamic and endocrine functions. Also, DNA conservation between *SNORD* sequences across placental mammals strongly suggests that they have a functional role as RNA entities on an evolutionary basis. The broad clinical spectrum observed in PWS and the absence of a clear genotype-phenotype specific correlation imply that the numerous genes involved in the syndrome have an additive deleterious effect on different phenotypes when deficiently expressed.

Keywords: Prader-Willi syndrome, genotype, phenotype, endocrine, imprinting, SNORDs

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana Rosa Pérez,
National Council for Scientific and
Technical Research, Argentina

Reviewed by:

Christian P. Schaeff,
Heidelberg University, Germany
Dag H. Yasui,
University of California, Davis,
United States

*Correspondence:

Leticia da Cunha Guida
leticia.guida@focuz.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 20 September 2015

Accepted: 26 November 2015

Published: 13 December 2015

Citation:

Costa RA, Ferreira IR, Cintra HA,
Gomes LHF and Guida LC (2015)
Genotype-Phenotype Relationships
and Endocrine Findings in Prader-Willi
Syndrome. *Front. Endocrinol.* 10:854.
doi: 10.3389/fendo.2015.00854

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA SÍNDROME DE PRADER-WILLI: RASTREAMENTO NEONATAL E DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Pesquisador: Juan Clinton Llerena Junior

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 5

CAAE: 45767015.0.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Apresentação de relatório parcial

Data do Envio: 10/02/2022

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.250.145

Apresentação da Notificação:

Notificação

Objetivo da Notificação:

Apresentar relatório parcial

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não foi alterado risco e benefício

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

foi informada alteração de cronograma

recrutados 40 participantes todos com TCLE e já informados dos resultados dos seus testes.

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 5.250.145

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

relatorio inserido

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendencias

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatoriosemestral2022.doc	10/02/2022 15:19:40	Leticia da Cunha Guida	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 18 de Fevereiro de 2022

Assinado por:

**Ana Maria Aranha Magalhães Costa
(Coordenador(a))**

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br