



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
MESTRADO EM NEUROLOGIA

CATIELLY FERREIRA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI EM
PACIENTES SUSPEITOS**

RIO DE JANEIRO
2011

CATIELLY FERREIRA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI EM
PACIENTES SUSPEITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Antão
Paiva

RIO DE JANEIRO
2011

616.8
R672i

Rocha, Catielly Ferreira,
Investigação molecular da síndrome de Prader-Willi em
pacientes suspeitos. / Catielly Ferreira Rocha - Rio de
Janeiro, 2011.

70 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Antão Paiva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do
Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Mestrado em Neurologia, 2011.

1. Síndrome de Prader-Willi. 2. Deleção. 3. Metilação. I.
Paiva, Carmen Lucia Antão. II. Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro. III. Título.

CATIELLY FERREIRA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI EM
PACIENTES SUSPEITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Antão Paiva

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Antão Paiva
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Rosa Rita Martins
Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione

Prof^o. Dr^o. Eduardo Matos Nogueira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Ao meu pai, Manoel Rocha (*in memoriam*)
por tudo que me ensinou e pelo incentivo
na realização do mestrado.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Carmen Lúcia Antão Paiva pelo carinho e aprendizado durante todo o mestrado.

À co-orientadora Suely Rodrigues dos Santos por todo ensinamento e pelo tempo que disponibilizou para me ensinar no laboratório de citogenética.

À Dr^a. Joelma Freire de Mesquita por ter me indicado como estagiária ao laboratório de genética da UNIRIO, o que me possibilitou a oportunidade de ingressar no mestrado.

Aos queridos amigos Elizabeth Duarte, Luciana Agostinho, Diego Rodrigues, Eduardo Nogueira e Isabella Campos pela ajuda no laboratório.

À gentileza da Dr^a. Sônia Middleton, Dr^a. Rosa Rita Martins, Dr^a. Márcia Ribeiro, Dr. Ney Boa Sorte, Dr^a. Juliane Dalbem, Dr. Fernando Vargas e a equipe de genética do Instituto Fernandes Figueira, pelo encaminhamento dos pacientes.

À professora Regina Lugarinho, pelas sugestões na dissertação de mestrado.

À Dr^a Greice Andreotti de Molfetta da Universidade Federal de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela validação externa das amostras.

Ao André Andrade pela ajuda na captura das imagens com o software Geneall®.

Ao laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da Fiocruz pelo uso do Nanodrop®.

Ao suporte financeiro da CAPES/PROAP, UNIRIO e FINEP/CT-Infra.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) cursa com obesidade e deficiência mental, devido à falta da expressão de genes localizados no braço longo do cromossomo 15 de origem paterna. O diagnóstico clínico da síndrome baseia-se em critérios propostos por Holm e colaboradores (1993), que consistem no somatório de pontos obtidos pela presença de sinais e/ou sintomas comuns na doença. Posteriormente, esses critérios foram revisados por Gunay-Aygun e colaboradores que propuseram novos critérios baseados em sinais e sintomas para cada faixa etária com a finalidade de apontar para a identificação de indivíduos que deveriam ser submetidos ao teste molecular. Os objetivos do trabalho são: 1) identificar em nível molecular a SPW, por meio do teste de metilação (Martínez et al., 2006) em 45 pacientes com o quadro clínico completo ou parcial da síndrome, 2) verificar se o diagnóstico molecular era compatível com o diagnóstico clínico baseado nos critérios de Holm e Gunay, e 3) investigar a presença de deleção nos pacientes com análise molecular positiva. O teste de metilação do éxon-1 do gene *Small Nucleolar Ribonucleoprotein Polypeptide N (SNRPN)*, utiliza a enzima de restrição McrBC. A técnica de FISH foi realizada segundo o protocolo da *CytoCell®*, que utiliza a sonda da região Prader-Willi/Angelman, juntamente com a sonda subtelomérica específica (15qter) para o controle da técnica de FISH. Dos 45 pacientes suspeitos, 13 tiveram resultados positivos da investigação molecular para SPW, portanto a técnica detectou 13 pacientes com SPW. Destes, um paciente tinha sido classificado apenas segundo os critérios de Holm, dois segundo a proposta de Gunay e oito segundo ambos e dois não apresentaram sinais e sintomas que preenchessem os critérios de classificação de Holm ou Gunay. Com relação aos 32 pacientes negativos, três preenchem os critérios de Holm, nove os de Gunay, oito preencheram ambos os critérios e doze nenhum dos critérios. A técnica de FISH detectou oito pacientes com deleção 15q11-13 dentre os 10 com resultado do teste de metilação positiva. Por meio do diagnóstico clínico por pontuação de Holm houve muitos pacientes falsos positivos e falsos negativos para a SPW, o que pôde ser detectado pelo teste de metilação. Portanto, a análise do padrão de metilação do éxon-1 do gene *SNRPN* para o diagnóstico da Síndrome de Prader-Willi é fundamental para o diagnóstico definitivo. Palavras-chave: Síndrome de Prader-Willi. Deleção. Metilação.

ABSTRACT

Prader-Willi syndrome (PWS) usually shows obesity and mental disability due to lack of expression of genes located on the long arm of chromosome 15 (15q11-13) of paternal origin. Its clinical diagnosis is based on criteria proposed by Holm et al. (1993), which consist of the sum of points obtained from a list of common signs and symptoms of PWS. In 2001, these criteria were revised by Gunay-Aygun et al., and the signs and symptoms were classified according to the age group. These criteria point towards the patients who should undergo molecular testing. The aims of this work were to identify at molecular level the Prader-Willi syndrome through methylation test (Martínez et al., 2006) in 45 Brazilian patients with clinical suspicion of PWS; to verify whether the molecular diagnosis is compatible with the clinical diagnosis based on Holm and Gunay-Aygun's criteria; and to investigate the presence of deletions in patients who were positive for methylation test. The molecular test of the exon-1 of *Small Nucleolar Ribonucleoprotein Polypeptide N* gene (*SNRPN*) used for detecting PWS employs a restriction enzyme (McrBC). The FISH technique was performed according to protocol Cytocell®, which uses the probe Prader-Willi/Angelman the region, along with specific subtelomeric probe (15qter) for the control of the FISH technique. Out of 45 patients suspected, 13 had positive results of molecular analyse to PWS, so the technique detected 13 patients with PWS. Of these, one patient had been compatible only Holm, two Gunay based and eight on based both and two showed no signs and symptoms that filled the classification of Holm or Gunay's criteria. Of the negative patients, three filled the Holm's criteria, nine Gunay's criteria, eight filled criteria both and twelve none of the criteria. The FISH technique detected eight patients with deletion 15q11-13. By means of clinical diagnosis by Holms et al.'s criteria led false positives and false negatives for PWS which could be detected by the test of methylation. Therefore, the analysis of the pattern of methylation of exon-1 *SNRPN* gene for the diagnosis of Prader-Willi syndrome is crucial for definitive diagnosis.

Key words: Prader-Willi Syndrome. Deletion. Methylation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ideograma do cromossomo 15	25
Figura 2	Diferentes formas de dissomia uniparental	29
Figura 3	Exemplo de uma família com mutações no Centro de <i>Imprinting</i>	31
Figura 4	Ideograma das possíveis causas cromossômicas da SPW	32
Figura 5	Roteiro da investigação laboratorial da SPW	40
Figura 6	Eletroferese em gel de agarose dos produtos de amplificação do éxon-1 do gene <i>SNRPN</i> dos pacientes 27, 28, 30 ao 35	43
Figura 7	Par de cromossomos 15 dos pacientes 1 4 e 12	44
Figura 8	Imagens da Técnica de FISH pela microscopia de epifluorescência	45
Figura 9	Imagem da Técnica de FISH pela microscopia de epifluorescência	46
Gráfico 1	Aplicação dos critérios de Holm e Gunay a todos os 45 pacientes com suspeita clínica	48
Gráfico 2	Aplicação dos critérios de Holm e Gunay aos 13 pacientes com PCR positiva para SPW	49
Gráfico 3	Aplicação dos critérios de Holm e Gunay aos 32 pacientes com PCR negativa para SPW	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios para o diagnóstico clínico da SPW segundo Holm e colaboradores (1993)	18
Tabela 2	Critérios sugeridos para solicitação da análise genética para SPW segundo Gunay-Aygun e colaboradores (2001)	19
Tabela 3	Sequência dos primers	37
Tabela 4	Resultado da investigação clínica e genética da SPW nos pacientes suspeitos	42
Tabela 5	Sinais e sintomas para SPW presentes em indivíduos com deleção 15q11-13 e sem deleção	47
Tabela 6	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e seus respectivos intervalos de confiança (IC) do diagnóstico de Holm e da indicação de Gunay-Aygun	50
Tabela 7	Frequência do sinal ou sintoma na amostra, sensibilidade e especificidade de cada sinal ou sintoma proposto por Holm	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SPW	Síndrome de Prader-Willi
15q11-13	Braço longo do cromossomo 15 na região 1 entre as bandas 1 e 3
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DUPm	Dissomia uniparental materna
LH	Hormônio Luteinizante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
(CH3)	Grupo Metil
CpG	Citosina Fosfato Guanina
DNMT	DNA-metiltransferase
SAH	Adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
5mC	5-metil citosina
CI	Centro de <i>imprinting</i>
CI-SPW	Centro de <i>imprinting</i> da Síndrome de Prader-Willi
CI-SA	Centro de <i>imprinting</i> da Síndrome de Angelman
SNRPN	<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N</i>
SNURF	<i>upstream reading frame</i>
GCP5	<i>TUBULIN-GAMMA COMPLEX-ASSOCIATED PROTEIN 5</i>
CYFIPI	<i>CYTOPLASMIC FMRP-INTERACTING PROTEIN 1</i>
NIPA-1	NONIMPRINTED GENE IN PRADER-WILLI SYNDROME/ANGELMAN SYNDROME CHROMOSOME REGION 1
NIPA-2	<i>NONIMPRINTED GENE IN PRADER-WILLI SYNDROME/ANGELMAN SYNDROME CHROMOSOME REGION 2</i>
MKRN3	<i>ZINC FINGER PROTEIN 127</i>
MAGEL2	<i>MAGE-LIKE 2</i>
NDN	Necdin
C15ORF2	<i>CHROMOSOME 15 OPEN READING FRAME 2</i>
snoRNA	<i>SMALL NUCLEOLAR RNA</i>
UBE3A	<i>UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE E3A</i>
ATP10A	ATPase
GABRB	GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID RECEPTOR
OCA2	<i>ALBINISM, OCULOCUTANEOUS, TYPE II</i>
PQ	Ponto de Quebra

SmN	<i>Small Nucleolar</i>
XIST	<i>X INACTIVATION-SPECIFIC TRANSCRIPT</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
rpm	Rotações por minuto
GTG	Giemsa Tripsina Giemsa
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	HISTÓRICO DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI	15
2.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SPW	16
2.2.1	Características clínicas no período Pré-natal e Neo-natal	19
2.2.2	Características clínicas na Infância	20
2.2.3	Características clínicas nos Adolescentes e Adultos	21
2.3	GENÉTICA	22
2.3.1	<i>Imprinting</i> genômico	22
2.3.2	Região 15q11-13	24
2.3.3	Genes envolvidos na Síndrome de Prader-Willi	26
2.4	ETIOLOGIA DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI	28
2.4.1	Deleção 15q11-13	28
2.4.2	Dissomia Uniparental Materna	28
2.4.3	Defeito no <i>imprinting</i>	30
2.4.4	Reorganizações Cromossômicas	30
2.5	ACONSELHAMENTO GENÉTICO	32
2.6	ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO	33
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	PACIENTES	35
4.2	MÉTODOS	36
4.2.1	Coleta de sangue	36
4.2.2	Investigação molecular por digestão metilação-dependente seguida de PCR	36
4.2.3	Análise citogenética	38
4.2.4	Análise citogenética molecular por meio do FISH	39
4.2.5	Documentação	40
5	RESULTADOS	41
5.1	DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	41
5.2	DIAGNÓSTICO GENÉTICO LABORATORIAL	43
5.2.1	Investigação molecular por PCR	43

5.2.2	Investigação citogenética em alta resolução e FISH	43
5.2.3	Pacientes com alteração citogenética	46
5.3	Associação genótipo-fenótipo	47
5.4	Diagnóstico por Holm e indicação genética por Gunay	48
6	DISCUSSÃO	52
6.1	DIAGNÓSTICO GENÉTICO LABORATORIAL	52
6.2	PACIENTES COM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA	53
6.3	ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO - FENÓTIPO	54
6.4	DIAGNÓSTICO POR HOLM E INDICAÇÃO MOLECULAR POR GUNAY	55
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	APENDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66
	APENDICE B - Protocolo do Paciente	69
	ANEXO A - Protocolo Cytocell, FISH	70

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma desordem neurogenética (BUTLER et al., 1990 apud BITTEL; BUTLER, 2005) caracterizada por alterações neurometabólicas (PINTO et al., 2007) que afetam o neurodesenvolvimento (BUTLER et al., 1990 apud BITTEL; BUTLER, 2005) devido às disfunções hipotalâmicas (CASSIDY, 1997). Suas principais características clínicas são: hipotonia neonatal, dificuldade de sucção, ganho excessivo de peso a partir de 1 ano de idade devido a hiperfagia, deficiência mental, hipogonadismo e características faciais (Cassidy e Driscoll, 2008).

Um estudo epidemiológico realizado na América do Norte estima uma incidência de 1:10.000 - 20.000 nascidos vivos, acometendo igualmente ambos os sexos (BURD et al., 1984 apud CASSIDY, 1997) com 350.000 a 400.000 pessoas afetadas no mundo. Está presente em todos os grupos étnicos, mas é mais frequente em caucasianos (BUTLER et al., 1982 apud BITTEL et al, 2005). Na maioria dos casos a condição é esporádica, tendo sido reportados poucos casos familiares (SAITOH et al., 1997 apud FRIDMAN et al., 2000).

1.1 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A deficiência mental e a obesidade possuem uma frequência significativa na população. A Síndrome de Prader-Willi é uma doença genética que cursa com obesidade e deficiência mental. Até onde se sabe, há ausência na literatura científica da incidência das diferentes etiologias genéticas da Síndrome de Prader-Willi no Brasil. Vale ressaltar que a determinação da etiologia genética é importante, pois existe uma correlação entre o genótipo e o fenótipo (Cassidy e Driscoll, 2008).

A obesidade, por si só, traz riscos de co-morbidade a ela associados, tais como o diabetes mellitus, a hipertensão arterial e outras doenças crônicas. Como os pacientes apresentam hiperfagia desde os primeiros anos de vida, o atendimento multidisciplinar deve ser oferecido logo que o diagnóstico seja estabelecido para evitar complicações clínicas da síndrome, além do aconselhamento genético, que pode avaliar o risco de recorrência na família.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Um relato inicial da síndrome foi feito por John Langdon Down (1828-1896) em seu livro *Mental Affections of Childhood and Youth* (1877), usando o termo "*polysarcia*" para o conjunto de sintomas. Down descreveu o caso de uma menina que aos 14 anos apresentava deficiência mental, 1,32m de altura e 84kg, e que aos 25 anos de idade pesava 95,4kg. Down ainda afirmou: "*Seus pés e mãos permaneceram pequenos e ela não tinha pêlos nas axilas e quase nenhum sobre o púbis. Ela nunca menstruou nem apresentou o menor instinto sexual*".

A síndrome de Prader Labhart e Willi foi descrita pela primeira vez em 1956 pelo Dr. Andrea Prader, Dr. Alexis Labhardt e Heinrich Willi, a partir da observação do fenótipo de nove crianças que possuíam em comum baixa estatura, deficiência mental, obesidade e mãos e pés pequenos (PRADER et al., 1956). Cinco anos depois Prader e Willi reanalisaram a condição, associando ao fenótipo a hipotonia muscular na infância e o desenvolvimento de diabetes mellitus. Desde então ficou mais conhecida como síndrome de Prader-Willi (SPW) (PRADER et al., 1961).

Em 1981 foram relatadas as primeiras evidências citogenéticas que associaram a SPW com uma deleção intersticial entre as bandas 1 e 3 da região 1 do braço longo do cromossomo 15 (15q11-13). Esta deleção foi detectada através da técnica de alta resolução em alguns pacientes, mas não em todos analisados (LEDBETTER et al., 1981 apud BITTEL; MERLIN, 2005).

Dois anos após, Butler e Palmer (1983) analisaram os cromossomos 15 dos pais de crianças com SPW e nenhuma alteração estrutural foi encontrada, além de demonstrarem que a deleção presente nos afetados ocorria sempre no cromossomo 15 de origem paterna.

Utilizando sondas de DNA específicas para a região 15q11-13, onde a deleção não foi encontrada, foi possível mostrar que em alguns casos de SPW os dois cromossomos 15 dos pacientes eram provenientes da mãe, ou seja, ocorria dissomia uniparental materna do cromossomo 15 (DUPm). Este achado sugeriu que a origem parental da alteração cromossômica influenciava o fenótipo (NICHOLLS et al., 1989 apud BITTEL; MERLIN, 2005).

A deleção equivalente à encontrada na SPW, porém no cromossomo 15 de origem materna (MAGENIS et al., 1987) é uma das causas da Síndrome de Angelman (KNOLL et al., 1989), que se caracteriza por deficiência mental severa, dificuldades na fala, distúrbios no sono, convulsões, movimentos desconexos e sorriso frequente; portanto com aspectos clínicos diferentes daqueles encontrados na SPW (PAPROCKA et al., 2007).

O *imprinting* genômico foi proposto a partir da observação que a mesma alteração cromossômica com diferente origem parental, resultava em fenótipos inteiramente distintos. Consequentemente ficou clara a necessidade da herança e integridade biparental do cromossomo 15 materno e paterno, para o desenvolvimento normal do indivíduo (NICHOLLS et al., 1989 apud BITTEL; MERLIN, 2005).

Hoje a SPW é uma das síndromes de microdeleção cromossômica mais comum, e a forma mais frequente de obesidade de causa genética. É também a primeira doença humana envolvida em um evento epigenético, o *imprinting* genômico; além de ser a primeira desordem descrita como causa de dissomia uniparental (NICHOLLS et al., 1989 apud CASSIDY, 1997).

Assim, a SPW ocupa um importante lugar na história contemporânea das desordens genéticas.

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

A SPW afeta múltiplos sistemas corporais e a maioria das manifestações fenotípicas estão relacionadas com disfunções hipotalâmicas, como a baixa estatura, hipogonadismo (CRINO et al., 2003 apud WANTTENDORF et al, 2005) e hiperfagia (HOLM et al., 1993 apud GOLDSTONE, 2004). Suas principais características clínicas são: hipotonia, hiperfagia com posterior obesidade, baixa estatura, hipogonadismo, mãos e pés pequenos, deficiência mental e problemas comportamentais.

O diagnóstico clínico da síndrome é difícil uma vez que as características mudam conforme a idade do paciente e podem estar presentes em outras síndromes (FRIDMAN et al., 2000).

Para auxiliar o diagnóstico clínico da SPW, Holm e colaboradores (1993) estabeleceram critérios maiores e menores (Tabela 1) referentes às características fenotípicas e comportamentais, que consistem no somatório de pontos obtidos pela presença de sinais e/ou sintomas, classificados em maiores (valor creditado: 01) e menores (valor creditado: 0,5), conforme sua frequência nos pacientes com SPW. O diagnóstico é estabelecido se o somatório perfizer 5 pontos, em idade igual ou inferior a três anos, sendo quatro pontos de critérios maiores; e se perfizer um total de 8 pontos, se a idade for superior a 3 anos, e destes, 5 pontos forem devidos à presença de critérios maiores.

Em 2001, com a possibilidade de rastreamento molecular para a SPW, foram propostos por Gunay-Aygun e colaboradores (2001) critérios clínicos para a solicitação da investigação molecular (tabela 2), caso o paciente apresentasse os seguintes critérios correspondentes à sua faixa etária: 0 a 2 anos, hipotonia com má sucção; 2 a 6 anos, hipotonia com história de má sucção e atraso global do desenvolvimento; 6 a 12 anos, hipotonia com história de má sucção, com atraso global do desenvolvimento e excessiva ingesta alimentar; acima de 12 anos, funções cognitivas prejudicadas, excessiva ingesta alimentar, hipogonadismo hipogonadotrópico e/ou problemas comportamentais típicos (tabela 2).

Tabela 1: Critérios para o diagnóstico clínico da SPW segundo Holm e colaboradores (1993)

Critérios maiores (1.0 ponto)
Hipotonia neonatal
Dificuldade de alimentação na infância ou retardo do desenvolvimento neuro-psicomotor
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano
Hipogonadismo
Deficiência mental, problemas de aprendizado
Hiperfagia, obsessão por comida
Características faciais (olhos amendoados, lábio superior pouco espesso)
Deleção do <i>locus</i> 15q11-q13 em análise citogenética
Critérios Menores (0.5 ponto)
Diminuição dos movimentos fetais
Problemas de comportamento (5 destes: fúria, acessos de violência, obsessivo-compulsivo, argumentativo, rígido, possessivo, teimoso, mentiroso, cleptomania)
Apnéia do sono
Baixa estatura
Cabelos, olhos e pele mais claros
Mãos e pés pequenos
Mãos estreitas
Miopia
Saliva viscosa
Defeito na articulação das palavras
Lesões de pele (auto-agressão)

Critérios diagnósticos: 5 pontos, sendo 4 de critérios maiores em pacientes com idade ≤ 3 anos; 8 pontos, sendo 5 de critérios maiores em pacientes com idade > 3 anos.

Tabela 2: Critérios sugeridos para solicitação da análise genética para SPW segundo Gunay-Aygun e colaboradores (2001)

Faixa etária	Manifestações clínicas
0 a 2 anos	1. Hipotonia com má sucção
2 a 6 anos	1. Hipotonia com história de má sucção 2. Atraso global do desenvolvimento
6 a 12 anos	1. História de hipotonia com má sucção (a hipotonia geralmente persiste) 2. Atraso global do desenvolvimento 3. Excessiva ingestão alimentar (hiperfagia, obsessão por alimento) com obesidade central resultante se não controlada
Maiores de 12 anos	1. Funções cognitivas prejudicadas; geralmente deficiência mental moderada 2. Excessiva ingestão alimentar (hiperfagia, obsessão por alimento) com obesidade central resultante se não controlada 3. Hipogonadismo Hipogonadotrófico e/ou problemas comportamentais típicos (incluindo transtornos obsessivo-compulsivos)

A análise genética está indicada caso os pacientes com suspeita diagnóstica de Prader-Willi apresentem todos os sinais e/ou sintomas correspondentes à sua faixa etária

2.2.1 Características clínicas no período pré-natal e neonatal

Mães com experiência em outras gestações normais na maioria dos casos relatam atividade fetal diminuída durante a gestação de filhos com SPW (SCHINZEL, 1986 apud OMIM). Este movimento fetal diminuído é decorrente da hipotonia que se manifesta também no período neonatal. É comum a posição fetal anormal no momento do parto, havendo necessidade de cesariana (MILLER et al., 1999 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

Características como polidrâmnio, diminuição dos movimentos fetais, e alteração do ritmo cardíaco fetal podem alertar os médicos para a possibilidade da SPW em fetos (FONG; DE VRIES, 2003), assim como um leve atraso no crescimento pré-natal, com peso médio de aproximadamente 2,8 kg (STEPHENSON, 1980 apud OMIM).

A hipotonia é uma característica importante no recém-nascido com SPW, e pode estar implicada na deficiência de sucção, redução da função pulmonar e maior susceptibilidade a infecções (HAKONARSON et al., 1995). A hipotonia não é progressiva e melhora com o passar do tempo e os estudos eletroneuromusculares e biopsias musculares podem mostrar atrofia de fibras tipo II, mas este achado não é específico (FRIDMAN et al., 2000).

Assim como a hipotonia, outras características inespecíficas importantes são encontradas em neonatos, como a diminuição ou ausência de choro, sonolência (CRINO et al., 2003 apud WATTENDORF et al., 2005), hiporreflexia, má alimentação devido à diminuição dos reflexos de deglutição e sucção, que em muitos casos, exige sonda de alimentação (MILLER et al., 1999 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

Em ambos os sexos, o hipogonadismo hipogonadotrópico se manifesta em decorrência de uma disfunção hipotalâmica. Em meninos pode ocorrer criptorquidia com hipoplasia de pênis e escroto, e nas meninas hipoplasia genital (STEPHENSON, 1980 apud OMIM). O tamanho das mãos e pés no primeiro ano de vida pode ser normal e não acompanham a idade cronológica (CHITAYAT et al., 1989 apud OMIM).

Casos de apnéia grave foram relatados em recém-nascidos que apresentaram SPW, havendo necessidade de ventilação mecânica transitória. A insuficiência respiratória que se apresenta depois de alguns dias de vida pode ser uma característica clínica neonatal para o diagnóstico da síndrome (VINTÉJOUX et al., 2009).

2.2.2 Características clínicas na infância

Dificuldades de alimentação, em geral, melhoram com a partir da idade de seis meses. A partir de 12 a 18 meses em diante, há uma hiperfagia incontrolável, causando problemas psicológicos e somáticos. A hiperfagia é de origem hipotalâmica resultando na falta de saciedade (HOLLAND et al., 1993).

Mãos e pés pequenos com dedos delicados e afilados são vistos na maioria das crianças e adolescentes; o tamanho das mãos e pés correlaciona-se bem coma

estatura, mas não com a idade cronológica. Além disso, o tamanho do pé tende a ser inferior ao tamanho da mão (HUDGINS E CASSIDY, 1991 apud OMIM).

A face é caracterizada por um diâmetro bifrontal estreito, olhos amendoados, estrabismo, lábio superior afilado com os cantos da boca voltados para baixo (HOLM et al., 2003, apud WATTENDORF et al., 2005). A obesidade pletórica torna a característica mais marcante. A partir da idade de seis anos, muitas crianças apresentam cicatrizes de arranhões devido ao prurido e, quando obesos quase todos mostram estrias abdominais (BUTLER et al., 1989 apud OMIM).

A hipopigmentação de cabelo, pele e olhos podem estar presentes (HOLM et al., 2003), além da diminuição da sensibilidade à dor (BUTLER, 1990 apud FRIDMAN et al., 2000).

2.2.3 Características clínicas nos adolescentes e adultos

A hipotonia melhora gradualmente e os adultos permanecem com um tônus muscular diminuído. Sugerindo que a hipotonia é um fator de risco que contribui para o estrabismo, escoliose e infecções respiratórias (BUTLER et al., 2002).

Distúrbios no sono como a sonolência diurna é comum e pode ser devido a uma disfunção do hipotálamo (CLIFT et al., 1994).

Em ambos os sexos a puberdade é tipicamente atrasada ou incompleta. O hipogonadismo é de origem hipotalâmica, portanto hipogonadotrópico, com redução dos níveis séricos de LH e FSH e, conseqüentemente, de testosterona e estrógeno. A menarca pode ocorrer até a terceira década de vida, embora seja mais frequente amenorréia ou oligomenorréia. Nos homens, há uma mudança de voz sutil, barba escassa e pouco pelo no corpo. Em ambos os sexos, pouco ou nada se sabe sobre a atividade sexual, que se acredita ser deficiente, e a maioria dos indivíduos afetados são considerados inférteis. Apesar disso, alguns casos de reprodução foram relatados e ocorreram nas mulheres portadoras da SPW (CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

Qualquer tentativa em reduzir a ingestão de alimentos nestes adolescentes leva a sérios problemas psicológicos e comportamentais e, em algumas crianças, a situação em seu ambiente familiar torna-se intolerável (CURFS et al., 1991).

Os pacientes raramente sobrevivem além de 25 a 30 anos de idade, devido ao alto consumo energético decorrente da hiperfagia. As causas de morte mais comuns são apnéia, diabetes e insuficiência cardíaca. No entanto, se a apnéia é tratada, e o controle rigoroso de peso é atingido, a expectativa de vida aumenta (CURFS et al., 1991).

2.3 GENÉTICA

2.3.1 *Imprinting* Genômico

O *imprinting* genômico foi descrito pela primeira vez em plantas e era desconhecido na genética humana até a descoberta da Síndrome de Prader-Willi. Contrariando as leis Mendelianas, onde a herança parental da informação genética não influenciava a expressão gênica, o *imprinting* genômico é caracterizado pela adição do radical metil (CH_3) a uma citosina em ilhas CpG, produzindo diferentes fenótipos dependendo da origem parental da mutação (ALBERTS et al., 2000).

A metilação do DNA nos vertebrados é restrita aos nucleotídeos de citosina (C) na sequência CG, que faz o pareamento de bases com a mesma sequência (na orientação oposta) na outra fita da hélice de DNA. Consequentemente, um mecanismo simples permite a existência de um padrão de metilação do DNA a ser herdado diretamente pelas fitas-filhas de DNA. Uma enzima chamada metiltransferase de manutenção, atua preferencialmente naquelas sequências 5'...CG...3' que estão pareadas com uma sequência 3'...GC...5' que já está metilada. Como resultado, o padrão de metilação do DNA da fita filha de DNA parental serve como molde para a metilação da fita-filha de DNA, tornando este padrão diretamente herdável após a replicação do DNA (ALBERTS et al., 2000).

Durante a formação das células germinais, os genes sujeitos ao *imprinting* são marcados por metilação, com um padrão próprio conforme estejam presentes no espermatozóide ou no óvulo. Dessa maneira, a origem parental do gene pode ser, subsequentemente, detectada no embrião; a metilação do DNA é usada como um marcador para distinguir duas cópias de um gene que, de outro modo, poderiam ser idênticas. Como os genes “imprintados” não são afetados pela onda de desmetilação que ocorre logo após a fertilização, esse marcador possibilita que as

células somáticas “relembrem” a origem parental de cada uma das duas cópias do gene (ALBERTS et al., 2000).

O processo de metilação é catalisado por uma família de enzimas denominadas DNA-metiltransferases (DNMT), que transferem um grupamento metil para o carbono 5' do anel da citosina, utilizando como doador de metil, a S-adenosilmetionina (SAM). A DNMT catalisa a transferência do grupo metil do SAM para o DNA, resultando em um DNA metilado e em uma S-adenosilhomocisteína (SAH) sem o grupamento metil (VAN DEN VEYER, 2002).

A DNMT1 é uma metiltransferase semiconservativa e atua durante a replicação do DNA, reconhecendo preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita (DNA hemimetilado), convertendo as fitas recém-sintetizadas para o seu padrão de metilação, sem induzir uma nova metilação (metilação de novo) (TURKER, 2002 apud FAGUNDES, 2009).

Foram descritas duas DNMT responsáveis pela metilação em DNA não metilado (metilação de novo) em mamíferos, DNMT3a e DNMT3b (Szyf, 2003 apud Fagundes, 2009), as quais metilam com igual eficiência o DNA hemimetilado e não metilado, *in vitro* e *in vivo*, e são altamente expressas em células tronco embrionárias (YANG et al., 2001 apud FAGUNDES 2009). Estas enzimas, geralmente, atuam no processo de metilação de novo, adicionando grupos metilas em locais do DNA em que não existe metilação, mesmo na fita complementar (OKANO et al., 1999 apud FAGUNDES 2009).

O processo de desmetilação pode ocorrer de forma passiva, onde a DNMT1 é suprimida no decorrer dos ciclos de replicação do DNA ou impedida de interagir com seu substrato durante a divisão celular (SZYF, 2003 apud Fagundes, 2009). E também de forma ativa, na qual ocorre uma rápida perda de metilação do DNA no prazo de um único ciclo celular, indicando a presença de enzimas que, ativamente, removem o grupo metil da 5mC. A enzima responsável por essa ação ainda permanece desconhecida (GEHRING et al., 2009 apud FAGUNDES, 2009).

Os padrões de metilação são estabelecidos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário pelas metilases de novo DNMT3a e DNMT3b e são copiados nas células somáticas pela DNMT1 de manutenção (BIRD, 2002; TURKER, 2002 apud FAGUNDES, 2009).

Nos mamíferos, a correta metilação do DNA é essencial para que ocorra o desenvolvimento embrionário normal, envolvendo os processos de desmetilação,

metilação de novo e metilação de manutenção (NEWELL- PRICE et al., 2000 apud FAGUNDES, 2009).

Com isso, a região 15q11-13 sofre o processo de *imprinting* genômico, contendo um número de genes “imprintados” e não “imprintados” que estão sob a regulação de um centro de *imprinting* (CI) (CASSIDY, 1997).

Um elemento deste CI é chamado de Centro de *Imprinting* da Síndrome de Prader-Willi (CI-SPW), que abrange o éxon-1 do gene *SNRPN* e inclui uma ilha CpG que é objeto de uma metilação diferencial. Esta ilha CpG no alelo materno está metilada, enquanto esta mesma ilha no alelo paterno não está metilada. Outro CI chamado Centro de *Imprinting* da Síndrome de Angelman (CI-SA) atua reprimindo o CI-SPW no alelo materno a partir da formação da linhagem germinal materna. O mecanismo pelo qual o CI-SA reprime o CI-SPW é desconhecido, mas é evidente que a perda do CI-SA resulta na perda da metilação do CI-SPW materna (BRANNAN; BARTOLOMEI, 1999 apud CHAMBERLAIN; LALANDE, 2010).

2.3.2 Região 15q11-13

O segmento cromossômico 15q11-13 é de grande interesse nos estudos de genética humana porque é uma região meioticamente instável, o que possibilita uma grande variedade de rearranjos citogenéticos. Nestes incluem-se deleções, duplicações invertidas, duplicações raras, triplicações (ROBINSON et al., 1998 apud PINTO et al., 2007), além de inversões e translocações equilibradas e desequilibradas (CALOUNOVA et al., 2006; MIGNON- RAVIX et al., 2007; VARELA et al., 2004; SCHULE et al., 2005 apud PINTO et al., 2007). A causa desta instabilidade é devido a sequências repetidas de DNA nesta região chamadas de *HECT DOMAIN AND RCC1-LIKE DOMAIN* (HERC), que podem resultar em uma recombinação aberrante deste segmento durante a meiose (AMOS-LANDGRAF et al., 1999 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

A região 15q11-13 pode ser dividida em quatro segmentos distintos (Figura1): (1) região próxima ao centrômero entre o ponto de quebra 1 (PQ1) e ponto de quebra 2 (PQ2) contendo quatro genes com expressão biparental: *Tubulin-Gamma Complex-Associated Protein 5* (*GCP5*), *Cytoplasmic Fmrp-Interacting Protein 1* (*CYFIP1*), *Nonimprinted Gene In Prader-Willi Syndrome/Angelman*

Syndrome Chromosome Region 1 (NIPA1) e Nonimprinted Gene In Prader-Willi Syndrome/Angelman Syndrome Chromosome Region 2 (NIPA2); (2) região da SPW com genes de expressão exclusivamente paterna: Zinc Finger Protein (MKRN3), Mage-Like 2 (MAGEL2), Necdin (NDN), Chromosome 15 Open Reading Frame 2 (C15ORF2), Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N (SNRPN) Upstream Reading Frame (SNURF), e uma região de genes para pequenos RNA's nucleolares (small nucleolar RNA, snoRNA): HBII-436, HBII-13, HBII-438A, HBII-85, HBII-52, HBII-438B e o gene Imprinted In Prader-Willi Syndrome (IPW); (3) região da Síndrome de Angelman com genes de expressão exclusivamente materna: Ubiquitin-Protein Ligase E3A (UBE3A) e ATPase (ATP10A); (4) e uma região distal contendo genes com expressão biparental: Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Beta-3 (GABRB3), Gamma-Aminobutyric Acid Receptor 5 (GABRA5), Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Gamma-3 (GABRG3), Albinism Oculocutaneous Type II (OCA2), HERC2 (CHAMBERLAIN et al., 2010). A exata função de cada um desses genes no fenótipo da SPW ainda não foi completamente elucidada.

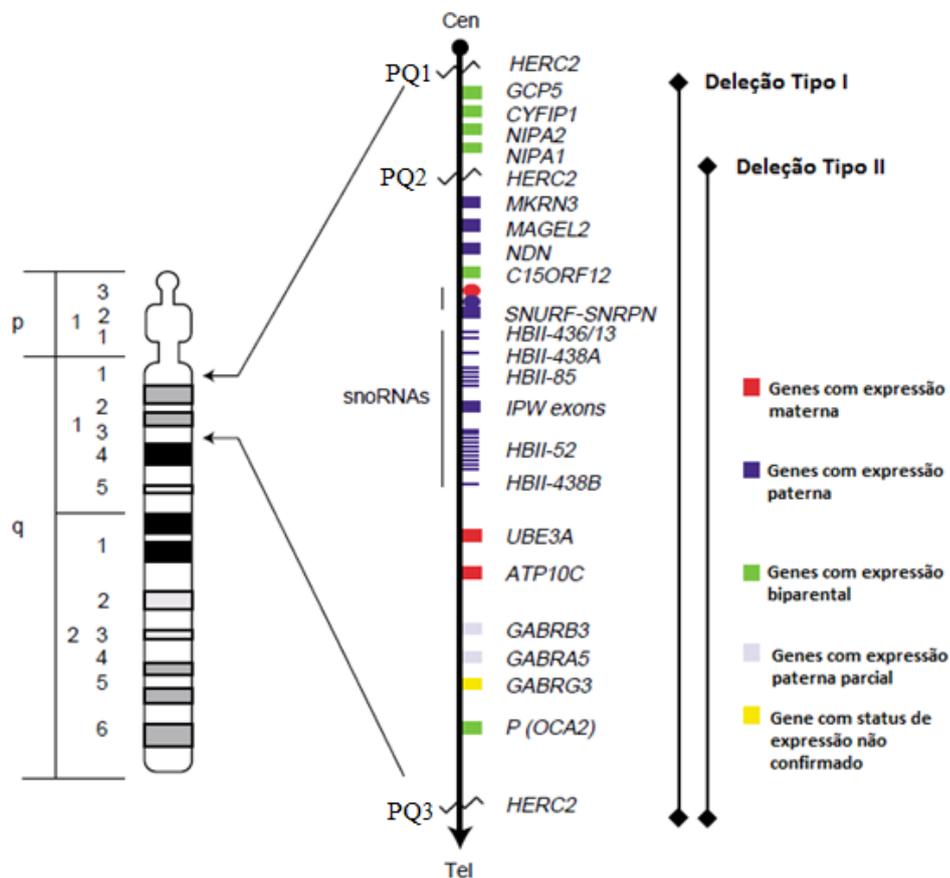


Figura 1: Ideograma do cromossomo 15, mostrando genes localizados na região típica da Síndrome de Prader-Willi. A localização dos genes na região 15q11-13 e seu estado de *imprinting* são mostrados. Abreviaturas: Cen, centrômero; Tel, telômero; PQ, ponto de quebra; CI Centro de *Imprinting*; snoRNA, *Small nucleolar RNA* (Bittel e Butler, 2005)

2.3.3 Genes envolvidos na Síndrome de Prader-Willi

A SPW pode ser classificada como uma síndrome de genes contíguos, uma vez que não há relato de pacientes com mutação em um único gene. Assim a SPW é causada pela perda de dois ou mais genes com expressão exclusivamente paterna (NICHOLLS et al., 1993 apud FRIDMAN; KOIFFANN, 2000).

Quatro genes foram identificados na região cromossômica entre o ponto de quebra 1 (PQ1) e o ponto de quebra 2 (PQ2), que está implicado na deleção tipo I que abrange o ponto de quebra 1 e 3, sendo um desses genes (*NIPA-1*) expresso também em tecido cerebral de ratos. Isto pode ser importante para o desenvolvimento cerebral e sua função. Estes genes estão ausentes em indivíduos com este tipo de deleção e estão ligados ao comportamento compulsivo e habilidade intelectual inferior, quando comparados com indivíduos com deleção tipo II, que ocorre entre o ponto de quebra 2 e 3 (BUTLER et al., 2004).

O gene *MKRN3* codifica a proteína Makorin Ring Finger 3 que contém um anel com domínio em dedo de zinco e vários domínios CH3, podendo funcionar como uma ribonucleoproteína (JONG et al., 1999).

Necdin homolog (NDN) é membro da família do *melanoma-associated antigen gene (MAGE)*, com expressão exclusivamente paterna. A função do *MAGE* ainda não está clara, mas pode desempenhar um papel na regulação do ciclo celular e apoptose (BARKER; SALEHI, 2002 apud BUTLER; BITTEL 2005). *Necdin* é detectada nos neurônios em desenvolvimento de embriões de camundongos, tanto no sistema nervoso central e periférico, com maiores níveis de expressão no diencéfalo e rombencéfalo. Após o 13º dia embrionário, *Necdin* tem se mostrado essencial para crescimento axonal (LEE et al., 2005 apud BUTLER; BITTEL 2005), e é expresso em estruturas específicas do sistema nervoso, como o hipotálamo, tálamo e ponte, sugerindo um papel no neurodesenvolvimento (ANDRIEU et al., 2003 apud BUTLER; BITTEL, 2005). Ratos com a ausência de *Necdin* apresentaram deficiência hipotalâmica, letalidade neonatal e alterações comportamentais semelhantes às observadas na SPW. Este gene também pode ser responsável por algumas das outras características clínicas de SPW (GERARD et al., 1999; MUSCATELLI et al., 2000 apud BUTLER; BITTEL, 2005), incluindo anormalidades respiratórias (BUTLER et al., 2002; DIMARIO et al., 1996 apud BUTLER et al., 2005).

O gene *MAGEL2* juntamente com *NDN* se ligam ao proteossomo ou impedem a degradação proteossômica de *FEZ1* (*fasciculation and elongation protein zeta 1*), que está implicada no crescimento axonal (LEE et al., 2005 apud OMIM).

O locus *SNURF-SNRPN* é um locus extremamente complexo de aproximadamente 465Kb, com mais de 148 éxons possíveis que sofrem *splicing* alternativo. Este locus também codifica pequenos RNA's nucleolares.

- A) *SNRPN*: Pertence a uma família de genes que codifica proteínas encontradas no spliceossomo e implicadas no *splicing* de pré-RNA; esta proteína, *SmN*, funciona como fator de *splicing* específico de neurônios (HUNTRISS et al., 1994).
- B) *SNURF*: a proteína resultante contém 71 aminoácidos enriquecidos em resíduos de arginina, sem função conhecida até agora. Este gene de expressão paterna codifica três éxons upstream (exons -1, 0, e 1) do locus *SNURF-SNRPN* que codificam para uma *open reading frame* (ORF) independente adicional (SUN et al., 1996).
- C) Centro de *Imprinting* (CI): O promotor e primeiro éxon do *SNURF-SNRPN* são componentes integrais do centro de *imprinting* que controla a regulação do *imprinting* ou atividade gênica ao longo da região cromossômica 15q11-q13. Uma interrupção, ou seja, supressão paterna, dissomia uniparental materna, defeitos no *imprinting* ou translocações cromossômicas do presente locus irá causar perda de função de genes de expressão paterna, levando à SPW (GOLDSTONE, 2004).
- D) *snoRNA*: Verificou-se que os indivíduos com a supressão completa de todas as cópias do HBII-52 não tinham o fenótipo clínico óbvio, sugerindo que HBII-52 não possui um papel importante na SPW (RUNTE et al., 2005 apud OMIM). Já a deficiência de SNORD116 (HBII-85) é a causa do hipogonadismo, obesidade e hiperfagia na SPW, entretanto outros genes nesta região podem contribuir para um fenótipo atípico da SPW. (SADDOO et al, 2008 apud OMIM).
- E) *IPW*: Não codifica proteína, porém pode ser um RNA funcional, semelhante ao gene *XIST* responsável pela inativação do cromossomo X (WEVRICK et al., 1994 apud BUTLER; BITTEL, 2005).

2.4 ETIOLOGIA DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

2.4.1 Deleção 15q11-13

Aproximadamente 70% dos casos de SPW resultam de uma deleção intersticial de 5 a 7 megabases do segmento 15q11-13. Esta perda ocorre devido à presença de segmentos repetidos com baixo número de cópias de DNA adjacentes aos pontos de quebra, na qual ocorre recombinação inter ou intracromossômica durante a meiose, resultando em deleções comuns identificadas na grande maioria dos pacientes (GLENN et al., 1997 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008). O segmento 15q11-13 possui três pontos de quebra, dois são ditos proximais (PQ1 e PQ2), devido à sua localização próxima ao centrômero quando comparado ao outro ponto de quebra que é chamado distal (PQ3).

A deleção tipo I engloba os PQ1 e PQ3, e possui um tamanho de aproximadamente 5MB, que geralmente é visível à microscopia óptica. Já a deleção tipo II se situa entre o PQ2 e PQ3, com um tamanho inferior de 500Kb (CHRISTIAN et al., 1995 apud BITTEL; BUTLER, 2005).

2.4.2 Dissomia Uniparental Materna

A dissomia uniparental materna encontrada em aproximadamente 20% dos casos de pacientes com SPW, se dá quando os dois cromossomos 15 são herdados da mãe. Este evento pode estar associado com a idade materna avançada e pode ser de dois tipos: heterodissomia, quando são recebidos os dois cromossomos homólogos; e isodissomia, quando se recebem duas cópias do mesmo homólogo (ENGEL, 1980 apud HITCHINS; MOORE, 2004), como demonstrado na figura 2.

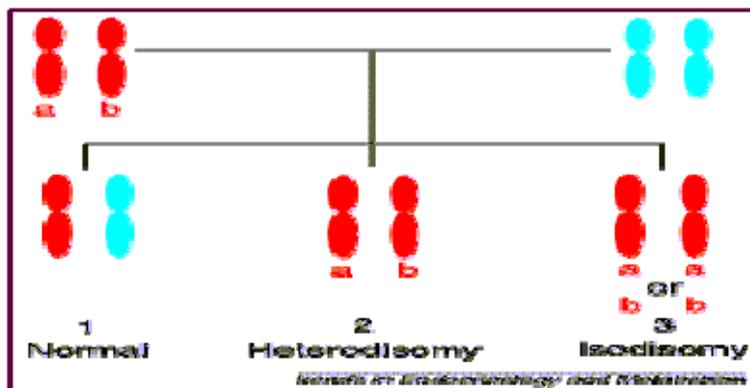


Figura 2: Diferentes formas da dissomia uniparental. 1, Indivíduo normal; 2, indivíduo com heterodissomia; 3, indivíduo com Isodissomia. Fonte: <http://genetica.ufcspa.edu.br/dissomia.html>

Os mecanismos descritos que podem causar a dissomia uniparental materna são:

A) Correção de uma trissomia: Ocorre na maioria dos casos causando uma heterodissomia materna. Resulta da não disjunção na meiose I gerando um oócito dissômico com dois cromossomos 15, que ao ser fecundado por um espermatozóide normal produz um zigoto com trissomia do 15. Esta trissomia é letal para o embrião, mas em algumas ocasiões pode ocorrer sua correção por não disjunção mitótica. A SPW se manifestará, por dissomia uniparental materna, se houver perda do cromossomo 15 paterno. Se ocorrer a perda de um dos cromossomos 15 maternos resultará em um embrião normal (PURVIS-SMITH et al., 1992).

B) Correção de uma monossomia: Um espermatozóide nulissômico é gerado devido a um erro de não disjunção na primeira divisão meiótica masculina. A fecundação de um oócito normal por este espermatozóide produz um zigoto monossômico que possui somente um cromossomo 15 materno. Este zigoto não é viável, mas uma duplicação mitótica do cromossomo 15 pode ocorrer gerando a isodissomia.

C) Complementação gamética: Resulta da não disjunção simultânea do cromossomo 15 de ambos os progenitores. A fecundação de um oócito dissômico por um espermatozóide nulissômico formaria um zigoto com dois cromossomos 15 maternos (ROBINSON et al., 1993).

2.4.3 Defeito no *imprinting*

A maioria dos defeitos do *imprinting* são epigenéticos e apresentam apenas o padrão de metilação materno, apesar da presença de ambos os alelos parentais. Nenhuma mudança na sequência do DNA foi encontrada nestas epimutações e acredita-se em um erro aleatório na espermatogênese do pai (BUITING et al., 2003 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

Aproximadamente 15% dos pacientes que apresentam um defeito no *imprinting* possuem uma microdeleção na região do centro de *imprinting* da SPW, localizada na porção 5' do gene *SNRPN* (CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

Há relato de transmissão de mutações no centro de *imprinting* que ocorre em homens e mulheres e está representado na figura 3. A alteração está no cromossomo herdado da avó paterna, o que sugere que o defeito no *imprinting* resulte de uma falha no apagamento do *imprinting* materno durante a espermatogênese (NICHOLLS et al, 1998 apud FRIDMAN; KOIFFMANN, 2000).

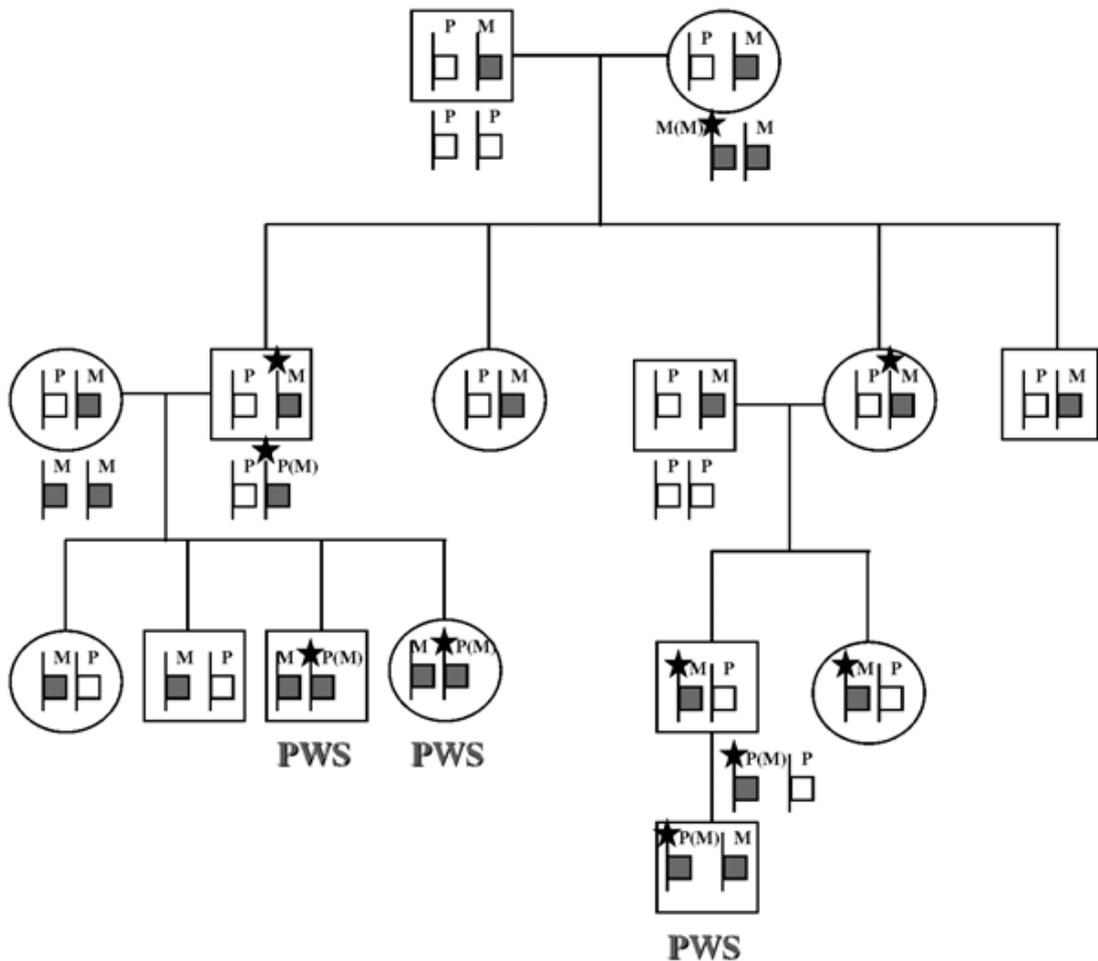


Figura 3: Exemplo de uma família com mutações no CI. A mutação pode surgir em um cromossomo 15 a partir de um ancestral feminino. Quando esta mutação passa através da gametogênese masculina não sofre as alterações epigenéticas para padrão masculino. Desta forma passa para a prole que terá a SPW, uma vez que o cromossomo paterno tem um epigenótipo feminino (Nicholls et al., 1998 apud Fridman e Koiffmann, 2000)

2.4.4 Reorganizações Cromossômicas

As reorganizações cromossômicas que originam a SPW são as translocações balanceadas, quando o ponto de quebra ocorre na região 15q11-13. Estas reorganizações são raras, com uma frequência menor que 1%. Todos os mecanismos genéticos que geram a SPW estão representados na figura 4 (NICHOLLS; KNEPPER, 2001).

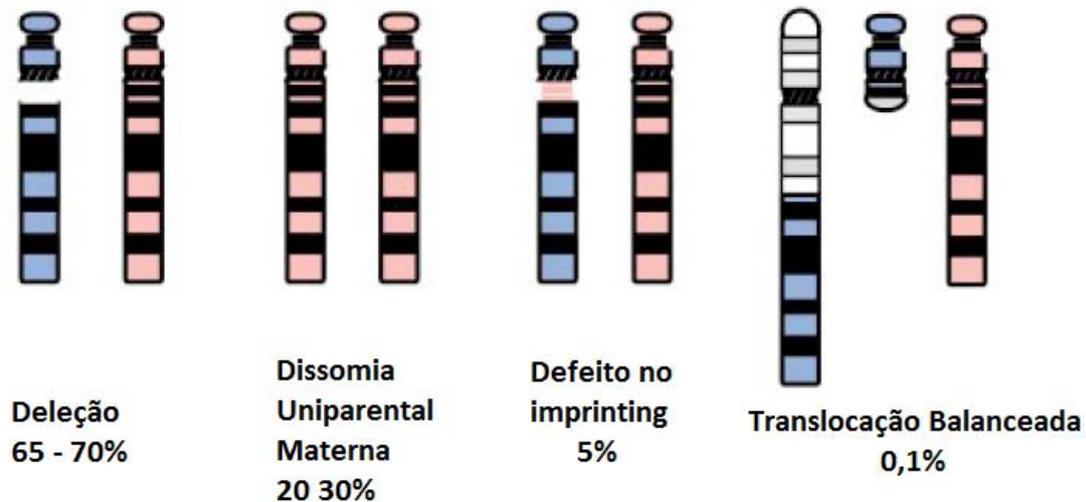


Figura 4: Ideogramas mostrando as possíveis causas cromossômicas de SPW. Em rosa, cromossomo 15 de origem materna; em azul, cromossomo 15 de origem paterno (NICHOLLS; KNEPPER, 2001)

2.5 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O risco de recorrência na família depende do mecanismo genético que gerou a SPW naquele familiar. O risco de repetição na irmandade de deleção é esporádico (<1%), exceto em raros casos onde um rearranjo cromossômico (inversão ou translocação) está presente no pai, por isso, deve ser oferecido ao pai de crianças com deleção, a investigação citogenética clássica e *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) da região 15q11-13, devido ao risco significativamente alto nestes casos.

A DUPm é tipicamente *de novo* (recorrência <1%) exceto se uma translocação robertsoniana estiver presente em qualquer um dos pais, nestes casos a análise cromossômica é indicada.

Uma proporção dos casos com defeito no *imprinting* é devido a uma microdeleção no CI, podendo ser familiar com risco de recorrência de 50%. Entretanto, a maioria dos casos com defeito no CI possuem uma mutação epigenética, e o risco de recorrência neste grupo é >1% (KUBOTA et al., 1996 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

Segundo a literatura o mecanismo genético é desconhecido em aproximadamente 5% dos pacientes com SPW, ou seja, não foram encontradas

deleções, mutações no CI ou DUPm, dificultando o aconselhamento genético (FRIDMAN; KOIFFMANN, 2000).

2.6 ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Comparações clínicas entre os três mecanismos envolvidos na gênese da SPW não foram significativas para diferenciá-los entre si, porém, observou-se que indivíduos com deleção apresentaram hipopigmentação de cabelo, pele e olhos. (BUTLER, 1989 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008). Já o avanço da idade materna é fator que colabora para ocorrência da dissomia uniparental, devido à não disjunção meiótica. Nestes pacientes, não é comum a presença de hipopigmentação, características faciais típicas ou habilidades com jogos de quebra cabeça. O QI verbal é maior e os problemas comportamentais são mais brandos que aqueles pacientes com deleção (DYKENS, 2002 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008). Além disso, psicose (HOLLAND et al, 2003 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008) e doenças do espectro autista ocorrem em alta frequência entre aqueles com DUP materna (VELTMAN et al, 2004 apud CASSIDY; DRISCOLL, 2008).

Estudos relataram que pacientes com deleção tipo I (PQ1- PQ3) possuem maior compulsão alimentar, pobre comportamento adaptativo, habilidade intelectual baixa e realização acadêmica inferior quando comparados com os pacientes com deleção tipo II (CASSIDY; DRISCOLL, 2008) e dissomia uniparental materna (BITTEL et al., 2006).

3 OBJETIVOS

- Identificar na amostra os pacientes que possuem diagnóstico clínico por Holm e colaboradores (1993) e os que possuem indicação para realização do teste molecular segundo os critérios de Gunay-Aygun e colaboradores (2001).
- Diagnosticar por teste molecular metilação-dependente a Síndrome de Prader-Willi em 45 pacientes com suspeita clínica, no período de 2009 a 2011.
- Identificar por meio da técnica de FISH, dentre os pacientes positivos para o teste molecular metilação-dependente, os que possuem a deleção 15q11-13.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade de cada critério proposto por Holm e colaboradores (1993) para o diagnóstico clínico de SPW.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Este estudo de série de casos com caráter observacional, descritivo e não analítico foi realizado no período de março de 2009 a fevereiro de 2011. Foram estudados 45 pacientes com suspeita clínica de SPW, destes 14 fizeram análise citogenética. Todos os responsáveis pelos pacientes assinaram voluntariamente o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A). O projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa do HUGG - UNIRIO em 12 de fevereiro de 2009, tendo sido aprovado com o número 04/2009 de acordo com a Resolução CNS nº 196/96.

Os critérios de inclusão neste estudo foram: pacientes com dificuldade no aprendizado (atraso escolar) e obesidade com ou sem outras características da SPW. Além desses, foram incluídos pacientes com hipotonia e outras características da SPW.

Informações pessoais e avaliação clínica de cada participante constaram do protocolo (APÊNDICE B), num total de 33 pacientes, realizado por um único médico de nossa equipe, conforme os critérios para o diagnóstico clínico, propostos por Holm e colaboradores (1993) Gunay-Aygun e colaboradores (2003). O mesmo procedimento foi feito em outros 12 pacientes pelos seus respectivos médicos assistentes, procedentes de outros estados, que nos enviaram as amostras de sangue acompanhadas dos questionários preenchidos conforme os autores citados. Este material foi enviado por Sedex 10 para o Departamento de Biologia Molecular da UNIRIO. Para simplificar a referência aos critérios de Holm e colaboradores (1993) e de Gunay-Aygun e colaboradores (2003), passaremos a chamá-los, respectivamente, de critérios de Holm e de Gunay.

Para definir a baixa estatura foi utilizada a tabela para o desenvolvimento pômbero-estatural para meninos e meninas de 1 a 19 anos de Marcondes e colaboradores (1982); para determinar pés pequenos foi utilizada a tabela de comprimento do pé para meninos e meninas de 0 a 18 anos; e para verificar mãos pequenas foi utilizada a tabela do comprimento total das mãos de 0 a 14 anos de Feingold e Bossert.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de sangue

Foram colhidos 4 ml de sangue periférico em seringa heparinizada para análise citogenética e 4 ml de sangue em tubo com EDTA para análise molecular. Dos pacientes externos foram colhidos 4 ml de sangue periférico em tubo com EDTA para análise molecular.

4.2.2 Investigação molecular por digestão metilação-dependente seguida de PCR

Em tubos com EDTA foram coletados 4 mL de sangue periférico dos pacientes e o DNA foi extraído com o Kit GE Healthcare® conforme o protocolo contido neste Kit. O DNA extraído foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nanodrop® D-1600, e utilizados 200ng para análise do padrão de metilação do éxon-1 do gene *SNRPN*, esta análise foi realizada em triplicata para cada paciente.

Para esta análise foi usada a endonuclease de restrição McrBC que cliva o sítio de restrição 5`... Pu^mC (N40 - 3000) Pu^mC... 3` presente em cromossomos normais de origem materna. Foram encubados 200ng de DNA com 1 µL da enzima de restrição McrBC suplementada com 0,2µL de GTP, 0,2 µL de BSA e 2 µL de tampão NE (50mM de NaCl, 10mM de Tris-HCl, 10mM de MgCl₂, 1mM de DTT, pH 7,9), em banho-maria a 37°C por no mínimo 4 horas, e posterior amplificação do éxon-1 do gene *SNRPN* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com 25 µL de TaqGreen Master Mix®, 4 µL do DNA digerido, e 1 µL de cada *primer* descrito na tabela 3.

Tabela 3: Sequência dos *primers*

<i>Primer</i>	Sentido	Sequência
SNRPN	Senso	5'-AGGTCATTCCGGTGAGGGAGG-3'
SNRPN	Antissenso	5'-ACCGCAGACACCCGCAATAGG-3'
H19p1	Senso	5'-GGCAACATGCGGTCTTCAGAC-3'
H19p2	Antissenso	5'-TCCGGAGACAGGGCTGAGCA-3'

O par de *primers* H19 para amplificação do gene que expressa um RNA não-codificante a partir do alelo de origem materno foi escolhido devido à sua similaridade na composição de sequência e no estado de metilação com o gene *SNRPN* (BARTHOLDI et al., 2009). Esta amplificação de *H19* foi usada como controle interno da reação em cadeia da polimerase, que resultou em um amplicon de 420 pb.

O alelo normal paterno do gene *SNRPN*, não metilado e, portanto, não cortado por McrBC, foi amplificado com os *primers* citados em material e métodos e resultou em um fragmento de 487 pares de bases.

A termocicladora para PCR (Px2 *Thermal Cycler*) foi programada da seguinte forma: um ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação da fita dupla de DNA; 30 ciclos de: 96°C por 40 segundos (desnaturação), seguido de 60°C por 60 segundos (hibridação do *primer*), 72°C por 30 segundos (alongamento das cadeias); ciclo de 72°C por 7 minutos para a extensão final das cadeias de DNA).

Após a PCR, foi realizada a identificação dos amplicons (produtos da amplificação de um segmento de DNA por PCR) por eletroforese em gel de agarose a 3% em cuba horizontal. O tampão de corrida eletroforética foi Tris-Ácido acético-EDTA. O produto da eletroforese foi corado com brometo de etídio (30 µL de uma solução de 10mg/ml em 300mL de água destilada) e visualizado no transiluminador com luz ultravioleta.

Para interpretar este resultado levamos em conta o seguinte:

1) Em indivíduos normais os resultados da eletroforese dos amplicons mostraram uma banda referente à amplificação do alelo paterno que não estava metilado, e, portanto não sofreu clivagem pela endonuclease McrBC, e uma banda referente à amplificação do gene H19 (controle da PCR);

2) Se a região paterna estava alterada, por exemplo, com deleção, não havia amplificação por PCR gerando falta deste amplicom;

3) No caso de dissomia uniparental materna o resultado da eletroforese também será negativo para a presença da referida banda do amplicom. Desta forma a técnica PCR metilação específica detecta SPW causada por deleção, por dissomia uniparental materna, ou metilação anômala na região de origem paterna.

Para simplificar a referência à investigação molecular da SPW por digestão metilação-dependente seguida de PCR, passaremos a chamar a mesma apenas de investigação por PCR.

4.2.3 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada em catorze pacientes, empregando-se a técnica clássica de Moorhead e colaboradores (1960), com ligeiras modificações instituídas no laboratório de citogenética da UNIRIO. Em tubo corning foram adicionados 15 gotas de sangue da seringa sem agulha, 6 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab®), 1,5 ml de soro fetal bovino (Cultilab®), e 0,2 ml de fitohemaglutinina, e o material foi incubado por 72 horas na estufa a 37°C. Após 70 horas de cultura, adicionou-se 0,06 ml de Chromosome Resolution Adictive® (Procell Reagents) às células em divisão para obtenção de cromossomos em alta resolução e uma hora após, acrescentou-se 16 µl/ml de colchicina (Colcemid Cultilab®) para a interrupção da mitose e, em seguida, o material foi devolvido para incubação na estufa a 37°C. Após 1 hora na estufa, o mesmo foi centrifugado por 10min a 1500 rpm para eliminação do sobrenadante com pipeta Pasteur, sendo este procedimento adotado toda vez que foi necessário separar o sobrenadante; após o descarte foram adicionados às células 6 ml de solução hipotônica (Optimal Hypotonic da Procell Reagentes) e as mesmas foram colocadas na estufa a 37°C por mais 20 minutos. Após esta etapa, foi feita a pré-fixação, adicionando-se ao material oito gotas da solução de Carnoy [metanol (Merck) e ácido acético (Merck) na proporção de 3:1], ficando em repouso à temperatura ambiente, por 10 minutos, sendo centrifugado, posteriormente. Em seguida, foi realizada a fixação com quantidades decrescentes de fixador (6, 5 e 4 ml), no total de três lavagens sucessivas. Ao final, as células foram ressuspensas em 2 ml de fixador e armazenadas em freezer até o momento

da preparação das lâminas. Estas foram preparadas gotejando-se a suspensão de células, para espalhamento dos cromossomos metafásicos e guardadas na geladeira por uma semana, para a técnica de bandamento G, Tripsina/Giemsa (GTG). Esta técnica consiste na digestão de regiões cromossômicas com a enzima tripsina seguido de coloração com corante Giemsa, dessa maneira os cromossomos metafásicos passam a exibir um padrão de bandas alternado em bandas claras e escuras. Em condições normais de temperatura e umidade, as lâminas envelhecidas por uma semana foram mergulhadas por 10 segundos na solução de tripsina, que consiste na adição de 0,1 mg de tripsina em 100ml de tampão Dulbecco (8g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2g de KH_2PO_4 , 1,44g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$, diluídos em 1L de água destilada, pH 6,8). Em seguida a lâmina foi lavada no tampão fosfato (6,808g de KH_2PO_4 , 0,882g de NaOH, diluídos em 1L de água destilada) e colocada no corante Giemsa 4% por 3 minutos. Após os 3 minutos a lâmina foi lavada com água destilada e observada ao microscópio óptico comum, sob imersão, em objetiva de 100x e ocular de 10x, na qual foram analisadas 20 metáfases de cada paciente.

4.2.4 Análise Citogenética molecular por meio da Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

A técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) foi realizada nos pacientes com análise molecular positiva, segundo o protocolo da Cytocell® (ANEXO A), utilizando a sonda da região Prader-Willi/Angelman vermelha específica para o locus *SNRPN* e a sonda verde para a região subtelomérica 15qter, para o controle do FISH. Este protocolo sofreu ligeiras modificações estabelecidas pelo Laboratório de Citogenética da UNIRIO, reduzindo-se de dois para um minuto e meio o tempo da desidratação em 2xSSC e também em uma série de etanol (70%, 85% e 100%). Em seguida 10 μL da sonda (LPU 005 da Aquarius Probes, Cytocell Ltda, Cambridge, Inglaterra) foram colocados sobre a lâmina que foi recoberta com lamínula, e colocada na estufa a 37°C em overnight, por aproximadamente oito horas. Após a retirada da lamínula, foram feitas lavagens com 0,4xSSC a 72°C por dois minutos e, subsequentemente, com uma mistura de 2xSSC e 0,05% de Tween-20 à temperatura ambiente por 30 segundos. A seguir, foram aplicados 10 μL de DAPI sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e deixada no escuro por 10 minutos para estabilização do o DAPI e posterior visualização no microscópio de

epifluorescência Olympus BX51, com filtros apropriados. Foram analisadas 10 interfases e 10 metáfases, segundo o protocolo a presença de dois sinais verdes confirma o cromossomo 15 e a ausência de um sinal vermelho, confirma a deleção.

O roteiro de toda investigação laboratorial da SPW pode ser visualizada na figura 5.

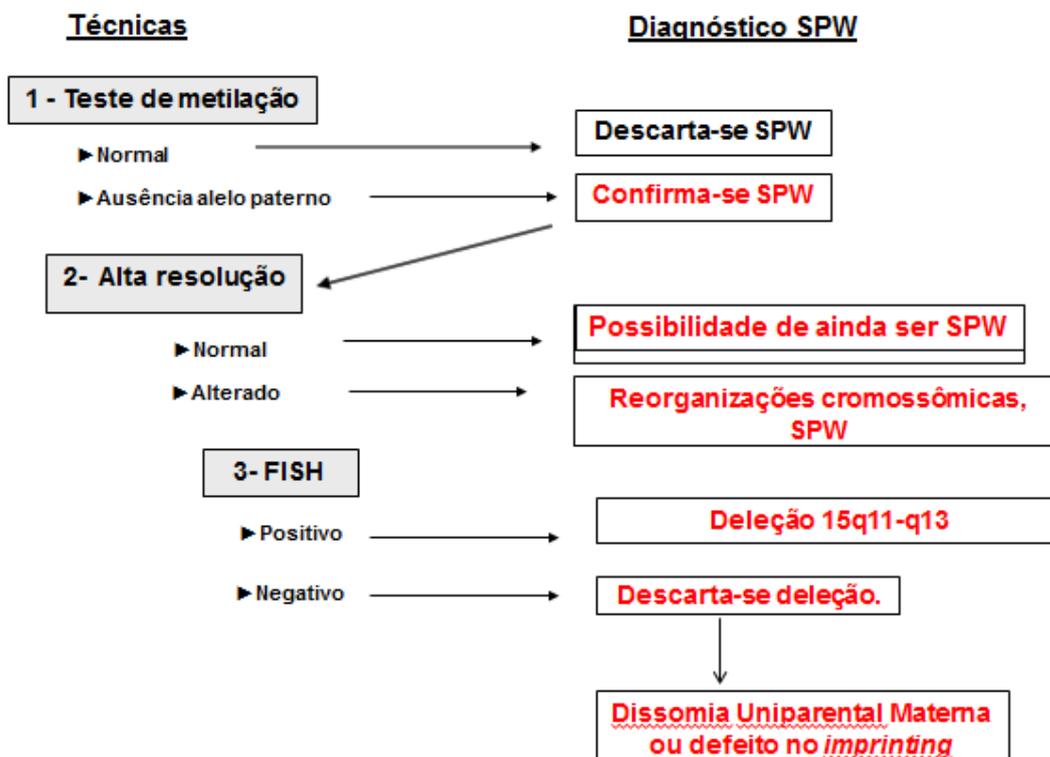


Figura 5: Roteiro da investigação laboratorial da SPW

4.2.5 Documentação

A documentação fotográfica foi realizada apenas nos casos com deleção cromossômica detectada pela banda G ou FISH. Para a captura das imagens em banda G foi utilizado o *software* Geneall®, e para o FISH foi utilizado o *software* FISHnew®.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Quanto à distribuição por sexo, a amostra apresentou 17 indivíduos (38%) do sexo feminino e 28 (62%) do sexo masculino. A idade do diagnóstico clínico ou da suspeita clínica de SPW variou de 11 meses a 31 anos e a idade da mãe, ao engravidar desses pacientes, com suspeita clínica de SPW, variou de 15 a 42 anos. Dos 13 pacientes positivos pela investigação por PCR, quatro são do sexo feminino e nove são do sexo masculino (tabela 4)

Tabela 4: Resultado da investigação clínica e genética dos pacientes suspeitos

Paciente	Sexo	Idade ao aplicar o score	Alta Resolução	Metilação	FISH	Crítérios maiores de Holm (pontos)	Crítérios menores de Holm (pontos)	Diagnóstico Clínico por Holm	Indicação para análise genética	Idade da mãe ao engravidar
1	M	4a5m	46, XY, -21sat+	negativo		5	3	sim	sim	35
2	F	11a4m	46,XX,+het 1	negativo		5	2	não	sim	24
3	M	26a6m	46,XY, del 15q	negativo	negativo	6	3	sim	sim	36
4	M	11a	46,XY	negativo		5	1,5	não	sim	23
5	F	7a4m	46,XX	negativo		5	3	sim	não	26
6	M	7a8m	46,XY	negativo		3	1,5	não	não	27
7	M	18a8m	46,XY	negativo		4	2,5	não	sim	22
8	F	3	46,XX	negativo		6	1,5	sim	sim	21
9	F	11m	46, XX	negativo		5	1	sim	sim	29
10	M	2a	ND	negativo		4	1,5	não	não	31
11	M	8a7m	46,XY	positivo	positivo*	6	2,5	sim	sim	19
12	F	21a4m	46,XX, del 15q	positivo	positivo	8	3,5	sim	sim	15
13	M	13a3m	46,XY	positivo	positivo	5	2,5	não	sim	19
14	M	11a9m	46,XY, del15q	positivo	positivo	6	3,5	sim	sim	22
15	F	9a	NA	negativo		5	3,5	sim	sim	NA
16	F	30a	46,XX	negativo		5	2	não	sim	37
17	M	10a10m	NA	negativo		6	1,5	não	sim	19
18	F	13a1m	46,XX	negativo		6	2	sim	sim	25
19	F	7a7m	46,XX,15psat+	negativo		4	2	não	não	28
20	M	21a4m	46,XY	negativo		2	0,5	não	sim	31
21	F	5a4m	46,XX	positivo	negativo	4	1,5	não	sim	42
22	M	3a5m	NA	negativo		3	1	não	não	41
23	F	17a	46,XX	negativo		2	2	não	não	24
24	F	6a9m	NA	positivo	positivo	5	2	não	não	26
25	F	14a	46,XX	negativo		5	1,5	não	sim	NA
26	F	23a7m	46, XX	negativo		6	3	sim	não	27
27	M	14a	NA	positivo	positivo	6	3,5	sim	sim	NA
28	M	7a6m	NA	negativo		3	1,5	não	não	37
29	M	6a10m	46,XY	positivo	positivo*	5	3,5	sim	sim	36
30	M	20a4m	46,XY	negativo		4	2	não	não	28
31	M	6a2m	NA	positivo	negativo	4	2	não	não	20
32	M	10a1m	NA	negativo		6	3	sim	não	NA
33	M	13a7m	46,XY	positivo	positivo	6	3	sim	sim	16
34	M	7a	46,XY	negativo		6	2	sim	sim	23
35	F	14a3m	NA	negativo		3	1	não	sim	25
36	F	11a	NA	negativo		1	0,5	não	não	24
37	M	21a	46,XY	positivo	NA	7	4	sim	sim	33
38	M	10a4m	NA	negativo		6	3,5	sim	não	24
39	M	10a	46,XY	negativo		5	1,5	não	não	26
40	M	7a7m	46.XY	negativo		1	1	não	não	35
41	M	2a11m	NA	negativo		4	1,5	não	sim	23
42	F	27a4m	46,XX	positivo	NA	6	3,5	sim	não	28
43	M	13a4m	46,XY	positivo	NA	6	3	sim	sim	33
44	M	10a10m	46,XY	negativo		5	3	sim	sim	26
45	M	10a4m	46,XY	negativo		4	1,5	não	não	40

*Pacientes que realizaram a técnica de FISH em outro laboratório

5.2 DIAGNÓSTICO GENÉTICO LABORATORIAL

5.2.1 Investigação molecular por digestão metilação-dependente seguida de PCR (investigação por PCR)

Foi realizada a investigação molecular pela técnica sugerida por Martínez e colaboradores (2006) que emprega a endonuclease de restrição McrBC e posterior amplificação por PCR da região homóloga do cromossomo de origem paterna não metilada e portanto não digerida pela McrBC. Esta técnica foi realizada para todos os 45 pacientes suspeitos, dos quais 13 (pacientes: 11, 12, 13, 14, 21, 24, 27, 29, 31, 33, 37, 42, 43) apresentaram resultado positivo para SPW. A figura 6 mostra a eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos de amplificação do éxon-1 do gene *SNRPN* dos pacientes 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34 e 35.

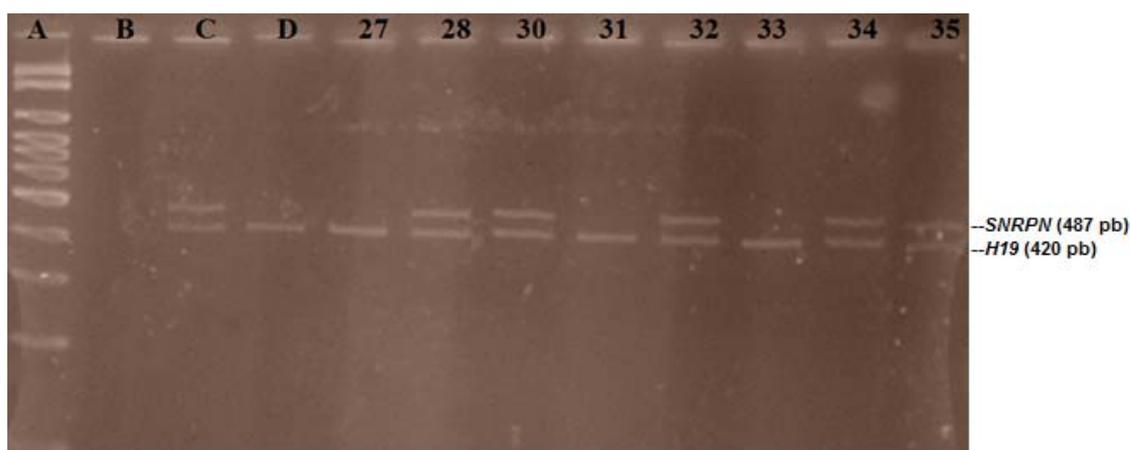


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos de amplificação do éxon-1 do gene *SNRPN* (487 pb) junto com o controle interno, uma sequência de 420 pb na ilha CpG do gene *H19* com coloração por brometo de etídio. A) Escala Alélica (de 100 a 1000); B) Sem DNA; C) Controle negativo para SPW; D) Controle positivo para SPW (paciente 11); Pacientes 28, 30, 32, 34, 35 negativos para SPW; Pacientes 27, 31, 33 positivos para SPW

5.2.2 Investigação Citogenética em Alta Resolução e *Fluorescence in situ hybridization* (FISH)

A investigação citogenética em alta resolução e FISH não foram realizadas para todos os pacientes com teste de PCR positiva (n=13), pois três (pacientes 37, 42, 43) eram provenientes de outros estados, e já haviam realizado estudo citogenético, com resultado normal do cariótipo (Boa Sorte, N., comunicação

pessoal), antes desta pesquisa, e outros dois (pacientes 11 e 29) optaram por realizar o FISH em laboratório particular.

Assim, oito destes treze pacientes realizaram o exame de cariótipo em alta resolução e posteriormente a análise citogenética molecular por FISH, com a finalidade de se identificar a presença de uma possível deleção da região 15q11-13. Em oito pacientes que possuíam diagnóstico molecular positivo dois pacientes (12 e 14) apresentaram deleção no braço longo do cromossomo 15 na região 1 entre as bandas 1 e 3 (FIGURA 7).

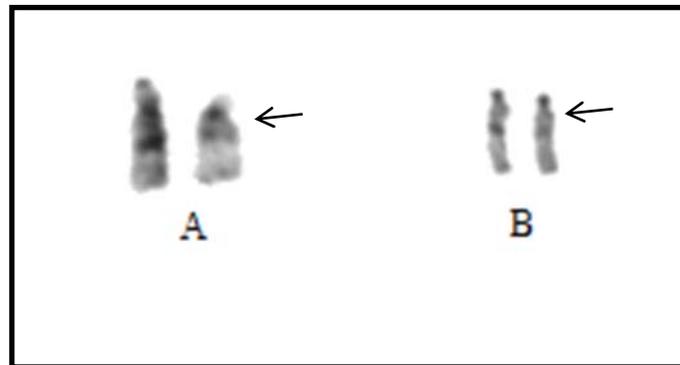


Figura 7: A) Par de cromossomos 15 do paciente 14, à direita cromossomo deletado. B) Par de cromossomos 15 do paciente 12, à direita cromossomo deletado. Seta preta, local da deleção

A técnica de FISH mostrou resultado positivo para deleção 15q 11-13 em oito casos: pacientes 12, 13, 14, 24, 27 e 33 (figura 8). Dois pacientes, 11 e 29, realizaram o FISH em laboratório particular com resultado positivo para a deleção.

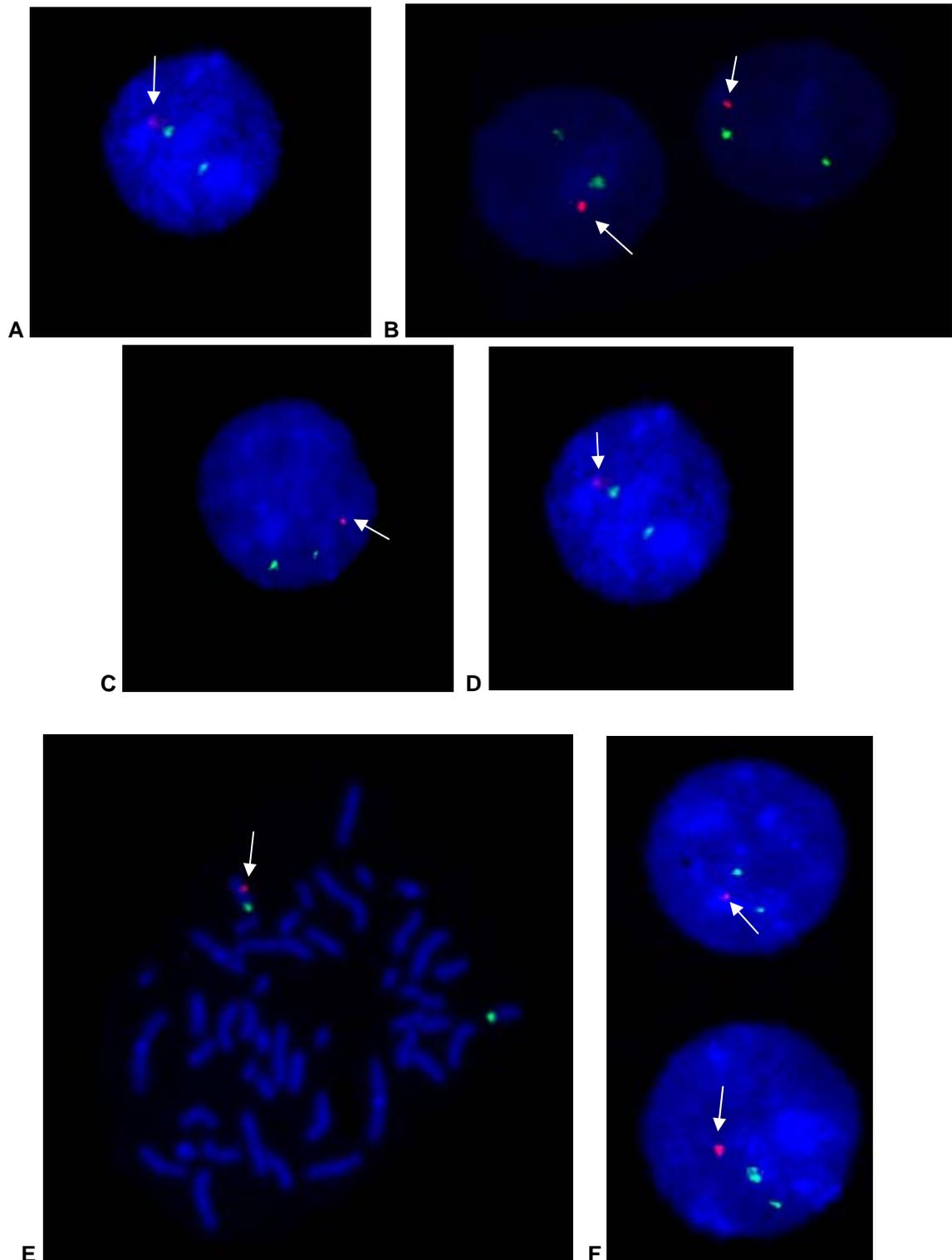


Figura 8: Imagens ao microscópio de epifluorescência de intérfases e de cromossomos metafásicos submetidos à hibridização com sondas fluorescentes (*SNRPN* e 15qter) pela técnica de FISH. A) Intérfase do paciente 12, com deleção de 15q11-13; B) Intérfases do paciente 13, com deleção de 15q11-13; C) Intérfase do paciente 14, com deleção; D) Intérfase do paciente 24, com deleção; E) Metáfase do paciente 27, com deleção; F) Intérfases do paciente 33, com deleção. Ponto verde: Sonda 15qter, Ponto vermelho: Sonda para o gene *SNRPN*. Seta branca indica a sonda *SNRPN* vermelha

5.2.3 Pacientes com outras alterações citogenéticas

O paciente 03 embora tenha apresentado a deleção pela citogenética clássica, em exame prévio a este estudo, não foi positivo para o teste de PCR. Portanto, foi realizado FISH (figura 9) para confirmação da presença da deleção em questão, pois preenchia os critérios diagnósticos estabelecidos por Holm e Gunay (tabela 5), sendo seu resultado negativo para a deleção.

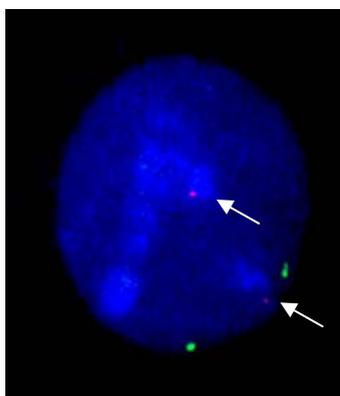


Figura 9: Imagem ao microscópio de epifluorescência de interfase submetida à hibridização com sondas fluorescentes (*SNRPN* e 15qter) pela técnica de FISH (paciente 03). Ponto verde: Sonda 15qter, Ponto vermelho: Sonda para o gene *SNRPN*. Seta branca indica a sonda *SNRPN* vermelha

O paciente 19 foi encaminhado para o estudo por MARTINS, R. R, que encontrou uma alteração estrutural no cromossomo 15, caracterizada por um aumento de satélite (15psat+), porém a investigação molecular por PCR mostrou resultado negativo e os sinais e sintomas do paciente não preenchem os critérios de Holm nem os de Gunay.

O paciente 02, quando submetido à investigação citogenética (bandamento GTG) apresentou um polimorfismo de heterocromatina no cromossomo 1 de origem paterna e a investigação molecular por PCR mostrou resultado negativo. Este paciente, entretanto se enquadrava nos critérios propostos por Gunay para a investigação molecular por PCR.

Já o paciente 01 apresentou polimorfismo envolvendo o satélite do cromossomo 21 (21sat+), com resultado da PCR negativo, embora se enquadrasse em ambos os critérios de diagnóstico de Holm e de Gunay.

5.3 ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A associação dos genótipos, com ou sem deleção 15q11-13, com os critérios maiores e menores de Holm é mostrada na tabela 4. Como o “n” amostral é pequeno não é possível fazer uma associação estatística precisa do genótipo com o fenótipo. Entretanto, vale mencionar que com relação às características faciais, 100% dos portadores de deleção apresentavam face característica de SPW contra 0% dos não portadores de deleção.

Tabela 5: Sinais e sintomas presentes em indivíduos com PCR positiva para SPW com deleção 15q11-13 e sem deleção pela técnica de FISH.

	Pacientes com deleção (n= 8)	Pacientes sem deleção (n= 2)
Hipogonadismo	6	1
Hipotonia	7	2
Dificuldade de alimentação na infância ou atraso neuropsicomotor	8	2
Deficiência mental	8	2
Ganho de excesso de peso	4	0
Hiperfagia	8	1
Características faciais	8	0
Diminuição dos movimentos fetais	2	0
Problemas de comportamento	7	1
Baixa estatura	6	1
Apnéia	3	0
Mãos e pés pequenos	3	0
Mãos estreitas	5	1
Miopia	3	0
Saliva viscosa	2	1
Defeito na articulação das palavras	7	1
Lesões de pele	7	2
Hipopigmentação	3	0

5.4 DIAGNÓSTICO POR HOLM E INDICAÇÃO MOLECULAR POR GUNAY

Cada paciente teve seu *score* de Holm calculado a partir da presença de sinais ou sintomas segundo este autor. Os pacientes foram classificados também de acordo com os critérios propostos pela tabela de Gunay de acordo com a faixa etária (tabela 5).

Dos 45 pacientes suspeitos 13 não apresentaram pontuação para SPW pelos critérios de Holm e nem possuíam classificação por Gunay; 16 se enquadravam nos critérios de Holm e Gunay; 11 preencheram os critérios de classificação para SPW por Gunay e 5 pacientes somente os critérios de Holm (gráfico 1).

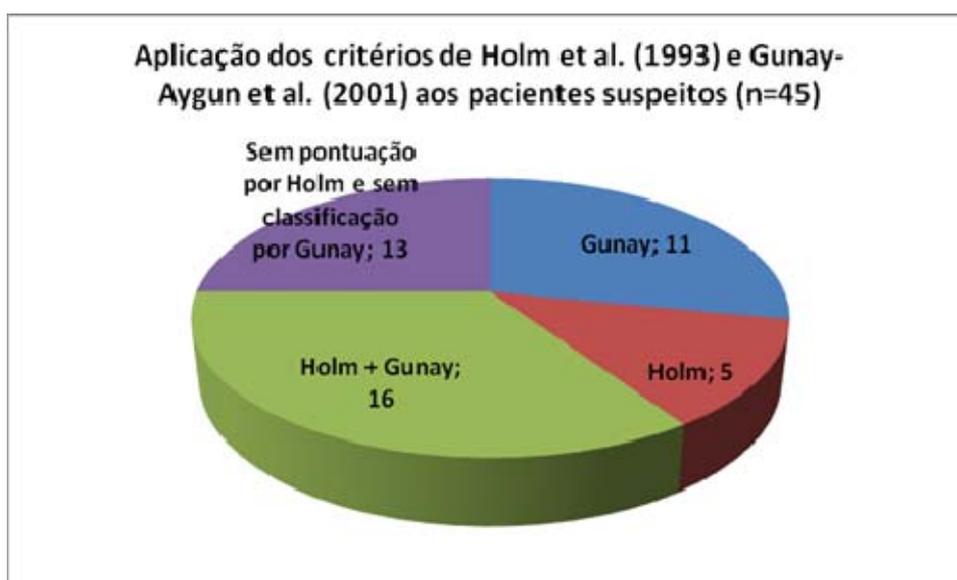


Gráfico 1: Aplicação dos critérios de Holm e Gunay a todos os 45 pacientes com suspeita clínica

Em relação aos 13 pacientes com PCR positiva para SPW dois não apresentavam somatório de pontos necessários para o diagnóstico clínico conforme os critérios propostos por Holm e também não se enquadraram nos critérios de Gunay; oito pacientes apresentavam pontuação para SPW conforme os critérios de Holm e se enquadravam na classificação de Gunay; um paciente preencheu os critérios de Holm, e dois os de Gunay (gráfico 2).

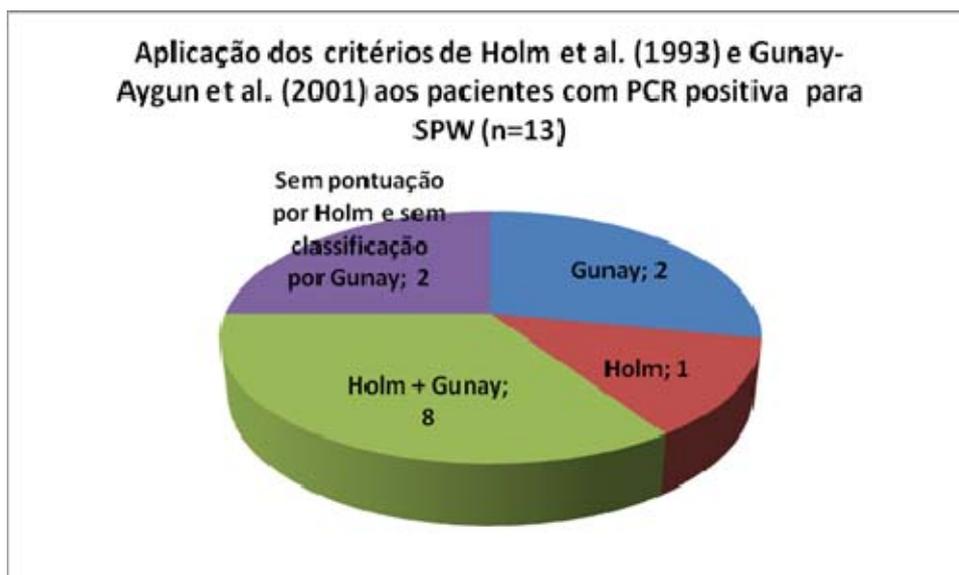


Gráfico 2: Aplicação dos critérios de Holm e Gunay aos 13 pacientes com PCR positiva para SPW

Dos 32 pacientes com análise molecular negativa, 11 não tinham pontuação para SPW e não se enquadravam na classificação de Gunay; oito apresentavam pontuação de Holm para SPW e preenchiam os critérios de Gunay; nove atendiam somente aos critérios de Gunay; e quatro apresentavam pontuação referente somente aos critérios de Holm (gráfico 3).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) para o diagnóstico clínico de Holm, e indicação por Gunay são mostrados na tabela 6.

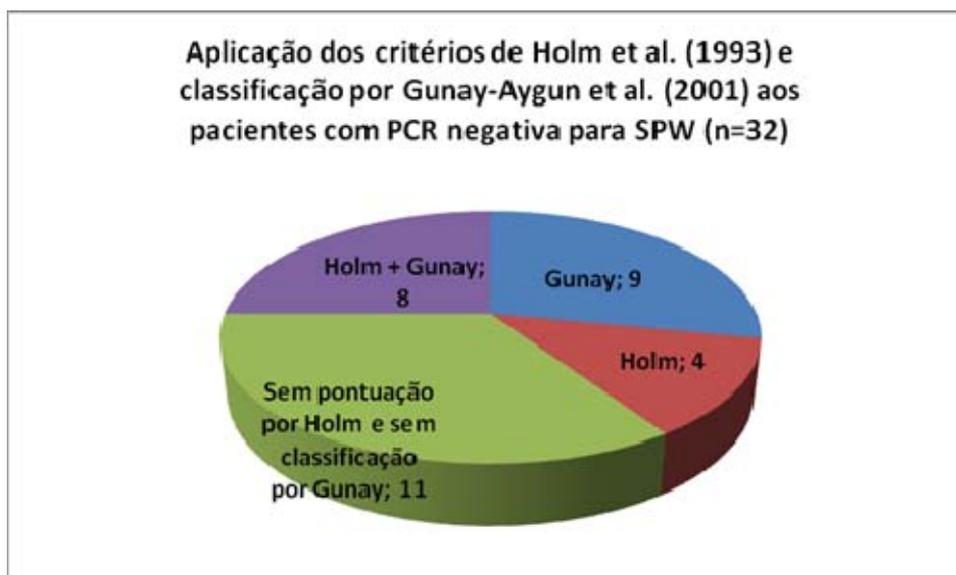


Gráfico 3: Aplicação dos critérios de Holm e Gunay aos 32 pacientes com PCR negativa para SPW

Tabela 6: Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo e seus respectivos intervalos de confiança (IC) do diagnóstico clínico de Holm e da indicação por Gunay-Aygun

Características	Holm	Gunay
Sensibilidade (IC)	69,2 (38,8 - 89,6)	76,9 (45,9 - 93,8)
Especificidade (IC)	62,5 (43,7 - 78,3)	46,8 (29,5 - 64,9)
Valor Preditivo Positivo (IC)	42,8 (22,5 - 65,5)	37,0 (0,20 - 0,57)
Valor Preditivo Negativo (IC)	83,3 (61,8 - 94,5)	83,3 (0,57 - 0,95)

Para o cálculo da porcentagem de documentação de cada critério na amostra o número de pacientes positivos para aquele critério foi dividido pelo número total de pacientes. A sensibilidade de cada critério foi calculada dividindo-se o número de pacientes positivos para cada critério pelo número de pacientes cujos critérios foram documentados (GUNAY-AYGUN et al, 2001) (tabela 7).

A especificidade de cada critério na amostra também foi calculada dividindo-se o número de pacientes com PCR negativa para a SPW que não apresentaram tal critério, pelo número total de pacientes negativos para o critério documentado (tabela 7).

Tabela 7: Frequência do sinal ou sintoma na amostra, sensibilidade e especificidade de cada sinal, ou sintoma, proposto por Holm

	Frequência na amostra %	Sensibilidade	Especificidade
Crítérios Maiores			
Hipotonia	71	0,92	0,37
Dificuldade de alimentação ou atraso neuropsicomotor	76	1	0,31
Deficiência mental	91	1	0,12
Ganho excessivo de peso	62	0,53	0,34
Hiperfagia	84	0,92	0,18
Características faciais	44	0,61	0,62
Crítérios Menores			
Diminuição dos movimentos fetais	24	0,23	0,68
Problemas de comportamento	64	0,84	0,43
Baixa estatura	38	0,76	0,84
Apnéia	33	0,38	0,59
Cabelos, olhos e pele mais claro	24	0,3	0,78
Mãos e pés pequenos	26	0,38	0,78
Mãos estreitas	42	0,61	0,65
Miopia	24	0,3	0,75
Saliva viscosa	22	0,3	0,81
Dificuldade na articulação das palavras	73	0,84	0,31
Lesões de pele	60	0,69	0,43

A característica clínica mais predominante na amostra foi deficiência mental (91%), seguida da hiperfagia (84%), dificuldade de alimentação na infância ou atraso neuropsicomotor (76%) e dificuldade na articulação das palavras (73%).

Quanto aos critérios maiores de Holm a sensibilidade do método variou de 1 a 0,53. Para a dificuldade de alimentação na infância ou atraso neuropsicomotor o valor da sensibilidade foi de 1, para deficiência mental também 1, para hipotonia 0,92 e hiperfagia 0,92. Os critérios maiores com menor sensibilidade foi características faciais (0,61) e ganho excessivo de peso (0,53).

Já a sensibilidade em relação aos critérios menores foi maior para problema de comportamento (0,84) e dificuldade de articulação das palavras (0,84).

Quanto aos critérios maiores de Holm, a especificidade variou de 0,12 a 0,62; já para os critérios menores a especificidade maior variou de 0,31 a 0,81 conforme mostra a tabela 7.3.

6 DISCUSSÃO

6.1 DIAGNÓSTICO GENÉTICO LABORATORIAL

Dentre as várias técnicas empregadas para o diagnóstico laboratorial específico da SPW, a investigação molecular por PCR metilação-dependente da região 15q11-13 é uma ferramenta que permite detectar a SPW nas suas três classes moleculares; o que levou à escolha deste teste, proposto por Martinez e colaboradores (2006). Além disso, é uma técnica de fácil realização e também considerada de baixo custo, quando comparado com outras técnicas moleculares.

Entretanto, esta técnica não é capaz de esclarecer qual o mecanismo genético que originou a SPW (deleção 15q11-13, dissomia uniparental materna ou defeito no *imprinting*). Portanto, para a discriminação dentre as três classes etiológicas é necessário o uso da técnica de FISH, que identifica uma deleção cromossômica, e a análise de microssatélites, que identifica a dissomia uniparental materna.

Em nossa amostra de 45 pacientes, 13 apresentaram resultado positivo por PCR, ou seja, compatível com a SPW. O passo seguinte deste trabalho foi investigar a presença de deleção cromossômica nesses pacientes por citogenética em alta resolução e FISH. Alguns laboratórios realizam a PCR metilação-dependente após a técnica de FISH, quando a deleção não foi encontrada. Entretanto Hamzi e colaboradores (2010) sugerem que a investigação mais coerente a ser realizada no primeiro instante é o teste de PCR, que, se detectado um padrão de metilação anormal, FISH e análise de microssatélites devem ser realizados posteriormente para definir a etiologia genética.

Neste estudo foi detectada pela citogenética molecular, em pacientes com PCR positiva, a presença da deleção 15q11-13 em 80% dos pacientes (8 de 10 casos), tendo sido descrito na literatura, que a deleção é encontrada em 65 a 70% dos casos com investigação molecular positiva para SPW (NICHOLLS; KNEPPER, 2001).

A visualização, ao microscópio ótico comum, do segmento 15q11-13 não é fácil devido à deleção ser pequena, aproximadamente 3-5 Mb, e também pelo polimorfismo da banda 15q11. Estes fatores fazem com que o exame citogenético da deleção não seja suficiente para diagnosticar a SPW, mesmo com alto padrão de

resolução das bandas, sendo necessária a aplicação de técnicas citogenéticas moleculares para confirmar a presença ou ausência da deleção cromossômica (HAMABE et al., 1991).

Nossa investigação por citogenética em AR encontrou três pacientes com deleção 15q11-13. Devido à dificuldade desta técnica citogenética, para discriminar a deleção dessa região, foi realizada a técnica de FISH que confirmou a deleção em dois dos três casos. Sendo um paciente negativo para a SPW tanto por FISH quanto por PCR, embora apresentasse deleção por citogenética em AR e fenótipo compatível com SPW por Holm e Gunay (paciente 03). Uma hipótese levantada é a de que pode se tratar de algum rearranjo cromossômico na região 15q11-13 próximo ao gene *SNRPN*, que envolva outros genes presentes nesta região fora do local do reconhecimento da sonda. Ressaltamos que os procedimentos estão sendo repetidos e o caso reanalisado pela citogenética em AR.

6.2 PACIENTES COM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA

As alterações cromossômicas estruturais visualizadas pela microscopia ótica por meio da técnica de bandamento GTG, como o polimorfismo no cromossomo 15 do paciente 19, e a região de heterocromatina do cromossomo 1 da paciente 02, além do caso 01 que apresentou polimorfismo envolvendo o satélite do cromossomo 21, podem ser responsáveis pelo fenótipo da SPW, pois os pacientes portadores dessas alterações cromossômicas tiveram um resultado negativo para a região 15q11-13 quanto à PCR.

Pacientes com fenótipo de SPW, mas com teste da PCR negativo para a síndrome, devem também ser investigados para outras alterações genéticas, como a duplicação Xq (GABBETT et al., 2008), a monossomia 1p36 (TSUYUSAKI et al., 2010), deleção 6q (BONAGLIA et al., 2008), a Síndrome do X- Frágil (NOWICKI et al., 2007), a deleção 10q26 (LUKUSA et al., 2000) e o defeito de *imprinting* da Síndrome de Angelman (MOLFETTA et al., 2002).

Foi observado, em uma revisão feita por Gilhuis e colaboradores (2000) um número considerável de pacientes obesos com alteração no braço longo do cromossomo 6, todos estes pacientes tinham em comum obesidade, hipotonia e atraso no desenvolvimento, o que se assemelha à SPW. Assim, a haploinsuficiência

do gene *SIM 1* presente neste segmento pode ser responsável pela obesidade, o que pode ser atribuível a alterações na via de leptina melanocortina-oxitocina.

Já a deleção 1p36 descrita por vários autores devido à sua similaridade fenotípica com a SPW foi pesquisada por Rodrigues e colaboradores (2007), em 16 pacientes com fenótipo de Prader-Willi, mas os autores não encontraram esta deleção em nenhum suspeito.

Pelo exposto, ressaltamos a importância da realização da técnica de citogenética em banda G, que é capaz de detectar outras alterações estruturais que podem estar envolvidos no fenótipo de Prader-Willi *like*. Portanto, esta técnica deve ser realizada para os pacientes suspeitos de SPW, pois possui baixo custo quando comparada com outras técnicas além de ter sido capaz de identificar 20% das deleções confirmadas pelo FISH.

6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPO-FENÓTIPO

A associação entre o genótipo e o fenótipo encontrada nos pacientes com deleção quando comparada com a dos pacientes sem essa alteração, mostrou que a hipopigmentação estava presente em 37,5% dos pacientes com deleção e em 0% daqueles que não a possuíam, o que está de acordo com a literatura. Uma explicação para o fato da hipopigmentação ocorrer mais frequentemente em indivíduos com deleção é a de que a ausência do gene *oculocutaneous albinism - II* (OCA-II) localizado na região 15q11-13 estaria propiciando o fenótipo, pois este gene codifica para uma proteína integral de membrana, envolvida no transporte do aminoácido tirosina, que é um precursor da melanina. Mutações neste gene ocasionam o albinismo oculocutâneo tipo II (SPRITZ et al., 1997).

Além da hipopigmentação, as características faciais são também sinais mais visíveis em pacientes com deleção (BUTLER e BITTEL, 2005), o que foi evidente em nossa amostra, uma vez que todos aqueles com deleção apresentaram características faciais típicas, como olhos amendoados, lábio superior afilado e fronte estreita. Nos pacientes sem deleção, aqui investigados, não foram encontradas tais características faciais.

A dissomia uniparental materna possui associação com a idade avançada da mãe, devido a erros na divisão celular durante a gametogênese (ENGEL, 1980 apud

HITCHINS; MOORE, 2004), com isso foi analisada a idade das mães quando engravidaram de seus filhos com SPW. As mães de pacientes que possuem deleção (6/8) engravidaram com idade que variou entre 15 a 36 anos, outras duas mães de filhos sem a deleção, engravidaram uma com 20 e a outra com 42 anos. Pode-se levantar a hipótese de que, tenha ocorrido erro na divisão meiótica na formação de gametas da genitora com idade materna avançada, levando assim à dissomia uniparental, que também determina a SPW, e pode ser confirmada pela análise de microssatélites. Por outro lado, no caso da mãe jovem, sugerimos que possa ter ocorrido um defeito no *imprinting*, uma vez que a probabilidade de erro de não disjunção meiótica, neste caso, é menos frequente.

6.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO POR HOLM E INDICAÇÃO DO TESTE MOLECULAR POR GUNAY

Neste trabalho a análise por PCR do gene *SNRPN*, envolvido na SPW, foi realizada em pacientes encaminhados ao ambulatório de genética da UNIRIO com suspeita de SPW baseada na presença de deficiência mental (que foi detectado pelo nível de escolaridade), obesidade e/ou hiperfagia em adolescentes e adultos; e hipotonia, pobre sucção e/ou hipogonitalismo em crianças. Após entrevistados os pacientes foram classificados conforme os critérios de Holm e Gunay.

Os critérios para o diagnóstico clínico da SPW propostos por Holm e colaboradores (1993) foram desenvolvidos por meio de um consenso de sete clínicos experientes com a síndrome. Tais critérios foram propostos na América do Norte em uma época quando ainda as deleções na região 15q11-13 eram na maioria das vezes investigadas por meio da microscopia ótica comum, pois a técnica de FISH não era amplamente disponível, muito menos os testes de metilação. O objetivo desses critérios foi o de ajudar os clínicos na confirmação ou exclusão do diagnóstico de SPW com base na investigação clínica.

Em 2001, Gunay-Aygun e colaboradores desenvolveram um estudo retrospectivo, em pacientes que já tinham diagnóstico genético firmado, para analisar se esses resultados genéticos eram compatíveis com o diagnóstico clínico proposto por Holm e colaboradores, e concluíram que o diagnóstico clínico através da proposta de Holm não estava completamente de acordo com o diagnóstico

molecular, pois eram muito excludentes. Com isso, estes autores elaboraram critérios para identificar os indivíduos que deveriam realizar a análise molecular de acordo com a presença de sinais e sintomas correspondentes às respectivas faixas etárias. Tais sinais e sintomas eram mais abrangentes que os de Holm, e não se comprometiam em firmar o diagnóstico do paciente.

Neste trabalho, com base nas propostas de Holm e colaboradores (1993) e Gunay-Aygun e colaboradores (2001), um total de 45 pacientes, uns com o quadro clínico pleno e outros com quadro clínico parcial da SPW, foram avaliados por médico geneticista, neuropediatra ou endocrinologistas experientes em SPW e tiveram a pontuação de Holm calculada. Foram encontrados pacientes com diagnóstico laboratorial compatível ou não com os critérios adotados, além daqueles que não se enquadravam em nenhum dos critérios de seleção de Holm ou Gunay, inclusive alguns pacientes não preencheram nenhum dos dois critérios, mas tiveram PCR positivo.

Os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo encontrados para o diagnóstico de Holm e a indicação de Gunay, estão contidos em um amplo intervalo de confiança, devido ao pequeno número de pacientes investigados, o que torna difícil concluir sobre a validade de ambos os critérios. Assim, deve-se levar em consideração que tais métodos permitem uma rápida avaliação do paciente, não possui custo algum e são úteis de qualquer forma para o clínico.

Além disso, a sensibilidade e especificidade, que também foram calculadas para cada característica clínica presente no critério de Holm, apresentaram valores heterogêneos, também implicados no pequeno número amostral.

Vale dizer, a respeito da sensibilidade dos critérios maiores de Holm que variou de 1 a 0,53 [1 para dificuldade de alimentação na infância (ou atraso neuropsicomotor) e deficiência metal] e 0,53 e ganho excessivo de peso]. Segundo Holm e colaboradores (1993) deve-se considerar portador de ganho excessivo de peso aqueles pacientes que começam a engordar a partir de um ano até os seis anos de idade. Em nosso estudo três começaram a aumentar a massa corporal a partir dos 7 meses, e outro só com oito anos de idade, o que indica que os critérios de Holm são muito excludentes quanto a esse aspecto, pois esses pacientes tiveram metilação positiva. Portanto, foram classificados como negativos por Holm para este critério, o que colaborou para o baixo valor de sensibilidade quanto ao

ganho excessivo de peso (0,53 foi o menor valor da sensibilidade que encontramos para os critérios maiores).

Com relação à sensibilidade dos critérios menores, dificuldade na articulação das palavras e problemas de comportamento (0,84), baixa estatura (0,76) e lesões de pele (0,69), os valores ultrapassaram os dos critérios maiores. Entretanto, saliva viscosa, miopia, hipopigmentação e diminuição dos movimentos fetais apresentaram uma sensibilidade extremamente baixa de aproximadamente 0,3. O resultado dessa última característica clínica pode ter ocorrido em razão do relato inadequado por parte das mães a respeito da diminuição dos movimentos fetais, que pode ser explicado pelo fato de que muitas mães, não tendo experiência prévia com filhos normais, não possuíam um parâmetro, para se guiarem, quando interrogadas pelo médico sobre este assunto. Outra explicação é que alguns pacientes estão sob os cuidados de outro responsável que não soube informar sobre este fato.

Segundo GILLESSEN-KAESBACH e colaboradores (1995), pacientes obesos com deficiência mental suspeitos de SPW, com idade que variou de 1 a 36 anos, foram encaminhados para todos os departamentos de Genética Humana e Pediatria na Alemanha, onde foi realizada análise molecular para SPW, e detectada a síndrome em 34% dos pacientes. Segundo esses autores, esta baixa porcentagem dos casos positivos se deve à falta de uma melhor triagem dos pacientes que devem ser submetidos ao teste molecular para a SPW, pois muitos pacientes que realizaram o exame genético não possuíam características clássicas da SPW como hipotonia neonatal, problemas de alimentação na infância, características faciais ou hipogenitalismo. Esse resultado é similar ao aqui apresentado, já que muitos pacientes com deficiência mental e obesidade com ou sem outras características da síndrome foram encaminhados para este estudo resultando em um teste molecular negativo (72%).

Uma investigação que poderia ser realizada em pacientes com quadro clínico parcial da síndrome, seria a pesquisa de mutações de ponto presentes na região 15q11-13, que poderiam impedir a ligação do *primer*, não ocorrendo a amplificação do segmento paterno, gerando um resultado falso-positivo, como descrito por Askree e colaboradores (2011).

Vale dizer que outros trabalhos com foco na compatibilidade entre o diagnóstico molecular e os critérios de Holm foram realizados na Tailândia (Promkan et al., 2007), África (Christianson et al., 1998), Chile (Cortés et al., 2005) e Reino

Unido (CHU et al., 1994), todos mostraram um resultado concordante entre o critério de Holm e a análise molecular. Este último trabalho também concluiu que não se deve fazer diagnóstico clínico da SPW no período neonatal a menos que seja realizada análise de DNA para confirmação.

Entretanto, Fridman e colaboradores (2000) sugerem que o teste genético da SPW seja requisitado em neonatos e lactentes com hipotonia e algumas características da síndrome, como mãos e pés pequenos, sinais de hipogonadismo, hipopigmentação, olhos amendoados e fronte estreita. O que pode contribuir para um diagnóstico precoce, diminuindo a utilização de recursos diagnósticos mais invasivos como a eletroneuromiografia e a biópsia muscular. Vale ressaltar que em nosso estudo, o teste de metilação, realizado em um lactente de 11 meses, que apresentava características típicas de SPW tais como hipotonia, dificuldade de sucção, hipoplasia de pequenos lábios e clitóris e características faciais, foi negativo.

Nossos resultados apontam para a dificuldade de se diagnosticar clinicamente a SPW. Segundo Gunay-Aygun e os critérios de Holm são muito excludentes, pois excluem aqueles pacientes sem pontuação mas que têm resultado de investigação molecular positiva, e incluem muitos pacientes com pontuação que apresentam resultado de exame molecular negativo. Soma-se a isso o fato de que os critérios de Gunay são também excludentes, pois em nossa amostra três indivíduos positivos para a SPW, detectados por PCR metilação-dependente, não preencheram os critérios de Gunay para indicação de investigação molecular.

Pelo exposto, fica evidente que os critérios de inclusão de Holm e Gunay são bastante úteis para a investigação de SPW, mas a experiência do clínico é fundamental para formular a primeira suspeita que deve ser confirmada pela análise molecular e/ou citogenética.

7 CONCLUSÃO

- Nossos resultados mostram que os critérios de Holm e a classificação de Gunay não são suficientes para a identificação de todos os portadores da SPW, mas são úteis em uma primeira abordagem clínica.
- A técnica de PCR metilação dependente foi capaz de detectar a SPW em 13 pacientes no total de 45.
- A deleção do segmento 15q11-13 foi encontrada em 8 dos 10 pacientes com resultado de PCR positivo para SPW.
- Os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo encontrados para o diagnóstico de Holm e a indicação de Gunay, estão contidos em um amplo intervalo de confiança, devido ao pequeno número de pacientes investigados, o que torna difícil discutir sobre a validade de ambos os critérios.
- Os pacientes com fenótipo de Prader-Willi *like*, com resultado de PCR negativo e clínica para SPW, podem ter outras mutações, que diferem das já descritas no segmento 15q11-13 que originam a SPW.
- Pacientes só com obesidade e deficiência mental não são indicados a realizar o teste de metilação, a não ser que possuam outras características clássicas da SPW como hipotonia neonatal, problemas de alimentação na infância, características faciais e/ou hipogonadismo.
- Para confirmação da suspeita clínica de pacientes portadores de SPW com alterações na região 15q11-13 a primeira abordagem molecular deve ser a PCR metilação-dependente seguida de análise citogenética em AR para detecção de outras alterações cromossômicas e FISH para confirmar a deleção, causa mais comum.

REFÊRENCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Artmed, 4ª edição, 1549p.

BARTHOLDI, D.; KRAJEWSKA-WALASEK, M.; OUNAP, K.; GASPAR, H.; CHRZANOWSKA, K. H.; ILYANA, H.; KAYSERILI, H.; LURIE, I. W.; SCHINZEL, A.; BAUMER, A. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *J. Med. Genet*, v. 46, p. 192-197, 2009.

BITTEL, D. C.; BUTLER, M. G. Prader-Willi Syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Rev Mol Med*, v. 7, p. 1-20, 2005.

BONAGLIA, M. C.; CICCONE, R.; GIMELLI, G.; GIMELLI, S.; MARELLI, S.; VERHEIJ, J.; GIORDA, R.; GRASSO, R.; BORGATTI, R.; PAGONE, F.; RODRÌGUEZ, L.; MARTINEZ-FRIAS, M. L.; VAN RAVENSWAAIJ, C.; ZUFFARDI, O. Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet*, v.16, p. 1443-9, 2008.

BUTLER, J. V.; WITTINGTON, J.; E, HOLLAND, A. J.; BOER, H.; CHARKE, D.; WEBB, J. Prevalence and risk factors for, physical ill-Health in people with Prader-Willi Syndrome: a population-based study. *Dev. Med. Child Neurol*, v. 44, p. 248-55, 2002.

BUTLER, M. G. 0.; PALMER, C. G. Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet*. v. 1, p. 1285-1286, 1983.

BUTLER, M. G.; BITTEL, D. C.; KIBIRYEVA, N.; TALEBIZADEH, Z.; THOMPSON, T. Behavioral Differences among subjects with Prader-Willi Syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics*, v. 113, n. 3, p. 565-573, 2004.

CASSIDY, S. B. Prader-Willi Syndrome. *J Med Genet*, v. 34, p. 917-923, 1997.

CASSIDY, S. B.; DRICOLL, D. J. Prader-Willi Syndrome. *Eur J Hum Genet*, v.17, n.1, p. 3-13, 2008.

CHAMBERLAIN, S. J.; LALANDE, M. Neurodevelopmental disorders involving genomic imprinting at human chromosome 15q11-q13. *Neurobiol Dis*, v. 39, n. 1, p. 13-20, 2010.

CLIFT, S.; DAHLITZ, M.; PARKES, J. D. Sleep apnea in the Prader-Willi syndrome. *J Sleep Res.*, v. 3, n. 2, p. 121-126, 1994.

CURFS, L. M.; VERHULST, F. C.; FRYNS, J. P. Behavioral and emotional problems in youngsters with Prader-Willi syndrome. *Genet Couns.* v. 2, n. 1, p. 33-41, 1991.

DOWN, J.L. In: *Mental Affections of Childhood and Youth*. Churchill Publisher, London, 1887, 172p. Disponível em: <http://www.amazon.com/Affections-Childhood-Classics-Developmental-Medicine/dp/0521413303>

FONG, B.; F.; DE VRIES, J. I. Obstetric aspects of the Prader-Willi syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*, v. 21, n. 4, p. 389-92, 2003.

FRIDMAN, C.; KOK, F.; KOIFFMANN, C. P. Síndrome de Prader-Willi em lactentes hipotônicos. *J Pediatr (Rio J)*, v.76, n. 3, p. 246-250, 2000.

FRIDMAN, C., KOIFFANN, C. P. Genomic imprinting: genetic mechanisms and phenotypic consequences in Prader-Willi and Angelman Syndrome. *Genet. Mol. Bio*, v. 23, n. 4, p. 715-724, 2000.

GABBETT, M. T.; PETERS, G. B.; CARMICHAEL, J. M.; DARMANIAN, A. P.; COLLINS, F. A. Prader-Willi syndrome phenocopy due to duplication of Xq21.1-q21.31, with array CGH of the critical region. *Clin Genet*, v. 73, n. 4, p. 353-9, 2008.

GILHUIS, H. J.; VAN RAVENSWAAIJ, C. M.; HAMEL, B. J.; GABREËLS, F. J. Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol*, v. 4, n. 1, p 39-43, 2000.

GOLDSTONE, A. P. Prader-Willi Syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab*, v. 16, n. 1, p. 12-20, 2004.

GUNAY-AYGUN, M.; SCHWARTZ, S.; HEEGER, S.; O'RIORDAN, M. A.; CASSIDY, S. B. The changing purpose of Prader-Willi Syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics*, v. 108, n. 5, p. 1-5, 2001.

HAKONARSON, H.; MASKOVITZ, J.; DAIGLE, K. L.; CASSIDY, S.; B.; CLOUTIER, M. M. Pulmonary function abnormalities in Prader-Willi Syndrome. *J Pediatr*, v. 126, p. 565 – 570, 1995.

HAMABE, J., FUKUSHIMA, Y., HARADA, N., ABE, K., MATSUO, N., NAGAI, T., YOSHIOKA, A., TONOKI, H., TSUKINO, R., NIIKAWA, N. Molecular study of Prader-Willi Syndrome: deletion, RFLP, and phenotype analyses of 50 patients. *Am J Med Genet*, v.41, p. 54 – 63, 1991.

HITCHINS, M. P.; MOORE, G. E. Genomic imprinting in fetal growth and development. *Expert Rev Mol Med*, v. 4, n. 11, p. 1-19, 2004.

HOLLAND, A. J.; TREASURE, J.; COSKERAN, P.; DALLOW, J.; MILTON, N.; HILLHOUSE, E. Measurement of excessive appetite and metabolic change in Prader Willi Syndrome. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord*, v. 17, p. 527-532, 1993.

HOLM, V.; A.; CASSIDY, S.; B.; BUTLER, M.; G.; HANCHETT, J.; M.; GREENSWAG, L.; R.; WHITMAN, B.; Y.; GREENBERG, F. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics*. v. 91, n. 2, p. 398-402, 1993.

JONG, M. T.; GRAY, T. A.; JI, Y.; GLENN, C. C.; SAITOH, S.; DRISCOLL, D. J.; NICHOLLS, R. D. A novel imprinted gene, encoding a Ring Zinc-Finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi Syndrome critical region. *Hum Mol Genet*, v.8, p. 783-793, 1999.

KNOLL, J. H.; NICHOLLS, R. D.; LALANDE, M. On the parental origin of the deletion in Angelman syndrome. *Hum Genet*, v. 83, p. 205-207, 1989.

LEDBETTER, D.H.; RICCARDI, V.M.; AIRHART, S.D.; STROBEL, R. J.; KEENAN, B. S.; CRAWFORD, J.D. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med*, v. 304, p. 325-329, 1981.

LEE, S.; KOSLOV, S.; HERNANDEZ, L.; CHABERLAIN, S. J.; BRANNAN, C. I.; STEWART, C. L.; WEVRICK, R. Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-Willi Syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet*. v. 6, p. 1873-1878, 2000.

LEE, S., WALKER, C. L., KARTEN, B., KUNY, S. L., TENNESE, A. A., O'NEILL, M. A., WEVRICK, R. Essential role for the Prader-Willi syndrome protein neclin in axonal outgrowth. *Hum. Molec. Genet*. v. 14, p. 627-637, 2005.

LUKUSA, T.; FRYNS, J. P. Pure distal monosomy 10q26 in a patient displaying clinical features of Prader-Willi Syndrome during infancy and distinct behavioural phenotype in adolescence. *Genet Couns*, v. 11, n.2, p. 119-26, 2000.

MAGENIS, R. E.; BROWN, M. G.; LACY, D. A.; BUDDEN, S.; LAFRANCHI, S. Is Angelman Syndrome an Alternative result of del (15) (q11q13)? *Am J Med Genet*, v. 28, p. 829-838, 1987.

MARTÍNEZ, F.; LEÓN, A. M.; MONFORT, S.; OLTRA, S.; ROSELLÓ, M.; ORELLANA, C. Robust, easy, and dose-sensitive methylation test for the diagnosis of Prader-Willi and Angelman Syndromes. *Genetic Testing*, v. 10, n. 3, p. 174-177, 2006.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res*, v. 20, p. 613-616, 1960.

MOLFETTA, G. A.; FELIX, T. M.; RIEGEL, M.; FERRAZ, VEF.; NETO, J. M. P. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 60, n.4, p. 1011-1014, 2002.

NOWICKI, S. T.; TASSONE, F.; ONO, M. Y.; FERRANTI, J.; CROQUETTE, M. F.; GOODLIN-JONES, B.; HAGERMAN, R. J. *The Prader-Willi phenotype of fragile X syndrome. J Dev Behav Pediatr*, v. 28, n. 2, p.133-8, 2007.

NICHOLLS, R. D. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi Syndrome. *Nature*, v. 342, p. 281-285, 1989.

NICHOLLS, R. D.; KNEPPER, J. L. Genome organization, function and, imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v. 2, p. 153-175, 2001.

NICHOLLS, R. D.; KNOLL, J. H. M.; BUTLER, M. G.; KARAM, S.; LALANDE, M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature*, v. 342, p. 281-5, 1989. *Nutrition*, v. 22, p. 255–282, 2002.

PAPROCKA, J.; JAMROZ, E.; SZWED-BIAŁOZYT, B.; JEZELA-STANEK, A.; KOPYTA, I.; MARSZAŁ, E. Angelman Syndrome Revisited. *Neurologist*, v. 13, n. 5, p. 305-12, 2007.

PINTO, M. C. R.; MAGALHÃES-FARIA, R.; PINTO, D. M.; MAIA, I. P.; MOYA, R. Impressão Genómica da Síndrome Metabólica de Prader-Willi. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, v. 1, p. 19-25, 2007.

PRADER A., LABHART A., WILLI H. Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz. Med. Wschr.* v.86, p. 1260-1261, 1956.

PRADER, A.; WILLI, H. Das Syndrom von Imbezilität, Adipositas, Muskelhypotonie, Hypogonitalismus, Hypogonadismus und Diabetes mellitus mit "Anamnese". 2nd Internationa Congress of Mental Retardation, Vienna. Karger, Basel & New York. Part 1: 353, 1961.

PURVIS-SMITH, S. G.; SAVILLE, T.; MANASS, S.; YIP, M. Y.; LAM-PO-TANG, P. R.; DUFFY, B.; JOHNSTON, H., LEIGH, D.; MACDONALD, B. Uniparental disomy 15 resulting from "correction" of an initial trisomy 15. *Am J Hum Genet*, v. 50, p. 1348-1350, 1992.

ROBINSON, W. P.; BERNASCONI, F.; MUTIRANGURA, A.; LEDBETTER, D. H.; LANGLOIS, S.; MALCOLM, S.; MORRIS, M. A.; SCHINZEL, A. A. Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am J Hum Genet*, v. 53, p. 740-751, 1993.

STATE, M. W.; DYKENS, E. M.; ROSNER, B.; MARTIN, A.; KING, B. H. Obsessive-compulsive symptoms in Prader-Willi and "Prader-Willi-Like" patients. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, v. 38, n. 3, p. 329-34, 1999.

SPRITZ, R. A.; BAILIN, T.; NICHOLLS, R. D.; LU, S. T. PARK, S. K.; MASCARI, M. J.; BUTLER, M. G.; Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. *Am J Med Genet*, v.71, p. 57-62.

SUN, Y.; NICHOLLS, R. D.; BUTLER, M. G.; SAITOH, S.; HAINLINE, B. E.; PALMER, C. G. Breakage in the *SNRPN* locus in a balanced 46,XX,T(15;19) Prader-Willi Syndrome patient. *Hum Mol Genet*, v.5, p. 517-524, 1996.

TSUYUSAKI Y, YOSHIHASHI H, FURUYA N, ADACHI M, OSAKA H, YAMAMOTO K, KUROSAWA K. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int*, v. 52, n. 4, p. 547-50, 2010.

VAN DEN VEYVER, I. B. Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr.* v. 22, p. 255-82, 2002.

VINTÉJOUX, A.; MONTAGNON, G.; DIENE, G.; GOUYON, J. B.; HUET, F. Severe delayed apnea in neonates and Prader-Willi syndrome: 2 case studies. *Arch Pediatr*, v. 16, n. 3, p. 248-51, 2009.

WATTENDORF, D. J.; MUENKE, M. Prader-Willi Syndrome. *Am Fam Physician*, v.72, n. 5, 2005.

YUNIS, J. J. High Resolution of human chromosomes. *Science*, v. 191, p. 1268-70, 1976.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFREÉ E GUINLE
LABORATÓRIO E AMBULATÓRIO DE GENÉTICA/ UNIGEN

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: *Investigação molecular da Síndrome de Prader-Willi em pacientes suspeitos.*

I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A síndrome de Prader Willi (SPW) é uma doença genética, cuja frequência na população europeia é de 1:15.000 – 1:30.000 das crianças nascidas vivas. Contudo, não se sabe qual a incidência das diferentes causas genéticas envolvidas na população de indivíduos afetados no Brasil. Sabe-se que na maioria das vezes ocorre ao acaso, mas há descrição de casos familiares. Além disso, a obesidade e a deficiência mental (DM) são manifestações clínicas encontradas na síndrome, mas também em outras doenças genéticas, sendo assim o diagnóstico preciso e por qual mecanismo a doença surgiu são fatores importantes para o aconselhamento genético da família dos pacientes. O presente estudo tem por objetivo estabelecer o diagnóstico da SPW em pacientes atendidos no ambulatório de genética do HUGG, com obesidade e DM apresentando ou não outros sinais característicos, através de técnicas que empregam biologia molecular; e, posteriormente, determinar se a causa genética foi por uma perda de parte de um cromossomo 15, através da técnica de FISH, onde os cromossomos são marcados com uma coloração específica para a região da SPW, se um deles estiver anormal, ele não vai apresentar essa coloração.

II – PROCEDIMENTOS

Os pacientes suspeitos de terem a síndrome e seus responsáveis serão submetidos ao preenchimento de um formulário de identificação e protocolo. Amostras de sangue serão coletadas dos pacientes (para cariótipo e extração de DNA) e, posteriormente, conforme os resultados serão colhidas amostras de sangue dos seus pais, quando disponíveis. Os pacientes, provenientes do ambulatório de genética do Hospital Universitário Gaffreé e Guinle (HUGG), terão todos os dados do estudo, anexos ao prontuário hospitalar.

III – DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS

O desconforto, inerente ao estudo, consiste nas coletas de sangue e outros exames que deverão ser feitos a fim de preencher o protocolo para definir o diagnóstico. Os riscos decorrem da necessidade de repetir um ou mais exames, por exemplo, quando a cultura de células não permitir a análise dos cromossomos, esta deverá ser repetida ou as técnicas empregadas não concluírem os objetivos.

Benefícios, uma vez estabelecido o diagnóstico, o aconselhamento genético será feito, com a finalidade de prevenir ou estabelecer o risco de recorrência da enfermidade na família afetada.

IV – ESCLARECIMENTOS

Todas as informações serão comunicadas, assim como quaisquer dúvidas serão esclarecidas aos participantes do estudo (exames, consultas, resultados e riscos). O principal investigador é Catielly Ferreira Rocha, biomédica do ambulatório de genética do HUGG. Haverá colaboração da equipe médica do referido ambulatório. O ambulatório será nossa referência e situa-se à Rua Mariz e Barros, 775 – Tijuca – Rio de Janeiro – RJ, 2264 1595, ou pelo celular da Catielly 9346 0603. Se houver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, deve-se entrar em contato com a Comissão de Ética do HUGG (2264 5517)

V – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

A autorização de participação no estudo pode ser retirada a qualquer momento, sem prejuízo do paciente com relação aos exames realizados e/ou obtenção destes resultados. Toda informação a respeito do participante e seus exames será mantida em sigilo com o intuito de preservar a privacidade do mesmo. As informações serão fornecidas de maneira atualizada, visando um maior esclarecimento dos familiares e até uma eventual mudança de opinião em continuar ou não participando do projeto.

VI – GASTOS

Todos os procedimentos médicos e de diagnóstico laboratorial, pertinentes à pesquisa, serão pagos pela Instituição, exceto àqueles correspondentes a passagens nos transportes coletivos urbanos. O atendimento é em caráter ambulatorial, portanto a coleta do sangue para a pesquisa será feita no curso da consulta.

VII - COMPROMISSOS

O pesquisador responsável se compromete a utilizar os dados obtidos e o material coletado somente para esta pesquisa e publicações científicas decorrentes da mesma. O responsável pelo paciente se compromete em seguir as orientações médicas e as instruções para a coleta de material, quando tiverem que ser realizadas em casa.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____
responsável por _____
declaro ter lido a carta de informação a respeito do projeto de pesquisa:
TÍTULO: *Investigação molecular da Síndrome de Prader-Willi em pacientes suspeitos.*

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que leram para mim, descrevendo o estudo. Eu discuti com a Catielly sobre minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros os objetivos e os propósitos desta pesquisa, os procedimentos a serem realizados, os desconfortos, riscos e as garantias de confidencialidade, além de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também, que a minha participação é isenta de despesas, exceto os inerentes à locomoção e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

_____ Data _____
Assinatura do responsável legal

_____ Data _____
Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação deste estudo.

_____ Data _____
Assinatura do responsável pelo estudo

APÊNDICE B - Protocolo do Paciente

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
Departamento de Genética e Biologia Molecular
Hospital Universitário Gaffrée e Guinle – Ambulatório de Genética

NOME:

DATA DE NASCIMENTO:

NOME PAI:

DATA DE NASCIMENTO:

NOME MÃE:

DATA DE NASCIMENTO:

ENDEREÇO:

BAIRRO:

CIDADE:

TEL.:

CEL.:

RESP.:

DATA DA AVALIAÇÃO CLÍNICA:

CARACTERÍSTICAS FACIAIS: estrabismo(); olhos amendoados (); lábios superiores afilados(); cantos da boca voltados para baixo (); frente estreita().

PESO:

ALTURA:

PERÍMETRO CEFÁLICO:

RESULTADO DO CARIÓTIPO:

OBSERVAÇÕES:

ANEXO A - Protocolo Cytocell, FISH

- a) Mergulhar a lâmina em 2xSSC (pH 7,0) durante 2 minutos.
- b) Desidratar em uma série de etanol (70%, 85% e 100%) 2 minutos em cada um.
Antes da desnaturação
- c) Retire a sonda SNRPN do freezer a -20°C e deixe em temperatura ambiente
- d) Homogeneizar várias vezes a sonda com a pipeta
- e) Retirar 10ul da sonda e colocar sobre a lâmina com o material já fixado, cubra a região da lâmina que está com a sonda com uma lamínula e vede as laterais da lamínula com uma cola transparente
- Desnaturação
- g) Coloque a lâmina em uma placa quente a 75°C e desnature durante 2 minutos.
- Hibridação
- h) Em uma câmara úmida e escura deixe hibridação ocorrer durante toda a noite na estufa a 37°C.
- Banhos pós-hibridação
- i) Retirar cuidadosamente a cola que recobre a lamínula
- j) Lavar a lâmina em 0,4x SSC (pH 7,0) a 72°C por 2 minutos
- l) Escorrer a lâmina e lavá-la em 2x SSC, 0,05% Tween-20 a temperatura ambiente por 30 segundos
- m) Escorrer a lâmina e aplicar 10 microlitros de DAPI (proveniente no Kit da sonda)
- n) Cubra a lâmina com uma lamínula e deixe-a no escuro por 10 minutos para estabilizar o DAPI
- o) Observar a lâmina no microscópio de fluorescência