



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

**ESTUDO PILOTO DE TRIAGEM USANDO A ANÁLISE DA  
CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO SENSÍVEL À  
METILAÇÃO (MS -HRM) EM SWABS ORAIS PARA DETECTAR A  
SÍNDROME DE PRADER-WILLI**

**Leticia Lopes Cabral Guimarães da Fonseca**

**Rio de Janeiro  
Novembro de 2022**



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

**ESTUDO PILOTO DE TRIAGEM USANDO A ANÁLISE DA  
CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO SENSÍVEL À  
METILAÇÃO (MS -HRM) EM SWABS ORAIS PARA DETECTAR A  
SÍNDROME DE PRADER-WILLI**

**Leticia Lopes Cabral Guimarães da Fonseca**

Dissertação apresentada à Pós-graduação em Pesquisa Clínica Aplicada à saúde da Criança e da Mulher, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Letícia da Cunha Guida

**Rio de Janeiro  
Novembro de 2022**

CIP - Catalogação na Publicação

Fonseca, Leticia Lopes Cabral Guimarães da.

ESTUDO PILOTO DE TRIAGEM USANDO A ANÁLISE DA CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO SENSÍVEL À METILAÇÃO (MS -HRM) EM SWABS ORAIS PARA DETECTAR A SÍNDROME DE PRADER-WILLI / Leticia Lopes Cabral Guimarães da Fonseca. - Rio de Janeiro, 2022.  
103 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, 2022.

Orientadora: Leticia da Cunha Guida.

Bibliografia: f. 37-40

1. Síndrome de Prader-Willi. 2. Técnicas de Diagnóstico Molecular. I. Título.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BP – Ponto de quebra (*Break Point*)

°C – Grau Celsius

CEP – Comitê de ética em Pesquisa

Ct – Limiar do ciclo (*Cycle threshold*)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FISH – Hibridização *in situ* com fluorescência (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

G – Aceleração da gravidade

GH – Hormônio do Crescimento GTG – Técnica de bandeamento G

HRM – Análise da Curva de Dissociação em Alta resolução (*High Resolution Melting*)

IC – Centro de imprinting

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

Mb – 1.000.000 pares de basemin – Minuto

MLPA – Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (*Multiplex Ligation Probe dependent Amplification*)

µL – Microlitro mL – Mililitro mM – Milimolar

MS-HRM – Análise da Curva de Dissociação em Alta resolução sensível a Metilação (*Methylation-Sensitive High Resolution Melting*)

MS-MLPA – Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação Sensível a Metilação (*Methylation-Sensitive Multiplex Ligation Probe dependent Amplification*)

MS-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase Metilação Específica (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*)

Ng – Nanograma Nm – Nanômetro pb – Pares de base

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

Hidrogeniônico

Primers – Oligonucleotídeos iniciadores RNA – Ácido ribonucleico

SA – Síndrome de Angelman SPW – Síndrome de Prader-Willi

UPD – Dissomia uniparental materna

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ideograma apresentando as possíveis causas da Síndrome

de Prader-Willi. Figura 2. Mapa cromossômico da região 15q11.2-q13.1.

Figura 3. Processo diagnóstico das Síndromes de Prader-Willi.

Figura 4. Gráficos de comparação entre os métodos de extração de DNA, a partir de *swab* oral, comercial e NaCl.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml), dos DNAs genômicos extraídos com diferentes métodos.

Figura 6. Curvas de amplificação do gene da RNase com os DNAs extraídos pelos dois métodos.

Figura 7. Curvas de amplificação do gene da região promotora do éxon 1 dos genes *SNRPN-SNURF* na região do Centro de Imprinting (IC) com os DNAs extraídos pelos dois métodos.

Figura 8. Padrão de metilação analisados por MS-HRM.

## RESUMO

A síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma desordem genética complexa, caracterizada por deleções, dissomia uniparental materna ou defeito no centro de *imprinting* no alelo paterno do cromossomo 15. As perdas de funções de genes específicos da região 15q11 afetam múltiplos sistemas corporais. O diagnóstico da SPW é difícil de ser realizado com base apenas no exame clínico e envolve a realização de diversas técnicas de biologia molecular para a completa elucidação da etiologia genética, tornando todo o processo laborioso, demorado e custoso. A realização de um teste molecular que permita um diagnóstico rápido e preciso é de vital importância para um melhor prognóstico para paciente. A coleta bem-sucedida de amostras e a extração de DNA de *swabs* são alternativas não invasivas e confiáveis, tanto para os pacientes quanto para os profissionais que realizarão a coleta destas amostras. Neste trabalho foi possível demonstrar um método simples de coleta de amostras e extração de DNA, que possui baixo custo, é eficaz, fácil e rápido, que fornece uma quantidade e qualidade suficiente de DNA para a execução do MS-HRM, qPCR e sequenciamento. Uma comparação dos procedimentos de extração mostra que o método simples de extração de NaCl é o mais adequado para extração de DNA de amostra bucal coletada através de *swab*. Neste trabalho foi demonstrado um método simples de coleta de amostras através do *swab* e extração de DNA com baixo custo e boa qualidade do DNA.

**Palavras-Chave:** Síndrome de Prader-Willi; Técnicas de Diagnóstico Molecular.

## ABSTRACT

Prader-Willi syndrome (PWS) is a complex disorder, uniparental by deletions, dissociated from no imprint defect in any of the chromosomes 15. As gene variants of the genetic region of the 15q11 region, the diagnosis of PWS is challenging to perform based on clinical examination alone. It involves the performance of several molecular biology techniques for the complete elucidation of genetics, determining the entire laborious, time-consuming, and costly process. The performance of a molecular test allows a quick diagnosis, which is vital for a better prognosis for the patient. Successful sample collection and DNA collection from swabs are non-invasive alternatives for patients and practitioners performing probable sample collection. In this work, it was possible to demonstrate a simple sample collection and DNA method, which has a low cost, is effective, easy, and fast, and provides a sufficient quantity and quality of DNA for the execution of MS-HRM, qPCR, and sequencing. A comparison of the extraction procedures shows that the simple NaCl extraction method is the most appropriate for extracting DNA from a buccal sample collected via swab. In this work, a simple method for swab sampling and extracting DNA was demonstrated, with low cost and good DNA quality.

**Key words:** Prader-Willi Syndrome; Molecular Diagnostic Techniques.



**SUMÁRIO**

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	10
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	11
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	11
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>4 – REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
4.1 - SÍNDROME DE PRADER-WILLI.....	112
4.2 - DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	115
<b>4.2.1 – Análise da Curva de Dissociação em Alta Resolução Sensível à Metilação (MS-HRM)</b> .....	16
<b>5 – METODOLOGIA</b> .....	20
5.1 - AMOSTRA/POPULAÇÃO.....	20
5.2 - LOCAL DO ESTUDO .....	20
5.3 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	20
5.4 - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	20
5.5 - ASPECTOS ÉTICOS .....	20
5.6 - DESCRIÇÃO DO ESTUDO .....	20
<b>5.6.1 – Coleta de amostras</b> .....	20
<b>5.6.2 – Protocolo de extração de DNA</b> .....	21

<b>5.6.2.1 – Método com NaCl</b> .....	21
<b>5.6.2.2 – Extração com o kit comercial Qiagen-DBS</b> .....	22
<b>5.6.3 – Quantificação do DNA</b> .....	22
<b>5.6.4 – Integridade do DNA</b> .....	22
<b>5.6.5 – Amplificação de Ribonuclease P (RPP38)</b> .....	22
<b>5.6.6 – Tratamento de bissulfito</b> .....	23
<b>5.6.7 – Análise da Curva de Dissociação em Alta Resolução sensível à Metilação (MS-HRM)</b> .....	23
<b>5.6.8 – Análise estatística</b> .....	23
<b>6 – RESULTADOS</b> .....	23
<b>7 – DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>8 – CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>9 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	37
<b>ANEXO 1 - Parecer Consubstanciado do CEP</b> .....	41
<b>ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	43
<b>ANEXO 3</b> .....	477
<b>ANEXO 4</b> .....	499
<b>ANEXO 5 – Artigo submetido a revista Genetics and Molecular Biology</b> .....	493
<b>ANEXO 6 - Artigo submetido a revista Orphanet Journal of Rare Diseases</b> .....	49

## 1 – INTRODUÇÃO

A Síndrome de Prader-Willi é considerada um transtorno genéticos raro (1,2), sendo originadas a partir de alterações genéticas que provocam a inativação dos genes presentes no cromossomo 15, região 15q11-q13, tendo relação com o material genético de origem paterna e ocorre devido a: deleção (ausência da região 15q11-q13), dissomia uniparental (quando existem os dois cromossomos 15, contudo, ambos são de herança materna), alteração do centro de *imprinting* (padrão anormal de metilação, metilação somente do DNA de um dos cromossomos, mesmo existido ambos os alelos) (3).

O diagnóstico clínico é complexo, pois algumas características mudam com a idade e podem ser semelhantes a outras síndromes. A SPW é caracterizada clinicamente por letargia infantil, deficiência no crescimento, hipogonadismo, hipotonia neonatal ou infantil, aparência facial característica (rosto fino, olhos amendoados, lábio superior fino), baixo nível de massa magra, alterações psicopatológicas (desabilidade intelectual, impulsividade, obsessões, comportamento autista, autolesões), hiperfagia que, se não controlada, pode causar obesidade mórbida (4,5) e diabetes mellitus tipo II, todos os indivíduos apresentam algum grau de comprometimento cognitivo e retardo do desenvolvimento da fala, todavia, alguns possuem o Quociente de Inteligência (QI) dentro da faixa considerada normal (6,7). Na maioria dos casos existe hipopituitarismo, com secreção anormal do hormônio do crescimento (hr GH) e hipogonadismo hipogonadotrófico, possivelmente sendo a causa da densidade mineral óssea reduzida observada também em adultos e crianças com SPW (8). Para que o diagnóstico seja feito de maneira correta, é necessário contar com testes laboratoriais como os de análise citogenética que são a técnica de obtenção de cromossomos metafásicos e de Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e, de biologia molecular, como a Análise da Curva de Dissociação em Alta resolução (HRM), Análise da Curva de Dissociação em

Alta resolução Sensível a Metilação (MS-HRM), Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA), Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação Sensível a Metilação (MS-MLPA), Reação em Cadeia da Polimerase Metilação Específica (MS-PCR), Polimorfismo de base única (SNP), Microarranjo genômico (SNP *array*) e Análise de microssatélite, Sequenciamento) (9–12).

Além da dificuldade no diagnóstico clínico, outras situações podem ocorrer que tornam ainda mais problemático este processo. Pacientes recém-nascidos, obesos ou que podem possuir algum outro tipo de resistência à coleta de sangue periférico, que é o tipo de amostra mais utilizada atualmente, podem fazer com que ocorra uma dificuldade na coleta do material biológico (13). Outra questão a ser levantada é o custo para a realização das técnicas, como a técnica para extração de DNA. Um custo mais elevado, pode implicar um atraso do diagnóstico, uma vez que o processo diagnóstico pode incluir mais de uma técnica (14), além dificultar a obtenção dos materiais para a execução de tais metodologias. Devido a essa problemática, torna-se necessário encontrar uma alternativa eficaz e não invasiva de coleta de amostra e um método de extração de DNA com o custo mais baixo e eficiente para facilitar e agilizar o diagnóstico molecular dos pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Prader-Willi.

## **2 – JUSTIFICATIVA**

Para que seja realizado o diagnóstico da Síndrome de Prader-Willi é de extrema importância a execução de técnicas moleculares, uma vez que o diagnóstico clínico é complexo tendo muitas características da SPW semelhantes à outras síndromes (15). As técnicas moleculares ajudarão a concluir o diagnóstico de forma correta, para que as devidas intervenções sejam feitas rapidamente com o intuito de evitar a evolução de problemas de saúde e melhorar a qualidade de vida dos pacientes SPW. Porém, além da dificuldade no diagnóstico clínico, existe também a dificuldade na coleta de amostras de

sangue destes indivíduos e de outros grupos que apresentam limitações quanto ao volume de sangue que pode ser coletado, pacientes que são frágeis para procedimentos invasivos, em pacientes com obesidade, que é uma das características mais comuns apresentadas por pacientes com SPW (15), recém-natos e até mesmo aqueles que possuem aversão a técnicas invasivas. Isso pode vir a ser prejudicial tanto para o paciente quanto para o profissional que realiza este procedimento. Em relação à extração de DNA, a metodologia adotada nem sempre é de fácil aquisição e realização. Muitas das vezes o material do paciente deve ser enviado para um centro especializado que está situado em até mesmo em outro estado, o que torna o processo mais demorado e caro. Devido a essas complicações é necessário padronizar novas fontes biológicas não invasivas que sejam utilizadas para o diagnóstico e a adoção de uma metodologia para a extração do DNA que seja eficaz, viável economicamente e compatível com a opção encontrada.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 – OBJETIVO GERAL**

Avaliar a metodologia de MS-HRM frente a amostras de DNA extraídos de *swab* oral.

#### **3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a aplicabilidade da metodologia MS-HRM de amostras extraídas de *swab* oral, validando os resultados obtidos frente a amostras de pacientes com diagnóstico molecular prévio, obtido por análise de metilação (MS-HRM) de amostras de sangue periférico;
- Avaliar dois métodos de extração de DNA de células da mucosa oral;
- Análise de concordância diagnóstica entre a técnica de MS-HRM a partir das amostras extraídas de sangue periférico e *swab* e entre os métodos de extração (kit e NaCl).

## 4 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 – SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Em 1956 os cientistas Andrea Prader, Alexis Labhart e Heinrich Willi descreveram uma síndrome que até então não havia sido relatada na literatura (16). Denominada Síndrome de Prader-Willi (SPW) (*Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) 176270), a doença genética observada foi classificada como transtorno neurocomportamental multissistêmico (17).

Essa enfermidade é caracterizada fenotipicamente de acordo com o desenvolvimento do indivíduo, a qual na fase neonatal apresenta hipotonia sendo associada à baixa movimentação, letargia, choro fraco, dificuldade de sugar e de alimentação, sendo constante o uso de sondas que auxiliam na correta nutrição .

Os portadores da SPW podem apresentar um atraso no desenvolvimento mental que se torna evidente na fase pré-escolar prejudicando o desempenho acadêmico devido às múltiplas dificuldades de aprendizado . Durante a infância é observado um atraso no desenvolvimento motor quando comparado a uma criança normal, o que dificulta atividades normais como se sentar e andar. Ainda nesse período apresentam birras, teimosias, dificuldade com mudança de rotina e comportamento compulsivo manipulativo (18).

Anomalias do sono são documentadas para a Síndrome de Prader-Willi devido disfunção hipotalâmica primária incluindo redução da fase de latência REM (movimento rápido dos olhos), dessaturação de oxigênio causado por distúrbios de ventilação e oxigenação, apneia central e obstrutiva (19).

Os portadores da síndrome apresentam hipogonadismo, em ambos os sexos, levando a uma hipoplasia genital devido à problemas relacionados a produção de hormôniossexuais, como a testosterona e o estrogênio em homens e mulheres respectivamente, provocando

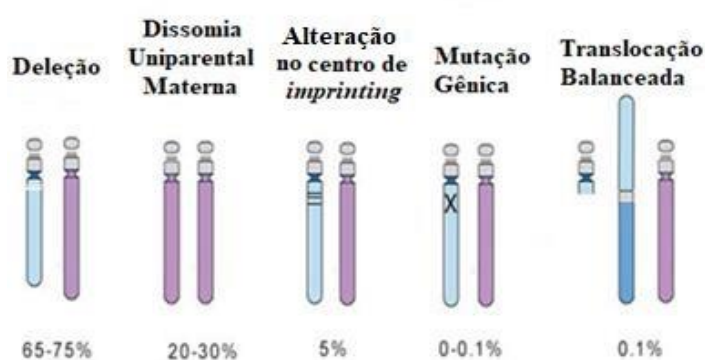
a infertilidade de seus portadores na maioria dos casos. Os portadores da síndrome apresentam a baixa estatura devido à baixa resposta ao hormônio do crescimento (GH), resultando em uma altura média para homens de 155 cm e para mulheres, 148 cm (20). Além disso características faciais típicas, mãos e pés pequenos, estrabismo e escoliose estão sempre presentes em pacientes com SPW (5).

A obesidade apresentada pela grande maioria dos portadores é devido ao consumo excessivo de calorias, pelo comportamento compulsivo relacionado a alimentação, fatores metabólicos e pouca atividade física, acarretando na alta incidência de morte por doenças cardiopulmonares, diabetes mellitus tipo II, hipertensão, trombo flebite e edema crônico na perna (21). A hiperfagia ocorre pelo não funcionamento correto do hipotálamo que eleva os níveis de grelina sinalizando para o organismo a necessidade de ingerir alimentos. Nos indivíduos com SPW, os níveis permanecem altos mesmo após a alimentação, não havendo sensação de saciedade. A grelina apresenta duas formas a n-octanoil e a des-acil, sendo que no jejum ocorre o aumento de ambas. Na hiperfagia e obesidade ocorre a redução apenas da des-acil grelina. É possível que na SPW ocorra a disfunção nessa relação entre os dois tipos de grelina, resultando na baixa concentração de ambas, opondo-se ao que ocorre no obeso não portador da síndrome (22).

Sendo uma das mais frequentes síndromes com microdeleções cromossômicas na atualidade, a Síndrome de Prader-Willi possui a incidência de 1:15.000 e prevalência de 60:1.000.000 (23), não possui distinção de sexo e etnias (24) e, por mais que o diagnóstico seja realizado durante a infância, existem relatos de pacientes que atingiram próximo aos 60 anos de idade (25).

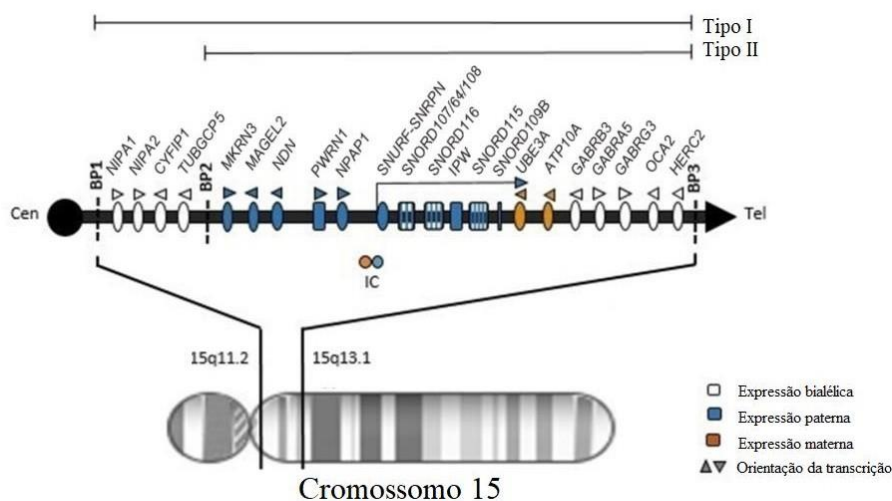
A SPW é caracterizada pela ausência da expressão gênica da região 15q11-q13 do cromossomo 15 e tem como principais causas a deleção (de 5–6 Mb), dissomia uniparental materna e defeito no centro de *imprinting* (alteração na sequência da região

que controla o *imprinting*, possivelmente causada por microdeleção, ou até mesmo herdada) (6,26), mas podendo também ser causada por mutação gênica e translocação balanceada (27), como é possível observar na Figura 1. Na Síndrome de Prader-Willi, a maior parte dos genes do cromossomo 15q11-q13 estão sujeitos ao *imprinting* genômico, tendo os genes, como *SNURF-SNRPN*, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN* e *snoRNAs*, apresentados na Figura 2, de origem paterna ativos e os maternos silenciados por fatores epigenéticos, principalmente pela metilação (3,28). A não expressão de um ou mais genes da região 15q11-13 pode implicar no fenótipo de SPW (6). Além disso, quando a alteração ocorre na mesma região, porém do cromossomo de origem materna, ocorre a Síndrome de Angelman, que possui as características clínicas diferentes das encontradas em SPW (29). As Síndromes de Prader-Willi e Angelman, foram de extrema importância para o conhecimento do mecanismo genético de *imprinting* genômico (30), sendo relatado pela primeira vez que a ausência da região 15q11-q13 de origem paterna está associado à características como obesidade, baixa estatura, mãos e pés pequenos entre outras características fenotípicas, culminando nas diferenças funcionais dos alelos de um ou mais genes da região em questão (*imprinting* genômico) (31).



**Figura 1.** Ideograma apresentando as possíveis causas da Síndrome de Prader-Willi. Em lilás, cromossomo 15 de origem materna; em azul, cromossomo 15 de origem paterna. Fonte: Adaptado de (Rocha e Paiva, 2014).





**Figura 2.** Mapa cromossômico da região 15q11.2-q13.1. Símbolos: ovais, genes de proteína codificante; retângulos, genes de RNA; BP1, ponto de quebra 1; BP2, ponto de quebra 2; BP3, ponto de quebra 3; Tipo 1, BP1-BP3 deleção com ~6 Mb; Tipo 2, BP2-BP3 deleção com ~5.3 Mb; Cen, Centrômero; Tel, Telômero; IC, Centro de *Imprinting*. Fonte: Adaptado de (Ferreira *et al*, 2019).

#### 4.2 – DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para que os indivíduos com suspeita clínica da Síndrome de Prader-Willi venham a ter um melhor prognóstico e tratamento, é necessário que, juntamente com o diagnóstico clínico, seja feito seu diagnóstico molecular. A realização de testes moleculares torna possível a detecção da causa genética do fenótipo observado e consequentemente conclui o diagnóstico do paciente de forma correta. No entanto, para que isso ocorra da melhor forma possível, deve-se escolher a técnica que melhor se enquadra no perfil da síndrome suspeita (7).

Para estes casos, escolher uma técnica que seja sensível a metilação na região de interesse (15q11q13) é o ideal. Técnicas voltadas para a análise de metilação, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) sensível a metilação (MS-PCR), ou a PCR em tempo Real (qPCR) seguida de uma análise da curva de Dissociação em Alta resolução sensível à

metilação (*Methylation-Sensitive High Resolution Melting – MS-HRM*) e a Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação sensíveis à metilação (MS-MLPA) (9), fazem com que deleção, dissomia uniparental e defeito de *imprinting*, que são as principais causas, sejam detectadas. Existem outras técnicas que são utilizadas para o diagnóstico de SPW, porém não são tão sensíveis, fazendo com que as técnicas baseadas em metilação sejam consideradas padrão-ouro (7,9).

#### **4.2.1 – Análise da Curva de Dissociação em Alta Resolução Sensível à Metilação (MS-HRM)**

É uma técnica baseada na análise da curva de *melting* pós PCR. Para sua execução, é necessária a utilização dos reagentes de uma PCR convencional, juntamente com um corante que emite fluorescência (fluoróforo) ao se intercalar na dupla fita de DNA. Depois que o PCR for realizado, assim como a amplificação do fragmento de interesse, o material é levado ao termociclador, onde cerca de trinta a quarenta ciclos serão realizados. O aumento na quantidade de DNA implicará no maior grau de fluorescência. Para a análise de HRM, o aparelho de PCR com leitura em tempo real aumenta a temperatura no tubo de reação, gradativamente (aproximadamente de 70°-90°C), provocando a dissociação da dupla fita de DNA. Essa dissociação faz com que ocorra a diminuição da fluorescência, que é captada pelo leitor do aparelho e forma a curva de decaimento da fluorescência, gerando padrões de curvas de dissociação (curvas de *melting*) de acordo com os diferentes genótipos. As regiões metiladas e não metiladas da região 15q11-13 podem ser diferenciadas pelo HRM de acordo com a composição de pares de bases (G=C ou A-T) (32).

A avaliação do estado de metilação do exon 1 na ilha CpG do gene *SNURP-SRNPN* pela técnica HRM consiste que após a extração do DNA, o material é submetido ao tratamento com bissulfito onde ocorre uma reação de desaminação seguida da conversão de todas as

citosinas não metiladas em uracila. A sequência de DNA modificada pelo tratamento com bissulfito é distinta da sequência correspondente ao alelo metilado, portanto utilizando-se de dois pares e *primers* para cada alelo (metilado e não metilado) para que ocorra amplificação específica de cada região (33).

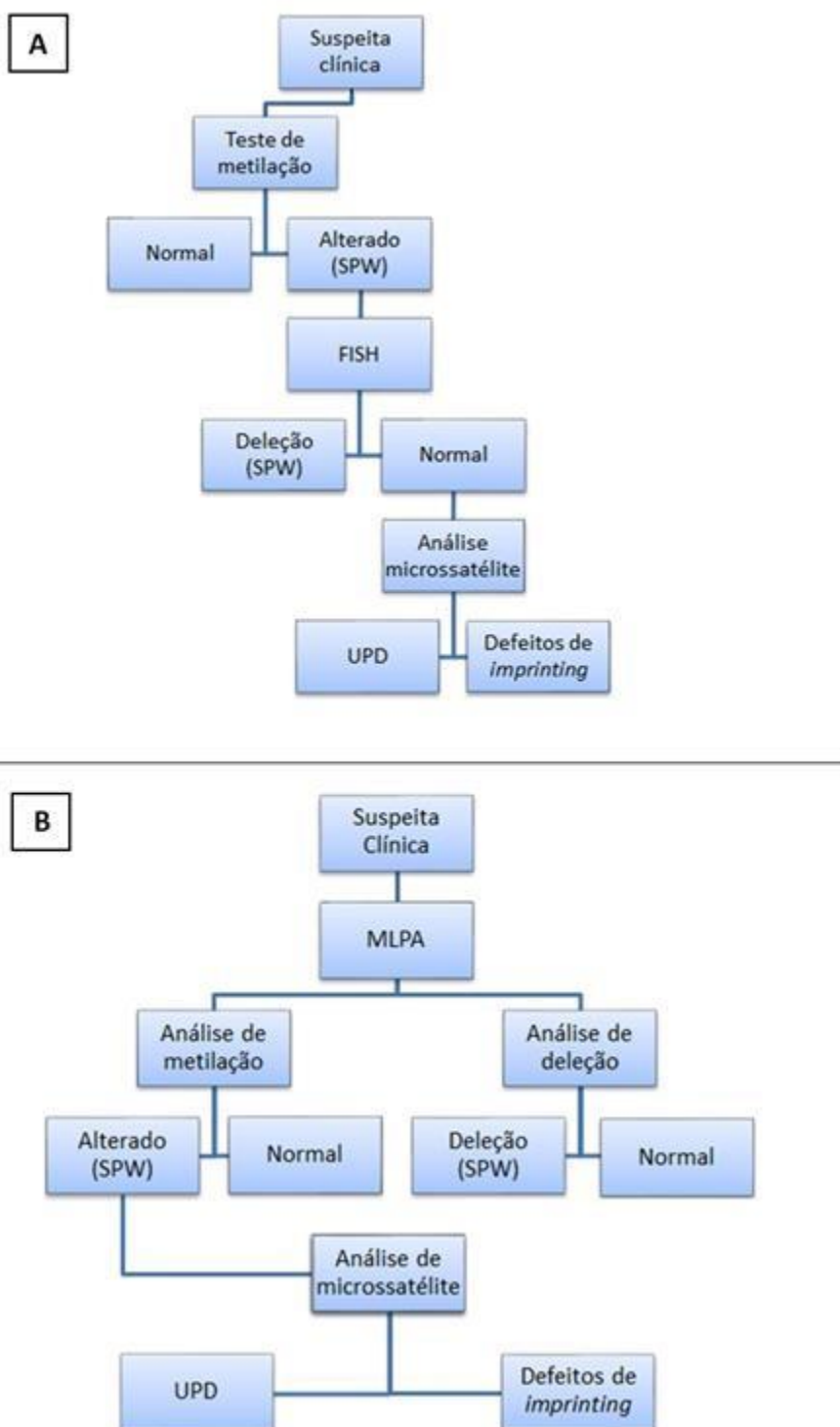
O resultado da análise do estado de metilação por HRM apenas confirma o diagnóstico da Síndrome de Prader-Willi, não havendo diferenciação entre UPD, deleção e defeitos no centro de *imprinting* (9,33). Técnicas adicionais como a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) para detecção de deleções, e GTG de alta resolução para identificação de translocações, inversões e outros rearranjos cromossômicos devem ser realizadas em paralelo ao HRM. O método FISH utiliza um microscópio de fluorescência para visualizar sinais luminosos emitidos por sondas que hibridizam ou não, em regiões homólogas do cromossomo espalhados em uma lâmina. Após a realização da técnica, a não hibridização de sondas a região crítica da SPW indica uma deleção da região, um resultado negativo torna necessária a realização de outro método para distinguir se o desenvolvimento da doença foi causado por UPD ou defeitos no centro de *imprinting* (14).

Por tratar-se de uma técnica voltada para a análise da metilação, o MS-HRM pode ser considerado padrão ouro para o diagnóstico molecular da Síndrome de Prader-Willi, uma vez que a análise de metilação do DNA detecta mais de 99% dos casos de SPW (6,34). Além disso, essa técnica é de rápida execução e alta precisão, o que faz com que seja indicada para uso clínico com a implementação de protocolos multiplexados para metilação de DNA, proporcionando uma maior eficiência na obtenção dos resultados (9,35).

A completa investigação a respeito dos mecanismos genéticos referentes a origem da doença, está diretamente relacionada com um aconselhamento genético eficaz. A partir

de um diagnóstico capaz de identificar a alteração responsável pelo desenvolvimento da síndrome, o médico responsável poderá indicar o risco de recorrência, que pode atingir 50% quando oriunda de um defeito no centro de *imprinting* (28).

O processo diagnóstico da SPW pode seguir duas vertentes distintas. A primeira linha diagnóstica inicia-se a partir de uma análise de metilação (MS-HRM/MS-PCR) seguida pela técnica de FISH e análise de microssatélite (Figura 4A). A segunda perspectiva diagnóstica por outro lado, inicia-se através da técnica de MS-MLPA que analisa simultaneamente o padrão de metilação e diferença no número de cópias cromossômicas, e por fim, a análise de microssatélite (Figura 4B).



**Figura 3.** A: Processo diagnóstico iniciando-se a partir da suspeita clínica e posterior realização das técnicas de análise de metilação, FISH e Análise de microssatélite; B: A partir de uma suspeita clínica realiza-se o teste diagnóstico MS-MLPA, avaliando a integridade cromossômica e o perfil de metilação do cromossomo 15. Subsequente ao MS-MLPA a análise de microssatélite se faz necessária.

## **5 – METODOLOGIA**

### **5.1 – AMOSTRA/POPULAÇÃO**

Crianças com suspeita clínica de Síndrome de Prader-Willi e crianças nascidas no IFF.

### **5.2 – LOCAL DO ESTUDO**

Laboratório de Alta Complexidade, Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – Fiocruz.

### **5.3 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Indivíduos com suspeita clínica de SPW e crianças nascidas no IFF.

### **5.4 – CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- Não houve critério de exclusão.

### **5.5 – 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 (CEP) do IFF/Fiocruz (CAAE: 45767015.0.0000.5269) (ANEXO 1).

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 (ANEXO 2) e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IFF/Fiocruz.

### **5.6 – DESCRIÇÃO DO ESTUDO**

#### **5.6.1 – Coleta de amostras**

Para a realização deste estudo foram coletados dois *swabs* orais de cada uma das 90

crianças nascidas no IFF e de 10 indivíduos com suspeita de SPW, com a faixa etária de 0 à 6 anos no período de 2015 à 2020. Nas amostras de conveniência dos 90 indivíduos não houve critério de inclusão, para que pudesse refletir a população geral e o número de pacientes com suspeita de SPW se dá por ser uma síndrome rara. Além do total de 200 amostras de *swabs* orais, 10 amostras de sangue total fresco foram obtidas dos pacientes com SPW e utilizadas como controles positivos.

### **5.6.2 – Protocolo de extração de DNA**

O procedimento foi executado seguindo o protocolo descrito por Abrão et al. (36). Foram coletados dois *swabs* orais de algodão de 100 voluntários e amostras de sangue. Para a coleta de swab, os pacientes foram orientados a fazer bochecho com 100 ml de água destilada e a coleta foi realizada raspando a face interna das bochechas com pequenas escovas citológicas estéreis, fazendo movimentos circulares aproximadamente 10-30 vezes. As escovas tinham a parte externa das hastas cortadas e colocadas em microtubos. As amostras orais foram submetidas a Extração de DNA, imediatamente ou após refrigeração (4 – 6°C) por 3 dias. O isolamento genômico do DNA dos *swabs* orais foi realizado usando dois protocolos distintos:

#### **5.6.2.1 – Método com NaCl**

Na extração de NaCl, 200 µl de TES (10 mM Tris HCl pH 7,6; 1 mM EDTA; 0,6% SDS) e 5 µl de proteinase K (10mg/ml) foram adicionados aos tubos contendo o *swab* e incubado por 2h a 42°C. Após a incubação, o pincel foi pressionado contra a parede dos tubos e removido. O volume final de aproximadamente 250 µl foi obtido, ao qual foram adicionados 42 µl de NaCl saturado (6 M), agitando vigorosamente à mão. Centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 2 vezes o volume de etanol absoluto foi adicionado. Os tubos foram agitados e centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g. Descartou-se o etanol absoluto e adicionou-se 1 ml de etanol 70%,

invertendo-se os tubos várias vezes para lavar o pellet. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante descartado. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e, após o descarte do sobrenadante, os tubos permaneceram abertos por 30 min para evaporar o etanol residual, conforme descrito por Abrão et al. (36). O DNA foi dissolvido em 25 µl de 1X TE (10 mM Tris HCl; 0,1 mM EDTA).

#### **5.6.2.2 – Extração com o kit comercial Qiagen-DBS**

O isolamento de DNA foi realizado com o kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Germantown, MD, EUA) seguindo o protocolo do fabricante com AL buffer. O mesmo método de extração de DNA foi realizado com o sangue total periférico de Prader-Willi, e pacientes controles saudáveis.

#### **5.6.3 – Quantificação do DNA**

A concentração e pureza de DNA (razões 260/280 e 260/230) foram avaliadas por Espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) de *swabs* e amostras de sangue total periférico processadas por cada um dos dois protocolos de extração.

#### **5.6.4 – Integridade do DNA**

A integridade do DNA genômico foi verificada através da eletroforese em gel de agarose 0,8% (TAE 1X) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguido de visualização com coloração de brometo de etídio 0,5ng/ml.

#### **5.6.5 – Amplificação de Ribonuclease P (RPP38)**

Para garantir a integridade do DNA e excluir a possibilidade de falsos negativos devido a presença de eventuais inibidores, o kit TaqMan RPP38 Control Reagents (Número de catálogo 4316844, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foi utilizado como um controle de amplificação de referência seguindo o protocolo do fabricante. Todas as reações foram realizadas em um MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Placa usando



o 7.500 Fast Real-Time PCR System Mix (Applied Biosystems).

#### **5.6.6 – Tratamento de bissulfito**

Um volume total de 20  $\mu\text{L}$  [20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ] de DNA extraído de *swabs* e sangue periférico foi tratado com EZ-96 DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA convertido em bissulfito foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

#### **5.6.7 – Análise da Curva de Dissociação em Alta Resolução sensível à Metilação (MS-HRM)**

O MS-HRM foi realizado em triplicata com o DNA tratado com bissulfito isolado de *swabs* ou sangue total periférico de cada indivíduo. Foi realizado em uma placa de reação de 96 poços MicroAmp Fast Optical usando o 7.500 Fast Real-Time PCR System Mix (Applied Biosystems) com os *primers* senso 5'GGATTTTTGTATTGCGGTAAATAAG-3' e antisenso 5'-CAACTAACCTTACCCACTCCATC-3' como descrito anteriormente por Ferreira et al. (9). As temperaturas de fusão de 78 °C e 83 °C foram escolhidas como uma amplificação quase proporcional de alelos não metilados e metilados, respectivamente. O par de *primers* usado neste estudo só irá parear com a região específica caso a conversão bissulfítica ocorra da forma esperada (Anexo 3).

#### **5.6.8 – Análise estatística**

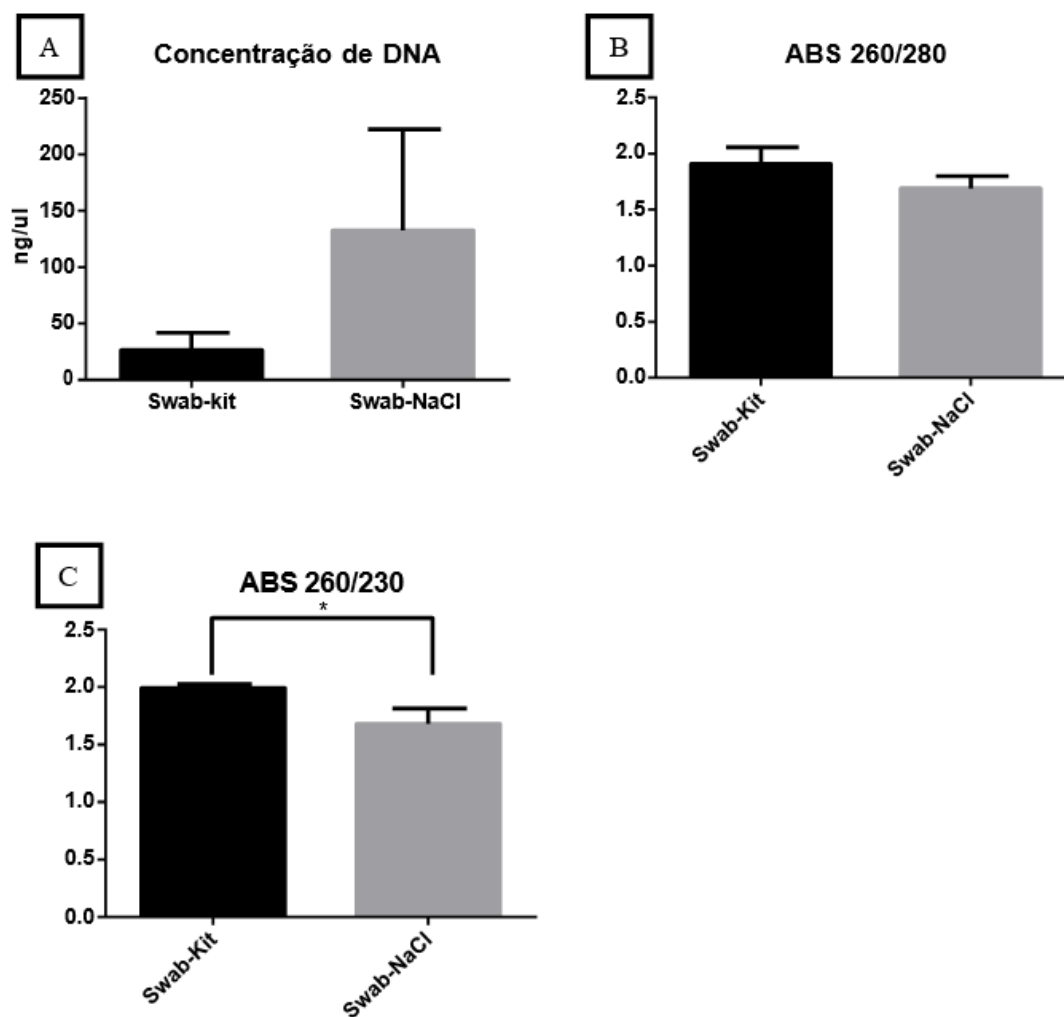
A análise de cada grupo foi realizada com Teste T de Student bicaudal não pareado com o objetivo de identificar as diferenças entre os grupos.

## **6 – RESULTADOS**

O estudo em questão busca apresentar um método rápido, confiável e robusto para a obtenção de DNA genômico a partir de *swabs* orais humanos que requerem volume de amostra com concentração e pureza ideais para as análises posteriores por PCR, MS-PCR, qPCR e MS-HRM.

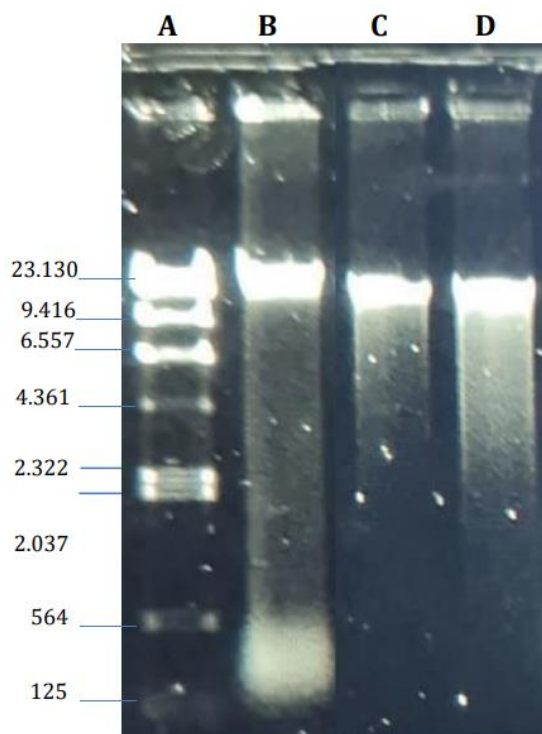
A parte inicial foi a determinação da qualidade e quantidade das amostras de DNA extraídos a partir dos *swabs* orais. Essa foi uma etapa de extrema importância pois a amostra de DNA influenciou nas análises que se seguiram neste trabalho.

Os valores observados para os parâmetros concentração e razões 260/280 e 260/230 foram semelhantes nas amostras extraídas com kit comercial nas amostras de sangue periférico e swab oral. Por esse motivo iremos focar nas comparações das extrações, a partir de swab oral, com NaCl e o kit comercial; A concentração de DNA foi maior com a metodologia NaCl (132,58ng +/- 89,68) em comparação com Qiagen (26,65ng +/- 15,11). Porém devido a grande variação das quantidades de DNA obtido com o método de extração com NaCl, as diferenças observadas não foram significativas (Figura 4 A e Anexo 4). A análise dos parâmetros de pureza (260/280 e 260/230) indicaram valores mais baixos para NaCl em relação ao Kit comercial (Figura 4B e 4C e Anexo 4). Em relação a razão dos comprimentos de onda 260/280 as diferenças foram 1,90 +/- 0,15 X 1,69 +/- 0,11, sendo o primeiro os valores para o Kit comercial e o segundo para extração com NaCl. O mesmo não foi observado em relação a razão 260/230nm, que apresentou uma diferença significativa entre o kit (1,99 +/-0,033) frente a extração com NaCl (1,68+/-0,13).



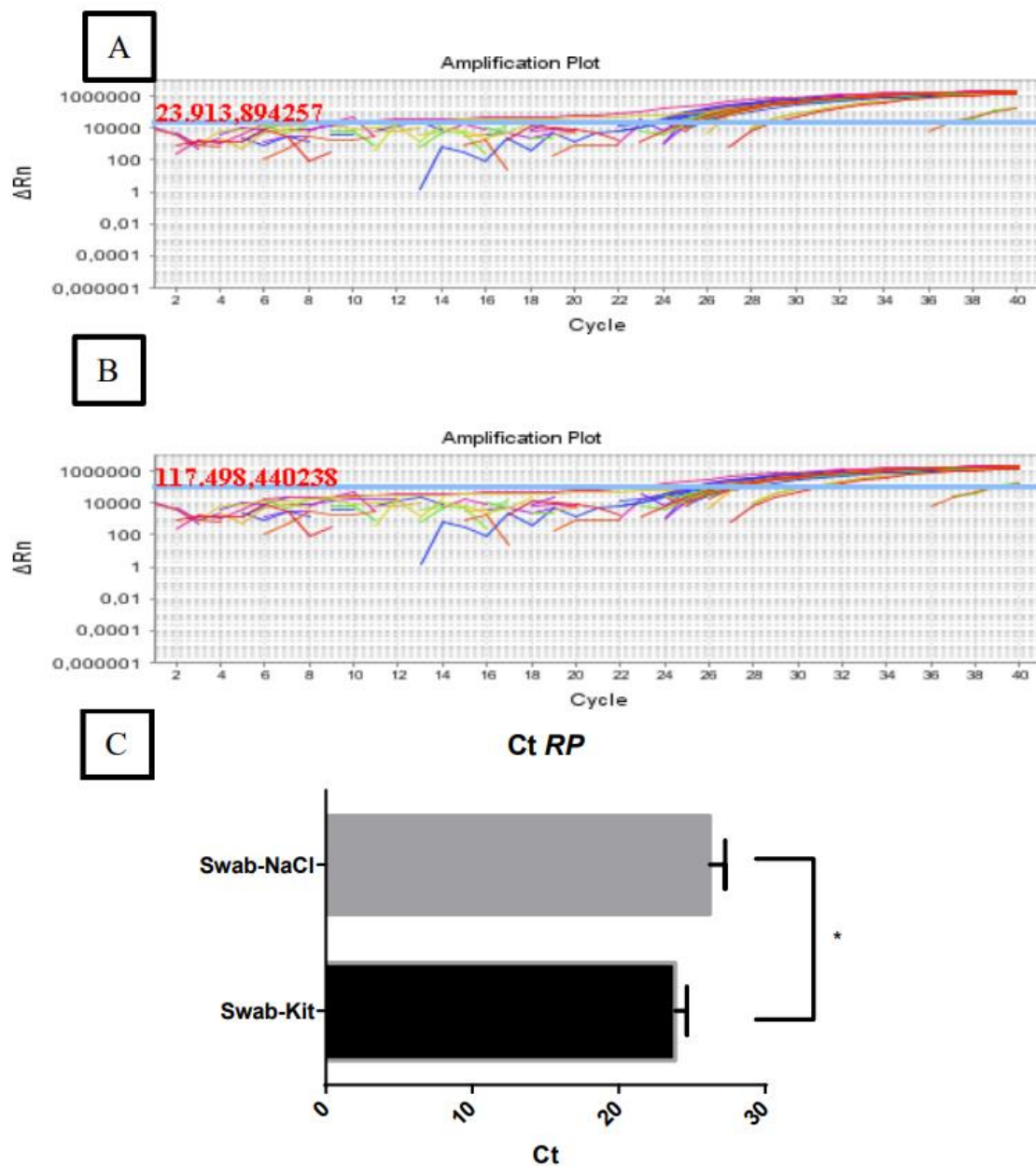
**Figura 4.** Gráficos de comparação entre os métodos de extração de DNA, a partir de *swab* oral, comercial e NaCl. Em A: média da Concentração de DNA do Kit (QiAGEN) e NaCl. B e C: Parâmetros de pureza para 260/230 e 260/280 respectivamente.

As amostras extraídas com NaCl apresentaram um padrão de degradação ligeiramente maior quando comparado com as amostras extraídas com o kit comercial (Figura 5), contudo este padrão de degradação parece não interferir na reação de PCR.



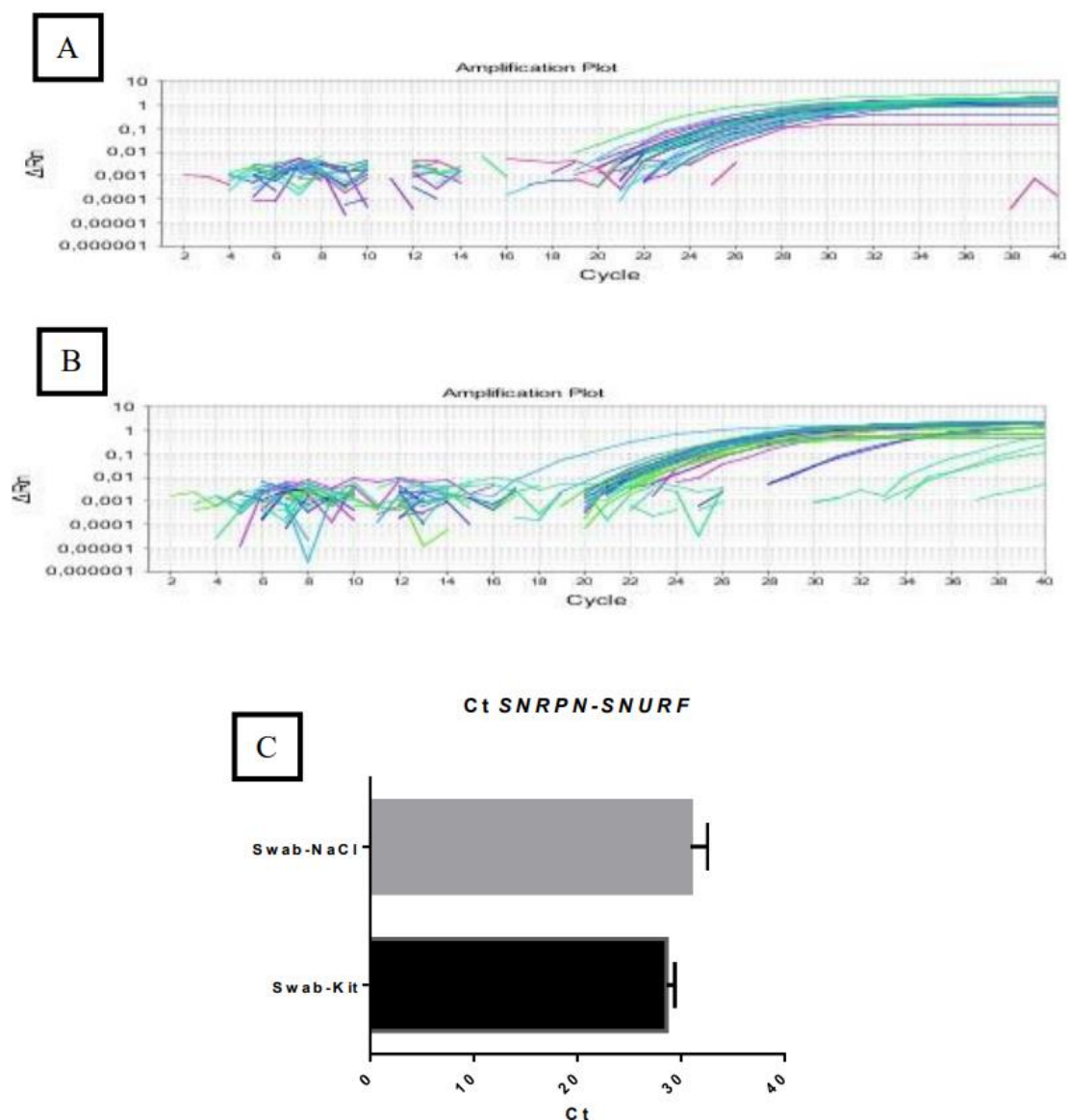
**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% (TAE 1X), corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), dos DNAs genômicos extraídos com diferentes métodos. Em A: Marcador de peso molecular ( $\lambda$ DNA/Hind III fragments, Invitrogen), B: DNA extraído a partir de swab oral por NaCl, C: DNA extraído a partir de sangue periférico com kit comercial; D: DNA extraído a partir de swab oral com Kit comercial. O marcador de massa molecular ( $\lambda$ DNA/Hind III fragments, Invitrogen) está expresso em pb.

A etapa seguinte foi à amplificação de regiões alvos pela técnica de PCR em tempo real. Em um primeiro momento, a região testada foi a do gene humano da ribonuclease P/MRP subunidade p38, todas as amostras amplificaram independente do protocolo de extração, tendo Ct médio de 23,86 (+/- 0,80) nas amostras extraídas com o kit comercial e Ct médio de 26,88 (+/- 1,51) para as amostras extraídas com NaCl. Esse par de primers para essa região apresentou diferença significativa em relação ao ciclo de detecção (Ct) na comparação dos dois protocolos (Figura 6 e Anexo 4).



**Figura 6.** Curvas de amplificação do gene da *RNase P* com os DNAs extraídos pelos dois métodos. Em A, curva de amplificação com o material extraído com o Kit Comercial. Em B, curva de amplificação com o material extraído com o NaCl; Em C, gráficos de comparação entre as médias dos Ct de amplificação para o gene da *RNase P* frente aos métodos de extração de DNA.

A análise da amplificação da região promotora do éxon 1 dos genes *SNRPN-SNURF* na região do Centro de Imprinting (IC) apresentaram Ct médio de 28,61 (+/- 0,80) nas amostras extraídas com o kit comercial e Ct médio de 30,97 (+/- 1,51) para as amostras extraídas com NaCl. Importante ressaltar que essas diferenças, ao contrário do que foi observado para o gene da *RNAse P*, não foram estatisticamente significativas (Figura 7 e Anexo 4). Um ponto importante a ressaltar é que com um menor grau de pureza os resultados quanto ao diagnóstico (normal X SPW) foram concordantes (materiais suplementares 02). Os resultados foram semelhantes às amostras de sangue. Em 12 pacientes, as sequências de DNA extraídas de sangue periférico e de swab oral extraído com NaCl foram amplificadas e apresentaram o mesmo resultado, demonstrando a aplicabilidade do DNA obtido por este método (Figura 7).



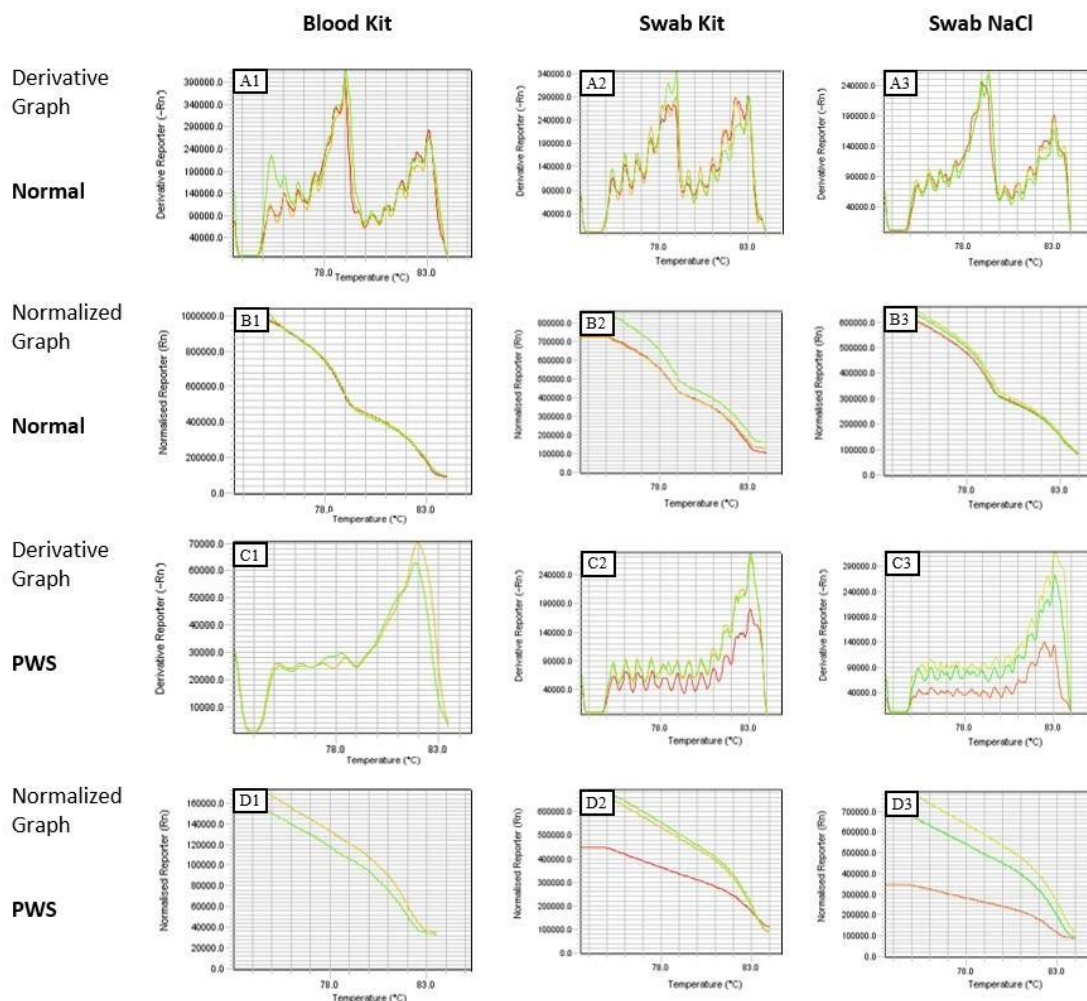
**Figura 7.** Curvas de amplificação do gene da região promotora do éxon 1 dos genes *SNRPN-SNURF* na região do Centro de Imprinting (IC) com os DNAs extraídos pelos dois métodos. Em A, curva de amplificação com o material extraído com o Kit Comercial. Em B, curva de amplificação com o material extraído com o NaCl; Em C, gráficos de comparação entre as médias dos Ct de amplificação para o gene da *SNRPN-SNURF* frente aos métodos de extração de DNA.

Conforme os objetivos propostos pelo estudo, a análise comparativa entre as diferentes fontes de material biológico, sangue e swab oral, para o diagnóstico da SPW, tiveram seu início a partir da seleção amostral de pacientes com suspeita de SPW e posterior coleta, atravessando as demais etapas descritas do item Material & Métodos.

A técnica de conversão bissulfítica converteu as citosinas não metiladas presentes no alelo paterno em uracila, enquanto as citosinas metiladas presentes no alelo materno não sofreram alteração. O DNA convertido foi submetido a técnica de MS-HRM para uma análise dos padrões de metilação dos alelos paterno e materno do gene *SNRPN-SNURF*. O HRM foi realizado em 200 amostras de *swab* da população em geral e de 10 indivíduos com suspeita de para as síndromes genéticas SPW. Desse total dos 10 indivíduos suspeitos, 6 casos foram confirmados para síndrome de Prader-Willi devido à alteração do padrão de metilação, representado pela presença de pico único relativo à temperatura de dissociação alélica materna, e ausência do pico relacionado ao alelo paterno (Figura 7C). Além dos 6 casos confirmados de SPW, os demais foram considerados normais para a SPW e AS devido ao padrão de metilação representado pela presença de dois picos relativos à temperatura de dissociação, sendo o primeiro pico correspondente ao alelo materno (metilado) e o segundo ao alelo paterno (não metilado) (Figura 8A). Esses resultados apresentaram concordância nas amostras extraídas de sangue periférico e swab (com os dois procedimentos de extração).

A análise do padrão da curva de *Melting* possibilitou o fácil diagnóstico das amostras extraídas pelo kit convencional e pelo método de NaCl (Figura 8). A análise das curvas normalizadas praticamente não apresentou diferença no perfil tanto nos pacientes com perfil de metilação normais (Figura 8 B1, B2 e B3) quanto os com perfil compatíveis com SPW (Figura 8 D1, D2 e D3). A Curva derivada apresentou uma pequena diferença no alelo materno nas amostras de Swab extraídas com NaCl frente as amostras extraídas com o kit comercial e com o sangue periférico, nos indivíduos com padrão de metilação normal (Figura 8 A1, A2 e A3), mas nos indivíduos com padrão de metilação condizentes com SPW as curvas normalizadas apresentam um comportamento próximo (Figura 8 C1, C2 e C3).





**Figura 8.** Padrão de metilação analisados por MS-HRM. As curvas de dissociação mostram o pico de metilação para cada alelo. Os pacientes normais, nas curvas derivadas de dissociação (A1, A2 e A3) apresentam dois picos correspondentes aos alelos paternos não metilados e os maternos metilados, sendo A1 o resultado da técnica feita com a utilização do kit a partir do sangue periférico, A2 com a utilização do kit a partir *swab* oral e A3 realizada por NaCl a partir *swab* oral. Os gráficos das curvas normalizadas dos pacientes normais apresentam fluorescência correspondente aos alelos paterno e materno, duas quedas acentuadas (B1, B2 e B3). A ausência do alelo paterno foi detectada devido a presença de um único pico, na curva derivada (C1, C2, C3) e de uma única queda, na curva derivada (D1, D2 e D3), confirmando o diagnóstico da Síndrome de Prader-Willi; As análises vistas em C1 e D1 foram realizadas a partir de sangue periférico, C2 e D2 com a utilização do kit a partir *swab* oral e C3 e D3 por NaCl a partir *swab* oral. A temperatura de metilação detectada para o alelo paterno não metilado foi próxima de 78,8° C em todos os casos e para o alelo materno metilado foi em torno de 83,3°C em todos os casos.

Os dados aqui apresentados foram compilados e submetidos para apreciação e posterior publicação no periódico *Genetics and Molecular Biology* (Anexo 5).

## 7 – DISCUSSÃO

A determinação da qualidade e quantidade de uma amostra de DNA é crucial para que as análises posteriores sejam satisfatórias e, na maioria dos laboratórios de biologia molecular, normalmente é realizada por espectroscopia UV/VIS. Para análise de DNA, normalmente é recomendado escanear a faixa espectral completa de 230 a 320nm. Nesta faixa, os comprimentos de ondas de maior interesse são de 260, 280, 230 e 320nm, respectivamente. O DNA possui absorção máxima a 260 nm. Quando medida em uma célula de 10 mm, a concentração do DNA de cadeia dupla é de aproximadamente 50  $\mu\text{g/mL}$  por 1 unidade de absorção, usando o coeficiente de extinção médio de 0,020 ( $\mu\text{g/mL}$ )-1 cm<sup>-1</sup>. Ao realizar uma leitura a 260 nm, a presença de contaminantes, que também absorvem a 260 nm, pode levar a um erro na estimativa do teor de DNA. Portanto, normalmente é aplicada uma correção de fundo a 320 nm. A taxa de absorção 260/280 é uma boa indicadora de contaminação por proteínas; quando  $\geq 1,8$ , indica uma amostra de DNA pura. Já a taxa de absorção 260/230, quando menor do que 1,8 indica contaminação provavelmente causada por compostos orgânicos e/ou agentes caotrópicos (ureia, tiourea, compostos fenólicos, guanidina, etanol, propanol, cloreto de magnésio, Dodecil sulfato de sódio -SDS), que absorvem a 230 nm. Nossos resultados apresentaram uma diferença significativa na razão 260/230 nm, uma possível explicação para o fato é a presença, em concentrações residuais, de SDS – detergente utilizado normalmente na etapa de lise celular, no primeiro passo da etapa de extração de DNA, mesmo em Kits comerciais ou métodos caseiros. O fato é que mesmo com essa alteração não detectamos problemas nas etapas seguintes de amplificação por tempo real, conversão por bissulfito e análise da curva de dissociação.

A síndrome de Prader-Willi é uma doença genética complexa desenvolvida a partir de anormalidades na região 15q11-q13 do alelo paterno do cromossomo 15. O diagnóstico da SPW apenas através dos fenótipos clínicos é de difícil detecção graças a sobreposição de fenótipos com outras doenças genéticas, como a Síndrome de Schaaf-Yang (SYS) e os demais espectros do quadro clínico Prader-Willi-Like (SPWL). Algumas sobreposições fenotípicas entre SPW, SYS e SPWL incluem hipotonia neonatal, dificuldades na alimentação, ganho de peso, atraso no desenvolvimento intelectual e obesidade (37). As alterações genéticas que acarretam na SPWL são encontradas fora da região características da SPW, no cromossomo 15. A SPWL apresenta diversas regiões genômicas associadas como: dissomia uniparental materna na região 14q32.2 (38); deleções no cromossomo 1 (1p36) (39); 6 (6q16.2) (40) e 10 (10q26) (41) além de outras anormalidades cromossômicas, ainda não descritas que impossibilitam um diagnóstico clínico preciso e exigem estudo molecular (42–45). O levantamento dessas características levou a elaboração do artigo sobre a relação de aspectos genotípicos e fenotípicos entre Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Prader-Willi-Like, submetido a revista *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Anexo 6). A caracterização laboratorial da SPW através de técnicas moleculares (MS-HRM, MS-MLPA e Análise de microssatélite) e de citogenética molecular (FISH) a distingue das demais síndromes genéticas além de elucidar o mecanismo genético causador da síndrome (33). Apesar das análises moleculares comumente utilizadas oferecerem um diagnóstico preciso, a necessidade de realização de diversas técnicas torna todo o processo diagnóstico demasiadamente laborioso, demorado e caro.

A análise do padrão de metilação do éxon 1 do gene *SNURF-SNRPN* pela técnica de MS-HRM detecta 99% dos casos da SPW. A metodologia é capaz de detectar alterações devido a deleção, defeito do Centro de *Imprinting* e dissomia Uniparental, embora não

consiga distinguir entre os mecanismos genéticos causadores da síndrome, impactando negativamente na eficiência do aconselhamento genético (14). A técnica de MS-HRM torna-se um excelente método de rastreamento pois demanda poucos passos para a sua realização, baixo custo e fácil interpretação dos resultados.

Um fator que deve ser considerado é que o diagnóstico rápido e preciso está diretamente relacionado com uma intervenção medicamentosa eficiente. Ângulo MA et al., 2007, Takeda A et al., 2010 e Wolfgram et al., 2013 (46–48) demonstraram que administração de Hormônio de Crescimento (GH) em pacientes com SPW oferece diversos benefícios. O tratamento com GH está relacionado à composição corpórea devido à regulação de massa gorda e massa magra, normalização de tônus muscular, correção das disfunções metabólicas e correção do desenvolvimento irregular cognitivo relacionado à SPW. Contudo, efeitos preeminentes do tratamento com GH são comumente observados com uma intervenção medicamentosa nos primeiros anos de vida (idade recomendada para iniciar a administração de GH: 4-6 meses de idade). O processo de análise laboratorial utilizado atualmente demanda maior tempo para um diagnóstico completo e acurado, além de uma equipe técnica especializada para elaboração e interpretação dos resultados, podendo comprometer os benefícios com o tratamento com GH (49).

Nossos resultados podem ser extrapolados para o diagnóstico de pacientes com doenças raras. Esse processo ainda é desafiador, uma vez que alguns fatores impactam diretamente esse processo:

- A) A sobreposição de fenótipos: esse quadro dificulta a avaliação clínica e o diagnóstico diferencial ao nascimento (50);
- B) Analisar o risco de recorrência: no caso de SPW, caso ocorra uma deleção no IC, o risco de recorrência vai a 50%
- C) Tornar o teste o menos invasivo e doloroso: em alguns casos ocorre a dificuldade de

obter sangue ou outro tecido do paciente e a família nem sempre está disponível;

D) Avaliar o custo do exame no sistema público de saúde.

Alterações no perfil de metilação permitem o surgimento de diversos tipos celulares através de um efeito pleiotrópico no genoma (51). Esse processo ocorre durante o desenvolvimento embrionário e ao longo da vida de um indivíduo saudável e está associado ao surgimento de doenças como os diversos tipos de cânceres, doença de Parkinson e doenças autoimunes. O estudo dessas modificações pode ser utilizado como biomarcadores para o prognóstico associados a fenótipos críticos (52,53). A extração de DNA é a etapa inicial da análise de metilação, a qualidade do material obtido impacta nas etapas de conversão e MS-PCR, MS-HRM e sequenciamento. O sangue total é o meio de obtenção de DNA mais largamente utilizado e atualmente existem diversos kits comerciais que permitem a obtenção de DNA de boa qualidade. A utilização de Kits comerciais apresenta baixa toxicidade quando comparadas a utilização de métodos caseiros com fenol-clorofórmio. Embora a identificação das alterações genéticas seja feita com a utilização do sangue periférico, existem alguns casos em que a obtenção deste material se torna extremamente difícil de ser realizada. Recém-natos, crianças obesas, como na SPW, indivíduos com transtornos neurológicos, que apresentam tremores e envio de amostras de doentes e familiares que vivem em locais distantes, são alguns exemplos de pacientes que podem apresentar tal dificuldade na coleta. Com isso, uma boa alternativa para situações como essa é a utilização de células da mucosa oral para a obtenção de DNA (13). A extração com kit comercial comparada a extração com NaCl apresentou menor rendimento, mas maior pureza e integridade do DNA extraído. Contudo foi possível realizar as etapas de conversão, MS-HRM, indicando ser uma forma de obtenção de DNA para a análise molecular. O próximo passo é a análise desse material como molde para o sequenciamento de Nova Geração.

## 8 – CONCLUSÃO

- Uma comparação dos procedimentos de extração mostra que o método de extração de NaCl é adequado para extração de DNA de amostra bucal coletada através de swab oral.
- Neste trabalho foi possível demonstrar um método simples de coleta de amostras e extração de DNA, que possui baixo custo, é eficaz, fácil e rápido, que fornece uma quantidade e qualidade suficiente de DNA para a execução do qPCR e MS-HRM.
- Foi observado concordância diagnóstica entre a técnica de MS-HRM a partir das amostras extraídas de sangue periférico e swab e entre os métodos de extração (kit e NaCl).
- A coleta bem-sucedida de amostras e a extração de DNA de *swabs* são alternativas não invasivas e confiáveis, tanto para os pacientes quanto para os profissionais que realizarão a coleta destas amostras.

## 9 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG. Clinical and Cytogenetic Survey of 39 Individuals With Prader-Labhart-Willi Syndrome. *Am J Med Genet.* março de 1986;23(3):793–809.
2. Buiting K, Williams C, Horsthemke B. Angelman syndrome — insights into a rare neurogenetic disorder. *Nat Rev Neurol.* outubro de 2016;12(10):584–93.
3. Cheon CK. Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;21(3):126.
4. Guinovart M, Coronas R, Caixàs A. Alteraciones psicopatológicas en el síndrome de Prader-Willi. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición.* 1º de novembro de 2019;66(9):579–87.
5. Cassidy SB, Driscoll DJ. Prader–Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* janeiro de 2009;17(1):3–13.
6. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Genet Med.* janeiro de 2012;14(1):10–26.
7. Beygo J, Buiting K, Ramsden SC, Ellis R, Clayton-Smith J, Kanber D. Update of the EMQN/ACGS best practice guidelines for molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Eur J Hum Genet.* setembro de 2019;27(9):1326–40.
8. Craig ME, Cowell CT, Larsson P, Zipf WB, Reiter EO, Albertsson Wikland K, et al. Growth hormone treatment and adverse events in Prader-Willi syndrome: data from KIGS (the Pfizer International Growth Database). *Clin Endocrinol.* agosto de 2006;65(2):178–85.
9. Ribeiro Ferreira I, Darleães dos Santos Cunha W, Henrique Ferreira Gomes L, Azevedo Cintra H, Lopes Cabral Guimarães Fonseca L, Ferreira Bastos E, et al. A rapid and accurate methylation-sensitive high-resolution melting analysis assay for the diagnosis of Prader Willi and Angelman patients. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. 29 de abril de 2019 [citado 20 de maio de 2021];7(6). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6565559/>
10. Botezatu A, Puiu M, Cucu N, Diaconu CC, Badiu C, Arsene C, et al. Comparative molecular approaches in Prader–Willi syndrome diagnosis. *Gene.* janeiro de 2016;575(2):353–8.
11. Izumi K, Housam R, Kapadia C, Stallings VA, Medne L, Shaikh TH, et al. Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving *SIMI* and Prader-Willi syndrome-like features. *Am J Med Genet.* dezembro de 2013;161(12):3137–43.
12. Calounova G, Novotna D, Simandlova M, Havlovicova M, Zumrová A, Kocarek E, et al. Prader-Willi syndrome due to uniparental disomy in a patient with a balanced chromosomal translocation. *Neuro Endocrinol Lett.* outubro de 2006;27(5):579–85.
13. Lijnen I, Willems G. DNA research in forensic dentistry. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001;23(9):511.
14. Smith A, Hung D. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome. *Transl Pediatr.* janeiro de 2017;5(1):46–56.
15. Angulo MA, Butler MG, Cataletto ME. Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest.* 2015;38:1249–63.

16. Prader A, Labhart A, Willi H. Ein syndrom von adipositas, kleinwuchs, kryptorchismus und oligophrenie nach myotonie artigen zustand im neugeborenenalter. - Schweiz Med Wochen. 1956;86:1260-1260.
17. Cassidy SB. Prader-Willi syndrome. *J Med Genet.* novembro de 1997;34(11):917–23.
18. Bakker NE, Siemensma EPC, Koopman C, Hokken-Koelega ACS. Dietary Energy Intake, Body Composition and Resting Energy Expenditure in Prepubertal Children with Prader-Willi Syndrome before and during Growth Hormone Treatment: A Randomized Controlled Trial. *Horm Res Paediatr.* 2015;83(5):321–31.
19. Festen DAM, de Weerd AW, van den Bossche RAS, Joosten K, Hoeve H, Hokken-Koelega ACS. Sleep-Related Breathing Disorders in Prepubertal Children with Prader-Willi Syndrome and Effects of Growth Hormone Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1º de dezembro de 2006;91(12):4911–5.
20. Emerick JE, Vogt KS. Endocrine manifestations and management of Prader-Willi syndrome. *Int J Pediatr Endocrinol.* dezembro de 2013;2013(1):14.
21. Relkovic D, Isles AR. Behavioural and cognitive profiles of mouse models for Prader–Willi syndrome. *Brain Research Bulletin.* março de 2013;92:41–8.
22. Correa-Silva SR, Sá LBPC de, Lengyel AMJ. [Ghrelin and growth hormone secretagogues (GHS): modulation of growth hormone secretion and therapeutic applications]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* julho de 2008;52(5):726–33.
23. Damiani D. Uso de hormônio de crescimento na síndrome de Prader-Willi. *Arq Bras Endocrinol Metab.* julho de 2008;52(5):833–8.
24. Aycan Z, Baş VN. Prader-Willi Syndrome and Growth Hormone Deficiency. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* junho de 2014;6(2):62–7.
25. Sinnema M, Maaskant MA, van Schrojenstein Lantman-de Valk HMJ, Caroline van Nieuwpoort I, Drent ML, Curfs LMG, et al. Physical health problems in adults with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet.* setembro de 2011;155(9):2112–24.
26. Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O’Riordan MA, Cassidy SB. The Changing Purpose of Prader-Willi Syndrome Clinical Diagnostic Criteria and Proposed Revised Criteria. *PEDIATRICS.* 1º de novembro de 2001;108(5):e92–e92.
27. Rocha CF, Paiva CLA. Mini-Review Prader-Willi-like phenotypes: a systematic review of their chromosomal abnormalities. *Genet Mol Res.* 2014;13(1):2290–8.
28. Butler MG, Miller JL, Forster JL. Prader-Willi Syndrome - Clinical Genetics, Diagnosis and Treatment Approaches: An Update. *Curr Pediatr Rev.* novembro de 2019;15(4):207–44.
29. Ehrhart F, Janssen KJM, Coort SL, Evelo CT, Curfs LMG. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: Visualisation of the molecular pathways for two chromosomal disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry.* 21 de outubro de 2019;20(9):670–82.
30. Pina-Neto JM de, Ferraz VEF, Molfetta GA de, Buxton J, Richards S, Malcolm S. Clinical-neurologic, cytogenetic and molecular aspects of the Prader-Willi and Angelman Syndromes. *Arq Neuro-Psiquiatr.* junho de 1997;55(2):199–208.
31. Nicholls RD, Knoll JHM, Butler MG, Karam S, Lalonde M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature.* 16 de novembro de



- 1989;342(6247):281–5.
32. Hussmann D, Hansen LL. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM). Em: Tost J, organizador. *DNA Methylation Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [citado 3 de maio de 2021]. p. 551–71. (Methods in Molecular Biology; vol. 1708). Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7481-8\\_28](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7481-8_28)
  33. Ramsden SC, Clayton-Smith J, Birch R, Buiting K. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet*. 11 de maio de 2010;11:70.
  34. Wu W, Zhang J, Yang H, Shao Y, Yu B. Examination of AKAP12 promoter methylation in skin cancer using methylation-sensitive high-resolution melting analysis: AKAP12 methylation and skin cancer. *Clinical and Experimental Dermatology*. junho de 2011;36(4):381–5.
  35. De Leeneer K, Coene I, Poppe B, De Paepe A, Claes K. Rapid and Sensitive Detection of BRCA1/2 Mutations in a Diagnostic Setting: Comparison of Two High-Resolution Melting Platforms. *Clinical Chemistry*. 1º de junho de 2008;54(6):982–9.
  36. Abrão MG, Billerbeck AEC, Nishi MY, Marui S, Mendonça BB de. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. *Arq Bras Endocrinol Metab*. dezembro de 2005;49(6):978–82.
  37. McCarthy JM, McCann-Crosby BM, Rech ME, Yin J, Chen CA, Ali MA, et al. Hormonal, metabolic and skeletal phenotype of Schaaf-Yang syndrome: a comparison to Prader-Willi syndrome. *J Med Genet*. maio de 2018;55(5):307–15.
  38. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, et al. Maternal Uniparental Disomy 14 Syndrome Demonstrates Prader-Willi Syndrome-Like Phenotype. *The Journal of Pediatrics*. dezembro de 2009;155(6):900-903.e1.
  39. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Osaka H, Yamamoto K, et al. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype: 1p36 deletion with PWS-like phenotype. *Pediatrics International*. agosto de 2010;52(4):547–50.
  40. Bonaglia MC, Ciccone R, Gimelli G, Gimelli S, Marelli S, Verheij J, et al. Detailed phenotype–genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader–Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet*. dezembro de 2008;16(12):1443–9.
  41. Lukusa T, Fryns JP. Pure distal monosomy 10q26 in a patient displaying clinical features of Prader-Willi syndrome during infancy and distinct behavioural phenotype in adolescence. *Genet Couns*. 2000;11(2):119–26.
  42. Monaghan KG, Van Dyke DL, Feldman GL. Prader-Willi-like syndrome in a patient with an Xq23q25 duplication. *Am J Med Genet*. 16 de novembro de 1998;80(3):227–31.
  43. Pramyothin P, Pithukpakorn M, Arakaki RF. A 47, XXY patient and Xq21.31 duplication with features of Prader–Willi syndrome: results of array-based comparative genomic hybridization. *Endocr*. junho de 2010;37(3):379–82.
  44. Florez L, Anderson M, Lacassie Y. De novo paracentric inversion (X)(q26q28) with features mimicking Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet*. 15 de agosto de 2003;121A(1):60–4.
  45. Nowicki ST, Tassone F, Ono MY, Ferranti J, Croquette MF, Goodlin-Jones B, et al. The

- Prader-Willi Phenotype of Fragile X Syndrome. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. abril de 2007;28(2):133–8.
46. Wolfgram PM, Carrel AL, Allen DB. Long-term effects of recombinant human growth hormone therapy in children with Prader–Willi syndrome. *Curr Opin Pediatr*. agosto de 2013;25(4):509–14.
  47. Angulo MA, Castro-Magana M, Lamerson M, Arguello R, Accacha S, Khan A. Final adult height in children with Prader–Willi syndrome with and without human growth hormone treatment. *Am J Med Genet*. 1º de julho de 2007;143A(13):1456–61.
  48. Takeda A, Cooper K, Bird A, Baxter L, Frampton G, Gospodarevskaya E, et al. Recombinant human growth hormone for the treatment of growth disorders in children: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess [Internet]*. setembro de 2010 [citado 16 de dezembro de 2022];14(42). Disponível em: <https://www.journalslibrary.nihr.ac.uk/hta/hta14420/>
  49. Grugni G, Marzullo P. Diagnosis and treatment of GH deficiency in Prader–Willi syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. dezembro de 2016;30(6):785–94.
  50. Dulka S, Choudhary AK, Methratta S, Fortuna K. Blount disease in a case of Prader-Willi syndrome: why is it not as prevalent as in obesity without Prader-Willi syndrome? *World J Pediatr*. maio de 2013;9(2):182–4.
  51. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry*. 1º de junho de 2003;49(6):853–60.
  52. Kristensen LS, Treppendahl MB, Grønþæk K. Analysis of Epigenetic Modifications of DNA in Human Cells. *Current Protocols in Human Genetics [Internet]*. abril de 2013 [citado 31 de outubro de 2022];77(1). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142905.hg2002s77>
  53. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*. agosto de 2016;14(4):264–70.

## ANEXO 1 Parecer Consubstanciado do CEP

INSTITUTO FERNANDES  
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/  
MS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**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 DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.699.893

**Apresentação do Projeto:**

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma doença genética complexa, multissistêmica caracterizada por alterações mentais, endócrina e neurológica.

As características endócrinas da SPW incluem baixa resposta do hormônio de crescimento (GH) em testes de estimulação, deficiência na secreção

de gonadotrofina, fator de crescimento insulina-like (IGF)-I baixo, e proteína-3 de ligação ao fator de crescimento IGF baixo. Os níveis plasmáticos

de insulina são mais baixos do que o esperado em crianças e adultos com SPW em relação ao grau de obesidade e são geralmente secundários ao

eixo GH-IGF-I deficiente. A maioria das deficiências hormonal, metabólica e de comportamento na SPW pode ser causada por uma disfunção hipotálamo-pituitária, porém a base fisiopatológica das características

clínicas na SPW é desconhecida. Neste projeto propomos o desenvolvimento de estratégias de estudos moleculares de alta complexidade com 2 eixos principais: 1) O desenvolvimento de metodologias de

rastreamento em recém nascidos e 2) diagnóstico molecular precoce desses pacientes visando o início do suporte clínico-terapêutico adequado, contribuirá para a

melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

**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: 2.699.893

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo da emenda:

- 1) Retirar o Centro Colaborador (IEDE) pois só serão incluídos pacientes do IFF.
- 2) Solicitar ampliação do prazo do projeto.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não são objetos da emenda.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisadora justificou a retirada do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia (IEDE) como centro colaborador pois os pacientes que incluídos no estudo são unicamente do IFF.

A pesquisadora justificou a ampliação do prazo do projeto para aumento do tamanho amostral.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_709415_E2.pdf	21/05/2018 14:20:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SPW_versao_4.docx	25/11/2015 20:46:41	Leticia da Cunha Guida	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_Parecer_CEP_CNPq_nov2015.docx	25/11/2015 20:46:18	Leticia da Cunha Guida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	proj_doencas_raras_cnpq_2014_v8_para_CEP.docx	26/10/2015 16:37:50	Leticia da Cunha Guida	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	26/10/2015 16:26:22	Leticia da Cunha Guida	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**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: 2.699.893

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 07 de Junho de 2018

*Ana Maria Aranha Magalhães Costa*

Assinado por:

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

**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

## ANEXO 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### **Pesquisador Responsável**

Dra. Leticia 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



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 instituída 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.**

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



### ANEXO 3

Os primers foram desenhados para anelarem apenas ao DNA convertido (tratado com bissulfito). Sem tratamento, não há como os primers se fixarem na região. Conforme discutido em Ferreira et al (2019 e 2021), ambos os primers podem se ligar a ambos os alelos e atuar como controle positivo para a conversão por bissulfito, processo devido à particularidade de hibridização no DNA tratado. O primer reverso mostra um anelamento perfeito nos dois alelos. O primer forward apresenta uma única incompatibilidade no alelo não metilado (troca de T por C) que não interfere na capacidade de amplificação, pois ainda existe o pareamento de dez nucleotídeos após essa incompatibilidade.

Abaixo está a sequência da região genômica (sequências ID NG\_012958.1 e NG\_002690.1) contendo os genes *SNRPN-SNURF*. As ilhas CpG estão em negrito.

#### DNA não tratado

tcattc**cg**gt gagggagggga gctgggaccc ctgcactg**cg** gcaacaagc **acgc**cctg**cg**c **ggcc**cgagag  
gcaggctg**gc** **gcgc**atgctc agg**cg**gggat gtgtg**cg**aag cctg**cg**ctg ctgcag**cg**ag tctgg**cg**cag  
agtggag**cg**g **cgcc**cggaga tgctgag**cg**c atctgtctga ggag**cg**gtca gtga**cg**cgat ggagcgggca  
aggtcagctg tgc**cg**gtggc ttctctcaag agacagcctg gggag**cg**gcc acttttattc atcatcattc **cg**gtgagggga  
gggagctggg accc

Após a conversão do DNA, as citosinas não metiladas são convertidas em timinas, em ambos os alelos. Esta condição permite que os primers hibridizem (local indicado por retângulos cinzas). vermelha indica a incompatibilidade do primer forward, no alelo não metilado. Por esta razão, a presença de amplificação é uma indicação de que a conversão do DNA funcionou corretamente.

T indica citosinas não metiladas convertidas em timinas.

Sequência de iniciadores 5'-GGATTTTTGTATTGCGGTAAATAAG-3' e 5'-CAACTAACCTTACCCACTCCATC-3'

#### Alelo não Metilado

tTattTTggt gagggagggga gTtgggaTTT TtgTaTtgTg gTaaaTaagT aTgTTtgTgT  
 ggTTgTagag gTaggTtggT gTgTatgTtT aggTggggat gtgtgTgaag TTtgTTgTtg  
 TtgTagTgag tTtggTgTag agtggagTgg TTgTTggaga tgTTtgaTgT atTtgtTtga  
 ggagTggtTa gtgaTgTgat ggagTgggTa aggtTagTtg tgTTggtggT ttTtTtTaag  
 agaTagTTtg gggagTggTT aTttttattT atTa

#### Alelo Metilado

tTattTcgt gagggagggga gTtgggaTTT TtgTaTtgcg gTaaaTaagT acgTTtgcgc  
 ggTcgTagag gTaggTtggc cgcTatgTtT aggcggggat gtgtgcgaag TTtgTcgTtg TtgTagcgag  
 tTtggcgTag agtggagcgg TcgTcggaga tgTTtgcgT atTtgtTtga ggagcgggtTa gtgacgggat  
 ggagcgggTa aggtTagTtg tgTcgggtggT ttTtTtTaag agaTagTTtg gggagcggTT aTttttattT  
 atTa

## ANEXO 4

Pacientes	DNA conc		ABS 260/280		ABS 260/230		CT SNRPN-SNURF		CT RNASE P	
	QiAGEN	NaCl	QiAGEN	NaCl	QiAGEN	NaCl	QiAGEN	NaCl	QiAGEN	NaCl
1	12,1	314,4	1,74	1,64	1,95	1,8	29,18205	31,25205	24,43	27,16205
2	24,9	287,3	1,95	1,64	1,99	1,7	29,26	31,62	24,51	27,53
3	16,6	213,2	1,56	1,73	2	2,2	29,4582	31,25205	24,71	27,16205
4	20,2	207,2	1,69	1,74	2,1	1,7	29,23467	30,95671	24,48	26,86671
5	15	174,4	1,84	1,75	2	2,1	29,24671	31,30467	24,50	27,21467
6	13,1	237,4	1,72	1,84	2	1,6	29,34671	30,30467	24,60	26,21
7	23	232,5	1,89	1,67	2	2,5	27,54429	29,61429	22,79	25,52
8	25,6	223,1	1,85	1,69	1,97	1,69	27,44289	29,35	22,69	25,26
9	26,6	202,7	1,95	1,6	1,99	1,64	27,14429	28,61429	22,39	24,52
10	24,6	234,8	1,82	1,69	1,98	1,65	27,68779	29,25779	22,94	25,17
11	10,6	252,07	1,72	1,64	2,01	1,61	27,18779	29,08776	22,44	25,00
12	19	19,15	1,44	1,64	2	1,6	27,87786	29,75779	23,13	25,67
13	30,7	35,49	1,82	1,77	2	1,6	27,94402	28,9644	23,19	24,87
14	17,4	15,96	1,84	1,74	2,03	1,63	27,3944	28,6494	22,64	24,56
15	17,2	80,6	1,94	1,73	2,01	1,69	27,5944	29,95632	22,8444	25,87
16	45	176,47	2,02	1,83	1,99	1,61	29,25563	32,97609	24,50563	28,89
17	18	220,11	1,75	1,67	1,98	1,64	29,61256	33,50586	24,86256	29,42
18	12	125,04	1,73	1,69	1,99	1,65	30,08377	33,51687	25,33377	29,43
19	40,2	177,19	1,93	1,61	1,99	1,68	30,04425	34,54925	25,29425	30,46
20	26,5	30,59	1,92	1,69	1,97	1,67	30,13923	35,83009	25,38923	31,74
21	27,3	133,43	1,8	1,74	1,99	1,69	30,75756	35,92466	26,00756	31,83
22	27,1	151,14	1,92	1,78	1,92	1,5	28,13987	33,24836	23,38987	29,16
23	16,8	192,66	1,84	1,44	1,94	1,59	29,85644	33,38955	25,10644	29,30
24	16,9	213,95	2,05	1,58	1,98	1,56	29,90956	33,41968	25,15956	29,33

25	16,1	156,1	2,03	1,45	1,97	1,5 8	28,874 19	32,868 65	24,124 19	28,78
26	17,8	29,78	1,84	1,54	1,97	1,5 7	29,090 06	32,871 24	24,340 06	28,78
27	16	8,24	2,05	1,57	1,99	1,6 1	29,353 81	33,019 22	24,603 81	28,93
28	16	3,82	1,85	1,62	1,96	1,6 2	28,746 09	33,517 63	23,996 09	29,43
29	40,5	34,91	1,9	1,45	1,95	1,6 5	29,328 35	33,764 23	24,578 35	29,67
30	16,6	138,6 4	2,1	1,47	1,97	1,6 7	29,530 71	33,967 37	24,780 71	29,877 37
31	39,1	51,44	1,98	1,87	1,99	1,6 9	30,027 56	32,457 56	25,277 56	28,367 56
32	13,3	71,85	1,9	1,77	1,99	1,8	27,409 87	29,129 87	22,659 87	25,039 87
33	13,9	32	2,02	1,55	1,98	1,8	27,526 44	29,246 44	22,776 44	25,156 44
34	18,2	164,8 3	1,69	1,66	1,99	1,6	29,179 56	30,899 56	24,429 56	26,809 56
35	16,2	86,57	1,79	1,88	1,97	2,1	28,144 19	29,864 19	23,394 19	25,774 19
36	18,2	14,62	2,2	1,87	1,99	1,6 9	28,360 06	30,080 06	23,610 06	25,990 06
37	8,8	72,92	2,17	1,85	1,98	1,6 1	28,623 81	30,343 81	23,873 81	26,253 81
38	10,1	95,1	2,04	1,75	2,01	1,6 4	28,016 09	29,736 09	23,266 09	25,646 09
39	20,9	47,87	1,91	1,84	2	1,6 6	28,598 35	30,318 35	23,848 35	26,228 35
40	24,6	199,4 2	2,03	1,67	1,99	1,6 3	28,800 71	30,520 71	24,050 71	26,430 71
41	16,7	62,78	2,02	1,69	1,99	1,6 5	28,870 22	30,590 22	24,120 22	26,500 22
42	15,9	23,61	2,01	1,6	1,94	1,6 6	29,409 23	31,129 23	24,659 23	27,039 23
43	26,8	32,78	1,95	1,69	1,99	1,6 8	27,526 44	29,246 44	22,776 44	25,156 44
44	14,3	113,8 9	1,88	1,64	1,98	1,6 4	28,360 06	30,080 06	23,610 06	25,990 06
45	11,7	97,69	1,91	1,64	1,99	1,6 4	28,598 35	30,318 35	23,848 35	26,228 35
46	10,1	47,27	2,21	1,77	2,01	1,6 1	28,525 63	30,245 63	23,775 63	26,155 63
47	15,7	290,0 7	1,97	1,74	2	1,6 1	28,016 09	29,736 09	23,266 09	25,646 09
48	12,7	265,0 7	1,82	1,73	1,97	1,6 2	28,016 09	29,736 09	23,266 09	25,646 09
49	35,9	191,7 7	2,12	1,74	1,97	1,6 3	28,144 19	29,864 19	23,394 19	25,774 19
50	29,6	178,0 7	2,02	1,87	1,95	1,6 5	27,409 87	29,129 87	22,659 87	25,039 87
51	43,4	148,3 6	1,85	1,77	1,96	1,6 6	28,185 63	29,905 63	23,435 63	25,815 63
52	58,2	212,0 9	1,9	1,55	1,99	1,6 2	28,391 26	30,111 26	23,641 26	26,021 26

53	55,3	207,5 9	2	1,66	2,02	1,6 2	29,013 77	30,733 77	24,263 77	26,643 77
54	49,2	203,3 9	2	1,88	2,08	1,6 8	28,974 25	30,694 25	24,224 25	26,604 25
55	60,3	197,6 9	2	1,87	2,01	1,6 1	29,069 23	30,789 23	24,319 23	26,699 23
56	40,3	211,3 1	2,01	1,85	2	1,6	29,687 56	31,407 56	24,937 56	27,317 56
57	41	182,6 7	2	1,75	2	1,6	27,069 87	29,789 87	22,319 87	25,699 87
58	44,5	140,6 7	1,99	1,84	2,01	1,6 6	27,186 44	28,906 44	22,436 44	24,816 44
59	25,1	198,2 7	1,96	1,67	1,99	1,7 9	28,839 56	31,159 56	24,089 56	27,069 56
60	20,1	199,1 7	1,91	1,7	1,98	1,7 1	27,804 19	29,524 19	23,054 19	25,434 19
61	19,7	93,87	2,22	1,71	1,98	1,7 5	28,020 06	29,740 06	23,270 06	25,650 06
62	19,1	127,7 7	2,05	1,74	1,99	1,7 1	28,283 81	30,080 06	23,533 81	25,990 06
63	15,2	425,8 7	1,92	1,73	1,99	1,7	27,676 09	29,396 09	22,926 09	25,306 09
64	13,8	277,8 7	1,87	1,72	1,99	1,7	28,258 35	29,978 35	23,508 35	25,888 35
65	16,8	287,4 7	1,96	1,82	1,99	1,7	28,460 71	31,180 71	23,710 71	27,090 71
66	23,2	210,8 7	2,12	1,54	1,98	1,7	28,530 22	30,250 22	23,780 22	26,160 22
67	16,3	255,6 7	2,18	1,53	1,95	1,7	29,069 23	30,789 23	24,319 23	26,699 23
68	15,3	22,75	2,01	1,52	1,97	1,7	27,586 44	29,506 44	22,836 44	25,416 44
69	23,2	39,09	1,97	1,84	1,99	1,6 3	28,420 06	30,340 06	23,670 06	26,250 06
70	45,4	19,56	1,84	1,72	1,99	1,6 5	28,658 35	31,578 35	23,908 35	27,488 35
71	51	84,2	2,1	1,46	1,99	1,6 6	28,585 63	30,505 63	23,835 63	26,415 63
72	55	180,0 7	2	1,63	2	1,6 2	28,017 61	30,086 09	23,267 61	25,996 09
73	27,4	223,7 1	1,95	1,65	1,98	1,6 4	28,076 09	30,009 99	23,326 09	25,919 99
74	38,7	128,6 4	1,82	1,67	1,99	1,6 9	28,204 19	30,124 19	23,454 19	26,034 19
75	20,4	180,7 9	1,45	1,64	1,98	1,6 8	27,469 87	29,389 87	22,719 87	25,299 87
76	19,9	34,19	1,94	1,66	1,98	1,6 1	28,855 63	30,775 63	24,105 63	26,685 63
77	17,8	137,0 3	1,99	1,78	1,94	2,1	29,061 26	30,981 26	24,311 26	26,891 26
78	34,2	154,7 4	1,78	1,77	2	1,6	29,683 77	31,603 77	24,933 77	27,513 77
79	44,7	196,2 6	1,83	1,63	2,12	1,7 2	29,644 25	32,564 25	24,894 25	28,474 25
80	17	217,5 5	1,89	1,84	2,09	1,6 9	29,739 23	32,659 23	24,989 23	28,569 23



## ANEXO 5 Artigo submetido a revista Genetics and Molecular Biology

Genetics and Molecular Biology



**The use of oral swabs in diagnosing  
Prader Willi syndrome: new  
biological sources for an old  
challenge**

Journal:	<i>Genetics and Molecular Biology</i>
Manuscript ID	GMB-2022-0356
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	23-Nov-2022
Complete List of Authors:	Fonseca, Letícia; Instituto Fernandes Figueira, Laboratório de Alta Complexidade ROCHA, DANIELLE; Instituto Fernandes Figueira, Pesquisa Clínica Azevedo, Hiago; Instituto Fernandes Figueira, Laboratório de AltaComplexidade Ribeiro Ferreira, Igor; Integrated Cardiovascular Clinical Network, Department of Health Canavarro, Fernanda; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Alta Complexidade Unidade de Pesquisa Clínica Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) Loureiro de Araújo, Luiza; Instituto Fernandes Figueira, Laboratório de Alta Complexidade Salú, Margarida; Instituto Fernandes Figueira, ; Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, Pediatria dos Santos Leite, Silvia Helena; Instituto Fernandes Figueira, academic Gomes, Leonardo; Instituto Fernandes Figueira, Unidade de Pesquisa Clínica Guida, Leticia; Instituto Fernandes Figueira, Pesquisa Clínica
Keyword:	Oral Swab, Prader-Willi Syndrome, Molecular diagnostics, imprinting disorder

<https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

**Title:** The use of oral swabs in diagnosing Prader Willi syndrome: new biological sources for an old challenge.

**Authors:** Letícia Lopes Cabral Guimarães da Fonseca<sup>1</sup> ‡, Danielle Nascimento Rocha<sup>1</sup> ‡, Hiago Azevedo Cintra<sup>1</sup>, Igor Ribeiro Ferreira<sup>2</sup>, Fernanda Rodrigues da Silva Von Sydow Canavarro<sup>1</sup>, Luiza Loureiro de Araújo<sup>1</sup>, Margarida dos Santos Salú<sup>1</sup>, Silvia Helena dos Santos Leite<sup>1</sup>, Leonardo Henrique Ferreira Gomes<sup>1</sup>, Letícia da Cunha Guida<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Alta Complexidade, Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Integrated Cardiovascular Clinical Network SA, Rural and Remote Support Services, Department of Health, Adelaide, South Australia, Australia.

‡ Authors contributing equally to this study

**\*Corresponding author**

Letícia da Cunha Guida, PhD

Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes

Figueira, Fiocruz. Avenida Rui Barbosa 716, Flamengo, Rio de Janeiro/RJ, Brazil

ZIP Code: 22250-020.

Telephone: +55 21 25541919

E-mail: [leticia@iff.fiocruz.br](mailto:leticia@iff.fiocruz.br)

ORCID: 0000-0003-3543-1532



## Abstract

Imprinting defects are often difficult to diagnose in neonates and young children based on clinical examination alone, and molecular analysis is required for a definitive diagnosis. The isolation of genetic material from oral swabs is essential as a DNA source for challenges associated with diagnosis, particularly for newborns, children, and patients living in settings where blood sample collection and submission is not feasible. Newborns have limited blood volumes and are often too fragile for invasive procedures. The material in the oral swab overcomes many obstacles associated with rare diseases. The present study was conducted to determine the quality and quantity of DNA extracted from oral swab samples with NaCl procedures and compare it with the extraction by the commercial kit and from this material to follow the MS-HRM analysis for the locus associated with Prader-Willi and Angelman syndromes. Here, we demonstrate that oral swab samples are an excellent source to reliably obtain an amount of DNA for performing MS-HRM. In addition, NaCl extraction allowed an economical, noninvasive and reliable method of obtaining DNA for genetic studies, including methylation, for molecular diagnosis, bringing benefits to patients who wait long until their characterization is performed, compromising treatment.

Keywords: Oral Swab; Prader-Willi Syndrome; Molecular diagnostics; imprinting disorder.

## **Introduction**

Prader-Willi syndrome (PWS) presents with hypotonia and failure to thrive in the neonatal period. Obesity usually starts after the onset of hyperphagia, often between 1 to 6 years. Individuals with PWS have mild to moderate mental retardation, small hands and feet, and almond-shaped eyes. Approximately 70% of individuals with PWS have a 15q11.2-q13 deletion on the paternal chromosome, and 25% have maternal uniparental disomy (UPD), or two copies of maternal chromosome 15, without paternal contribution. Less than 5% have an imprinting mutation. Less than 1% of patients have a structural chromosomal rearrangement involving 15q11.2-q13, which is detectable by chromosomal analysis (Cassidy, 1997; Mann and Bartolomei, 1999; Butler et al., 2019). Cases of deletion, UPD, and imprinting mutations are detectable by DNA methylation studies (Mann and Bartolomei, 1999; Butler et al., 2019).

Angelman syndrome (AS) is characterized by retardation with absent speech, microcephaly, laughter, seizures, and a stiff, ataxic gait. Approximately 70% of individuals with AS have a maternal chromosome 15q11.2-q13 deletion, 11% have a mutation in the UBE3A gene, approximately 7% of patients have a paternal UPD, and 3% have an imprint mutation. Both UPD and imprinting mutations are detectable by DNA methylation studies. Less than 1% of patients have a structural chromosomal rearrangement, which is detectable by chromosomal analysis. The molecular mechanism is unknown in approximately 10% of patients with AS (Mann and Bartolomei, 1999; Margolis et al., 2015; Butler et al., 2019).

The laboratory diagnosis of PWS and AS is complex and requires the combination of different molecular biology and cytogenetic techniques to identify the mechanism related to the development of the disease. Many imprinting defects lead to neurodevelopmental

disorders that generate overlapping clinical features. The reason for these overlapping phenotypes has yet to be clarified. One approach to studying methylation patterns is the bisulfite conversion of DNA, followed by analysis by PCR, qPCR, HRM, and sequencing. DNA quality is essential to identify carriers of imprinting defects for correct treatment and genetic counseling. Identifying these alterations in the DNA obtained from peripheral blood is a standard procedure. However, there are difficulties in collecting blood from children and sending samples from patients and family members who live in distant and difficult-to-access locations. Collecting material using oral cells is a good alternative for obtaining DNA (Lijnen and Willems, 2001). Some patients have limited blood volume and are often complex for invasive procedures, and parental consent is difficult to obtain, as in the case of neonates. Therefore, there is a great need to standardize new noninvasive biological sources used for diagnosis. Using an oral swab overcomes many obstacles associated with research on neonates and is a critical sample source to be explored. In the present study, we used the technique of DNA extraction in oral mucosa cells with NaCl (Abrão et al., 2005) to evaluate the quality of the DNA obtained to be used in subsequent conversion steps and MS-HRM as a model for the study of the region of the Printing Center of SPW and AS.

## **Methods**

### **Sample collection**

This study was approved by the Fernandes Figueira Institute IRB (CAAE:45767015.0.0000.5269). In this study, two oral swabs were collected from each of the 90 children born in the maternity ward of the National Institute Fernandes Figueira and ten individuals with suspected PWS. In addition to 200 oral swab samples, 10 Fresh peripheral blood samples were taken from patients with suspected PWS and used as

controls.

### **DNA extraction protocols.**

The procedure followed that described by Abrão *et al.*, 2005, oral cotton swabs were collected from 100 volunteers. Patients were instructed to rinse with 100 ml of distilled water, and the collection was performed by scraping the inner face of the cheeks with small sterile cytological brushes and making circular movements approximately 10-30 times. The brushes had the external portion of the stems cut and placed in microtubes. The oral samples were submitted to DNA extraction immediately or after refrigeration (4 – 6°C) for three days. Genomic DNA isolation from oral swabs was performed using two different protocols:

**The method with NaCl:** In the NaCl extraction, 200µl of TES (10mM Tris HCl pH 7.6; 1mM EDTA; 0.6% SDS) and 5µl of proteinase K (10mg/ml) were added to the tubes containing the swab and incubated for 2h at 42°C. After incubation, the brush was pressed against the wall of the tubes and removed. A final volume of approximately 250µl was obtained, to which 42µl of saturated NaCl (Abrão *et al.*, 2005) was added, shaking vigorously by hand. Centrifuge for 1 minute at 15,000 x g. The supernatant was transferred to a new tube, and two times the volume of absolute ethanol was added. The tubes were shaken and centrifuged for 1 minute at 15,000 x g. Absolute ethanol was discarded, and 1 ml of 70% ethanol was added, inverting the tubes several times to wash the pellet. The tubes were centrifuged for 1 minute at 15,000 x g, and the supernatant was discarded. Washing with 70% ethanol was repeated one more time, and after discarding the supernatant, the tubes remained open for 30 min to evaporate the residual ethanol, as described by Abrão e cols (6). The DNA was dissolved in 25 µl of 1X TE (10 mM Tris HCl; 0.1 mM EDTA).

### **Extraction with the Commercial Kit Qiagen-DBS**

DNA isolation was performed with the QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) following the manufacturer's protocol with AL buffer. The same DNA extraction method was performed with the peripheral blood from Prader-Willi, Angelman, and healthy control patients.

### **DNA quantification.**

DNA concentration and purity (260/280 and 260/230 ratios) were assessed by NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) from swabs and peripheral whole blood samples processed by each of the two extraction protocols.

### **DNA Integrity**

The integrity of genomic DNA was tested by resolving DNA extracts on a 0.8% agarose gel by electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), followed by visualization with ethidium bromide staining. Each DNA sample was graded according to the electrophoretic migration of sample DNA compared with a known molecular weight marker (( $\lambda$ DNA/Hind III fragments, Invitrogen).

### **Ribonuclease P (*RPP38*) amplification**

To ensure DNA integrity and to exclude the possibility of false negatives due to the presence of eventual inhibitors, the TaqMan *RPP38* Control Reagents kit (Catalog number 4316844, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used as a reference amplification control following the manufacturer's protocol. All reactions were performed in a MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate using the 7,500 Fast Real-Time PCR System Mix (Applied Biosystems).

### **Bisulfite treatment**

A total volume of 20  $\mu$ L [20 ng/ $\mu$ L] of DNA extracted from swabs and peripheral blood

was treated with an EZ-96 DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), following the manufacturer's protocol. Bisulfite-converted DNA was quantified by NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

### **Methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM)**

The MS-HRM was performed in triplicates with the bisulfite-treated DNA isolated from swabs or whole peripheral blood from each individual. It was performed in a MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate using the 7,500 Fast Real-Time PCR System Mix (Applied Biosystems) with the primers 5'- GGATTTTTGTATTGCGGTAAATAAG-3' and 5'-CAACTAACCTTACCCACT CCATC-3' (forward and reverse, respectively) as previously described by Ferreira et al. (2019 and 2020). The melting temperatures of 78 °C and 83 °C were chosen as a near-proportional amplification of unmethylated and methylated alleles, respectively. The primers used in this study will only be paired if the bisulfite conversion works well (supplementary material 1).

### **Statistical analysis.**

Each group analysis was done with the unpaired Student's t-test to detect differences. A two-sided P value;

## **RESULTS**

In the present study, we demonstrate a fast, reliable, and robust method to obtain ready-made genomic DNA from human oral swabs requiring very low sample volume with optimal concentration and purity for qPCR, MS-HRM, and PCR methylation analysis.

The quality and quantity of the DNA samples extracted from the oral swabs and a DNA sample are crucial for the analyzes that followed in this work. The values observed for the concentration parameters and 260/280 and 260/230 ratios were similar in samples extracted with a commercial kit in peripheral blood and oral swab samples. For this

reason, we will focus on comparisons of extractions, from the oral swab, with NaCl and the commercial kit; DNA concentration was higher with NaCl methodology (132.58ng +/- 89.68) compared to Qiagen (26.65ng +/- 15.11). However, the differences observed were insignificant due to the significant variation in the amounts of DNA obtained with the NaCl extraction method (Figure 1A and supplementary material 2). The analysis of the purity parameters (260/280 and 260/230) indicated lower values for NaCl in the commercial Kit (Figures 2B and 2C and supplementary material 2). Regarding the 260/280 wavelength ratio, the differences were  $1.90 \pm 0.15$  X  $1.69 \pm 0.11$ , the first being the values for the commercial kit and the second for extraction with NaCl. The same was not observed about the 260/230nm ratio, which showed a significant difference between the kit ( $1.99 \pm 0.033$ ) and extraction with NaCl ( $1.68 \pm 0.13$ ).

### **FIGURE 1**

The samples extracted with NaCl showed a slightly higher degradation pattern when compared to the samples extracted with the commercial kit (Figure 2). However, this degradation pattern does not seem to interfere with the PCR reaction.

### **FIGURE 2**

The next step was the amplification of target regions by the real-time PCR technique. At first, the region tested was the human P/MRP ribonuclease gene RPP38 subunit; all samples amplified regardless of the extraction protocol, with an average Ct of 23.86 ( $\pm 0.80$ ) in the samples extracted with the commercial kit and average Ct of 26.88 ( $\pm 1.51$ ) for the samples extracted with NaCl. This pair of primers for this region showed a

significant difference in the detection cycle (Ct) in comparing the two protocols (Figure 3 and supplementary material 2).

### FIGURE 3

The analysis of the amplification of the promoter region of exon 1 of the SNRPN-SNURF genes in the Imprinting Center (IC) region showed an average Ct of 28.61 (+/- 0.80) in the samples extracted with the commercial kit and an average Ct of 30.97 (+/- 1.51) for samples extracted with NaCl. It is important to emphasize that these differences, contrary to what was observed for the *RNAse P* gene, were not statistically significant (Figure 4 and Annex 2). An important point to emphasize is that with a lower degree of purity, the results regarding the diagnosis (no PWS X PWS) were in agreement (supplementary materials 02). The results were similar to the blood samples. In 12 patients, the DNA sequences extracted from peripheral blood and oral swab extracted with NaCl were amplified and presented the same result, demonstrating the applicability of the DNA obtained by this method (Figure 3).

### FIGURE 4

According to the objectives proposed by the study, the comparative analysis between the different sources of biological material, blood and oral swab, for the diagnosis of PWS began with the sample selection of patients with suspected PWS and subsequent collection, crossing the other steps described in the Material & Methods item.

The bisulfite conversion technique converted the unmethylated cytosines in the paternal allele into uracil, while the methylated cytosines in the maternal allele were not altered. The converted DNA was submitted to the MS-HRM technique to analyze the methylation



patterns of the paternal and maternal alleles of the *SNRPN-SNURF* gene. In addition, HRM was performed on 200 swab samples from the general population and ten individuals suspected of having PWS genetic syndromes. Of this total of 10 suspected individuals, six cases were confirmed for Prader-Willi syndrome due to the change in the methylation pattern, represented by the presence of a single peak related to the maternal allele dissociation temperature and the absence of the peak related to the paternal allele (Figure 4C). In addition to the six confirmed cases of PWS, the others were considered normal for PWS and AS due to the methylation pattern represented by the presence of two peaks related to the dissociation temperature, the first peak corresponding to the maternal allele (methylated) and the second to the paternal allele (unmethylated) (Figure 4A). Analyzing the Melting curve pattern made it possible to easily diagnose the samples extracted by the conventional kit and the NaCl method (Figure 5). The analysis of the normalized curves showed practically no difference in the profile in patients with standard methylation profiles (Figures 5B1, B2, and B3) and those with profiles compatible with PWS (Figures 5D1, D2, and D3). The derived curve showed a slight difference in the maternal allele in the Swab samples extracted with NaCl compared to the samples extracted with the commercial kit and with peripheral blood in individuals with standard methylation patterns (Figure 5A1, A2, and A3). However, in individuals with a methylation pattern consistent with PWS, the normalized curves present a similar behavior (Figure 5C1, C2, and C3).

## FIGURE 5

## Discussion

Determining the quality and quantity of a DNA sample is crucial for satisfactory subsequent analyzes, and in most molecular biology laboratories, it is usually performed by UV/VIS spectroscopy. Therefore, scanning the entire spectral range from 230 to 320nm is usually recommended for DNA analysis. In this range, the wavelengths of most significant interest are 260, 280, 230, and 320nm, respectively. DNA has maximum absorption at 260 nm. When measured in a 10 mm cell, the concentration of double-stranded DNA is approximately 50  $\mu\text{g/mL}$  per 1 absorption unit, using the mean extinction coefficient of  $0.020 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . When performing a reading at 260 nm, contaminants, which absorb at 260 nm, can lead to an error in estimating the DNA content. Therefore, a background correction usually is applied at 320 nm. The 260/280 absorption rate indicates protein contamination; when  $\geq 1.8$ , it indicates a pure DNA sample. The absorption rate 260/230, when lower than 1.8, indicates contamination probably caused by organic compounds and chaotropic agents (urea, thiourea, phenolic compounds, guanidine, ethanol, propanol, magnesium chloride, sodium dodecyl sulfate (SDS), which absorb at 230 nm. Our results showed a significant difference in the 260/230 nm ratio, a possible explanation for this fact is the presence, in residual concentrations, of SDS (detergent generally used in the cell lysis step), in the first step of the DNA extraction step, even in commercial kits or home methods (Mathieson and Thomas, 2013). The fact is that even with this change, we did not detect problems in the following steps real-time amplification, bisulfite conversion, and analysis of the dissociation curve.

Prader-Willi syndrome is a complex genetic disease developed from abnormalities in the 15q11-q13 region of the paternal allele of chromosome 15. The diagnosis of PWS only

through clinical phenotypes is challenging to detect due to the overlap of phenotypes with other genetic diseases, such as Schaaf-Yang Syndrome (SYS) and other spectra of the Prader-Willi-Like (PWLS) clinical picture. Some phenotypic overlaps between PWS, SYS, and PWLS include neonatal hypotonia, feeding difficulties, weight gain, intellectual developmental delay, and obesity (Berends et al., 1999; Schaaf et al., 2013; Ângulo et al., 2015; Cheon, 2016). The laboratory characterization of PWS through molecular techniques (MS-HRM, MS-MLPA, and Microsatellite Analysis) and molecular cytogenetics (FISH) distinguishes it from other genetic syndromes in addition to elucidating the genetic mechanism that causes the syndrome (Smith and Hung, 2017). Although the molecular analyzes commonly used offer an accurate diagnosis, the need to perform several techniques makes the entire diagnostic process too laborious, time-consuming, and expensive.

The analysis of the methylation pattern of exon 1 of the SNURF-SNRPN gene by the MS-HRM technique detects 99% of PWS cases. The methodology can detect changes due to deletion, Imprinting Center defect, and Uniparental disomy, although it cannot distinguish between the genetic mechanisms causing the syndrome, negatively impacting the efficiency of genetic counseling (Noordam et al., 2021). The MS-HRM technique becomes an excellent screening method as it requires few steps, low cost, and has a straightforward interpretation of results.

One factor must be considered is that rapid and accurate diagnosis is directly related to an efficient drug intervention. For example, some research groups (Angulo et al., 2007, Takeda et al., 2010 and Wolfgram et al., 2013) demonstrated that the administration of Growth Hormone (GH) in PWS patients offers several benefits. Treatment with GH is related to body composition due to regulating fat and lean mass, normalizing muscle tone,

correcting metabolic dysfunctions, and correcting irregular cognitive development related to PWS. However, preeminent effects of GH treatment are commonly seen with a drug intervention in the first few years of life (recommended age to start GH administration: 4-6 months of age). Therefore, the laboratory analysis process requires more time for a complete and accurate diagnosis and a specialized technical team to prepare and interpret the results, which may compromise the benefits of GH treatment (Grugni and Marzullo, 2016). Our results can be extrapolated to the diagnosis of patients with rare diseases. This process is still challenging since some factors directly impact this process:

- A) overlapping phenotypes: this situation makes clinical assessment and differential diagnosis at birth difficult (Sparks and Escobar, 2011);
- B) Analyze the risk of recurrence: in the case of PWS and AS, if a deletion occurs in the CI, the risk of recurrence goes to 50% (Dulka et al., 2013);
- C) Make the test less invasive and painful: in some cases, it is difficult to obtain blood or other tissue from the patient, and the family is not always available;
- D) Evaluate the cost of the exam in the public health system.

Changes in the methylation profile allow the emergence of different cell types through a pleiotropic effect on the genome (Messerschmidt *et al.*, 2014). This process occurs during embryonic development and throughout the life of a healthy individual and is associated with the emergence of diseases such as various types of cancer, Parkinson's disease, and autoimmune diseases. The study of these modifications can be used as biomarkers for the prognosis associated with critical phenotypes (Messerschmidt et al., 2014; Miranda-Morales et al., 2017). DNA extraction is the initial step of methylation analysis, and the quality of the material obtained impacts the conversion steps and MS-PCR, MS-HRM, and sequencing. Whole blood is the most widely used means of obtaining DNA; currently,

several commercial kits allow obtaining good quality DNA. The use of commercial kits presents low toxicity when compared to the use of homemade methods with phenol-chloroform. Some patient groups have difficulty obtaining whole blood. Collecting cells from an oral swab makes it easier to obtain and forward the sample, especially for newborns, children, and patients living where collecting and sending the blood sample is expensive. Extraction with a commercial kit compared to extraction with NaCl showed a lower yield but greater purity and integrity of the extracted DNA. However, it was possible to carry out the conversion steps, MS-HRM, indicating that it is a way of obtaining DNA for molecular analysis. The next step is analyzing this material as a template for Next Generation sequencing.

### **Conclusion**

Based on clinical examination alone, patients with imprinting defects are often difficult to diagnose in neonates and young children, and molecular analysis is required for a definitive diagnosis. The performance of a molecular test that allows rapid and accurate diagnosis is of vital importance for a better prognosis for patients with rare diseases associated with imprinting defects. The successful sample collection and the extraction of genomic DNA from buccal swabs are noninvasive and reliable alternatives to prickly invasive blood sampling for subjects and sample collectors. In addition, we have demonstrated a simple method of sample collection and DNA extraction, which is cost-effective, easy, and rapid, providing a sufficient quantity and quality of DNA for MS-HRM, qPCR, and DNA Sequencing. Comparing the extraction procedures shows that the simple NaCl extraction method is the most suitable for DNA extraction from a buccal cotton swab sample.

### **Acknowledgments**

This work was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)” and was financed in part by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”; by Programa Inova Fiocruz (Geração de Conhecimento - 2021); Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ (Jovem Cientista – 2022) and Rede de Laboratórios de Referência- FIOCRUZ. All the experiments were developed in the technological platform “P04-13- Real-Time PCR – IFF”, belonging to the FIOCRUZ Network of Technical Platforms.

### **Conflict of Interest**

All authors declare that they have no competing interests.

### **Author Contributions**

LCG and LHFG conceived and designed the study; LLCGF, DNR, HAC, FRSVSC, LLA, MSS, and SHSL conducted the experiments; LCG, LHFG, IRF, DNR, LLCGF analyzed the data; LCG, LHFG, DNR, LLCGF wrote the manuscript, and all authors read and approved the final version.

## References

- Abrão MG, Bbillerbeck AEC, Nishi MY, Marui S, Mendonça BB. (2005). Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação em estudo do gene PROP1. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 49(6): 978–982. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302005000600019>
- Angulo MA, Butler MG, Canaletto ME. (2015). Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest* 38, 1249–1263. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0312-9>
- Berends MJ, Hordijk R, Scheffer H, Oosterwijk JC, Halley DJ, Sorgedragger N. (1999). Two cases of maternal uniparental disomy 14 with a phenotype overlapping with the Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet.* 84(1):76-9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-628\(19990507\)84:1%3C76::aidajmg16%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-628(19990507)84:1%3C76::aidajmg16%3E3.0.co;2-f)
- Butler MG, Miller JL, Forster JL. (2019). Prader-Willi Syndrome - Clinical Genetics, Diagnosis and Treatment Approaches: An Update. *Curr Pediatr Rev.* 15(4):207-244. doi:10.2174/1573396315666190716120925.
- Cassidy SB. (1997). Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 34:917–923. Cheon CK. (2016). Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 21(3):126-135. <https://doi.org/10.6065/apem.2016.21.3.126>
- Dulka S, Choudhary AK, Methratta S, Fortuna K. (2013). Blount disease in a case of Prader-Willi syndrome: Why is it not as prevalent as in obesity without Prader-Willi syndrome? *World Journal of Pediatrics,* 9(2), 182–184. [10.1007/s12519-011-0315-3](https://doi.org/10.1007/s12519-011-0315-3)
- Grugni G, Marzullo P. (2016). Diagnosis and treatment of GH deficiency in Prader-Willi syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 30(6): 785-794. doi:10.1016/j.beem.2016.11.003. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27974191.
- Lijnen I, Willems G. (2001). DNA research in forensic dentistry. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 23(9):511-7.
- Mann MR, Bartolomei MS. (1999). Towards a molecular understanding of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Human Molecular Genetics* 8:1867–1873.
- Margolis SS, Sell GL, Zbinden MA, Bird LM. Angelman Syndrome. *Neurotherapeutics.* 2015 Jul;12(3):641-50. doi: 10.1007/s13311-015-0361-y.
- Mathieson W, Thomas GA. (2013). Simultaneously extracting DNA, RNA, and protein

using kits: is sample quantity or quality prejudiced? *Anal Biochem.* 1;433(1):10-8. doi:10.1016/j.ab.2012.10.006

Miranda-Morales E, Meier K, Sandoval-Carrillo A, Salas-Pacheco J, Vázquez-Cárdenas P, Arias-Carrión O. (2017). Implications of DNA Methylation in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci.* 18;10:225. doi: 10.3389/fnmol.2017.00225. PMID: 28769760; PMCID:PMC551395

Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 15;28(8):812-28. doi: 10.1101/gad.234294.113. PMID: 24736841; PMCID: PMC4003274.69).

Noordam C, Höybye C, Eiholzer U. (2021). Prader-Willi Syndrome and Hypogonadism: A Review Article. *Int J Mol Sci.* 8;22(5):2705. doi: 10.3390/ijms22052705.

Ribeiro IF, Costa RA, Gomes LHF, Cunha WDS, Tysler LS, Freitas S, EF, Llerena Junior JC, Vasconcelos ZFM, Nicholls RD, Guida LC. (2020). A newborn screening pilot study using methylation-sensitive high resolution melting on dried blood spots to detect Prader-Willi and Angelman syndromes. *Scientific reports v. 10, p. 13026-9, 2020.*

Ribeiro IF, Cunha WDS, Gomes LHF, Cintra HA, Fonseca LLCG, Bastos EF, Llerena Junior JC, Vasconcelos ZFM, Guida LC. (2019). A rapid and accurate methylation-sensitive high-resolution melting analysis assay for the diagnosis of Prader willi and Angelman patients. *Molecular genetics & genomic medicine, v. 7, p. E637, 2019.*

Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Gripp KW, Zhang B, Peters BA, McElwain MA, Drmanac R, Beaudet AL, Caskey CT, Yang Y. (2013). Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet.* 45(11):1405-8. <https://doi.org/10.1038/ng.2776>

Smith, A., & Hung, D. (2017). The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome. *Translational Pediatrics, 5(1), 46– 56.* <https://doi.org/10.21037/tp.2016.07.04>  
Sparks SE, Escolar DM. Congenital muscular dystrophies. *Handb Clin Neurol.*2011;101:47-79. doi: 10.1016/B978-0-08-045031-5.00004-9. PMID: 21496624.

## Figure Legends

**Figure 1.** Comparison between DNA extraction methods (commercial kit and NaCl) from oral swabs. In A: mean Kit DNA Concentration (Qiagen) and NaCl. B and C: Purity parameters for 260/230 and 260/280 respectively

**Figure 2.** Electrophoresis in 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5µg/ml), of genomic DNAs extracted with different methods. In A: Molecular weight marker (λDNA/Hind III fragments, Invitrogen), B: DNA extracted from oral swab by NaCl, C:



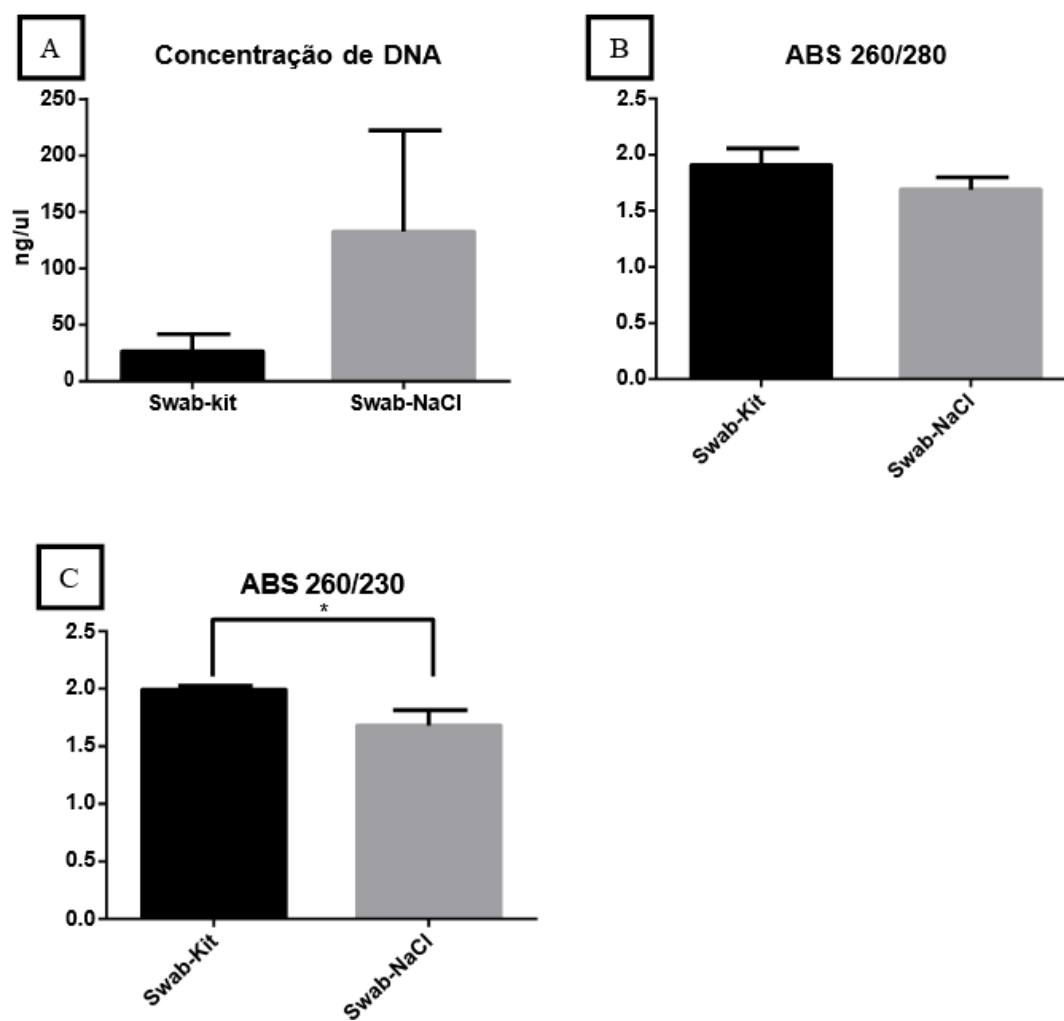
DNA extracted from peripheral blood with the commercial kit; D: DNA extracted from oral swab with a commercial kit. The molecular mass marker ( $\lambda$ DNA/Hind III fragments, Invitrogen) is expressed in bp.

**Figure 3.** Amplification curves of the RNase P gene with the DNAs extracted by the two methods. In A, the amplification curve with the material extracted with the Commercial Kit. In B, the amplification curve with the material extracted with NaCl; In C, graphs of comparison between the means of amplification Ct for the RNase P gene compared to DNA extraction methods.

**Figure 4.** Amplification curves of the exon 1 promoter region gene of the SNRPN-SNURF genes in the Imprinting Center (IC) region with the DNAs extracted by the two methods. In A, the amplification curve with the material extracted with the Commercial Kit. In B, the amplification curve with the material extracted with NaCl; In C, graphs of comparison between the means of amplification Ct for the SNRPN-SNURF gene compared to DNA extraction methods.

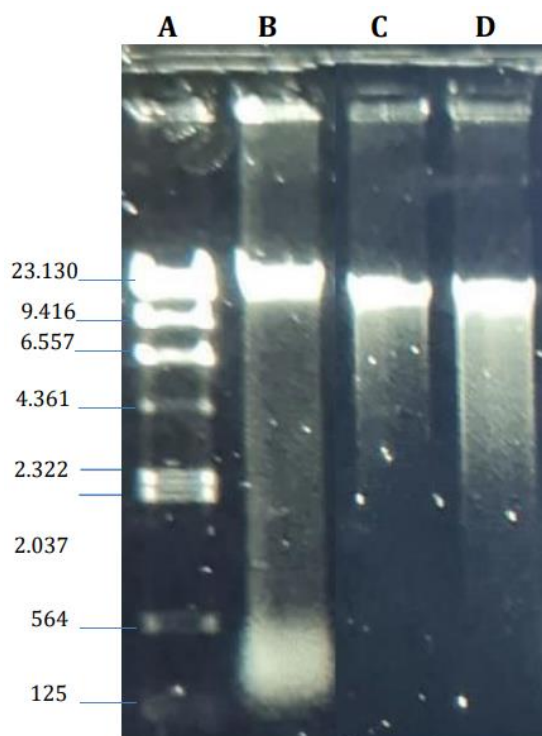
**Figure 5.** Methylation pattern analyzed by MS-HRM. The dissociation curves show the methylation peak for each allele. Normal patients, in the dissociation-derived curves (A1, A2, and A3) present two peaks corresponding to unmethylated paternal alleles and methylated maternal alleles, A1 is the result of the technique performed using the kit from peripheral blood, A2 with the use of the kit from oral swab and A3 performed by NaCl from an oral swab. The graphs of the normalized curves, the normal patients present fluorescence corresponding to the paternal and maternal alleles, and two sharp drops (B1, B2, and B3). The absence of the paternal allele was detected due to the presence of a single peak in the derived curve (C1, C2, C3) and a single drop in the derived curve (D1, D2, and D3), confirming the diagnosis of Prader- Willi; The analyzes seen in C1 and D1

were performed from peripheral blood, C2 and D2 using the kit from oral swab and C3 and D3 by NaCl from an oral swab. The methylation temperature detected for the unmethylated paternal allele was close to 78.8°C in all cases and for the methylated maternal allele, it was around 83.3°C in all cases.

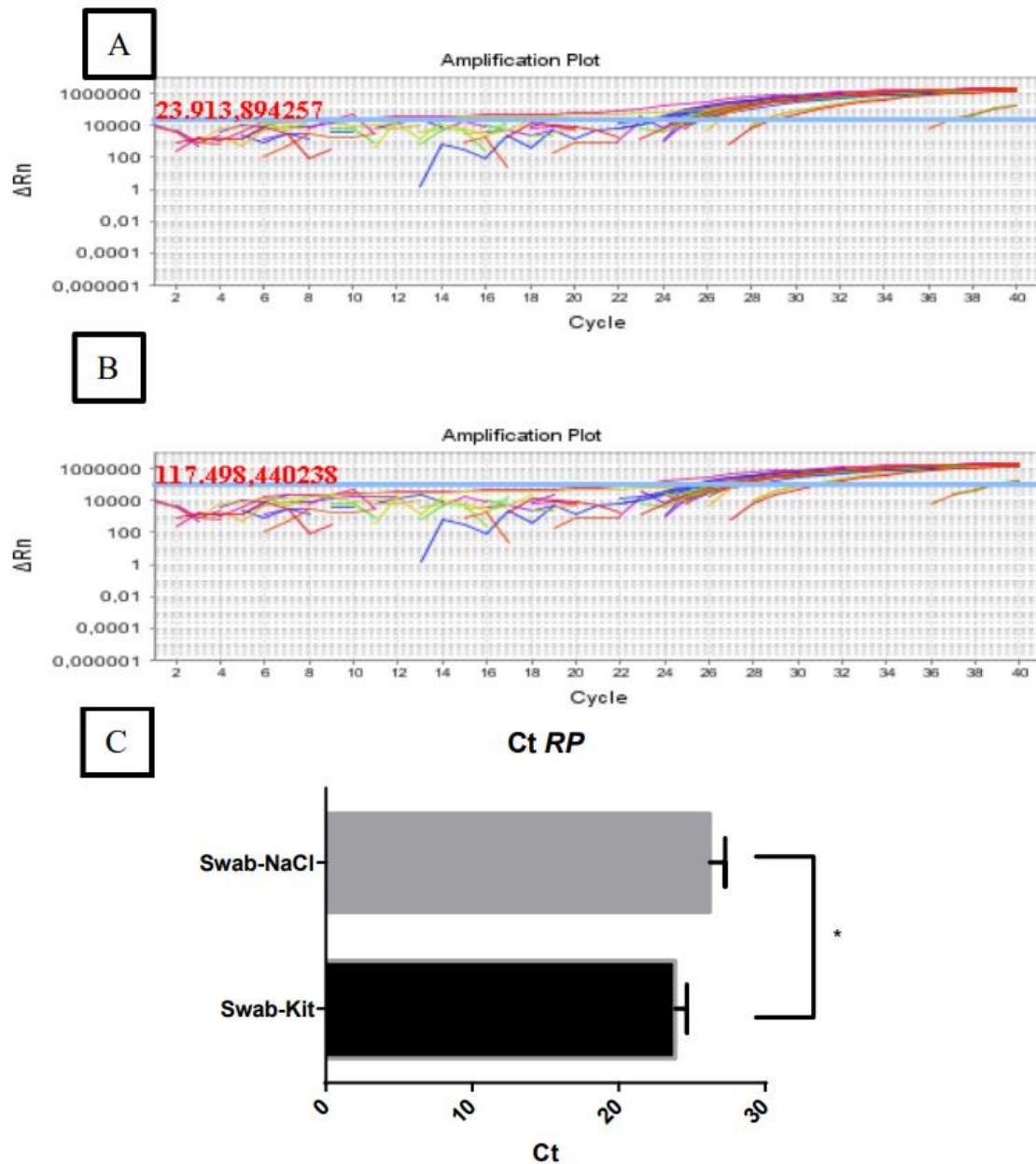


**Figure 1.** Comparison between DNA extraction methods (commercial kit and NaCl) from oral swabs. In A: mean Kit DNA Concentration (Qiagen) and NaCl. B and C:

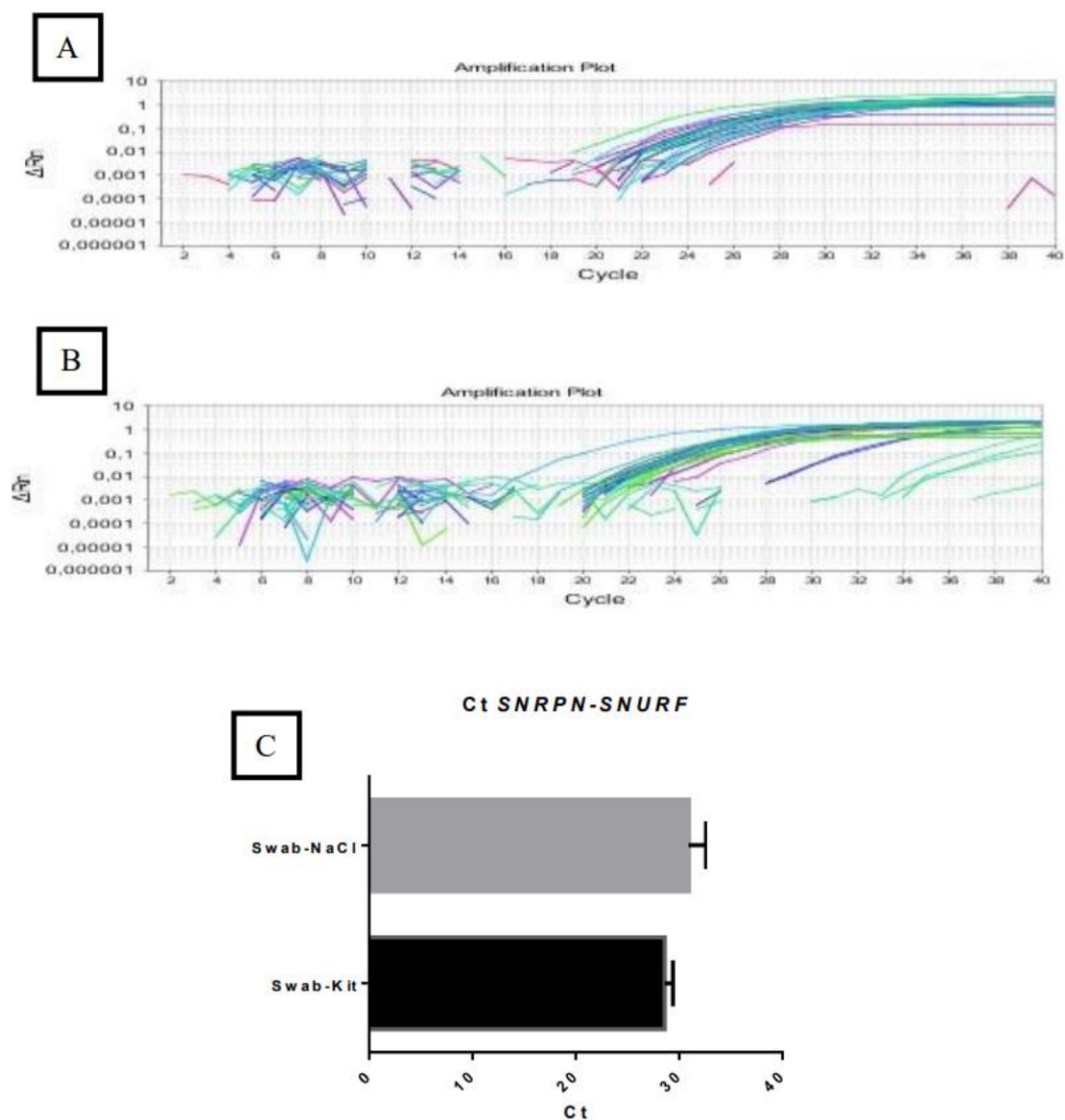
Purity parameters for 260/230 and 260/280 respectively



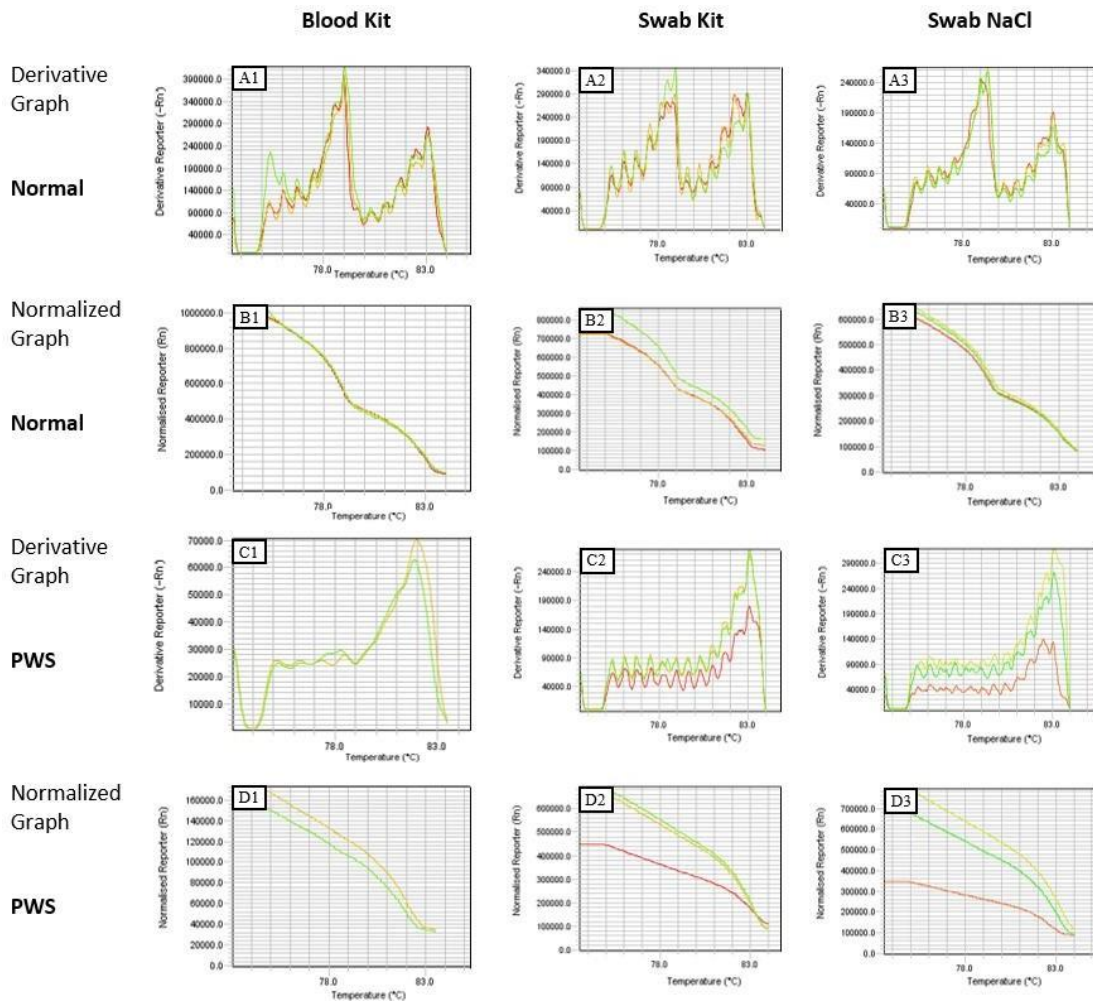
**Figure 2.** Electrophoresis in 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 $\mu$ g/ml), of genomic DNAs extracted with different methods. In A: Molecular weight marker ( $\lambda$ DNA/Hind III fragments, Invitrogen), B: DNA extracted from oral swab by NaCl, C: DNA extracted from peripheral blood with the commercial kit; D: DNA extracted from oral swab with a commercial kit. The molecular mass marker ( $\lambda$ DNA/Hind III fragments, Invitrogen) is expressed in bp.



**Figure 3.** Amplification curves of the RNase P gene with the DNAs extracted by the two methods. In A, the amplification curve with the material extracted with the Commercial Kit. In B, the amplification curve with the material extracted with NaCl; In C, graphs of comparison between the means of amplification Ct for the RNase P gene compared to DNA extraction methods.



**Figure 4.** Amplification curves of the exon 1 promoter region gene of the SNRPN-SNURF genes in the Imprinting Center (IC) region with the DNAs extracted by the two methods. In A, the amplification curve with the material extracted with the Commercial Kit. In B, the amplification curve with the material extracted with NaCl; In C, graphs of comparison between the means of amplification Ct for the SNRPN-SNURF gene compared to DNA extraction methods.



**Figure 5.** Methylation pattern analyzed by MS-HRM. The dissociation curves show the methylation peak for each allele. Normal patients, in the dissociation-derived curves (A1, A2, and A3) present two peaks corresponding to unmethylated paternal alleles and methylated maternal alleles, A1 is the result of the technique performed using the kit from peripheral blood, A2 with the use of the kit from oral swab and A3 performed by NaCl from an oral swab. The graphs of the normalized curves, the normal patients present fluorescence corresponding to the paternal and maternal alleles, and two sharp drops (B1, B2, and B3). The absence of the paternal allele was detected due to the presence of a single peak in the derived curve (C1, C2, C3) and a single drop in the derived curve (D1,

D2, and D3), confirming the diagnosis of Prader- Willi; The analyzes seen in C1 and D1 were performed from peripheral blood, C2 and D2 using the kit from oral swab and C3 and D3 by NaCl from an oral swab. The methylation temperature detected for the unmethylated paternal allele was close to 78.8°C in all cases and for the methylated maternal allele, it was around 83.3°C in all cases.

**Table S1:** DNA concentration data, 260/280 and 260/230 absorbance ratios, and CT values frQiagen DNA concentration data, 260/280 and 260/230 absorbance ratios, and CT values from RNASE P and SNRPN-SNURF genes amplifications.

Patients	[DNA]		ABS 260/280		ABS 260/230		CT <i>SNRPN-SNURF</i>		CT <i>RNASEP</i>	
	Qiagen	NaCl	Qiagen	NaCl	Qiagen	NaCl	Qiagen	NaCl	Qiagen	NaCl
1	12,1	314,4	1,74	1,64	1,95	1,8	29,18205	31,25205	24,43	27,16205
2	24,9	287,3	1,95	1,64	1,99	1,7	29,26	31,62	24,51	27,53
3	16,6	213,2	1,56	1,73	2	2,2	29,4582	31,25205	24,71	27,16205
4	20,2	207,2	1,69	1,74	2,1	1,7	29,23467	30,95671	24,48	26,86671
5	15	174,4	1,84	1,75	2	2,1	29,24671	31,30467	24,5	27,21467
6	13,1	237,4	1,72	1,84	2	1,6	29,34671	30,30467	24,6	26,21
7	23	232,5	1,89	1,67	2	2,5	27,54429	29,61429	22,79	25,52
8	25,6	223,1	1,85	1,69	1,97	1,69	27,44289	29,35	22,69	25,26
9	26,6	202,7	1,95	1,6	1,99	1,64	27,14429	28,61429	22,39	24,52
10	24,6	234,8	1,82	1,69	1,98	1,85	27,68779	29,25779	22,94	25,17
11	10,6	252,07	1,72	1,64	2,01	1,61	27,18779	29,08776	22,44	25
12	19	19,15	1,44	1,64	2	1,6	27,87786	29,75779	23,13	25,67
13	30,7	35,49	1,82	1,77	2	1,6	27,94402	28,9644	23,19	24,87
14	17,4	15,96	1,84	1,74	2,03	1,63	27,3944	28,6494	22,64	24,56
15	17,2	80,6	1,94	1,73	2,01	1,69	27,5944	29,95632	22,8444	25,87
16	45	176,47	2,02	1,83	1,99	1,61	29,25563	32,97609	24,50563	28,89
17	18	220,11	1,75	1,67	1,98	1,64	29,61256	33,50586	24,86256	29,42
18	12	125,04	1,73	1,69	1,99	1,85	30,08377	33,51687	25,33377	29,43
19	40,2	177,19	1,93	1,61	1,99	1,68	30,04425	34,54925	25,29425	30,46
20	26,5	30,59	1,92	1,69	1,97	1,67	30,13923	35,83009	25,38923	31,74
21	27,3	133,43	1,8	1,74	1,99	1,69	30,75756	35,92466	26,00756	31,83
22	27,1	151,14	1,92	1,78	1,92	1,5	28,13987	33,24836	23,38987	29,16
23	16,8	192,66	1,84	1,44	1,94	1,59	29,85644	33,38955	25,10644	29,3
24	16,9	213,95	2,05	1,58	1,98	1,56	29,90956	33,41968	25,15956	29,33
25	16,1	156,1	2,03	1,45	1,97	1,58	28,87419	32,86865	24,12419	28,78
26	17,8	29,78	1,84	1,54	1,97	1,57	29,09006	32,87124	24,34006	28,78
27	16	8,24	2,05	1,57	1,99	1,61	29,35381	33,01922	24,60381	28,93
28	16	3,82	1,85	1,62	1,96	1,62	28,74609	33,51763	23,99609	29,43
29	40,5	34,91	1,9	1,45	1,95	1,65	29,32835	33,76423	24,57835	29,67
30	16,6	138,64	2,1	1,47	1,97	1,67	29,53071	33,96737	24,78071	29,87737
31	39,1	51,44	1,98	1,87	1,99	1,69	30,02756	32,45756	25,27756	28,36756
32	13,3	71,85	1,9	1,77	1,99	1,8	27,40987	29,12987	22,85987	25,03987
33	13,9	32	2,02	1,55	1,98	1,8	27,52644	29,24644	22,77644	25,15644
34	18,2	164,83	1,69	1,66	1,99	1,6	29,17956	30,89956	24,42956	26,80956

35	16,2	86,57	1,79	1,88	1,97	2,1	28,14419	29,86419	23,39419	25,77419
36	18,2	14,62	2,2	1,87	1,99	1,69	28,36006	30,08006	23,61006	25,99006
37	8,8	72,92	2,17	1,85	1,98	1,61	28,62381	30,34381	23,87381	26,25381
38	10,1	95,1	2,04	1,75	2,01	1,64	28,01609	29,73609	23,26609	25,64609
39	20,9	47,87	1,91	1,84	2	1,66	28,59835	30,31835	23,84835	26,22835
40	24,6	199,42	2,03	1,67	1,99	1,63	28,80071	30,52071	24,05071	26,43071
41	16,7	62,78	2,02	1,69	1,99	1,65	28,87022	30,59022	24,12022	26,50022
42	15,9	23,61	2,01	1,6	1,94	1,66	29,40923	31,12923	24,65923	27,03923
43	26,8	32,78	1,95	1,69	1,99	1,68	27,52644	29,24644	22,77644	25,15644
44	14,3	113,89	1,88	1,64	1,98	1,64	28,36006	30,08006	23,61006	25,99006
45	11,7	97,69	1,91	1,64	1,99	1,64	28,59835	30,31835	23,84835	26,22835
46	10,1	47,27	2,21	1,77	2,01	1,61	28,52563	30,24563	23,77563	26,15563
47	15,7	290,07	1,97	1,74	2	1,61	28,01609	29,73609	23,26609	25,64609
48	12,7	265,07	1,82	1,73	1,97	1,62	28,01609	29,73609	23,26609	25,64609
49	35,9	191,77	2,12	1,74	1,97	1,63	28,14419	29,86419	23,39419	25,77419
50	29,6	178,07	2,02	1,87	1,95	1,65	27,40987	29,12987	22,65987	25,03987
51	43,4	148,36	1,85	1,77	1,96	1,66	28,18563	29,90563	23,43563	25,81563
52	58,2	212,09	1,9	1,55	1,99	1,62	28,39126	30,11126	23,64126	26,02126
53	55,3	207,59	2	1,66	2,02	1,62	29,01377	30,73377	24,26377	26,64377
54	49,2	203,39	2	1,88	2,08	1,68	28,97425	30,69425	24,22425	26,60425
55	60,3	197,69	2	1,87	2,01	1,61	29,06923	30,78923	24,31923	26,69923
56	40,3	211,31	2,01	1,85	2	1,6	29,68756	31,40756	24,93756	27,31756
57	41	182,67	2	1,75	2	1,6	27,06987	29,78987	22,31987	25,69987
58	44,5	140,67	1,99	1,84	2,01	1,66	27,18644	28,90644	22,43644	24,81644
59	25,1	198,27	1,96	1,67	1,99	1,79	28,83956	31,15956	24,08956	27,06956
60	20,1	199,17	1,91	1,7	1,98	1,71	27,80419	29,52419	23,05419	25,43419
61	19,7	93,87	2,22	1,71	1,98	1,75	28,02006	29,74006	23,27006	25,65006
62	19,1	127,77	2,05	1,74	1,99	1,71	28,28381	30,08006	23,53381	25,99006
63	15,2	425,87	1,92	1,73	1,99	1,7	27,67609	29,39609	22,92609	25,30609
64	13,8	277,87	1,87	1,72	1,99	1,7	28,25835	29,97835	23,50835	25,88835
65	16,8	287,47	1,96	1,82	1,99	1,7	28,46071	31,18071	23,71071	27,09071
66	23,2	210,87	2,12	1,54	1,98	1,7	28,53022	30,25022	23,78022	26,16022
67	16,3	255,67	2,18	1,53	1,95	1,7	29,06923	30,78923	24,31923	26,69923
68	15,3	22,75	2,01	1,52	1,97	1,7	27,58644	29,50644	22,83644	25,41644
69	23,2	39,09	1,97	1,84	1,99	1,63	28,42006	30,34006	23,67006	26,25006
70	45,4	19,56	1,84	1,72	1,99	1,65	28,65835	31,57835	23,90835	27,48835
71	51	84,2	2,1	1,46	1,99	1,66	28,58563	30,50563	23,83563	26,41563
72	55	180,07	2	1,63	2	1,62	28,01761	30,08609	23,26761	25,99609
73	27,4	223,71	1,95	1,65	1,98	1,64	28,07609	30,00999	23,32609	25,91999
74	38,7	128,64	1,82	1,67	1,99	1,69	28,20419	30,12419	23,45419	26,03419
75	20,4	180,79	1,45	1,64	1,98	1,68	27,46987	29,38987	22,71987	25,29987
76	19,9	34,19	1,94	1,66	1,98	1,61	28,85563	30,77563	24,10563	26,68563
77	17,8	137,03	1,99	1,78	1,94	2,1	29,06126	30,98126	24,31126	26,89126
78	34,2	154,74	1,78	1,77	2	1,6	29,68377	31,60377	24,93377	27,51377
79	44,7	196,26	1,83	1,63	2,12	1,72	29,64425	32,56425	24,89425	28,47425
80	17	217,55	1,89	1,84	2,09	1,69	29,73923	32,65923	24,98923	28,56923
81	56,5	159,7	1,89	1,6	2,11	1,71	28,35756	32,27756	23,60756	28,18756
82	66	33,38	1,52	1,61	2,11	1,71	27,73987	30,65987	22,98987	26,56987
83	73,3	11,84	1,84	1,58	2,01	1,61	27,85644	30,77644	23,10644	26,68644
84	56,2	7,42	1,73	1,55	2	1,6	29,50956	31,42956	24,75956	27,33956
85	19,4	38,51	1,87	1,76	2	1,6	28,47419	30,39419	23,72419	26,30419





## REVIEW

# Relationship of genotypic and phenotypic aspects between Prader-Willi Syndrome and Prader-Willi-Like Syndrome

Letícia Lopes Cabral Guimarães da Fonseca, Hiaqo Azevedo Cintra, Danielle Nascimento Rocha, Fernanda Rodrigues da Silva Von Sydow Canavarro, Luiza Loureiro de Araújo, Leonardo Henrique Ferreira Gomes, Letícia da Cunha Guida\*.

\*Correspondence:  
[leticia\\_guida@iff.fiocruz.br](mailto:leticia_guida@iff.fiocruz.br) \*Laboratório de Alta Complexidade, Unidade de Pesquisa Clínica, Instituto Fernandes Figueira / Fiocruz, RJ, Brazil.  
 A full list of author information is available at the end of the article

## Abstract

**Background:** Prader-Willi-Like syndrome (PWLS) is a rare genetic disorder with clinical features that include hypotonia, obesity, short extremities, and developmental delay. As its name suggests, the clinical presentation of PWLS shares phenotypic features with the genetic imprinting disorder of Prader-Willi Syndrome (PWS). The sharing of phenotypes between these syndromes likely indicates that the genomic regions affected in PWLS that these genes are involved in are involved in the same genetic pathway related to the development of the PWS phenotype. Thus, the genetic heterogeneity of PWLS and the absence of a molecular diagnosis associated with PWS constitute a clinical challenge for health professionals.

**Results:** This review presents phenotypic and genotypic characteristics related to

## CONTENT

Prader Willi-Like syndrome (PWLS) is a rare disorder whose clinical features include hypotonia, obesity, short extremities, and developmental delay (1). As its name suggests, the clinical presentation of PWLS shares features with Prader-Willi Syndrome (PWS), and different genetic mechanisms cause this overlap of phenotypes. The clinical overlap between the two syndromes makes accurate diagnosis difficult, and correct diagnosis can aid in proper management but also provide conclusive genetic explanation and accurate genetic counseling.

The mechanisms leading to the presentation of PWLS are still unclear. However, it is believed to be caused by various disruptions in genetic pathways within and outside the genetic region implicated in PWS. For example, PWLS does not demonstrate mutations in the 15q11-q13 region (2). Some cases were reported in which patients presented the

phenotype described as PWS but without alteration in the specific region. For example, an investigation of these patients showed changes involving the 1p, 2p, 3p, 6q, and 9q regions, Temple Syndrome, Fragile X Syndrome, and Schaaf-Yang Syndrome (1, 2, 3, 4).

This work aims to demonstrate the most frequent phenotypic characteristics associated with the different genotypes related to PWLS to facilitate the diagnostic process.

### **Main Text**

This article is a literature review of case reports of individuals who had the phenotype related to Prader-Willi-Like Syndrome, intending to obtain a descriptive panel, relating genotypes and phenotypes and observing the frequency of phenotypic characteristics.

The search was carried out in April 2022, using the search platform "National Center for Biotechnology Information" (www.pubmed.com), with the search engine ("Prader-Willi-Like"[All Fields] AND ("syndrome "[All Fields] OR "syndromal"[All Fields] OR "syndromal"[All Fields] OR "syndrome"[MeSH Terms] OR "syndrome"[All Fields] OR "syndromes"[All Fields] OR "syndrome s" [All Fields] OR "syndromic"[All Fields] OR "syndrome"[All Fields])). The terms were combined using "OR" and "AND" logic. Forty-nine articles were found, with no duplications. As inclusion criteria, articles were considered with individual case descriptions, regardless of the publication date, excluding bibliographic reviews, protocols, letters, and editorials (Figure 1).

The 34 articles that met the criteria were included in the review: age, gender, genotype, and clinical characteristics.

### **FIGURE 1**

The survey of the clinical profile of the patients was carried out based on supplementary material 1, which used the methodology described by McCandless SE; Committee on Genetics 2011 (5). Supplementary material 2 of the supplementary material presents the list of phenotypic characteristics not described as Prader-Willi Syndrome and the frequency of patients.

### **RESULTS**

We found 49 articles related to Prader-Willi-Like Syndrome, with 34 articles from the United States: 9, France: 4, Holland: 4, Italy: 4, Brazil: 3, Japan: 2, Belgium: 1, Canada: 1, China: 1, Colombia: 1, Spain: 1, Estonia: 1, Sweden: 1, Tunisia: 1, met the inclusion criteria. Within the analyzed articles, 74 patients were reported, 45 males and 29 females (Table 1).

### **TABLE 1**

The age group of 5 infants, 7 preschoolers, 27 schoolchildren, 22 adolescents, 11 young adults, and two adults, taking into account the date of the last day of follow-up until the publication of the articles (Figure 2), among which they presented the following genetic causes:

### **FIGURE 2**

#### **Chromosome 1p Deletion**

There were nine patients described with 1p deletion, which was reported as follows: Tsuyusaki et al (6). and Stage et al (7). 2 cases each, which involved the D1Z2 gene; Oiglane-Shlik et al.(8) 4 cases with a deletion in the KLHL17, PEX10 and GABRD genes; D'Angelo et al.(9) 1 case with a deletion close to the PEX10 gene;

Phenotypic characteristics related to PWS were: Global developmental delay- 7, short stature- 2, small-appearing mouth/thin upper lip- 3, weak or high-pitched cry in infancy- 1, clinodactyly- 3, seizures- 3, diabetes mellitus (type 2)- 2, learning disability- 2, behavioral disorders- 4, scoliosis- 1, strabismus- 5, palpebral fissures- 2, hyperphagia- 6, hyperinsulinemia- 2, hypopigmentation- 2, hypotonia- 9, little hands with straight ulnar border- 1, small hands- 2, myopia- 2, obesity- 4, small feet- 3, speech-articulation problems- 6, weak neonatal sucking and swallowing reflexes- 3, gastroesophageal reflux- 1, excessive daytime sleepiness- 1 and excoriation disorder- 2 (6, 7, 8, 9).

Among the other characteristics are: Overweight- 1, isolated coccygeal bone agenesis- 1, brain anatomical alterations- 3, oral aspiration- 1, astigmatism- 1, slow and/or low background activity- 1, increased blood copper- 1, lack of independent gait- 1, brachycephaly- 2, cataract- 1, cyanosis- 2, tonic-clonic crisis- 1, short toes- 3, atrial septal defect- 1, spinal deformity- 1, dilation of brain ventricles- 1, epicanthus- 2, capital femoral epiphysiolysis-1, freezing episodes accompanied with masticatory movements- 1, spasms- 1, spasticity- 1, bitemporal narrowing- 1, rounded face/full cheeks- 1, dysmorphic phenotype- 1, large/open anterior fontanelle- 1, weight gain between 1 and 6 years- 1, hemangioma- 1, hyperactivity- 1, hypercholesterolemia- 1, T2 and/or FLAIR hyperintensity- 4, hypertension- 2, pulmonary hypertension- 1, hypertrichosis- 1, midface hypoplasia- 2, respiratory infection- 1, neurological lesions- 1, sleep myoclonus- 1, microbrachycephaly -1, microcephaly- 2, late myelination- 1, thyroid nodule- 1, sunken eyes- 6, dysplastic ears- 3, posteriorly rotated ears- 1, small ears- 2, arched/high/huddled palate- 2, facial nerve palsy- 1, general passivity- 1, partial or complete hearing loss- 3, patent ductus arteriosus- 1, pylorospasm- 1, wide nasal bridge- 2, palmar creases- 1, small chin- 2, pointed/protruding chin- 2, wide and flat nasal root- 1, exaggerated deep tendon reflexes- 3, regurgitation- 1, insulin resistance- 2, mental retardation- 3, Babinski sign- 2, synophris- 1, bushy eyebrows- 1, straight and/or thin eyebrows- 4, telangiectasia- 1, high and/or prominent forehead- 3, toe walking- 1, impaired glucose tolerance- 1, attention deficit disorder- 1, and benign tumor- 1 (6, 7, 8,9).

### **Chromosome 2p Deletion**

Five patients described by Doco-Frenzy et al. (10) presented this alteration, having the genes FAM110C, SHY3YL1, ACP1, FAM150B, TMEM18, C2ORF90, SNTG2, TPO, PXDN, and partial deletion of MYT1L involved.

PWS-related phenotypic characteristics were: obstructive sleep apnea- 2, global developmental delay- 4, small- appearing mouth/thin upper lip- 3, clinodactyly- 2, seizures- 2, learning disability- 4, difficulty gaining weight- 1, behavioral disorders- 2, scoliosis- 1, strabismus- 3, palpebral fissures- 3, hyperphagia- 4, hyperopia- 1, hypotonia- 1, small hands- 2, obesity- 4, small feet- 2, speech-articulation problems- 4 and excoriation disorder -1 (10). Among the other characteristics are: Overweight- 1, ophthalmic pigmentary changes - 1, anxiety- 1, flexible joints- 4, cognitive delay- 1, head shaking- 1, brachycephaly- 1, crying and/or unexplained laughter- 1, short columella- 2, labial commissure- 1, seizures/epilepsy- 1, nasal bridge depression- 3, dyspraxia- 1, epicanthus- 2, stereotypies- 2, rounded face/full cheeks- 1, asymmetrical face- 1, short philtrum- 1, prominent philtrum- 1, weight gain between 1 and 6 years- 3, genu valgus -1, hyperactivity- 3, palmar and/or plantar hypersensitivity- 1, hypertelorism- 2, hyperthyroidism- 1, hirsutism- 1, thick lips- 1, high plasma leptin- 1, low hairline- 2, large

lobes- 1, skin patches- 1, anteverted nostrils- 2, small nose- 3, ventricular omegaly- 1, large ears- 2, thick ears- 1, small ears- 1, arched/high palate /heavy- 1, mitral valve prolapse- 1, puberty- 1, permanent salivation- 1, straight and/or thin eyebrows- 1, high and/or prominent forehead- 1, stereotyped movement disorder- 1, elevated TSH- 1, and dystrophic nails- 1 (10).

### **Chromosome 6q Deletion**

There were 29 patients with a 6q deletion, with Varela et al. (11), Faivre et al. (12)., and Izumi et al. (13) reporting one individual with a mutation in the SIM1 gene. Bonaglia et al. (14) described five patients with alterations in GRIK2, POPDC3, and MCHR2. Candelo et al. (15) described one individual who had alterations involving all the genes mentioned above, and El Khattabi et al. (16) described 15 patients, 13 of whom had a mutation in the SIM1 gene.

PWS-related phenotypic characteristics were: Tooth crowding and malocclusion- 1, reduced fetal activity- 1, global developmental delay- 24, short stature- 4, small-appearing mouth/thin upper lip- 4, downturned corners of mouth- 1, clinodactyly- 2, seizures- 1, cryptorchidism- 2, impaired motor coordination- 2, GH deficiency- 2, narrow bitemporal diameter- 1, learning disability- 17, behavioral disorders- 16, scoliosis- 1, strabismus- 8, palpebral fissures- 6, hyperphagia- 9, hyperopia- 2, hypogonadism- 1, hypotonia- 11, small hands- 8, myopia- 5, nystagmus- 2, obesity- 22, almond-shaped eyes- 4, small feet- 7, childhood eating problems- 4, food-related behavioral problems- 2, speech problems joint- 7 and weak neonatal sucking and swallowing reflux- 7 (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

Among the other characteristics are: Underweight- 1, overweight- 3, adenoids- 1, tall stature (perinatal)- 2, astigmatism- 3, ventricular conduction delay- 1, ventricular enlargement- 1, no bowel control- 1, no axillary hair- 1, no/few pubic hair- 1, autism- 2, poor language development- 2, extended gait base- 3, brachycephaly- 4, brachymetacarpus- 1, brachymetatarsia- 1, tall hair- 1, thin hair- 1, camptodactyly- 1, cataract- 1, prominent nasal columella- 1, seizures/epilepsy- 1, venereal cord- 1, asymmetric skull- 1, stubby fingers- 4, short fingers- 4, short toes- 2, thin fingers- 1, patent ductus arteriosus defect- 1, aortic septal defect- 3, gonadotropin deficiency- 1, insulin deficiency/signs of insulin deficiency- 1, intellectual disability- 2, elbow deformities- 1, fetal heart rate decelerations- 2, day central betes insipidus- 1, internal capsule dysmorphia- 1, dyspraxia- 1, abdominal distention- 1, sleep disturbance/difficulty sleeping- 5, marked suborbital folds- 1, neuronal ectopia- 1, entropion- 1, nocturnal enuresis- 1, epicanthus- 3, twisted epididymis- 1, scaphocephaly- 2, angle esophoria- 1, spasms- 1, bitemporal narrowing- 1, round face/full cheeks- 18, asymmetrical face- 1, flat face- 1, square face- 1, triangular face- 1, tapered phalanx- 1, short phalanx- 1, lack of attention- 1, lack of interaction social- 2, clumsiness when walking- 2, marked philtrum- 4, prominent philtrum- 2, fistula in the sacral region- 1, large/open anterior fontanelle- 1, weight gain between 1 and 6 years- 8, gynecomastia- 1, inguinal hernia- 1, umbilical hernia- 1, hyperactivity- 3, hypertelorism- 3, hyperthyroidism- 1, choroid plexus hypertrophy- 1, lobe hypoplasia- 1, hypothyroidism- 2, hirsutism- 1, greater than actual bone age- 1, lower than actual bone age- 1, restlessness- 1, adrenal insufficiency- 1, genu valgus- 1, intrauterine growth limitation/retardation- 1, livedo- 1, small lobes- 1, macrocephaly- 9, Arnold-Chiari malformation- 2, kidney malformation- 1, inverted nipples- 1, skin spots- 2, short upper limbs- 1, small jaw- 1, megacysts- 1, metatarsus valgus- 1, microcephaly- 4,

microphallus- 1, micrognathia- 1, anteverted nostrils- 1, bulbous nose- 7, thin nose- 1, flat occiput- 1, eyes- 1, oligohydramnios- 1, shallow orbits- 1, low ears- 2, ears with small anti-helices- 1, ears with abnormally bent helices- 2, ears with square helix, ears cauliflower- 1, posteriorly rotated ears- 1, large ears- 4, orchidopexy- 1, arched/high/huddled palate- 3, thick upper eyelids- 1, pectus excavatum- 1, dry skin- 1, sparse pubic hair- 1, small for gestational age - 1, partial or total hearing loss- 3, flat feet- 3, big feet- 1, flat feet- 1, clubfoot- 2, valgus feet- 1, pyeloectasis- 1, pyelonephritis- 1, low thumbs- 1, polydipsia- 1, polyuria- 1, high nasal bridge- 1, thin nasal bridge- 1, wide nasal bridge- 4, flat nasal bridge- 1, poor tendon reflexes- 1, palmar creases- 1, redundant foreskin- 1, constipation- 1, zygomatic prominence- 1, suppressed basal prolactin- 1, ptosis- 3, pointed/protruding chin- 1, flat malar region- 1, prominent occipital and/or frontal region- 1, restricted forearm pronation- 1, restricted forearm supination- 1, mental retardation- 2, retrognathia- 1, syndactyly- 3, synophris- 3, bushy eyebrows- 1, imperceptible eyebrows- 1, straight or thin eyebrows- 2, heart murmur- 2, high and/or prominent forehead- 6, small testes- 2, tetralogy of Fallot- 1, increased nuchal translucency- 1, attention deficit disorder- 1, short trunk- 1, fragile nails- 1, use of non-verbal communication- 1, large ventricles of the corpus callosum- 1 and ventriculomegaly-1 (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

### **Temple Syndrome**

Balbeur et al. (20) described one patient who presented maternal uniparental disomy of chromosome 14 (UPD(14)mat), which led to the appearance of clinical features caused by dysregulation of the expression of imprinted genes. Human chromosome 14 carries the imprinted locus 14q32, controlled by the paternal differentially intergenic methylated region (IG-DMR). It contains genes expressed only in the paternal allele (DLK1, DIO3, and RTL1) and genes expressed only in the maternal allele (GTL2, RTL1as, and MEG8). In the case of UPD(14)mat, overexpression of maternal genes and non-expression of paternal genes explain the patient's phenotype (21, 22).

Phenotypic characteristics related to PWS were: Global developmental delay, learning disability, palpebral fissures, hypotonia, obesity, childhood eating problems, speech-articulation problems, and weak neonatal sucking and swallowing reflexes (20).

Among the other features are Camptodactyly, intellectual disability, mitral myxoid degeneration, abnormal collagen fibers, abnormal elastic fibers, weight gain between 1 and 6 years, hypercholesterolemia, joint hyperlaxity, hyperpigmentation, heart failure, slanted nose, small nose, bridge depressed/low nose, broad nasal bridge, and precocious puberty) (20).

### **Schaaf-Yang Syndrome**

D.Hidalgo-Santos et al. (23) and Enya et al. (24) reported four patients with a mutation in the MAGEL2 gene. Phenotypic characteristics related to PWS were: Delay in global development- 4, short stature- 1, weak or high- pitched childhood crying- 2, seizures- 1, cryptorchidism- 1, GH deficiency- 1, scoliosis- 1, strabismus- 1, palpebral fissures- 1, hypotonia- 4, small penis- 1, weak neonatal sucking and swallowing reflexes- 4 and gastroesophageal reflux- 1 (23, 24). Other features include: intrahepatic portosystemic shunt findings- 1, asphyxia- 1, atrophy- 1, brain atrophy- 1, autism- 2, low urine specific gravity- 1, low development of language-1, camptodactyly- 3, coarse facial features- 1, tonic-clonic crisis- 1, decay- 1, thin fingers- 1, FSH deficiency- 2, LH deficiency- 2, testosterone deficiency- 1, neonatal depression- 1, cavo-caval intrahepatic shunt- 1,

central diabetes insipidus- 1, round face/full cheeks- 1, respiratory failure- 3, cleft palate- 1, flattened philtrum- 1, hypernatremia- 1, hyperprolactinemia- 1, hypertelorism- 1, hyperthyroidism- 1, hypertonia- 1, pituitary hypoplasia- 1, pulmonary hypoplasia- 1, hyposthenuria- 1, hypothyroidism- 1, respiratory infection- 1, adrenal insufficiency- 1, micrognathia- 4, low ears- 1, arched/high/hugged palate- 1, pallor- 1, panhypopituitarism- 1, equinovarus feet- 1, clubfoot- 1, pneumonia- 2, polyuria- 1, broad nasal bridge- 1, depressed nasal root- 1, bushy eyebrows- 1, fetal distress- 1, sweating- 1, high and/or prominent forehead- 1 and volvulus- 1 (23, 24).

### **Chromosome 15q Deletion**

Cao et al. (25), Tan et al. (26), and Zhang et al. (27) described three patients with mutations in the SNURF and SNRPN genes. Phenotypic characteristics related to PWS were: Obstructive sleep apnea- 1, reduced fetal activity- 2, global developmental delay- 2, small-appearing mouth/thin upper lip- 1, downturned corners of the mouth- 1, weak or high-pitched childhood crying- 1, cryptorchidism- 1, learning disability- 2, behavioral disturbances- 1, hyperphagia- 1, hypotonia- 2, hypoventilation- 1, small hands- 1, obesity- 2, almond-shaped eyes- 1, speech- articulation problems- 2, psychosis- 1, weak neonatal sucking and swallowing reflexes- 2, obsessive-compulsive disorder- 1 (25, 26, 27).

Among the other characteristics are anxiety- 1, autism- 1, low respiratory effort- 1, short fingers- 1, thin fingers- 1, long fingers- 1, depression- 1, respiratory distress severe- 1, facial dysmorphia- 1, dyspnea- 1, epicanthus- 1, bitemporal narrowing- 1, fatigue- 1, weight gain between 1 and 6 years- 2, hypothyroidism- 1, infection respiratory distress- 1, lethargy- 1, intrauterine growth limitation/retardation- 2, poor response to external stimuli- 1, testicular malformation- 1, spaced nipples- 1, large nostrils- 1, flat nose- 1, pneumonia- 1, fetal distress- 1, and attention deficit disorder- 1 (25, 26, 27).

### **Duplication of 15q**

Three patients had mutations involving the long arm of chromosome 15. Hoggart et al. (28) reported cases of hexasomy and tetrasomy. Hood et al. reported cases of partial trisomy. PWS-related phenotypic characteristics were: Global developmental delay- 3, downturned corners of the mouth- 1, seizures- 3, narrow bitemporal diameter- 1, learning disability- 1, behavioral disorders- 1, dolichocephaly- 1, palpebral fissures- 1, hyperphagia- 1, hypotonia- 3, high pain threshold- 1, obesity- 1, childhood eating problems- 2, speech-articulation problems- 2 and excoriation disorder- 1 (28, 29).

Other features include: ventricular enlargement with interhemispheric fissures- 1, hyperextensible joints- 2, delayed absorption of cerebrospinal fluid in the superior sagittal sinus- 1, autism- 1, bronchitis- 1, seizures/epilepsy- 2, tonic-clonic crisis- 1, dacryostenosis- 1, thin fingers- 1, decreased density of the frontal and anterior temporal regions- 1, epicanthus- 2, esophoria- 1, spasms- 1, spasticity- 1, myopathic facial expression- 1, sylvian fissures- 1, hypersarrhythmia- 1, macrocephaly- 1, hyperextensible hands- 1, adductor metatarsal- 1, upturned nose- 1, conjugated gaze- 1, low ears- 2, unfolded helix ears- 1, posteriorly rotated ears- 1, otitis- 1, arched/high/crowded palate- 2, pneumonia- 1, depressed/low nasal bridge- 1, mental retardation 1, eye roll 1, joint stiffness 1, and prominent underlying cerebral sulcus- 1 (28, 29).

### **Duplication of Xq**

Linhares et al. (30) and Monaghan et al. (31) described two patients who presented with this alteration. Phenotypic characteristics related to PWS were: Delay in global

development- 1, short stature- 1, downturned corners of the mouth- 1, weak or high-pitched cry in infancy- 1, clinodactyly- 1, cryptorchidism- 1, behavioral disorders- 1, palpebral fissures- 1, hypotonia- 2, high pain threshold- 1, small hands- 1, myopia- 1, obesity- 1, small feet- 1, problems food-related behaviors- 1, speech-articulation problems- 1, weak neonatal sucking and swallowing reflexes- 1, thick, slimy saliva- 1, excoriation disorder- 2, obsessive-compulsive disorder- 1 (30, 31). Among the other characteristics are underweight- 1, hyperextensible joints- 1, increased peak lactate- 1, poor language development- 1, short fingers- 1, intellectual disability- 2, depression- 1, dilated ventricles of the brain- 1, sleep disorder/difficulty sleeping- 1, lack of social interaction- 1, weight gain between 1 and 6 years- 1, genu varus- 1, gynecomastia- 1, inguinal hernia- 1, hypothyroidism- 1, prominent incisors- 1, urinary incontinence- 1, erythematous lesions- 1, asymmetrical breasts- 1, low ears- 1, large ears-1, arched/high/huddled palate- 2, pectus excavatum- 1, high blood pressure- 1 and ptosis- 1 (30, 31).

### **Fragile X Syndrome**

De Vries et al. (32), Stalker et al. (33), and Schrader-Stumpel et al. (34) described ten patients with a mutation in the FMR-1 gene. Phenotypic characteristics related to PWS were: dental crowding and malocclusion- 2, global developmental delay- 5, short stature- 1, cryptorchidism- 1, hyperphagia- 1, hypogonadism- 1, scrotal hypoplasia- 1, hypotonia- 1, small hands- 8, obesity- 9, small penis- 4, small feet- 7, and speech-articulation problems- 1 (32, 33, 34). Other features include: Hyperextensible joints- 2, delayed puberty 3, stubby fingers- 3, short fingers- 2, short toes- 2, thin fingers- 1, round face/ full cheeks- 8, sagging- 1, hyperpigmentation- 6, midface hypoplasia- 1, large earlobes- 1, stocky hands- 5, large hands- 1, deep eyes- 1, ears with prominent helical root- 1, large ears- 1, arched/high/hugged palate- 1, hyperelastic skin- 1, sparse pubic hair- 1, flat feet- 1, large feet- 1, wide feet- 5, pneumonia- 1, depressed/low nasal bridge- 1, plantar creases- 1, abnormal insulin/glucose ratio- 1, reluctance to make eye contact- 1, mental retardation- 3, somatomedin C above average- 1, large testes- 2, small testes- 3, shyness- 1, hyperconvex nails- 1, small nails- 1 and deep nails- 1 (32, 33, 34).

### **OTHER GENETIC DEFECTS**

#### *Chromosomes 15q Microdeletion and 18q Microduplication*

Dello Russo et al. (35) described one patient who presented this alteration. Phenotypic characteristics related to PWS were: Delay in global development, short stature, learning difficulties, hyperphagia, small hands, and obesity (35). Among the other characteristics are Delayed puberty, intellectual disability, sleep disorder/difficulty sleeping, weight gain between 1 and 6 years, large feet, and short neck (35).

#### *Chromosomes Xq disomy and 3p deletion*

Ben-Abdallah-Bouhjar et al. (36) described one patient who presented this alteration. Phenotypic characteristics related to PWS were: Global developmental delay, short stature, small-appearing mouth/Thin upper lip, seizures, cryptorchidism, hypotonia, obesity, small penis, speech-articulation problems, and weak neonatal suck and swallow reflexes (36). Among the other characteristics are Underweight, abnormal hypoplastic corpus callosum, facial dysmorphism, epicanthus, bitemporal narrowing, rounded face/full cheeks, short philtrum, respiratory infection, urinary tract infection, intrauterine growth limitations/retardation, microcephaly, thin nose, small nose, oligohydramnios, flattened



ears, short neck, pointed/protruding chin, high and prominent forehead, and frequent vomiting (36).

#### *Chromosomes 6q and 10p duplication*

Desch et al. (37) described one patient who presented a phenotype that appears to be related to chromosome 6 euchromatin and not chromosome 10. Duplication of the 6q16.3q23.3 region may be a candidate locus of PWLS with the TCBA1 gene as a candidate for mental retardation and the BMIQ3 and ENPP1 implicated in obesity susceptibility. Phenotypic characteristics related to PWS were: Global developmental delay, short stature, GH deficiency, learning disability, small hands, small feet, and speech-articulation problems (37). Other characteristics include Overweight, delayed puberty, low IGF-I concentrations, respiratory infection, livedo, skin spots, and saturnism (37).

#### *Obesity*

Blackburn et al. (38) described two patients who presented this alteration, having a variation in the SIM1 gene. Phenotypic characteristics related to PWS were: obstructive sleep apnea- 1, short stature- 1, behavioral disorders- 1, hyperphagia- 1, obesity- 2, and speech-articulation problems- 1 (38). Among the other characteristics are anxiety- 1, arthrosis- 1, intellectual disability- 1, facial dysmorphism- 1, sleep disorder/difficulty sleeping- 1, lack of social interaction- 1, lack of O<sub>2</sub> during labor- 1, hypercholesterolemia- 1, inability to focus eyes on objects- 1, macrocephaly- 1, low ears- 1, small ears- 1, Bell's palsy- 1, neck short- 1, cargo neck- 1, neurological problems- 1, and tremors- 1 (38).

#### *TRAPPC9 (8q24)*

Marangi et al. (39) described two patients who presented this alteration, as having an alteration in the TRAPPC9 gene. Phenotypic characteristics related to PWS were: Global developmental delay- 2, small-appearing mouth/thin upper lip- 1, downward-turning corners of the mouth- 2, clinodactyly- 1, behavioral disturbances- 1, hypotonia- 2, and speech-articulation problems- 2 (39). Among the other features are: anatomical brain changes- 2, brachycephaly- 2, seizures/epilepsy- 1, myoclonic seizures with hyperpyrexia- 1, hypoplastic supraorbital ridges- 1, thin fingers- 1, intellectual disability- 2, sleep disturbance/difficulty sleeping- 2, epicanthus- 1, bitemporal narrowing- 1, round face/full cheeks- 2, weight gain between 1 and 6 years- 2, T2 hyperintensity- 1, hypertelorism- 2, hyperthyroidism- 1, raised earlobes- 1, thick ears- 2, placenta previa- 1, depressed/low nasal bridge- 1, wide nasal bridge- 2, synopsis- 2, straight and thin eyebrows- 2 (39).

#### *Mutation in exon 6 of the SNURF-SNRPN gene*

Pellikaan et al. (40) described one patient who presented this alteration. Phenotypic characteristics related to PWS were: obstructive sleep apnea, reduced fetal activity, global developmental delay, kyphosis, GH deficiency, diabetes mellitus (type 2), behavioral disorders, strabismus, palpebral fissures, hyperphagia, hypogonadism, hypotonia, hands small, obesity, almond-shaped eyes, small feet, food-related behavioral problems, speech-articulation problems, poor neonatal sucking and swallowing reflexes, and excoriation disorder (40). Other features include Primary amenorrhea, lack of pubic hair/few, cyanosis, thin fingers, vitamin D deficiency, dyslipidemia, bitemporal narrowing, weight

gain between 1 and 6 years, low IGF, low hairline, wide nose, constipation, osteopenia, osteoporosis, bow feet, small chin, and trichotillomania (40).

A summary of the most common clinical phenotypes entailed at the different loci described above that reflect genetic heterogeneity is presented in Figure 3.

### **FIGURE 3**

The PWLS phenotype has been described in patients with chromosomal abnormalities 1p, 2p, 3p, 6q, and 9q, in cases with maternal uniparental disomy of chromosome 14 and fragile X syndrome (2, 12, 41). The most common clinical manifestations of PWLS include global developmental delay (78.4%), obesity (67.6%), hypotonia (51.3%), speech-articulation problems (41.9%), and behavioral disturbances. (40.5%).

### **DISCUSSION**

It is challenging for clinicians to make a diagnosis when faced with patients who have PWLS (15). When genetic analysis excludes PWS, an alternative diagnosis must be sought. Because clinical diagnosis is difficult, these individuals are often not referred for treatment or misdiagnosed with PWS. This article can help facilitate this process. However, it is still necessary to understand how the metabolic pathways are affected in different ways in PWLS and PWS will be of great value to the understanding of the genotype-phenotype relationship in complex human diseases.

The literature suggests that obesity and the PWLS syndrome are attributable to loss-of-function variants in the single-minded gene 1 (SIM1) included in the 6q16 region (42). The SIM1 gene encodes a transcription factor that acts on developing the hypothalamic paraventricular nucleus. Loss-of-function variants in SIM1 may cause hyperphagic obesity with or without PWS-like features and, additionally, may be responsible for neurobehavioral disorders (42). Thus, SIM1 haploinsufficiency may be responsible for severe obesity in some cases. Furthermore, deletions of GRIK2 have been suggested to play a role in behavior disorders (14). Observations have identified that the minimum critical region for PWLS is 1 Mb (42). This region contains the SIM1, MCHR2, and ASCC3 genes. Furthermore, MCHR2 encoding a receptor for melanin-concentrating hormones is known to increase mice's food intake and body weight. Therefore, as several genes with the 6q16 region are essential for controlling appetite and metabolism, a cumulative effect can cause the PWLS phenotype (12, 17, 37, 43).

Genomic imprinting or epigenetic factors may be mechanisms associated with the variability of chromosomal defects that lead to PWLS. For example, an imprinting defect in 6q16 deletions has been hypothesized based on the paternal origin of a de novo 6q16 deletion in a patient with PWLS (12). The phenotype may be due to the haploinsufficiency of paternally expressed genes located in the deleted region (44). On the other hand, some cases have been described with a deletion of parental origin. However, no substantial evidence supports an imprinting mechanism in the 6q16 region (45).

Few cases were reported in Brazil and Latin America, and only two cases reported in the literature came from this region (11, 15). All other reported cases are from North America or Europe.

Analyzing the phenotypic overlap of PWS and PWLS, it is essential to understand the mechanisms that lead to the development of phenotypes. First, it is crucial to know the genomic regions and their role in phenotypic development. Genetic mechanisms are associated with a concept related to the cascade of relationships at different organizational levels from the initial ones, that is, the nucleotide sequence of genes, to the observable

ones, characteristics of the organism. However, cause-and-effect links between traits are notoriously difficult to determine. Since these two syndromes share common affected metabolic pathways, making it is difficult to fully understand the genotype-phenotype relationship, an issue that comes from Mendelian genetics to 21st-century biology.

## CONCLUSION

The genetic diversity associated with appetite control, body composition, growth, reproduction, learning disabilities, psychosis, and other behavioral problems leads to difficulties in understanding the overlap of these phenotypes in various diseases.

Despite sharing common phenotypic characteristics, these diseases must be distinguished early since the therapeutic pathways may differ. Therefore, having clinical evaluation as a basis for determining the best options for diagnosis and subsequent treatment is still a challenge.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the teaching and research departments of the Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira.

### Funding

Grant-in-aid partially supported this study for Programa Inova Fiocruz (Geração de Conhecimento - 2021), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ (Auxílio Básico à Pesquisa em ICTs sediadas no estado do Rio de Janeiro, 2021), Rede de Laboratórios de Referência- FIOCRUZ and and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Abbreviations Mat: maternal

PWLS: Prader Willi-Like syndrome PWS: Prader Willi Syndrome UPD: Uniparental disomy

Availability of data and materials Not applicable

Ethics declarations approval and consent to participate Not applicable

Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

Consent for publication

Written informed consent for publication was provided by each donor.

Authors' Contributions

Fonseca LLCG, Cintra HA, Rocha DN, Canavarro FRSVS, Araújo LL, Gomes LHF, and Guida LC wrote the manuscript; all authors read and approved the final manuscript.

Authors Details

High Complexity Laboratory, National Institute for Women's, Children and Adolescents' Health Fernandes Figueira, Fiocruz, Avenida Rui Barbosa 716, Flamengo, Rio de Janeiro, RJ 22250 020, Brazil.

Corresponding author

Correspondence to Leticia da Cunha Guida (leticia.guida@if.focruz.br)

## References

1. Cheon CK (2016) Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 21(3):126-135. <https://doi.org/10.6065/apem.2016.21.3.126>
2. Berends MJ, Hordijk R, Scheffer H, Oosterwijk JC, Halley DJ, Sorgedraeger N (1999). Two cases of maternal uniparental disomy 14 with a phenotype overlapping with the Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet.* 84(1):76-9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19990507\)84:1%3C76::aid-ajmg16%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19990507)84:1%3C76::aid-ajmg16%3E3.0.co;2-f)
3. Angulo MA, Butler MG, Canaletto ME (2015) Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest* 38, 1249 -1263. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0312-9>

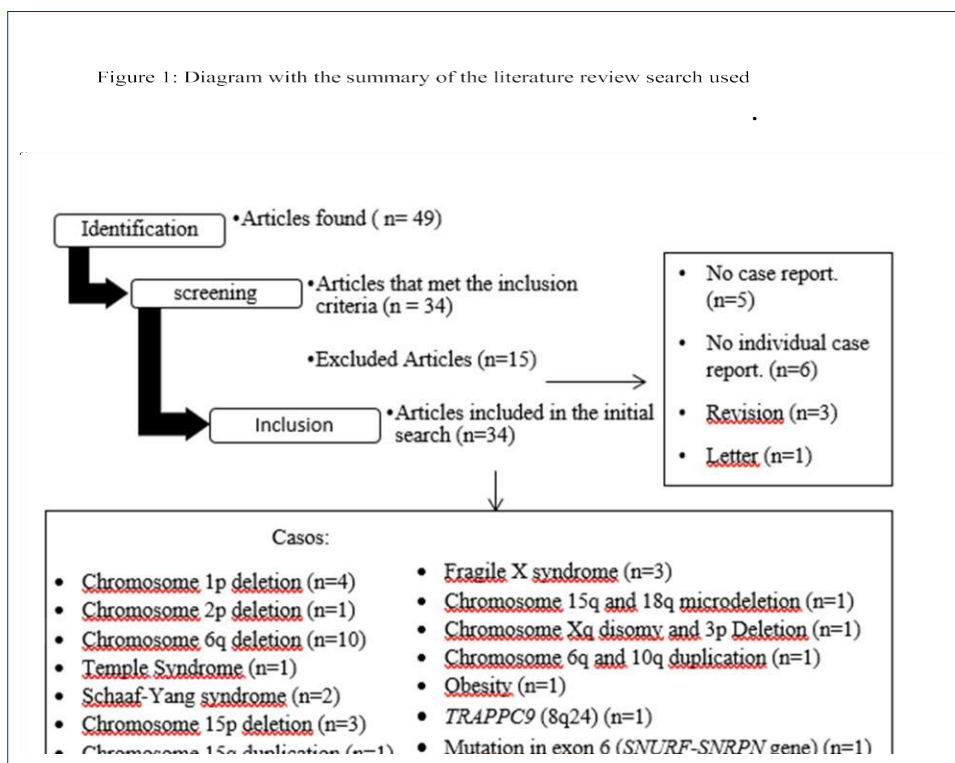
4. Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Gripp KW, Zhang B, Peters BA, McElwain MA, Drmanac R, Beaudet AL, Caskey CT, Yang Y (2013) Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet.* 45(11):1405-8. <https://doi.org/10.1038/ng.2776>
5. McCandless SE; Committee on Genetics. (2011). Clinical report—health supervision for children with Prader-Willi syndrome. *Pediatrics* Jan;127(1):195- 204. doi: 10.1542/peds.2010-2820.
6. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K (2010) 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int.*52(4):547-50. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2010.03090.x>
7. Stage S, Lapi E, Pantaleo M, Chiarelli F, Seminara S, de Martino M (2014) Type II diabetes and impaired glucose tolerance due to severe hyperinsulinism in patients with 1p36 deletion syndrome and a Prader-Willi-like phenotype. *BMC Med Genet.* 15:16. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-16>
8. Öglane-Shlik E, Puusepp S, Talvik I, Vaher U, Rein R, Tammur P, Reimand T, Teek R, Žilina O, Tomberg T, Ōunap K (2014) Monosomy 1p36 - a multifaceted and still enigmatic syndrome: four clinically diverse cases with shared white matter abnormalities. *Eur J Paediatr Neurol.* 18(3):338-46. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2014.01.008>
9. D'Angelo CS, Da Paz JA, Kim CA, Bertola DR, Castro CI, Varela MC, Koiffmann CP (2006) Prader-Willi-like phenotype: investigation of 1p36 deletion in 41 patients with delayed psychomotor development, hypotonia, obesity and/or hyperphagia, learning disabilities and behavioral problems. *Eur J Med Genet.* 49(6):451 -60. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2006.02.001>
10. Doco-Frenzy M, Leroy C, Schneider A, Petit F, Delrue MA, Andrieux J, Perrin- Sabourin L, Landais E, Aboura A, Puechberty J, Girard M, Tournaire M, Sanchez E, Rooryck C, Email A, Goossens M, Jonveaux P, Lefort G, Taine L, Cailley D, Gaillard D, Leheup B, Sarda P, Geneviève D (2014) Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. *Eur J Hum Genet.* (4):471-9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.189>
11. Varela MC, Simões-Sato AY, Kim CA, Bertola DR, De Castro CI, Koiffmann CP (2006) A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader-Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. *Eur J Med Genet.* 49(4):298-305. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2005.12.002>
12. Faivre L, Cormier-Daire V, Lapiere JM, Colleaux L, Jacquemont S, Geneviève D, Saunier P, Munnich A, Turleau C, Romana S, Prieur M, De Blois MC, Vekemans M (2002). Deletion of the SIM1 gene (6q16.2) in a patient with a Prader-Willi-like phenotype. *J Med Genet.* 39(8):594-6. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.8.594>
13. Izumi K, Housam R, Kapadia C, Stallings VA, Medne L, Shaikh TH, Kublaoui BM, Zackai EH, Grimberg A (2013) Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving SIM1 and Prader-Willi syndrome-like features. *Am J Med Genet A.* 161A(12):3137-43. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36149>
14. Bonaglia M, Ciccone R, Gimelli G, Gimelli S, Marelli S, Verheij J, Giorda R, Grasso R, Borgatti R, Pagone F, Rodriguez L, Martinez-Frias ML, van Ravenswaaij C, Zuffardi O (2008) Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 16, 1443-1449. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.119>
15. Candelò E, Feinstein MM, Ramirez-Montaño D, Gomez JF, Pachajoa H (2018) First Case Report of Prader-Willi-Like Syndrome in Colombia. *Front Genet.* <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00098>
16. El Khattabi L, Guimiot F, Pipiras E, Andrieux J, Baumann C, Bouquillon S, Delezoide AL, Delobel B, Demurger F, Dessuant H, Durant S, Dubourg C, Dupont C, Faivre L, Holder-Espinasse M, Jaillard S, Journal H, Lyonnet S, Malan V, Masurel A, Marle N, Missirian C, Moerman A, Moncla A, Odent S, Palumbo O, Palumbo P, Ravel A, Romana S, Tabet AC, Valduga M, Vermeule M, Carella M, Dupont JM, Verloes A, Benzacken B, Delahaye A (2015) Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including SIM1. *Eur J Hum Genet.* (8):1010-8. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.230>
17. Stein CK, Stred SE, Thomson LL, Smith FC, Hoo JJ (1996) Interstitial 6q deletion and Prader-Willi-like phenotype. *Clin Genet.* 49(6):306-10. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1996.tb03794.x>
18. Wentzel C, Lynch SA, Stattin EL, Sharkey FH, Annerén G, Thuresson AC (2010) Interstitial Deletions at 6q14.1-q15 Associated with Obesity, Developmental Delay and a Distinct Clinical Phenotype. *Mol Syndromol.* 1(2):75-81. <https://doi.org/10.1159/000314025>
19. Gonsalves R, Aleck K, Newbern D, Shaibi G, Kapadia C, Oatman O (2020) Severe early-onset obesity and hypopituitarism in a child with a novel SIM1 gene mutation. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2020:20-0042. <https://doi.org/10.1530/EDM-20-0042>
20. Balbeur S, Grisart B, Parmentier B, Sartenaer D, Leonard PE, Ullmann U, Boulanger S, Leroy L, Ngendahayo P, Lungu-Silviu C, Lysy P, Maystadt I (2016) Trisomy rescue mechanism: the case of concomitant mosaic trisomy 14 and maternal uniparental disomy 14 in a 15-year-old girl. *Clin Case Rep.* 4(3):265-71. <https://doi.org/10.1002/ccr3.501>
21. Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet.* 2014 Aug;51(8):495-501. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102396.
22. Ogata T, Kagami M. Molecular mechanisms leading to the phenotypic development in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2008;17(4):103-11. doi: 10.1297/cpe.17.103.
23. D Hidalgo-Santos A, Del Carmen DeMingo-Aleman M, Moreno-Macián F, Roselló M, Orellana C, Martínez F, Caro-Llopis A, León-Cariñena S, Tomás-Vila M (2018) A Novel Mutation of MAGEL2 in a Patient with Schaaf-Yang Syndrome and Hypopituitarism. *Int J Endocrinol Metab.* 16(3):e67329. <https://doi.org/10.5812/ijem.67329>
24. Enya T, Okamoto N, Iba Y, Miyazawa T, Okada M, Ida S, Naruto T, Imoto I, Fujita A, Miyake N, Matsumoto N, Sugimoto K, Takemura T (2018) Three patients with Schaaf-Yang syndrome exhibiting arthrogyposis

- and endocrinological abnormalities. *Am J Med Genet A*. 176(3):707-711. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38606>
25. Cao Y, AlHumaidi SS, Faqeih EA, Pitel BA, Lundquist P, Aypar U (2017) A novel deletion of SNURF/SNRPN exon 1 in a patient with Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Med Genet*. 60(8):416-420. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.05.003>
  26. Tan Q, Potter KJ, Burnett LC, Orsso CE, Inman M, Ryman DC, Haqq AM (2020) Prader-Willi-Like Phenotype Caused by an Atypical 15q11.2 Microdeletion. *Genes (Basel)*. 11(2):128. <https://doi.org/10.3390/genes11020128>
  27. Zhang K, Liu S, Gu W, Lv Y, Yu H, Gao M, Wang D, Zhao J, Li X, Gai Z, Zhao S, Liu Y, Yuan Y (2021) Transmission of a Novel Imprinting Center Deletion Associated With Prader-Willi Syndrome Through Three Generations of a Chinese Family: Case Presentation, Differential Diagnosis, and a Lesson Worth Thinking About. *Front Genet*. 12:630650. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.630650>.
  28. Hoggart A, Leung KN, Wang NJ, Wu DJ, Driscoll J, Vallero RO, Schanen NC, LaSalle JM (2009) Chromosome 15q11-13 duplication syndrome brain reveals epigenetic alterations in gene expression not predicted from copy number. *J Med Genet*. 86-93. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.061580>.
  29. Hood OJ, Rouse BM, Lockhart LH, Bodensteiner JB (1986) Proximal duplications of chromosome 15: clinical dilemmas. *Clin Genet*. 29(3):234-40. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1986.tb00817.x>
  30. Linhares ND, Valadares ER, da Costa SS, Arantes RR, de Oliveira LR, Rosenberg C, Vianna-Morgante AM, Svartman M (2016) Inherited Xq13.2-q21.31 duplication in a boy with recurrent seizures and pubertal gynecomastia: Clinical, chromosomal and aCGH characterization. *Meta Gene*. 9:185-90. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2016.07.004>
  31. Monaghan KG, Van Dyke DL, Feldman GL (1998) Prader-Willi-like syndrome in a patient with an Xq23q25 duplication. *Am J Med Genet*. 80(3):227-31. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19981116\)80:3<227::aid-ajmg10>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19981116)80:3<227::aid-ajmg10>3.0.co;2-q)
  32. de Vries BB, Fryns JP, Butler MG, Canziani F, Wesby-van Swaay E, van Hemel JO, Oostra BA, Halley DJ, Niermeijer MF (1993) Clinical and molecular studies in fragile X patients with a Prader-Willi-like phenotype. *J Med Genet*. 30(9):761-6. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.9.761>
  33. Stalker HJ, Keller KL, Gray BA, Zori RT (2003) Concurrence of fragile X syndrome and 47, XYY in an individual with a Prader-Willi-like phenotype. *Am J Med Genet A*. 116A(2):176-8. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.10001>
  34. Schrader-Stumpel C, Gerver WJ, Meyer H, Engelen J, Mulder H, Fryns JP (1994) Prader-Willi-like phenotype in fragile X syndrome. *Clin Genet*. 45(4):175-80. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1994.tb04018.x>
  35. Dello Russo P, Demori E, Sechi A, Passon N, Romagno D, Gnan C, Zoratti R, Damante G (2016) Microdeletion 15q26.2qter and Microduplication 18q23 in a Patient with Prader-Willi-Like Syndrome: Clinical Findings. *Cytogenet Genome Res*. 148(1):14-8. <https://doi.org/10.1159/000445923>
  36. Ben-Abdallah-Bouhjar I, Hannachi H, Labalme A, Gmidène A, Mougou S, Soyah N, Gribaa M, Sanlaville D, Elghezal H, Saad A (2012). Chromosomal microarray analysis of functional Xq27-qter disomy and deletion 3p26.3 in a boy with Prader-Willi-like features and hypotonia. *European Journal of Medical Genetics*, Volume 55, Issues 8-9, Pages 461-465. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.04.011>
  37. Desch L, Marle N, Mosca-Boidron AL, Faivre L, Eliade M, Payet M, Ragon C, Thevenon J, Aral B, Ragot S, Ardalan A, Dhouiabi N, Bensignor C, Thauvin-Robinet C, El Chehadeh S, Callier P (2015) 6q16.3q23.3 duplication associated with Prader-Willi-like syndrome. *Mol Cytogenet*. 8:42. <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0151-6>
- Blackburn PR, Sullivan AE, Gerassimou AG, Kleinendorst L, Bersten DC, Coleman M, Harris KG, Wierenga JG, Klee EW, van Gerpen JA, Ross OA, van Haelst MM, Whitelaw ML, Caulfield TR, Atwal P (2020). Functional Analysis of the SIM1 Variant p.G715V in 2 Patients With Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 105, Issue, Pages 355-361. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz192>
38. Marangi G, Leuzzi V, Mantì F, Lattante S, Orteschi D, Pecile V, Neri G, Zollino M (2013) TRAPPC9-related autosomal recessive intellectual disability: report of a new mutation and clinical phenotype. *Eur J Hum Genet*. 21(2):229-32. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.79>
  39. Pellikaan K, van Woerden GM, Kleinendorst L, Rosenberg AGW, Horsthemke B, Grosser C, van Zutven LJC, van Rossum EFC, van der Lely AJ, Resnick JL, Brüggerwirth HT, van Haelst MM, de Graaff LCG (2021) The Diagnostic Journey of a Patient with Prader-Willi-Like Syndrome and a Unique Homozygous SNURF-SNRPN Variant; Bio-Molecular Analysis and Review of the Literature. *Genes (Basel)*. 12(6):875. <https://doi.org/10.3390/genes12060875>
  40. Gilhuis HJ, van Ravenswaaij CM, Hamel BJ, Gabreëls FJ (2000) Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol*. 4(1):39-43. <https://doi.org/10.1053/ejpn.1999.0259>
  41. Bonnefond A, Raimondo A, Stutzmann F, Ghousaini M, Ramachandrapa S, Bersten DC, Durand E, Vatin V, Balkau B, Lantieri O, Raverdy V, Pattou F, Van Hul W, Van Gaal L, Peet DJ, Weill J, Miller JL, Horber F, Goldstone AP, Driscoll DJ, Bruning JB, Meyre D, Whitelaw ML, Froguel P (2013). Loss-of-function mutations in SIM1 contribute to obesity and Prader-Willi-like features. *J Clin Invest*. Jul;123(7):3037-41. doi: 10.1172/JCI68035.
  42. Rosenfeld JA, Amrom D, Andermann E, Andermann F, Veilleux M, Curry C, Fisher J, Deputy S, Aylsworth AS, Powell CM, Manickam K, Heese B, Maisenbacher M, Stevens C, Ellison JW, Upton S, Moeschler J, Torres-Martínez W, Stevens A, Marion R, Pereira EM, Babcock M, Morrow B, Sahoo T, Lamb AN, Ballif BC, Paciorkowski AR, Shaffer LG (2012). Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics*. Feb;13(1):31-47. doi: 10.1007/s10048-011-0306-5.
  43. Spreiz, A., Müller, D., Zotter, S., Albrecht, U., Baumann, M., Fauth, C., ... Kotzot, D. (2010). Phenotypic

variability of a deletion and duplication 6q16.1 → q21 due to a paternal balanced ins(7;6)(p15;q16.1q21). American Journal of Medical Genetics PartA, 152A(11), 2762-2767. doi:10.1002/ajmg.a.33699

44. Holder Jr, J. L. (2000). Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. Human Molecular Genetics, 9(1), 101-108. doi:10.1093/hmg/9.1.101

Figures



Tables

Table 1: Summary of genotypes described in articles as related to PWLS.

Genotype	1p del	2p del	6q del	Temple SYN	Schaaf-Yang SYN	15q del	15q dup	Xq dup	X fragile SYN	15q Micro del + 18q Microdup	Xq disomy + 3p del	6q dup + 10p dup	Obesity	TRAPPC9 (8q24)	Mut in SNURF- SNRPN
Number of papers	4	1	10	1	2	3	1	2	3	1	1	1	1	1	1
Number of cases	9	5	29	1	4	3	3	2	10	1	1	1	2	2	1
Gender (M/F)	02/jul	01/mar	21/ago	0/1	01/mar	02/jan	02/jan	01/jan	10/0	1/0	1/0	1/0	2/0	0/2	0/1

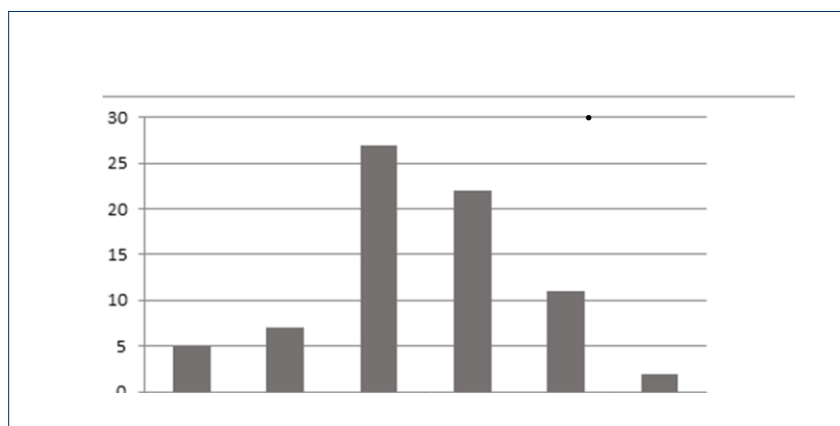
Note: del: deletion, SYN: syndrome, dup: duplication and Mut: mutation

Additional Files

Additional file 1 – Clinical findings in PWS patients divided by genetic subgroups. P(1) = Pearson's chi-square test; P(2) = Fisher's exact test; a = 0.05. Rows without values are

variables that have had a constant analysis

Figure 2 Graph showing the age of patients when they were reported



	Patients with deletion (n=29)		Patients with UPD mat (n=16)		P/a=0,05
	Percentage	n	percentage	n	
Reduced fetal activity	82,80%	24	75%	12	P(2)=0,700
Polyhydramnios	27,60%	8	18,80%	3	P(2)=0,720
Short	55,20%	16	37,50%	6	P(1)=0,353
Failure to gain weight in childhood	89,70%	26	68,80%	11	P(2)=0,111
Central obesity	51,70%	15	43,80%	7	P(1)=0,758
Dolichocephaly	34,50%	10	12,50%	2	P(2)=0,164
Narrow bitemporal diameter	58,60%	17	37,50%	6	P(1)=0,221
Almond eyes	86,20%	25	87,50%	14	P(2)=1,000
Oblique palpebral fissures	34,50%	10	31,30%	5	P(1)=1,000
Tin upper lip	41,40%	12	18,80%	3	P(1)=0,189
Small looking mouth	48,30%	14	62,50%	10	P(1)=0,533
Corners of mouth turned down	44,8	13	62,50%	10	P(1)=0,353
Thick and viscous saliva	31%	9	18,80%	3	P(2)=0,491
Dental enamel hypoplasia	10,30%	3	6,30%	1	P(2)=1,000
Early dental caries	31%	9	25%	4	P(2)=0,743

Tooth crowding and malocclusion	20,70%	6	12,50%	2	P(2)=0,691
Squint	51,70%	15	25%	4	P(1)=0,118
Nystagmus	0%	0	6,30%	1	P(2)=0,356
Retinal hypopigmentation	0%	0	0%	0	-----
Foveal hypoplasia	0%	0	0%	0	-----
Hypermetropia	3,40%	1	0%	0	P(2)=1,000
Myopia	31%	9	0%	0	P(2)=0,017
Hypernasal speech	41,40%	12	37,50%	6	P(1)=1,000
Weak or high-pitched childhood crying	62,10%	18	62,50%	10	P(1)=1,000
Hypoventilation	3,40%	1	0%	0	P(2)=1,000
Obstructive sleep apnea	51,70%	15	18,80%	3	P(1)=0,055
Childhood feeding problems	51,70%	15	31,30%	5	P(1)=0,224
Gastroesophageal reflux	17,20%	5	31,30%	5	P(2)=0,455
Decreased vomiting	24,10%	7	31,30%	5	P(2)=0,728
Small penis	37,50%	6	16,70%	1	P(2)=0,616
Scrotal hypoplasia	56,30%	9	33,30%	2	P(2)=0,635
Cryptorchidism	81,30%	13	66,70%	4	P(2)=0,585
Hypoplastic labia minora	38,50%	5	20%	2	P(2)=0,405
Hypoplastic clitoris	23,10%	3	10%	1	P(2)=0,604
Scoliosis	27,60%	8	12,50%	2	P(2)=0,292
Kyphosis	3,40%	1	6,30%	1	P(2)=1,000
Small hands and feet	75,90%	22	75%	12	P(2)=1,000
Narrow hands with straight ulnar edge	20,70%	6	12,50%	2	P(2)=0,691
Clinodactyly	24,10%	7	18,80%	3	P(2)=1,000
Hypopigmentation	20,70%	6	0%	0	P(2)=0,075
blonde to light brown hair	41,40%	12	18,80%	3	P(1)=0,189
Front hair rise	31%	9	12,50%	2	P(2)=0,279
Hyperinsulinemia	3,40%	1	18,80%	3	P(2)=0,121



GH deficiency	69%	20	50%	8	P(1)=0,336
hypogonadotropic hypogonadism	10,30%	3	12,50%	2	P(2)=1,000
Diabetes mellitus (type 2)	3,40%	1	12,50%	2	P(2)=0,285
excoriation disorder	62,10%	18	50%	8	P(1)=0,534
Rectal excoriation disorder	6,90%	2	18,80%	3	P(2)=0,330
Food-related behavioral problems	58,60%	17	43,80%	7	P(1)=0,369
temper problems	58,60%	17	56,30%	9	P(1)=1,000
Difficulty with transitions	24,10%	7	31,30%	5	P(2)=0,728
Stubbornness	55,20%	16	62,50%	10	P(1)=0,757
obsessive behaviors	34,50%	10	37,50%	6	P(1)=1,000
persevering speech	48,30%	14	43,80%	7	P(1)=1,000
Obsessive-compulsive disorder	34,5%	10	18,80%	3	P(2)=0,322
Psychosis	3,40%	1	0%	0	P(2)=1,000
Escape	13,80%	4	12,50%	2	P(2)=1,000
Excessive daytime sleepiness	13,80%	4	37,50%	6	P(2)=0,131
wake up early in the morning	55,20%	16	37,50%	6	P(1)=0,353
Waking up at night to look for food	6,90%	2	6,10%	1	P(2)=1,000
Severe neonatal hypotonia that improves with age	100%	29	100%	16	-----
Weak neonatal sucking and swallowing reflexes	96,60%	28	93,80%	15	P(2)=1,000
Deficiency in gross motor coordination	31%	9	25%	4	P(2)=0,743
Fine motor coordination impairment	37,90%	11	31,30%	5	P(1)=0,752
learning difficulties	51,70%	15	37,50%	6	P(1)=0,533
Higher risk of seizures	20,70%	6	18,80%	3	P(2)=1,000

Global development delay	82,80%	24	68,80%	11	P(2)=0,455
speech-articulation problems	55,20%	16	62,50%	10	P(1)=0,757
Hyperphagia	51,70%	15	25%	4	P(1)=0,118
Body temperature instability	27,60%	8	18,80%	3	P(2)=0,720
high pain threshold	48,30%	14	37,50%	6	P(1)=0,544
breech presentation	37,90%	11	31,30%	5	P(1)=0,752
Unusual puzzle skill	48,30%	14	6,30%	1	P(1)=0,007

### Additional file 2 – Clinical Features of the Prader-Willi Phenotype

Clinical Features of the Prader-Willi Phenotype	Number of patients
Tooth crowding and malocclusion	3
Obstructive sleep apnea	5
Reduced fetal activity	4
Global development delay	58
Short	13
Small-looking mouth/ Thin upper lip	13
Corners of the mouth facing downwards	6
Weak or high-pitched childhood crying	5
Kyphosis	1
Clinodactyly	9
Seizures	12
Cryptorchidism	7
Motor coordination impairment	2
GH deficiency	5
Diabetes mellitus (type 2)	3
Narrow bitemporal diameter	2
Learning difficulty	29
Difficulty gaining weight	1
Behavioral disorders	30
Dolichocephaly	1
Scoliosis	4
Squint	18
Palpebral fissures	16
Hyperphagia	25
Hyperinsulinemia	2
Hypermetropia	3
Hypogonadism	3
Hypopigmentation	2
Scrotal hypoplasia	1
Hypotonia	38
Hypoventilation	1
High pain threshold	2
Narrow hands with straight ulnar edge	1
Small hands	25
Myopia	8
Nystagmus	2
Obesity	50
Almond eyes	6

Small pennis	6
Small feet	22
Childhood eating problems	7
Food-related behavioral problems	4
Speech-articulation problems	31
Psychosis	1
Weak neonatal sucking and swallowing reflexes	20
Gastroesophageal reflux	3
Thick and viscous saliva	1
Excessive daytime sleepiness	1
Excoriation disorder	7
Obsessive-compulsive disorder	2
Underweight	3
Intrahepatic portosystemic shunt findings	1
Overweight	7
Adenoids	1
Isolated coccygeal bone agenesis	1
Ventricular enlargement with interhemispheric fissures	1
Tall stature (perinatal)	2
Brain anatomical changes	5
Ophthalmologic pigmentary changes	1
Primary amenorrhea	1
Anxiety	3
Flexible joints	4
Hyperextensible joints	5
Osteoarthritis	1
Asphyxia	1
Oral aspiration	1
Astigmatism	4
Delayed absorption of cerebrospinal fluid in the superior sagittal sinus	1
Puberty delay	5
Cognitive delay	1
Ventricular conduction delay	1
Atrophy	1
Brain atrophy	1
Slow and/or low background activity	1
Increased copper in the blood	1
Increase in lactate peak	1
Ventricular enlargement	1
Absence of bowel control	1
No independent gait	1
Absence of axillary hair	1
Absence of pubic hair/few	2
Autism	6
The low specific gravity of urine	1
Low concentrations of IGF-I	1
Low language development	4
Low respiratory effort	1
Head shake	1
Extended walking base	3
Brachycephaly	9
Brachymetacarpus	1
Brachymetatarsia	1
Bronchitis	1
Tall hair	1
Fine hair	1

Camptodactyly	5
Cataract	2
Coarse facial features	1
Crying and unexplained laughter	1
Cyanosis	3
Short columella	2
Prominent nasal columella	1
Labial commissure	1
Seizures/Epilepsy	5
Venereal rope	1
Abnormal hypoplastic corpus callosum	1
Asymmetrical skull	1
Myoclonic seizure with hyperpyrexia	1
Tonic-clonic crisis	3
Hypoplastic supraorbital ridges	1
Dacryostenosis	1
Decay	1
Stubby fingers	7
Short fingers	8
Short toes	7
Thin fingers	7
Long fingers	1
Patent ductus arteriosus defect	1
Atrial septum defect	4
FSH deficiency	2
Gonadotropin Deficiency	1
Insulin deficiency/signs of insulin deficiency	1
LH deficiency	2
Testosterone deficiency	1
Vitamin D deficiency	1
Intellectual disability	9
Spine deformity	1
Elbow deformities	1
Mitral myxoid degeneration	1
Depression	2
Neonatal depression	1
Nasal bridge depression	3
Cavo-caval intrahepatic shunt	1
Fetal heart rate decelerations	2
Severe respiratory distress	1
Central diabetes insipidus	2
Dilation of the ventricles of the brain	2
Decreased density of the frontal and anterior temporal regions	1
Dyslipidemia	1
Internal capsule dysmorphia	1
Facial dysmorphia	3
Dyspnea	1
Dyspraxia	2
Abdominal distension	1
Sleep disorder/difficulty sleeping	10
Marked suborbital folds	1
Neuronal ectopia	1
Entropion	1
Nocturnal Enuresis	1
Epicanthic	12
Twisted epididymis	1

Capital femoral epiphysiolysis	1
Freezing episodes accompanied by chewing movements	1
Scaphocephaly	2
Esophoria	1
Angle esophoria	1
Spasms	3
Spasticity	2
Stereotypes	2
Bitemporal narrowing	6
Myopathic facial expression	1
Rounded face/full cheeks	32
Asymmetrical face	2
Flat face	1
Square face	1
Triangular face	1
Fatigue	1
Tapered phalanx	1
Short phalanx	1
Respiratory failure	3
Lack of attention	1
Lack of social interaction	4
Clumsiness when walking	2
Lack of O2 during labor	1
Cleft palate	1
Dysmorphic phenotype	1
Abnormal collagen fibers	1
Abnormal elastic fibers	1
Flat filter	1
Short filter	2
Checked filter	4
Prominent filter	3
Sylvian fissures	1
Fistula in the sacral region	1
Large/open anterior fontanelle	2
Flaccidity	1
Weight gain between 1 and 6 years	20
Genus valgus	1
Genus varus	1
Gynecomastia	2
Hemangioma	1
Inguinal hernia	2
Umbilical hernia	1
Hyperactivity	7
Hypercholesterolemia	3
Hyperlaxity of the joints	1
Hyperintensity on T2 and/or FLAIR	5
Hypernatremia	1
Hyperpigmentation	7
Hyperprolactinemia	1
Palmar and/or plantar hypersensitivity	1
Hypertelorism	8
Hypertension	2
Pulmonary hypertension	1
Hyperthyroidism	3
Hypertonia	1
Hypertrichosis	1

Choroid plexus hypertrophy	1
Lobe hypoplasia	1
Midface hypoplasia	3
Pituitary hypoplasia	1
Pulmonary hypoplasia	1
Hyposthenuria	1
Hypothyroidism	6
Hypsarrhythmia	1
Hirsutism	2
Bone age greater than actual	1
Bone age is lower than actual	2
Low IGF	1
Inability to focus eyes on objects	1
Prominent incisors	1
Urinary incontinence	1
Respiratory infection	4
Urinary infection	2
Restlessness	1
Adrenal insufficiency	2
Cardiac insufficiency	1
Valgus knee	1
Thick lips	1
High plasma leptin	1
Erythematous lesions	1
Neurological injuries	1
Lethargy	1
Limitations/intrauterine growth retardation	4
Low hairline	3
Livedo	2
Big lobes	2
Raised lobes	1
Small lobes	1
Poor response to external stimuli	1
Macrocephaly	13
Arnold-Chiari malformation	2
Kidney malformation	1
Testicle malformation	1
Asymmetrical breasts	1
Spaced nipples	1
Inverted nipples	1
Spots on the skin	4
Stubby hands	5
Big hands	1
Hyperextensible hands	1
Short upper limbs	1
Small jaw	1
Megacysts	1
Adductor metatarsal	1
Metatarsal valgus	1
Sleep myoclonia	1
Microbrachycephaly	1
Microcephaly	5
Microphallus	1
Micrognathia	5
Late myelination	1
Anteverted nostrils	3

Big nostrils	1
Flat nose	1
Upturned nose	1
Bulbous nose	7
Thin nose	2
Broad nose	1
Oblique nose	1
Small nose	5
Thyroid nodule	1
Constipation	1
Flat occiput	1
Joint look	1
Deep eyes	8
Oligohydramnios	2
Ventricular omegaly	1
Shallow orbits	1
Flattened ears	1
Low ears	7
Ears with small anti-helices	1
Ears with abnormally bent helices	2
Ears with unfolded helix	1
Ears with square helix	1
Ears with prominent helical root	1
Dysplastic ears	3
Cauliflower shaped ear	1
Ears rotated posteriorly	3
Big ears	8
Thick ears	3
Small ears	4
Orchidopexy	1
Osteopenia	1
Osteoporosis	1
Otitis	1
Arched/high/huddled palate	12
Pallor	1
Thick upper eyelids	1
Panhypopituitarism	1
Bell's palsy	1
Facial nerve palsy	1
General passivity	1
Pectus Excavatum	2
Hyperelastic skin	1
Dry skin	1
Sparse pubic hair	2
Small for gestational age (SGA)	1
Partial or total hearing loss	6
Patent ductus arteriosus	1
Arched feet	1
Flat feet	4
Equinovarus feet	1
Big feet	3
Wide feet	5
Flat feet	1
Club feet	3
Valgus feet	1
Short neck	3

Wide neck	1
Pyeloectasis	1
Pyelonephritis	1
Pylorospasm	1
Placenta previa	1
Pneumonia	5
Low thumbs	1
Polydipsia	1
Polyuria	2
High nose bridge	1
Depressed/low nasal bridge	4
Thin nose bridge	1
Wide nose bridge	10
Flat nose bridge	1
Little tendon reflex	1
Palm pleats	2
Plantar folds	1
Redundant foreskin	1
High pressure	1
Constipation	1
Neurological problems	1
Zygomatic prominence	1
Suppressed basal prolactin	1
Mitral valve prolapse	1
Abnormal insulin/glucose ratio	1
Ptosis	4
Early puberty	2
Small chin	3
Pointed/protruding chin	4
Depressed nasal root	1
The wide and flat nasal root	1
Exaggerated deep tendon reflexes	3
Flat malar region	1
Prominent occipital and/or frontal region	1
Regurgitation	1
Reluctance to eye contact	1
Insulin resistance	2
Restricted forearm pronation	1
Restriction in forearm supination	1
Mental retardation	9
Retrognathia	1
Eye roll	1
Joint stiffness	1
Permanent salivation	1
Saturnism	1
Babinski's sign	2
Syndactyly	4
Synopsis	6
Thick eyebrows	3
Imperceptible eyebrows	1
Straight and/or thin eyebrows	9
Fetal distress	2
Above normal somatomedin C	1
Heart murmur	2
Sweating	1
Prominent underlying cerebral sulci	1



Telangiectasia	1
High and/or prominent forehead	12
Big testicles	2
Small testicles	5
Tetralogy of Fallot	1
Shyness	1
Toe walking	1
Decreased glucose tolerance	1
Increased nuchal translucency	1
Attention deficit disorder	3
Stereotyped movement disorder	1
Tremors	1
Trichotillomania	1
Short trunk	1
High TSH	1
Benign tumor	1
Hyperconvex nails	1
Dystrophic nails	1
Fragile nails	1
Small nails	1
Deep nails	1
Use of non-verbal communication	1
Wide ventricles of the corpus callosum	1
Ventriculomegaly	1
Volvulus	1
Frequent vomiting	1

