



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO BIOMÉDICO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LÍVIA LEITE FERREIRA

INVESTIGAÇÃO DA REGIÃO 20q13.32 ONDE SE SITUA O GENE *GNAS* EM
PACIENTES COM FENÓTIPO PRADER-WILLI *LIKE* PELA TÉCNICA DE MLPA
E REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE TRATAMENTO DE PACIENTES COM
SÍNDROME DE PRADER-WILLI COM O HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

Rio de Janeiro

2019

Lívia Leite Ferreira

INVESTIGAÇÃO DA REGIÃO 20q13.32 ONDE SE SITUA O GENE *GNAS* EM
PACIENTES COM FENÓTIPO PRADER-WILLI *LIKE* PELA TÉCNICA DE MLPA
E REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE TRATAMENTO DE PACIENTES COM
SÍNDROME DE PRADER-WILLI COM O HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

Monografia a ser apresentada do curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como
requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Carmen Lucia Antão Paiva

Co-orientadora: Biomédica Mestranda (PPGBMC) Ingrid Camila Possa Paranhos

Rio de Janeiro

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

L383 Leite Ferreira, Livia
Investigação da região 20q13.32 onde se situa o gene GNAS em pacientes com fenótipo Prader-Willi like pela técnica de MLPA e revisão sistemática sobre o tratamento de pacientes com síndrome de Prader Willi com o hormônio do crescimento. / Livia Leite Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2019.
101

Orientadora: Carmen Lúcia Antão Paiva.
Coorientadora: Ingrid Camila Possa Paranhos .
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,
Graduação em Biomedicina, 2019.

1. Síndrome de Prader-Willi. 2. Síndrome de Prader-Willi like. 3. Hormônio do Crescimento. 4. GNAS. 5. Obesidade. I. Antão Paiva, Carmen Lúcia, orient. II. Possa Paranhos , Ingrid Camila, coorient. III. Título.

Lívia Leite Ferreira

**INVESTIGAÇÃO DA REGIÃO 20q13.32 ONDE SE SITUA O GENE *GNAS* EM
PACIENTES COM FENÓTIPO PRADER-WILLI *LIKE* PELA TÉCNICA DE
MLPA E TRATAMENTO DE PACIENTES COM SÍNDROME DE PRADER-
WILLI COM O HORMÔNIO DO CRESCIMENTO: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Profª Drª Carmen Lucia Antão Paiva

Orientadora

Profª Drª Claudia Cardoso Netto

Examinador 1

Prof. Dr Carlos Fernando Araujo-Lima

Examinador 2

Doutoranda Thays Andrade Apolinário

Examinador Suplente

Rio de Janeiro

2019

À minha família, que fez de tudo para que eu
chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de todos os dias me renovar como pessoa; por Ele ser minha base e segurança nos momentos mais difíceis, e pela certeza que Ele ilumina meu caminho e minhas decisões.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe (Aneíse) que me apresentou a biomedicina e ao meu pai (Ailton) por sempre apoiarem minhas escolhas. À minha Tia Neinha e minha prima-irmã Natália por sempre acreditarem no meu potencial e na ciência brasileira. Ao meu irmão Vitor, que da sua forma peculiar, sempre que eu precisava me ajudava. E ao meu avô Geraldo, que mesmo longe, sei que guiou meu caminho até aqui.

Aos meus amigos que fiz durante esses quatro anos e meio, em especial aos da minha turma, Cândida, Carina, Carolina, Gabriela, Hugo, Isabelle, Luiza, Rafael e Sara que fizeram da graduação um período mais fácil e divertido.

À família construída, que foi, literalmente, uma família enquanto a minha de sangue estava longe e um alicerce para nunca desistir. Minha madrinha Michelle, minhas afilhadas Alana, Sulamita e Vanessa e toda família, amo vocês.

E aos demais amigos que a graduação me deu, obrigada pelos conselhos, ensinamentos e calma. Os momentos vividos com vocês, com certeza, foram os mais gratificantes durante a graduação.

Agradeço também aos meus amigos de longa data e de vida, Danielle, Luma, Priscila, Tobias e Vinicius por sempre estarem presentes na minha vida, e acompanharem e torcerem sempre pelo meu sucesso e aturarem as minhas lamúrias.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Carmen Lúcia, por ter confiado no meu potencial e por ter me permitido vivenciar a melhor oportunidade que tive na vida acadêmica e a minha co-orientadora Ingrid Paranhos que não excitou esforços para sanar minhas dúvidas.

E agradeço à UNIRIO por sua excelência e ter me permitido estudar gratuitamente o curso dos meus sonhos, além do auxílio financeiro com a minha bolsa de Iniciação Científica. E à CAPES/PROAP e FINEP/CT-Infra o suporte financeiro do projeto.

*“Science and everyday life cannot and should not
be separated”*

Rosalind Franklin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Síndrome de Prader Willi e características	19
1.2 Obesidade	23
1.3 Uso do Hormônio do Crescimento (GH).....	24
1.4 Técnicas de diagnóstico.....	26
1.4.1 Critérios clínicos.....	26
1.4.2 MLPA	30
1.5 Síndrome de Prader-Willi <i>Like</i>	31
1.6 Gene <i>GNAS</i>	32
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. METODOLOGIA.....	38
3.1 Pacientes	37
3.2 Extração de DNA e SALSA MS-MLPA.....	37
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Paciente 95.....	42
4.2 Paciente 101.....	46
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1 Discussão Paciente 95.....	50
5.2 Discussão Paciente 101.....	51
3. METODOLOGIA.....	53
3.3 Revisão sistemática.....	53
4. RESULTADOS	55
4.3 Revisão sistemática	54
5. DISCUSSÃO.....	61
5.3 Discussão Revisão Sistemática.....	61

6. Conclusão	75
7. Referências	75
8. Apêndices.....	81
9. Anexos.....	83

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquemática das possíveis causas de anormalidades cromossômicas na síndrome de Prader Willi, onde os cromossomos azuis representam os cromossomos paternos e os cromossomos rosas os maternos. Adaptado de Geets; Meuwissen e Van Hul, 2018.....19
- Figura 2:** Cromossomo 15 na região 11-13q, que contém vários genes que contribuem para o fenótipo da SPW. Adaptado de Irizarry; Miller e Freemark et al., 2016.....20
- Figura 3:** Paciente com SPW, em que é possível observar as características de baixa estatura, obesidade e lábios superiores finos e voltados para baixo. Adaptado de Pedrals et al.,21
- Figura 4:** Esquema representando os sinais da fome e saciedade no cérebro, na região do hipotálamo. Os hormônios colecistocinina e leptina serão analisados pelo hipotálamo, que produzirá informações sobre o consumo de alimento. Uma desordem no feedback hipotálamo-hormônio pode desencadear a hiperfagia. Adaptado de Museu Escola do IB – UNESP.22
- Figura 5:** Gene SIM1 localizado no cromossomo 6q.3. Fonte: Adaptado de Genome Decoration Page / NCBI.....31
- Figura 6:** Gene POU3F2. Fonte: Adaptado de Gene Cards Human Gene DATABASE.....32
- Figura 7:** Cromossomo 20 e a localização do gene *GNAS*. Credit: Genome Decoration Page/NCBI33
- Figura 8:** Modelo estrutural de variantes identificadas no *GNAS*, onde a estrutura A é um complexo da proteína ternária do estado ativo do receptor beta2-adrenérgico do receptor acoplado à proteína G, e o heterotrímero Gs livre de nucleotídeos. Fonte: Adaptado de Hendricks; Bochukova e Marenne et al., 2017..... 33
- Figura 9:** Transdução de sinal desencadeado por agonista e ativação/inativação das proteínas G pelo receptor acoplado à proteína G (GPCR). Adaptado de Princípios da Bioquímica de Lehninger, 6ª ed.....35
- Figura 10:** Resultado obtido pelo software Coffalyser.NET, indicando a deleção do éxon 7 do gene *GNAS*, indicada pela seta vermelha.....42

Figura 11: Resultado do eletroferograma gerado pelo software Coffalyser.NET do paciente 95, que auxilia na verificação da qualidade da amostra e corrida eletroforética capilar.....43

Figura 12: Resultado obtido pelo software Coffalyser.NET, indicando a deleção do éxon 1A e 1 do gene *GNAS*, indicada pela seta vermelha.....46

Figura 13: Resultado do eletroferograma gerado pelo software Coffalyser.NET do paciente 95, que auxilia na verificação da qualidade da amostra e corrida eletroforética capilar.....46

Figura 14: Fluxograma de identificação dos artigos utilizados. Fonte: Adaptado do PRISMA.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios clínicos diagnósticos. Adaptado de Carvalho; Cercato e Almeida et al., 2007.....	27
Tabela 2: Novos critérios sugeridos para solicitação da análise genética para Síndrome de Prader-Willi. Adaptado de Carvalho; Cercato e Almeida et al., 2007.....	28
Tabela 3: Programação do termociclador na etapa de desnaturação.....	38
Tabela 4: Programação do termociclador na etapa de hibridação.....	39
Tabela 5: Programação do termociclador na etapa de ligação e digestão.....	39
Tabela 6: Programação do termociclador na etapa de PCR.....	40
Tabela 7: Características clínicas e fenotípicas dos pacientes.....	41
Tabela 8: Critérios de Holm et a (1993) aplicados para o paciente 95 e ao paciente descrito por Ham; Baek e Lee et al. (2014)	44
Tabela 9: Critérios de Gunay-Aygun et al aplicados para o paciente 95 e comparada com o paciente Ham; Baek e Lee et al. (2014)	45
Tabela 10: Critérios de Holm et a (1993) aplicados para o paciente 101 e ao paciente descrito por Demura; Takeda; Yoneda et al. (2003) e Reyes; Karaca; Bastepe et al. (2017).....	47
Tabela 11: Critérios de Gunay-Aygun et al aplicados para o paciente 101 e comparada com o paciente de Demura; Takeda; Yoneda et al. (2003) e Reyes; Karaca; Bastepe et al. (2017)	48
Tabela 12: Termos utilizados para a pesquisa nas plataformas online.....	52
Tabela 13: Os 23 artigos encontrados na busca no PubMed e no LILACS.....	54-55
Tabela 14: Resultados da Revisão Sistemática, com os artigos selecionados para a síntese do estudo.....	57-59
Tabela 15: Fases nutricionais na SPW. Adaptado de Miller (2012).....	61

Tabela 16: Resumo das diretrizes de cuidados clínicos para terapia com rhGH em pacientes com SPW. Adaptado de Deal; Tony e Höybye et al., 2013.....66-67

Tabela 17: Efeitos colaterais que se deve monitorar em pacientes em tratamento com GH. Adaptado de Deal; Tony e Höybye et al., 201370

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A: Resultado gerado pelo Coffalyser.NET do paciente 9582

Apêndice B: Resultado gerado pelo Coffalyser.NET da paciente 10183

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Cadastro da Plataforma Brasil	83
ANEXO B: Termo de Livre e Esclarecido.....	85
ANEXO C: Ficha do paciente do Ambulatório de Genética	89
ANEXO D: Ficha clínica com os critérios de Holm (1993) e Gunay-Aygun et al. (2001).	90
ANEXO E: Descrição do kit SALSA MS-MLPA probemix ME031 (Citogem Biotecnologia)	91

LISTA DE ABREVEATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AG: Grelina nas formas aciladas

AHO: Osteodistrofia hereditária de Albright

ASP: Acilação do plasma

cAMP: Monofosfato de adenosina cíclico

CGH: Hibridação genômica comparativa

CMA: Análise cromossômica por microarray

CNV: Variações no número de cópias

DUP: Dissomia uniparental

FISH: FLuorecente *in situ*

G α : Subunidade alfa da proteína reguladora da subunidade G trimérica ligada à membrana

G $\beta\gamma$: Regiões de ligação complexo beta-gama

GDP: Guanosina difosfato

GTP: Guanosina trifosfato

GER: Gasto energético em repouso

GH: Hormônio do crescimento

GNAS: Gene *Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating*

HDL:LDL: Lipoproteína de alta densidade: lipoproteína de baixa densidade

HUGG: Hospital Universitário Gaffrée Guinle

IGF-I: Fator de crescimento insulina-símile I

MIX: Mistura reacional

MLPA: Amplificação de sondas-Multiplex Dependente de Ligação (do inglês Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MS-MLPA: Amplificação de sondas-Multiplex Dependente de Ligação-Metilação Específica (do inglês Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

OC: Osteoma cútis

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PBMT: Terapia de fotobiomodulação

PHP1A: Pseudo-hipopararidireoidismo tipo 1A

POH: Heteroplasia óssea progressiva

POU3F2: *POU domain, class 3, transcription factor 2*

PPHP: Pseudopseudo-hipoparatiroidismo

PTH: Hormônios a paratiroides

SDS: Escores de desvio padrão

SIM1: Gene *Single-minded 1*

SPW: Síndrome de Prader-Willi

SPWL: Síndrome de Prader-Willi *like*

sSMC: Pequenos cromossomos supranumerários

TSH: Hormônio estimulante da tireoide

UAG: Grelina na forma não-acilada

RESUMO

Diferentes genes podem ser responsáveis por um mesmo fenótipo, como é o caso da obesidade e retardo mental observado na Síndrome de Prader-Willi e compartilhada com outras síndromes, caracterizadas como Síndrome de Prader-Willi *like*. Desvendar a etiologia genética da síndrome proporciona ao paciente o tratamento correto com melhor prognóstico. Um desses tratamentos é a utilização do hormônio do crescimento (GH), que dentre os seus benefícios está o crescimento normal da criança, seguido de melhora no quadro de hiperfagia.

O objetivo desse trabalho foi investigar a presença mutação no gene *GNAS*, conhecido na literatura por causar nos pacientes obesidade, baixa estatura e retardo mental, características clássicas da Síndrome de Prader-Willi. Além disso, foi realizado uma revisão sistemática sobre o tratamento com o hormônio do crescimento em pacientes que apresentam a Síndrome de Prader-Willi.

Foi utilizado o kit SALSA-MLPA ME031-B2 *GNAS* probemix para se investigar *GNAS*, em amostras de DNA extraídas do sangue periférico dos pacientes obesos sindrômicos com diagnóstico molecular negativo para Síndrome de Prader-Willi. Trinta e seis pacientes foram recrutados, dos quais dois apresentaram resultados positivos quanto a alteração no *GNAS*. Para a revisão foi utilizada a metodologia do PICO, proposta pelo PRISMA, seguindo critérios de elegibilidade e exclusão.

O primeiro paciente era do sexo masculino, tinha 8 anos, e apresentou uma aparente deleção do éxon 7 do gene *GNAS*. O segundo paciente era do sexo feminino, e apresentava ao MLPA uma aparente deleção do éxon 1A e 1 também do *GNAS*. Ambas deleções são descritas na literatura em pacientes, separadamente, que também apresentavam características fenotípicas de obesidade, baixa estatura e retardo mental. A revisão contou com 11 artigos encontrados nos sites PubMed e LILACS, que discutiam os benefícios do tratamento com GH, os seus riscos e critérios para a sua administração.

PALAVRA CHAVE: Síndrome de Prader-Willi *like*, *GNAS*, obesidade, tratamento com GH.

ABSTRACT:

Different genes can be responsible for the same phenotype, as in the obesity and intellectual disability observed in the Prader-Willi Syndrome, which is shared among other syndromes, such as the Prader-Willi *like* Syndrome. Unveiling the genetic etiology of the disease provides the patient with a better prognosis of treatment. One of these treatments is the use of Growth Hormone (GH), that provides normal growth of the child, as well better control of the hyperphagia.

The objective of this study to investigate the mutation in the *GNAS* gene, known for causing obesity, short stature and mental deficiencies, characteristic traits of Prader-Willi Syndrome. Also, a systematic review of the available literature was performed about GH treatment in patient with the syndrome.

The SALSA-MLPA ME031-B2 *GNAS* kit was used to investigate the gene, using DNA samples extracted from peripheral blood cells of patients with syndromic obesity and negative molecular testing for Prader-Willi Syndrome. 36 patients were recruited, 2 of the positive for mutations in the gene. For the review, the PICO methodology proposed by PRISMA was used, following eligibility and exclusion criteria.

The first one was an 8-year-old female, with a deletion of *GNAS* exon 7. The second patient was 27-year-old man, presenting deletion of *GNAS* exons 1A and. Both deletions were previously described, separately, with obesity, short stature and mental deficiencies as the phenotype. The review featured 11 articles found on PubMed and LILACS, which discussed the benefits of GH treatment, its risks and criteria for its administration.

KEY WORDS: Prader-Willi *like*, *GNAS*, obesity, GH treatment.

INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de Prader Willi e características

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma doença genética e neurocomportamental que foi descrita pela primeira vez pelos médicos suíços Andrea Prader, Heinrich Willi e Alexis Labhart em 1956. Ela é uma das mais frequentes síndromes com microdeleções cromossômicas e a forma mais comum de obesidade com causa genética, com incidência de 1:10.000 a 15.000 nascimentos (FRIDMAN; KOK; KOIFFMANN, 2000; MESQUITA; BRUNONI; DE PINA NETO et al., 2010 e DIEGUES et al., 2014).

A SPW é caracterizada pela falta de expressão dos genes da região cromossômica 15q11-q13 paterna, resultante de microdeleções intersticiais herdadas do cromossomo paterno (70% dos casos). Além disso, outras anormalidades têm sido relacionadas à SPW, uma delas é a dissomia uniparental materna do cromossomo 15 (DUP materna), que ocorre em 25 % dos casos, quando ambos os cromossomos 15 são de origem materna. Como os alelos maternos herdados estão normalmente inativos, em decorrência de mecanismo de *imprinting* genômico, não há expressão gênica na região. Outras anormalidades seriam os defeitos de *imprinting* do cromossomo paterno, resultante de epimutações (2–5%), gerando um padrão de metilação do DNA semelhante ao materno; e, por fim, translocações (1%) também são uma possível causa da SPW (FIGURA 1) (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007; CHEON, 2016 e MESQUITA; BRUNONI; DE PINA NETO et al., 2010).

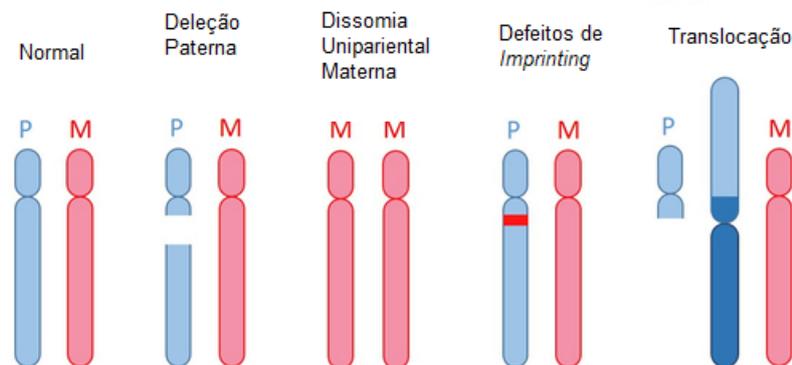


Figura 1: Esquematização das possíveis causas de anormalidades cromossômicas na síndrome de Prader Willi; os cromossomos azuis representam os cromossomos paternos e os cromossomos rosas os maternos. Adaptado de Geets; Meuwissen e Van Hul, et al. (2018)

A SPW é uma desordem multigênica contígua, causada pela perda da expressão de vários genes contidos na região 15q11-13q, onde os genes maternos silenciados são: *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN* e *SNURF/SNRPN/IC* (FIGURA 2). Ainda não se sabe se um único gene é o responsável por tais características, o que sugere que a perda desses múltiplos genes seja necessário para a síndrome, e que a perda da expressão desses genes de forma individual possa contribuir para os vários fenótipos distintos associados a SPW (MILLER; WEVRICK e MELLON, 2009).

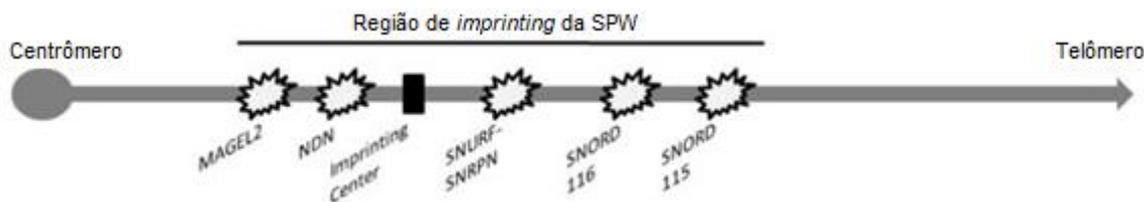


Figura 2: Cromossomo 15 na região 11-13q, que contém vários genes que contribuem para o fenótipo da SPW. Adaptado de IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016

Manzardo e Butler (2016) explicam que quase todos os genes que sofrem *imprinting* genômico possuem regiões metiladas ricas em CpG, sendo tipicamente associada à repressão da expressão gênica. Tal fenômeno surge como contribuinte para a obesidade e vários distúrbios associados a doenças, como por exemplo, a SPW (MANZARDO e BUTLER 2016).

A SPW é caracterizada por, principalmente, hipotonia, retardo mental, características dismórficas e hiperfagia (compulsão alimentar devido à disfunção hipotalâmica). Ela é dividida em duas fases distintas: a primeira é caracterizada pelo recém-nascido que apresenta hipotonia, dificuldade na alimentação com pouca ou nenhuma sucção, hipogonadismo, características faciais peculiares como olhos amendoados, diâmetro bifrontal diminuído, cantos da boca para baixo e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. A hipotonia não é progressiva e tende a melhorar entre 8 e 11 meses de idade. Já a segunda fase tem como principais sinais e sintomas o aumento da hiperfagia, e consequente obesidade, além de outras características (FRIDMAN; KOK; KOIFFMANN, 2000 e CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007).

Baixa estatura está presente em até 90% dos indivíduos afetados. A diminuição da massa magra e o aumento da massa gorda contribuem para a hipotonia e a obesidade. Além disso, a relação massa gorda/ massa magra é maior nos pacientes com SPW quando

comparada a indivíduos de peso normal e obesos não portadores da SPW (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007).

O indivíduo com a SPW apresenta alterações tanto estruturais, como comportamentais e intelectuais. No que tange as alterações estruturais, podemos citar a baixa estatura, relacionada à deficiência de hormônio do crescimento (GH), além de hipogonadismo hipogonadotrófico hipotalâmico, levando ao retardo puberal e a infertilidade, e mineralização óssea reduzida, que está associada aos casos de osteoporose. De acordo com o Diegues et al. (2014), os pacientes com SPW apresentam alterações nos genitais, onde os indivíduos do sexo masculino apresentam criptorquidia, micropênis e bolsa escrotal hipoplásica, já as do sexo feminino apresentam hipoplasia dos genitais externos. A respeito das alterações comportamentais, os indivíduos que apresentam a síndrome possuem comportamento compulsivo e impulsivo, que é percebido através de episódios de auto escoriações, ansiedade, perturbação obsessivo-compulsivo, crises de raiva e violência, tendência à rigidez, comportamento de mentir e furtar e hábito compulsivo alimentar. E quanto as alterações intelectuais, os pacientes apresentam graus variados de retardo mental, dificuldade para aprender e menor coeficiente de inteligência quando comparada a indivíduos normais da mesma idade. Há também alterações em habilidades de competência social, controle inibitório e déficit de atenção e hiperatividade (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007; DIEGUES et al., 2014) (FIGURA 3).



Figura 3: Paciente com SPW, em que é possível observar as características de baixa estatura, obesidade e lábios superiores finos e voltados para baixo. Fonte Pedrals et al., 2012

Dos problemas enfrentados na SPW, a hiperfagia é um dos principais, em que o indivíduo apresenta uma grave desordem alimentar, por ingestão exacerbada, ultrapassando a demanda energética do organismo. Essa hiperfagia desencadeia o desenvolvimento da obesidade e doenças endócrinas (MESQUITA; SERACENI E CARREIRO et al., 2014).

A obesidade é a principal causa de mortalidade entre os indivíduos com SPW, com os agravantes de um maior risco de se desenvolver hipertensão, diabetes, insuficiência respiratória e cardíaca. Essa obesidade está relacionada à disfunção no hipotálamo, amígdala e hipocampo nos pacientes, que apresentam uma menor resposta à saciedade, causando compulsão alimentar, a hiperfagia, que é um dos principais sintomas da doença (Figura 4). Junto a essa disfunção hipotalâmica, a obesidade nos pacientes com Prader-Willi pode ser explicada por problemas endócrinos e metabólicos, onde a deficiência em GH e a alteração da composição corporal, também auxiliam na patogênese da obesidade (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007; DIEGUES et al., 2014; MESQUITA; SERACENI E CARREIRO et al., 2014).

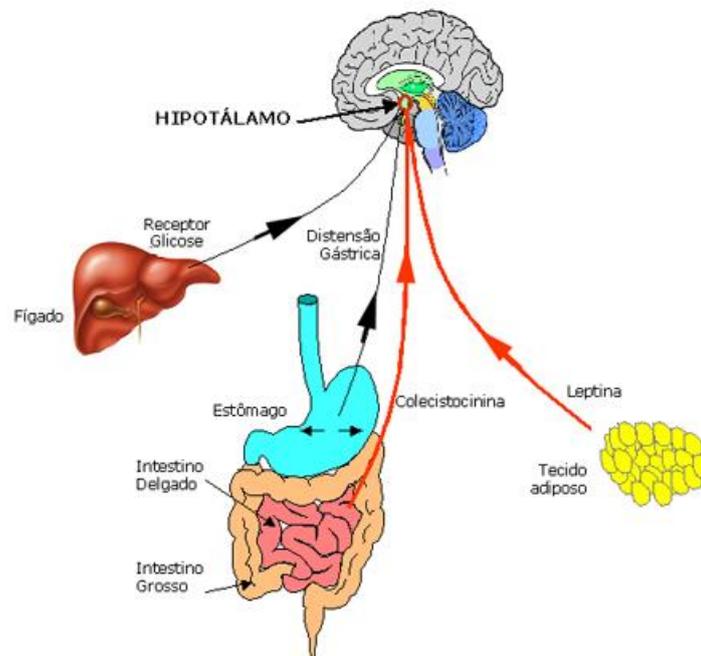


Figura 4: Esquema representando os sinais da fome e saciedade no cérebro, na região do hipotálamo. Os hormônios colecistocinina e leptina atuam no hipotálamo, que produzirá informações sobre o consumo de alimento. Uma desordem no feedback hipotálamo-hormônio pode desencadear a hiperfagia. ADAPTADO de Museu Escola do IB – UNESP.

1.2 Obesidade

A obesidade é um distúrbio geneticamente heterogêneo, onde Manzardo e Butler (2016) a define tendo como característica o índice de massa corporal superior a 30 kg/m², sendo um problema de saúde generalizado. A SPW é a forma mais comum de obesidade síndrômica, tendo por início o sintoma por volta dos 2 anos de idade, levando a problemas mais graves. São conhecidas mais de 25 formas de obesidade síndrômica, nas quais podem estar envolvidos um gene (monogênica) ou mais (poligênica). A forma mais comum é a obesidade poligênica multifatorial, causada por fatores genéticos e ambientais (GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018; HENDRICKS; BOCHUKOVA; MARENNE et al., 2017 e MANZARDO e BUTLER, 2016).

Geets; Meuwissen e Van Hul (2018) nos explica que até o momento, foram identificados até 97 *loci* relacionados com a obesidade poligênica, que correspondem por aproximadamente 2,7% da variação do IMC. Porém, a obesidade monogênica não síndrômica é mais grave e rara e a maioria dos genes fazem parte da via de sinalização da leptina no hipotálamo, responsável pela manutenção da homeostase energética. Já a obesidade monogênica síndrômica refere-se a um conjunto distinto de fenótipos clínicos associados ao sobrepeso, como por exemplo deficiência intelectual, características dismórficas e anormalidades de desenvolvimento específicas do órgão (GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

O fenômeno epigenético conhecido como *imprinting* genômico afeta um pequeno número de genes que resulta na supressão parcial ou completa da expressão gênica de um alelo parental, e em muitos casos, a obesidade está associada à função alterada de genes que sofreram ação de mecanismos epigenéticos. Com isso, genes impressos normalmente estão silenciados, uma vez que, a metilação ocorre dentro da região promotora do gene, assim a função sobre o metabolismo energético é prejudicada, além de comprometer o crescimento fetal. (WEINSTEIN; XIE e QASEM et al, 2011)

A SPW é a forma mais comum de obesidade síndrômica, onde nos primeiros meses de vida, devido a hipotonia muscular, a alimentação é dificultada, e o tecido adiposo se encontra em porcentagem variável. Conforme o paciente vai envelhecendo, ele ganha peso, mas sem mudanças no apetite e na ingestão alimentar. Contudo, com o tempo há o aumento de apetite e diminuição da sensação de saciedade, e a massa corporal chega a ser 45% composta pelo tecido adiposo (GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018 e SIMONY; CHAUD; SPINELLI, 2012).

O paciente com SPW, ao chegar no quarto ano de vida, começa então a apresentar os sintomas de hiperfagia, com apetite voraz e progressivo ganho de peso. A compulsão alimentar pode chegar a níveis críticos, onde a obesidade no paciente pode colocar a sua vida em risco, devido a hipoventilação alveolar. Com isso, a obesidade torna-se a principal causa de morbidade e mortalidade entre pacientes com SPW (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007 e DAMIANI et al., 2008).

A obesidade exógena presente nos pacientes com SPW vai seguir um padrão hiperfágico diferente do de indivíduos normais também com obesidade exógena. De acordo com Garzuzi; Carreiro; Schwartzman et al. (2009), essa diferença está relacionada com o padrão comportamental de privação-saciedade. Estudos comprovam que crianças com SPW não manifestam desaceleração do comportamento de comer, indicando falta de saciedade, o que contrapõe às crianças obesas sem SPW. A atividade física é prejudicada pela obesidade, agravando ainda mais a hipotonia (GARZUZI; CARREIRO; SCHWARTZMAN et al., 2009 e SIMONY; CHAUD; SPINELLI, 2012).

Porém, de acordo com Amaro; Teixeira; Mesquita et al. (2013), quando o paciente com SPW faz treinamento físico, o mesmo traz benefícios importantes para a saúde física dessas pessoas, como a melhora da capacidade cardiorrespiratória, aumento da resistência muscular e redução do peso. Contudo, o treinamento deve ser acompanhado e feito com cautela, uma vez que, os sintomas causados pela síndrome, como frouxidão ligamentar, obesidade, hipotonia e alteração na estrutura do aparelho locomotor podem ser agravados (AMARO; TEIXEIRA; MESQUITA et al., 2013)

1.3 Uso do Hormônio do Crescimento (GH)

O processo de crescimento humano é complexo e dependente de múltiplos fatores, tanto endógenos quanto exógenos. Dos endógenos podemos citar a genética, os hormônios, a etnia e o metabolismo, por exemplo; já os exógenos, a nutrição. Tais fatores durante a gravidez, infância e adolescência irão determinar a altura final do indivíduo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) determina que o atraso no crescimento ou baixa estatura para a idade como um dos mais significativos impedimentos para o desenvolvimento humano, afetando 162 milhões de crianças menores de 5 anos no mundo. Um dos efeitos ao longo prazo causados pelo déficit de crescimento são o desenvolvimento cognitivo e físico afetados, bem como a saúde geral e a capacidade produtiva (AMARILLA; TASSARA; e CHAVES et al., 2016).

A densidade mineral óssea reduzida em pacientes com SPW é decorrente da baixa secreção do GH. Além disso, a patogênese da obesidade em indivíduos com SPW parece estar relacionada com a deficiência em GH, onde as suas ações metabólicas estão relacionadas com o aumento da massa magra e redução de tecido adiposo. Por essa razão, hoje em dia existe algumas pesquisas para verificar o efeito do GH na composição corporal nos pacientes com SPW (SIMONY; CHAUD; SPINELLI, 2012; e FINTINI et al., 2017).

O GH ou somatotrofina é uma proteína composta por 191 aminoácidos, que é sintetizada na adenohipófise. Sua deficiência causa no indivíduo baixa estatura/baixa velocidade de crescimento. A terapia utilizando o GH existe há mais de 50 anos, passando por diferentes estágios de produção, sendo a tecnologia do DNA recombinante utilizada atualmente, onde sua molécula é exatamente igual ao do hormônio endógeno (AMARILLA; TASSARA; e CHAVES et al., 2016).

De acordo com Carvalho; Cercato; Almeida et al. (2007), estudos feitos para se analisar a resposta à reposição de GH estão tendo efeitos favoráveis, com melhora na composição corporal, redução da massa gorda e aumento da massa magra, se administrado juntamente com orientação nutricional adequada. Já Simony; Chaud; Spinelli (2012) aponta que os benefícios do tratamento com GH foram a redução da gordura corporal, e normalização da altura de crianças com SPW. Já em adultos, o uso do hormônio durante dois anos foi responsável por contribuir para melhora da composição corporal e função muscular e aumento dos níveis séricos do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I). Contudo, o uso de GH parece não ter efeito significativo no controle dos níveis séricos para substâncias que controlam o apetite, e ainda é discutido se realmente a terapia com GH predispõe a resistência à insulina nos pacientes (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007 e SIMONY; CHAUD; SPINELLI, 2012).

Já foi observado em um estudo, a relação da administração do GH e o metabolismo de carboidratos, e constatou-se uma melhora em relação a intolerância à glicose, além de normalização dos níveis séricos e regressão da resistência à insulina. Observaram-se também que a glicemia dos pacientes em jejum, os níveis de hemoglobina glicada e triglicérides foram normais (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007).

O GH possui um secretagogo endógeno, ou seja, uma substância que promove ou estimula a sua secreção. Essa substância é a grelina, peptídeo orexigênico produzida por

células do fundo gástrico. Em pacientes com SPW, esse peptídeo está em níveis elevados, e parece desempenhar papel importante na fisiologia das alterações fenotípicas da SPW (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007).

1.4 Técnicas de diagnóstico

1.4.1 Critérios clínicos

Os mecanismos genéticos exatos que levam à SPW são incertos, porém, o fenótipo da síndrome é bem descrito, como dito anteriormente. Suas características clínicas variam conforme a idade e as manifestações menores são frequentes, porém, inespecíficas. O diagnóstico para SPW baseia-se em critérios clínicos, que serão confirmados com diagnóstico laboratorial de análise genética. Em 1993, Holm e colaboradores desenvolveram um sistema de pontuação baseado em critérios clínicos divididos em critérios maiores (1 ponto) e menores (0,5 ponto), e além dos critérios maiores e menores, existe também os critérios de apoio, em que não há pontuação, conforme ilustrado na Tabela 1 (CARVALHO et al., 2007; GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018; GUNAY-AYGUN et al., 2001; IRIZARRY, MILLER e FREEMARK et al., 2017 e PEREIRA; PEREIRA; MATTA et al 2009).

Tais critérios foram desenvolvidos, uma vez que, na época, técnicas moleculares para diagnóstico laboratorial ainda não estavam amplamente disponíveis, como hibridação fluorescente *in situ* (FISH), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou os microssatélites, além de ajudar os médicos a confirmar ou descartar o diagnóstico de SPW em uma base clínica, e identificar pacientes que necessitam de testes genéticos imediatos (GUNAY-AYGUN et al., 2001; DELLO RUSSO; DEMORI; SECHI et al., 2016 e IRIZARRY; MILLER, e FREEMARK et al., 2017).

A sensibilidade dos critérios varia, entre uns mais sensíveis do que outros, por isso, em 2001, os autores Gunay-Aygun e colaboradores revisaram tais critérios clínicos para ajudar a identificar pacientes apropriados para os testes de diagnósticos moleculares da SPW. Para isso, Gunay-Aygun e colaboradores propuseram a divisão dos mesmos por faixa etária em que é mais frequente a manifestação de tais características, uma vez que a SPW apresenta características distintas conforme a idade conforme visto na Tabela 2 (CARVALHO; CERCATO; ALMEIDA et al., 2007 e GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

Com isso, seria indicado a realização de testes moleculares considerado a hipotonia inexplicada em crianças recém-nascidos/lactentes; história de hipotonia associada ao atraso de desenvolvimento para crianças de 2 e 6 anos; com base nas sensibilidades dos critérios publicados, é sugerido testar os recém-nascidos- lactentes que apresentaram hipotonia inexplicada com dificuldade de sucção. Para crianças entre 2 e 6 anos de idade, consideramos a hipotonia com histórico de dificuldade de sucção associado com atraso global de desenvolvimento critérios suficientes para solicitar testes. Dos critérios utilizados, o de atraso do desenvolvimento e hipotonia neonatal são os critérios mais constantemente positivos, com uma taxa de 97% (GUNAY-AYGUN et al., 2001).

Tabela 1: Critérios clínicos diagnósticos.

Critérios maiores (1 ponto)	Critérios menores (0,5 pontos)
Hipotonia neonatal	Diminuição dos movimentos fetais
Dificuldade de alimentação na infância ou retardo do desenvolvimento neuropsicomotor	Problemas de comportamento (5 entre: fúria, acessos de violência, obsessivo-compulsivo, argumentativo, rígido, possessivo, teimoso, mentiroso e cleptomania)
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano e 6 meses	Apneia do sono
Hipogonadismo	Baixa estatura
Deficiência mental, problemas de aprendizagem	Cabelos, olhos e pele mais claro
Hiperfagia, obsessão por comida	Mãos e pés pequenos
Características faciais (olhos amendoados, lábio superior pouco espesso)	Mãos estreitas
Deleção do locus 15q11-q13 em análises citogenéticas	Miopia
	Saliva viscosa
	Defeito na articulação de palavras
	Lesões de pele (autoagressão)

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. Fonte: Adaptado de Carvalho; Cercato e Almeida et al., 2007

Tabela 2: Critérios sugeridos para solicitação da análise genética para Síndrome de Prader-Willi.

Idade	Critérios
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 história de má sucção 2. Atraso global do desenvolvimento 3. Excessiva ingesta alimentar (hiperfagia, obsessão alimentar) com obesidade central resultante se não controlada
Maiores de 12 anos	1. Funções cognitivas prejudicadas; geralmente retardo mental moderado 2. Excessiva ingesta alimentar (hiperfagia, obsessão por alimento) com obesidade central resultante se não controlada 3. Hipogonadismo, hipogonadotrófico e/ou problemas comportamentais típicos (incluindo transtornos obsessivos-compulsivos e temperamento tântrico)

A análise genética está indicada caso os pacientes com suspeita de Prader-Willi apresentem todos os critérios correspondentes a sua faixa etária

Fonte: Adaptado de Carvalho; Cercato e Almeida et al., 2007

Determinados então os critérios clínicos, segue-se para o diagnóstico laboratorial, sendo 95% dos resultados positivos para SPW, onde 70%-80% dos pacientes apresentam deleção de 15q11-q13 paterna, 25% têm dissomia uniparental e 1% defeitos no “*Centro de Imprinting*” paterno, impossibilitando a expressão na região (MESQUITA; BRUNONI; DE PINA NETO et al., 2010).

Segundo Pereira; Pereira; Matta et al (2009), as deleções responsáveis pela SPW podem ser diagnosticadas por técnicas de citogenética, hibridação, FISH e marcadores moleculares, como a técnica de PCR e Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). O cariótipo é pouco utilizado pela dificuldade da visualização da deleção da parte 15q11-q13 (apenas 3-5Mb) em microscópio de luz, além das diferenças na condensação da banda 15q12. Com isso, segundo Rocha (2011), bandas-G não são suficientes para diagnosticar SPW. Por isso, para se obter um diagnóstico mais preciso, é necessário técnicas moleculares, como o teste de metilação baseado em PCR para amplificação da região 15q11-q13. O diagnóstico é realizado por meio do teste de padrão de metilação, utilizando-se a hibridação com sondas sensíveis dos *locus* SNRPN e PW71 (ROCHA, 2011 e FRIDMAN; KOK; KOIFFMANN, 2000).

Por ser uma síndrome que, conforme a idade algumas características mudam, o diagnóstico clínico é complexo, e por isso, nos últimos anos as bases genéticas da SPW

têm sido intensamente investigadas, para que não haja confusão com outras síndromes com característica semelhantes (FRIDMAN; KOK; KOIFFMANN, 2000).

Contudo, a maior parte dos casos de SPW, infelizmente, só é detectada quando a obesidade aparece, ou seja, tardiamente, o que prejudica o desenvolvimento da criança e seu tratamento. Fridman, Kok e Koiffmann (2000) sugere que os testes genéticos sejam pedidos em neonatos e lactentes com hipotonia e dificuldade de sucção e outras características da síndrome, para evitar testes mais invasivos, como eleroneuromiorafia e biópsia muscular. Mesmo que seja uma doença genética e sem cura, quanto antes a síndrome for diagnosticada, com acompanhamento médico e tratamento corretos, melhor prognóstico de desenvolvimento da criança, com maior expectativa e melhores condições de vida (FRIDMAN; KOK; KOIFFMANN, 2000 e PEREIRA; PEREIRA; MATTA et al 2009).

1.4.2 MLPA

Apesar do índice de diagnóstico com base nos critérios clínicos serem altos, a análise de metilação é obrigatória para a confirmação do diagnóstico da SPW. O MLPA, segundo Schouten; McElgunn; e Waaijer et al. (2002) é um método para quantificação relativa de até 40 sequências diferentes de DNA em uma reação simples a ser realizada, sendo necessário apenas 20ng/μl de DNA para sua realização. (GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

Nessa técnica, são adicionadas sondas às amostras, que serão amplificadas e quantificadas. Para a amplificação das sondas por PCR, como explicam Schouten; McElgunn; e Waaijer et al. (2002), é necessário que tenha a presença de sequências alvo da sonda na amostra. Essa sonda é composta por dois oligonucleotídeos, sendo um sintético e outro derivado de M13, que será hibridizado em locais adjacentes da sequência alvo. Dessa maneira, Schouten; McElgunn; e Waaijer et al. (2002) explica que todas as sondas ligadas têm sequências finais idênticas, e que, dessa maneira, há a amplificação simultânea por PCR, utilizando-se apenas um par de primers (SCHOUTEN; MCELGUNN; e WAAIJER et al., 2002;).

A análise de MLPA de Metilação Específica (MS-MLPA) possui uma taxa de detecção de mais de 99%, e quando comparada com a metilação tradicional do DNA, possui como vantagem a investigação em 5 *loci* metilados diferentes, e não apenas um, como no teste de metilação tradicional, além de fornecer informações sobre o número de

cópias na região 15q11.2. A análise cromossômica por microarray (CMA) é o primeiro teste a ser realizado quando se suspeita de SPW e, quando comparado com a técnica de MLPA, a CMA fornece informações mais precisas sobre a extensão da deleção, entretanto o MLPA apresenta um custo-efetividade melhor. Contudo, quando comparada com outros testes, o MLPA não é capaz de detectar inversões e translocações cromossômicas, sendo necessário a análise simultânea do cariótipo e realização do FISH (CHEON, 2016).

Geets; Meuwissen e Van Hul (2018) ressaltam que a vantagem da técnica do MLPA em relação às outras técnicas, é a sua capacidade de diferenciar a SPW da síndrome de Angelman, que é uma condição genética que mostra ausência da expressão de genes maternos na região 15q11.2-q13. Porém, quando são realizados os testes clínicos e laboratoriais, como MLPA e técnicas adicionais, e mesmo assim o diagnóstico para SPW não é confirmado molecularmente, tais pacientes são considerados como portadores de Síndrome de Prader-Willi *Like* (GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

Contudo, tal técnica apresenta limitações, como a maior sensibilidade a contaminantes do que as reações convencionais de PCR, incapacidade de detectar anomalias no nível de única célula e mutações pontuais desconhecidas, além da sensibilidade a novas alterações na sequência na/ou perto de uma ligação da sonda. (MRC-Holland MLPA®)

1.5 Síndrome de Prader-Willi *Like*

A síndrome de Prader-Willi *Like* (SPWL), como definida por Candelo; Feinstein; Ramirez-Montaña et al. (2018), são síndromes raras com fenótipo de Prader-Willi (hipotonia, obesidade, extremidades curtas, e atraso no desenvolvimento), porém não apresenta a mutação na região 15q11-q13. Clinicamente, o fenótipo é heterogêneo, sendo associada a variações no número de cópias (CNVs) em diferentes cromossomos. Por possuir uma causa genética diversificada, a ausência de diagnóstico correto pode piorar o prognóstico, devido ao mau funcionamento endócrino-metabólico associado à SPW (CHEON, 2016 e GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

Esta síndrome apresenta sobreposição clínica com outras doenças, e já foi descrita em pacientes com deleções 1p36.6; 2p21; 3p26.3; 6q; anormalidades cromossômicas 9q34; 10q26; 12q; em casos com dissomia uniparental materna do cromossomo 14 e X frágil, sendo as deleções 6q as mais comuns (CANDELO; FEINSTEIN; RAMIREZ-MONTAÑA et al., 2018; CHEON, 2016 e GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

Para tal investigação, uma variedade de testes pode ser realizada para confirmar realmente que a deleção não ocorre na região 15q11-q13, como por exemplo terapia de fotobiomodulação (PBMT), FISH e análise cariotípica, bem como hibridação genômica comparativa (CGH), como realizado no paciente descritos por Rocha (2011). Geets; Meuwissen e Van Hul (2018) destacam também o uso de microarrays cromossômicos para identificação das CNVs. (GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018 e ROCHA, 2011)

Desch; Marle; Mosca-Boidron et al. (2015) destacam que o caso clínico apresentado por eles é resultante de alterações de pequenos cromossomos supranumerários (sSMC), que são cromossomos estruturalmente anormais, geralmente do mesmo tamanho ou menores, que não podem ser caracterizados por bandas convencionais citogenéticas. Eles podem ter formatos diferentes, e na maioria dos casos consistem em material cromossômico pericêntrico. Os sSMC podem se originar de qualquer parte dos cromossomos humanos para formar neocentrômeros. Os sSMC associados a outras condições predispõe à obesidade e incapacidade de desenvolvimento nos indivíduos. (DESCH; MARLE; MOSCA-BOIDRON et al., 2015;)

Geets; Meuwissen e Van Hul (2018) evidenciam que a maioria das deleções encontradas estão no 6q, englobando o gene *Single-minded 1 (SIM1)* (FIGURA 5), que faz parte da via de sinalização da leptina-melanocortina, responsável pela regulação da homeostase energética, sendo uma das causas de obesidade nesses pacientes. Além do *SIM1*, também no cromossomo 6, um gene encontrado a jusante do *SIM1*, o *POU domain, class 3, transcription factor 2 (POU3F2)* (FIGURA 6) também tem um papel no fenótipo de obesidade. Geets; Meuwissen e Van Hul (2018) mostra também que os sinais e sintomas da SPW também são comuns a outras síndromes, como a Síndrome de Bardet-Biedl (BBS), Síndrome de Angelman, microdeleções em 16p11.2, síndrome do X frágil, síndrome de Cohen, síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann e síndrome de LRP (GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

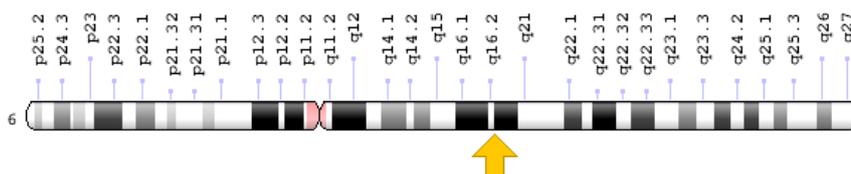


Figura 5: Gene SIM1 localizado no cromossomo 6q.3. Fonte: Adaptado de Genome Decoration Page / NCBI

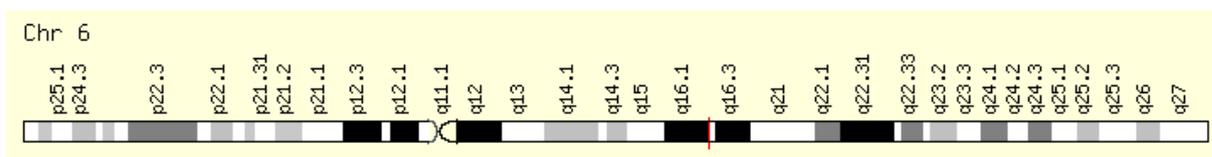


Figura 6: Gene POU3F2. Fonte: Adaptado de Gene Cards Human Gene DATABASE

As doenças com características fenotípicas semelhantes a SPW, porém, podem precisar de tratamentos diferentes daqueles usados para SPW, e por isso, os médicos necessitam investigar molecularmente cada caso. Porém, ambos tratamentos são focados nos sintomas, que são compatíveis entre si, e pode ocorrer do tratamento ser semelhante, por ambos os fenótipos serem iguais (CANDELO; FEINSTEIN; RAMIREZ-MONTAÑO et al., 2018 e GEETS; MEUWISSEN e VAN HUL, 2018).

No entanto, os clínicos enfrentam desafios quanto ao aconselhamento genético dos pacientes com SPWL, sendo que a ausência de diagnóstico correto pode piorar o prognóstico desses indivíduos devido ao mau funcionamento endócrino-metabólico associado à SPW (CHEON, 2016).

1.6 Gene *GNAS*

O *Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating (GNAS)* está localizado no braço longo (q) do cromossomo 20, na posição q13.32 (FIGURA 7) ([Genome Decoration](#) Page/NCBI) sendo uma unidade transcricional complexa com múltiplas variantes de transcritos. Ele é um gene “imprintado” regulado por hormônios, implicado em um fenótipo e síndromes associadas à obesidade, como é o caso da osteodistrofia hereditária de Albright. Estudos com roedores mostram que o gene *GNAS* está imprintado no núcleo paraventricular do hipotálamo, local onde a maioria dos neurônios expressam o receptor MC4R acoplado à proteína G, sendo plausível, supor, que tal gene esteja relacionado com a obesidade e crescimento linear, devido à redução da sinalização da melanocortina, não tendo estímulos a atividades do sistema nervoso simpático e gasto de energia (HALDEMAN-ENGLERT; HURST et al., 2017; HENDRICKS; BOCHUKOVA; MARENNE et al., 2017; MANZARDO e BUTLER, 2016 e WEINSTEIN; XIE e QASEM et al, 2011).

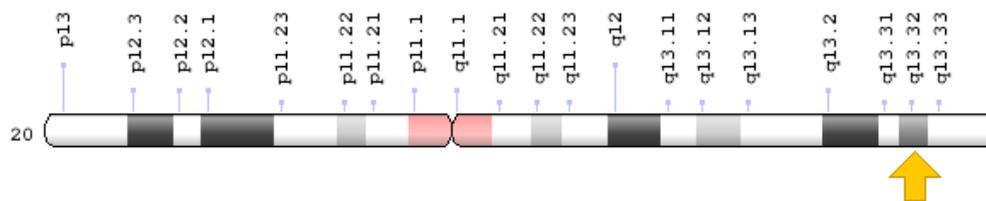


Figura 7: Cromossomo 20 e a localização do gene *GNAS*. Credit: Genome Decoration Page/NCBI

O gene *GNAS* apresenta alguns domínios principais, sendo eles: o domínio α helicoidal e domínio GTPase tipo-Ras, onde as principais interações do *GNAS* com a proteína G (GPCRs) envolve as hélices α terminais e carboxi. Já o domínio da GTPase do tipo Ras apresenta a maioria dos resíduos catalíticos que são necessários para a hidrólise do GTP (guanosina trifosfato), assim como as regiões de ligação complexo beta-gama ($G\beta\gamma$) e efetoras das regiões de troca I, II e III, que mudam de conformação ao se ligar ao guanosina trifosfato ou guanosina difosfato (GDP) (HENDRICKS; BOCHUKOVA; MARENNE et al., 2017) (FIGURA 8).

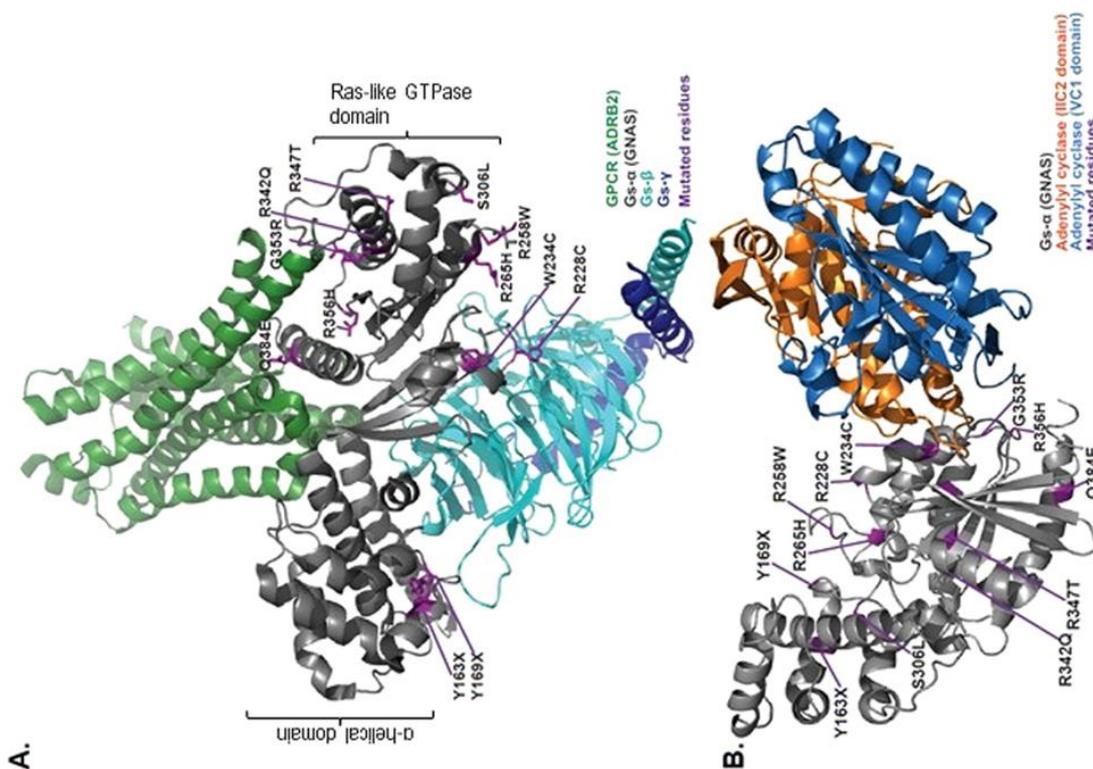


Figura 8: Modelo estrutural de variantes identificadas no *GNAS*, onde a estrutura A é um complexo da proteína ternária do estado ativo do receptor beta2-adrenérgico do receptor acoplado à proteína G, e o heterotrímero Gs livre de nucleotídeos. Fonte: Adaptado de HENDRICKS; BOCHUKOVA; MARENNE; et al., 2017

O gene *GNAS* e seus promotores alternativos usam mecanismos de *splicing* para produzir múltiplos transcritos que podem ser expressos bialelicamente ou

monoalelicamente. Ele codifica quatro transcritos principais, subunidade alfa da proteína G (que se liga e hidrolisa o GTP como um efeito à jusante após ativação de um receptor hormonal), XLAS (isoforma expressa paternalmente), NESP55 (expressa matematicamente e codifica uma proteína secretora neuroendócrina do tipo cromogranina) e o transcrito A/B (derivado do alelo *GNAS* paterno). O status de metilação realizado por Manzardo e Butler, (2016) comprovou que o gene *GNAS* se apresenta normal na SPW, evidenciando que possíveis alterações no gene podem desencadear fenótipo de SPWL (BUTLER, 2009; MANZARDO e BUTLER, 2016 e HALDEMAN-ENGLERT; HURST et al., 2017).

Em 1942, Albright pela primeira vez relatou a condição de osteodistrofia em pacientes com deleção no gene *GNAS*, devido à resistência do órgão-alvo às ações dos hormônios a paratireoide (PTH), onde duas variantes foram descritas: pseudohipopararidireoidismo (PHP), podendo ser do tipo Ia, Ib, ou Ic e pseudopseudohipoparatiroidismo (PPHP). Ambas variantes da osteodistrofia hereditária de Albright (AHO) são resultantes da função prejudicada da subunidade alfa da proteína reguladora da subunidade G trimérica ligada à membrana ($G\alpha$). A haploinsuficiência de $G\alpha$ resulta em PHP-Ia e PHP-Ic pela falta de expressão do alelo do *GNAS* materno, desenvolvendo resistência de vários hormônios. Já quando a falta de expressão se dá no alelo paterno, resulta em PPHP, em que não há o desenvolvimento da resistência hormonal (BUTLER, 2009; WEINSTEIN; XIE e QASEM; et al, 2011; SANCTIS; GIACHERO e MANTOVANI et al., 2016 e HALDEMAN-ENGLERT; HURST et al., 2017).

A proteína $G\alpha$ é sinalizadora de ligação ao nucleotídeo guanina, e apresenta a função de acoplar receptores de membrana para a atividade da adenil ciclase, estimulando assim o mensageiro secundário, monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) na via de sinalização de vários hormônios peptídicos que se ligam aos receptores acoplados à proteína G, como PTH, hormônio estimulante da tireoide (TSH), hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), calcitonina e gonadotrofinas, entre outros (FIGURA 9). Logo, $G\alpha$ é necessária para a produção de cAMP, que por sua vez, ativa moléculas sinalizadoras, como a proteína cinase A (PKA), que irão ativar processos metabólicos, como lipólise, gliconeogênese e glicogenólise, por meio da fosforilação direta de enzimas e fatores envolvidos no metabolismo intermediário (BUTLER, 2009; WEINSTEIN; XIE e QASEM et al, 2011 e SANCTIS; GIACHERO; MANTOVANI, et al., 2016).

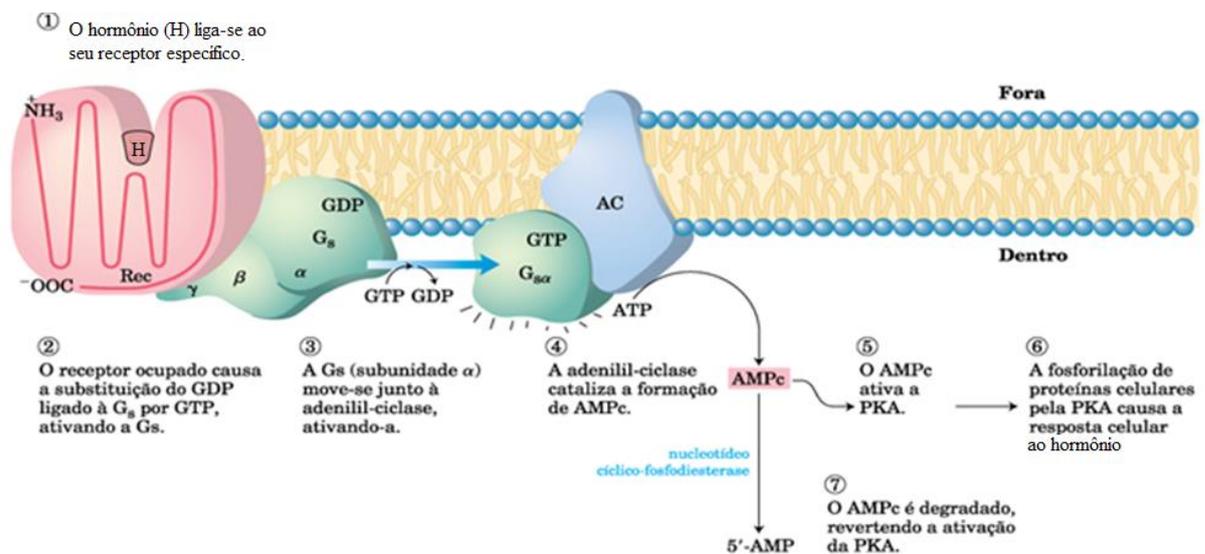


Figura 9: Transdução de sinal desencadeado por agonista e ativação/inativação das proteínas G pelo receptor acoplado à proteína G (GPCR). Adaptado de Princípios da Bioquímica de Lehninger, 6ª ed.

A síndrome AHO é a evidencia mais direta do papel do *GNAS* na regulação do balanço energético, ela apresenta características clínicas compartilhadas com a SPW, tais como: baixa estatura, obesidade moderada, deficiência mental (QI médio de 60), metacarpo e metatarsos curto, falange distal curta do polegar, osteoporose, hipocalcemia, hipoterooidismo, hipogonadismo. Além disso, apresenta também características que diferem da SPW, como: face arredondada com nariz e pescoço curto, erupção dentária atrasada, opacidade do cristalino, atrofia óptica, degeneração ocular e anomalias vertebrais (BUTLER, 2009 e WEINSTEIN; XIE e QASEM et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar molecularmente, por MLPA, a região 20q13.32, onde se situa o gene *GNAS*, em pacientes obesos sindrômicos com diagnóstico molecular negativo para SPW (PCR-ME).

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar por MLPA, utilizando-se o kit SALSA-MLPA ME031-B2 *GNAS* probemix, a região 20q13.32, onde se situa o gene *GNAS*, em 36 pacientes obesos sindrômicos com diagnóstico molecular negativo para SPW (PCR-ME) e negativos para outros kits de MLPA previamente utilizados pelo grupo.
2. Realizar um levantamento das características clínicas de todos os pacientes, a partir de suas fichas presentes no arquivo do ambulatório de genética.
3. Realizar revisão da literatura de mutações nos genes investigados neste estudo, e comparar o fenótipo final dos indivíduos portadores de tais mutações com o fenótipo dos pacientes deste projeto.
4. Realizar uma revisão sistemática da literatura acerca das principais características dos pacientes com Síndrome de Prader-Willi, concomitante ao seu tratamento com base no hormônio do crescimento e sua eficácia.
5. Discutir a importância do diagnóstico diferencial das Síndromes de Prader-Willi e Prader-Willi *like* diante das diferentes estratégias terapêuticas e causas genéticas.

Capítulo 1: Experimental

3. METODOLOGIA

3.1 Pacientes

Este projeto de pesquisa foi desenvolvido sob os padrões vigentes de ética em pesquisa com seres humanos, segundo a resolução 466/12 CNS/MS. Ele é uma extensão do estudo “Investigação Molecular da Síndrome de Prader-Willi em pacientes suspeitos” cuja aprovação consta nos registros da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée Guinle (HUGG), de número 04/2009 e está cadastrado na plataforma Brasil sob o número CAAE 25858314.9.0000.5258 (ANEXO A).

Ao todo, 36 pacientes que já faziam acompanhamento no ambulatório de genética do HUGG foram selecionados de ambos os sexos. O fator de inclusão para a pesquisa foi a presença do critério obesidade/sobrepeso e atraso no desenvolvimento mental positivos com diagnóstico molecular para Síndrome de Prader-Willi negativo. Todos os responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B) e foi feito o preenchimento das fichas clínicas de acompanhamento do ambulatório de genética do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (ANEXO C) com os critérios de Holm e Gunay-Aygun (ANEXO D).

3.2 Extração de DNA e SALSA MS-MLPA

Para realização da pesquisa, foram coletados, no HUGG, cerca de 4ml de sangue periférico, em tubos com EDTA (frasco Vacuette® EDTA), de cada paciente com suspeita de SPW. Para se fazer a extração do DNA linfocitário, foi utilizado o kit de extração Axygen® (Union City, California, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro (Spectrophotometer NanoDrop® 2000, Thermo Scientific), e diluídos até chegar na concentração de 20ng/μl. As amostras foram, então, armazenadas em freezer para posteriores análises.

Já o MLPA, como dito anteriormente, é um método capaz de uma quantificação relativa, que detecta um aumento ou diminuição do número de cópias do material genético, investigando-se até 40 sequências diferentes de DNA em uma reação simples

de PCR, por meio da qual, tais sondas serão amplificadas por hibridação. Para isso, é necessário que haja a presença de sequências alvo da sonda na amostra.

Nesse projeto utilizamos a metodologia do SALSA MS-MLPA (metilação específica do MLPA) com o kit ME031-B2 *GNAS* probemix, que é projetado para fornecer informações acerca de metilações aberrantes. O kit contém 32 sondas, das quais, 25 sondas são específicas para o *GNAS*, seis para o gene *STX16*, localizado a 220kb centromericamente do *GNAS*, e uma sonda para o gene *TH1L*, situado a 90kb telomericamente de *GNAS*. Dessas 25 sondas, 18 contêm um sítio de restrição para HhaI e fornece informação sobre o estado de metilação da sequência alvo. E as 32 sondas podem revelar alterações no número de cópias, como deleções e duplicações na região do *GNAS*.

A reação do MS-MLPA diferencia funções epigenéticas de metilação e pode ser dividida em cinco etapas distintas, tais como: 1) desnaturação do DNA e incubação com as sondas de hibridação; 2) reação de ligação e digestão; 3) amplificação por PCR; 4) separação do produto da amplificação por eletroforese; e 5) análise de dados. Para o projeto foi escolhido o kit SALSA MS-MLPA probemix ME031-B2 *GNAS* (Citogen Biotecnologia) (ANEXO E).

No primeiro dia foi feito a desnaturação do DNA e a reação de hibridação das amostras dos pacientes e mais três indivíduos normais para controle negativo. Para a desnaturação, utilizou-se tubo tipo “eppendorf” de 0,2 mL, identificados com o número dos pacientes. Cerca de 5 µl do DNA extraído foram utilizados, totalizando aproximadamente 100ng do mesmo. Em seguida o tubo foi colocado no termociclador, programado como mostra a tabela 3, para o início do processo.

Tabela 3: Programação do termociclador na etapa de desnaturação.

Passo 1: 98°C	5 minutos
Passo 2: 25°C	Pausa

O mix para a reação de hibridação foi feito enquanto a desnaturação acontecia. Para isso, os reagentes foram agitados no aparelho tipo vórtex. E em cada amostra na pausa de 25°C foram adicionados 1,5 µl MLPA buffer com 1,5 µl de probemix (Tabela 3).

Ao final do processo de desnaturação do DNA, foram adicionados 3µL do mix de hibridização em cada tubo tipo Eppendorf® as amostras foram homogeneizadas por agitação no aparelho tipo vórtex. Em seguida, a reação para a etapa de hibridização por mais 18 horas, a 60°C, conforme mostra na Tabela 4. Após a hibridação, as semi-sondas, então, são capazes de reconhecer a sequência-alvo específica, podendo se ligar e amplificar-se.

Tabela 4: Programação do termociclador na etapa de hibridação.

Passo 1: 95°C	1 minutos
Passo 2: 60°C	Pausa
Passo 3: 20°C	Pausa

No segundo dia, foi feita a reação de ligação e digestão, além da PCR. Primeiro, iniciou-se pela reação de Ligação, para tal o buffer B e a ligase-65 da ligase são misturados em agitador do tipo vortex, para preparação da Ligase-65 master mix. Para isso foram adicionados 8,25 µl de H₂O DNAase *free*; 1,5 µl da Ligase buffer B e 0,25 µl da Ligase-65, correspondentes à quantidade de amostras utilizadas. Em seguida homogenizou-se o mix. Cada tubo continha ter 10 µl de volume reacional no total.

Para a preparação do “Ligação-Digestão master mix” foram utilizados 7,75 µl de H₂O DNAase *free*; 1,5 µl de Ligase buffer B; 0,25 µl da enzima Ligase-65 e 0,5 µl da enzima Salsa Hhal. Cada tubo continha 10 µl da mistura, que foi ser misturada por “*up and down*”, e não “vortexada”.

O ciclo foi pausado então em 20°C, e os tubos retirados do termociclador. Nesse momento adicionaram-se 3 µl de Buffer S da ligase e 10 µl de água ultrapura em cada tubo, misturando-se por “*up and down*”. Foram transferidos 10 µl de cada tubo para um segundo tubo, devidamente identificado para cada paciente e diferenciado dos tubos iniciais, onde os ciclos reacionais foram continuados e pausado em 48°C, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Programação do termociclador na etapa de ligação e digestão.

Passo 1: 48°C	Pausa
Passo 2: 48°C	30 minutos
Passo 3: 98°C	5 minutos
Passo 4: 20°C	Pausa

Ainda no termociclador, foram adicionados 10 µl do Ligase-65 master mix nas amostras da primeira reação do MLPA. Já nos tubos recém aliquotados com 10µl foram adicionados mais 10 µl da solução do kit *Ligase-Digestion*, misturados por “up and down”, e continuou-se o ciclo por 30 minutos a 48°C, como mostrado na Tabela 5, e mais 5 minutos a 98°C para inativação da enzima. Aos 20°C foi feita uma pausa para retirada dos tubos do termociclador.

A última reação foi a da PCR. Para isso, foi necessário “vortexar” o SALSA PCR *primer* mix e aquecer a polimerase por 20 segundos a fim de reduzir sua viscosidade. Preparou-se o Polymerase master mix com 3.75 µl de H₂O DNAase *free*; 1 µl SALSA PCR *primer* mix e 0,5 µl SALSA polimerase. Misturando-se o conteúdo por “up and down”, que foi armazenado no gelo até o seu uso. Cada tubo continha 5 µl da mistura de reação, a qual foi adicionada ao tubo em temperatura ambiente. O tubo com a mistura foi novamente adicionado ao termociclador, onde seguiu-se para 35 ciclos de 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C e finalizando com uma incubação de 20 minutos a 72°C e pausa a 15°C como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Programação do termociclador na etapa de PCR

Passo 1: 35 ciclos	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C por 30 segundos • 60°C por 30 segundos • 72°C por 60 segundos
Passo 2: 72°C	20 minutos
Passo 3: 15°C	Pausa

Os produtos da PCR foram guardados em papel alumínio na geladeira a 4°C, local onde pode permanecer por até 1 semana. Para a reação por PCR foi utilizada apenas um par de iniciadores, em que, apenas um dos dois está marcado por fluorescência. Esses produtos serão separados por eletroforese capilar em condição de desnaturação, por meio do 3730XL DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) (Massachusetts, EUA) e a visualização dos resultados foi feita utilizando-se o software Coffalyser.Net (Amsterdã, Holanda). As alturas dos picos de fluorescência foram medidas e comparadas com as amostras controle, o que indicará a quantidade relativa das sequencias de DNA alvo nas amostras testadas.

4. RESULTADOS

Dois pacientes apresentaram mutações em genes pesquisados pelos kits de MS-MLPA. O paciente 95 do sexo feminino, com 8 anos apresentou mutação detectada pelo kit o kit SALSA MS-MLPA probemix ME031-B2 *GNAS*: foi encontrada uma aparente deleção do éxon 7 do *GNAS*. Já a paciente 101, do sexo masculino e de 27 anos, apresentou mutação detectada pelo mesmo kit, encontrando uma possível deleção nos éxons 1A e 1 do gene *GNAS*. As características clínicas e fenotípicas dos dois pacientes encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Características clínicas e fenotípicas dos pacientes a partir dos critérios clínicos estabelecidos por Holm e colaboradores (1993).

Características	Paciente 95	Paciente 101
Hipotonia neonatal	-	-
Dificuldade de alimentação na infância do desenvolvimento neuropsicomotor	-	-
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano	+	+
Hipogonadismo	-	-
Deficiência mental, problemas de aprendizado	+	+
Hiperfagia	+	+
Características faciais (olhos amendoados, lábio superior pouco espesso)	+	-
Diminuição dos movimentos fetais	-	-
Problemas de comportamento	+	-
Apneia do sono	+	-
Baixa estatura	-	-
Cabelos, olhos e pele mais claros	+	-
Mãos e pés pequenos	-	-
Mãos estreitas	-	-
Miopia	-	-
Saliva viscosa	-	-
Defeito na articulação das palavras	+	+
Conduta auto-lesiva	-	-

4.1 Paciente 95

A técnica de MS-MLPA detectou uma possível deleção do éxon 7 do gene *GNAS* (APÊNDICE A) no paciente 95, região de 4 pb conhecida por ter papel na parada da DNA polimerase (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology). É possível perceber que houve uma deleção pelo número de cópias de uma região do gene estar abaixo do normal, onde, como indicado em vermelho, o éxon 7 aparece abaixo da marcação do considerado normal a partir dos controles negativos utilizados, indicando que o gene pode estar deletado de forma heterozigótica (Figura 10). Por meio da análise do eletroferograma (Figura 11), obtivemos a confirmação da metilação do éxon 7, onde o pico sinalizado com a seta laranja garante a qualidade da corrida; os picos indicados em seta rosa indicam a qualidade do DNA, e devem ser menores do que o laranja; os picos indicados nas setas azuis, indica a qualidade da desnaturação, e devem ser maiores que o pico laranja; e os picos marcados com as setas verdes são os dos cromossomos sexuais, que confirmam que o paciente é do sexo feminino. Já o pico indicado em amarelo, mostra o produto de amplificação do éxon 7 do *GNAS* em uma concentração menor do que o esperado e comparado com os indivíduos normais.

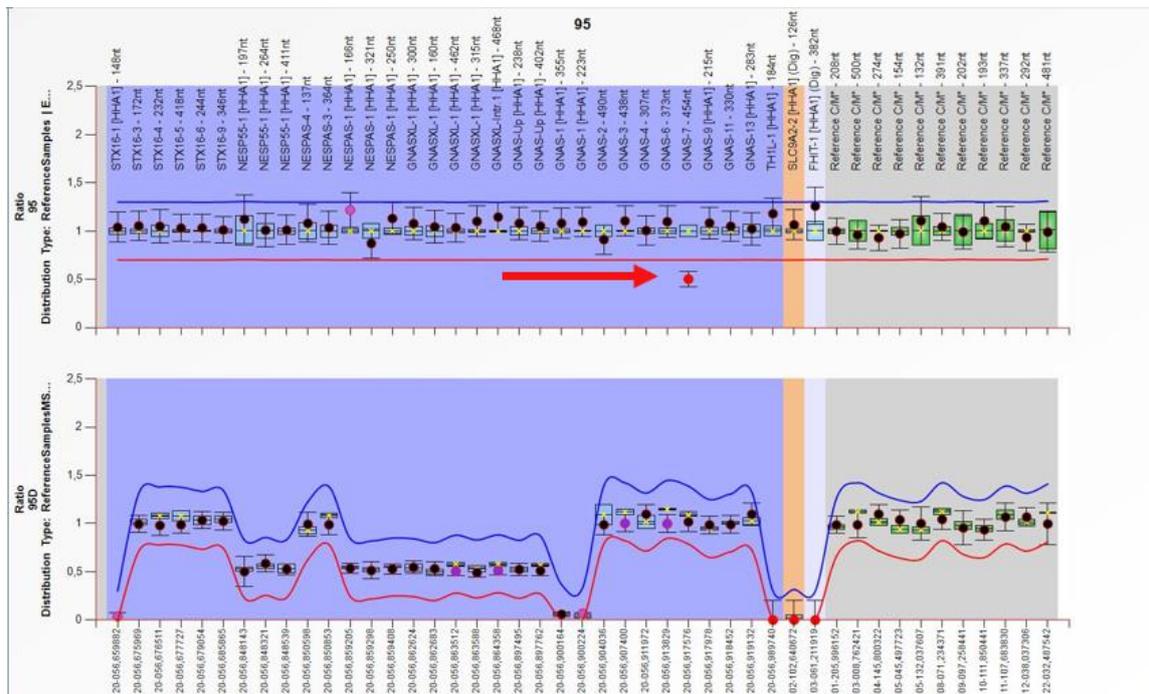


Figura 10: Resultado obtido pelo software Coffalyser.NET, indicando a deleção do éxon 7 do gene *GNAS*, indicada pela seta vermelha. (APÊNDICE A)

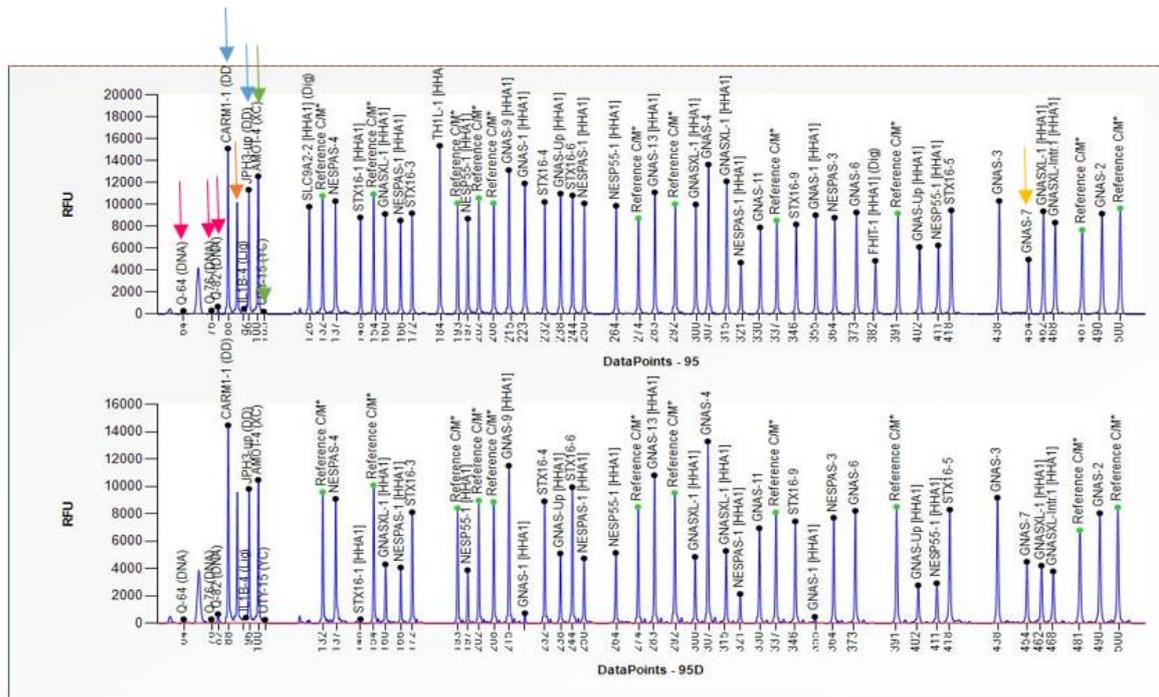


Figura 11: Resultado do eletroferograma gerado pelo software Coffalyser.NET do paciente 95, que auxilia na verificação da qualidade da amostra e corrida eletroforética capilar.

Outrossim, foi feita também a aplicação dos critérios de acordo com Holm et al. (1993) (Tabela 8) e Gunay-Aygun et al. (2001) (Tabela 9), fazendo-se uma comparação do paciente 95 com um caso da literatura descrito por Ham; Baek; Lee et al., 2014; (2014), com uma deleção também no éxon 7 do cromossomo 20. Tal paciente apresentou características físicas de AHO (Albright hereditary osteodystrophy, em português osteodistrofia hereditária de Albright), bem como baixa estatura, obesidade troncular, face redonda, pescoço curto e braquidactilia, sendo a obesidade e baixa estaturas comuns a SPW (HAM; BAEK; LEE et al., 2014).

Tabela 8: Critérios de Holm et al (1993) aplicados para o paciente 95 e ao paciente de Ham; Baek e Lee et al. (2014)

Critérios maiores (1 ponto)	Paciente 95 (8 anos)	Ham (2014) 16 anos
Hipotonia neonatal	Não	Não
Dificuldade de alimentação na infância ou retardo do desenvolvimento neuro-psicomotor	Não	Não avaliado
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano e 6 meses	Sim (4 anos)	Sim
Hipogonadismo	Não	Não avaliado
Retardo mental, problemas de aprendizagem	Sim	Não avaliado
Hiperfagia, obsessão por comida	Sim	Não avaliado
Características faciais	Sim	Não avaliado
Deleção do locus 15q11-q13 em análises citogenéticas	Não	Não
Critérios menores (0,5 pontos)		
Diminuição dos movimentos fetais	Não	Não
Problemas de comportamento	Sim	Não avaliado
Apneia do sono	Sim	Não avaliado
Baixa estatura	Não	Sim
Cabelos, olhos e pele mais claros	Sim	Não avaliado
Mãos e pés pequenos	Não	Não avaliado
Mãos estreitas	Não	Não avaliado
Miopia	Não	Não avaliado
Saliva viscosa	Não	Não avaliado
Defeito na articulação de palavras	Sim	Não avaliado
Lesões de pele (auto-agressão)	Não	Não avaliado
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.	Diagnóstico: 6 pontos. Não indicado para o teste molecular	Diagnóstico: 1,5 pontos. Não indicado para o teste molecular

Tabela 9: Critérios de Gunay-Aygun et al. aplicados para o paciente 95 e comparada com o paciente de Ham; Baek e Lee et al. (2014).

Idade	Critérios Gunay-Aygun	Paciente 95	Paciente Ham
Nascimento até 2 anos	Hipotonia com má sucção		
2-6 anos	Hipotonia com história de má sucção Atraso global do desenvolvimento		
6-12 anos	Hipotonia com histórico de má sucção Atraso geral de desenvolvimento Hiperfagia (excesso da ingestão alimentar) com obesidade se não controlado	-	
A partir de 13 anos	Problemas cognitivos; retardo mental moderado. Hiperfagia (excesso da ingestão alimentar) com obesidade se não controlado Hipogonadismo hipogonadotrófico e/ou problemas de comportamento (incluindo ataques de raiva e transtorno obsessivo-compulsivo)		-
Indicação para realização do exame molecular para SPW		Não	Não

4.2 Paciente 101

Também se utilizando da técnica de MS-MLPA, detectou-se uma aparente deleção do éxons 1 e 1A do gene *GNAS* no paciente 101. É possível perceber que houve uma possível deleção pelo número de cópias dos éxons menores que os dos controles negativos, onde, como indicado em vermelho, o éxon 1 e 1A aparecem abaixo da marcação do considerado normal, indicando que o gene está deletado. (Figura 12). Por meio da análise com eletroferograma (Figura 13), obtivemos a confirmação da metilação dos éxons 1 e 1A, onde o pico sinalizado com a seta laranja garante a qualidade da corrida; os picos indicados em seta rosa indicam a qualidade do DNA, e devem ser menores do que o laranja; os picos indicados nas setas azuis, indica a qualidade da desnaturação, e devem ser maiores que o pico laranja; e os picos marcados com as setas verdes são os dos cromossomos sexuais, que confirmam que o paciente é do sexo masculino. Já os picos indicados em amarelo, mostram o produto de amplificação do éxon 1A e 1 do *GNAS* em uma concentração menor do que o esperado e comparado com os indivíduos normais.

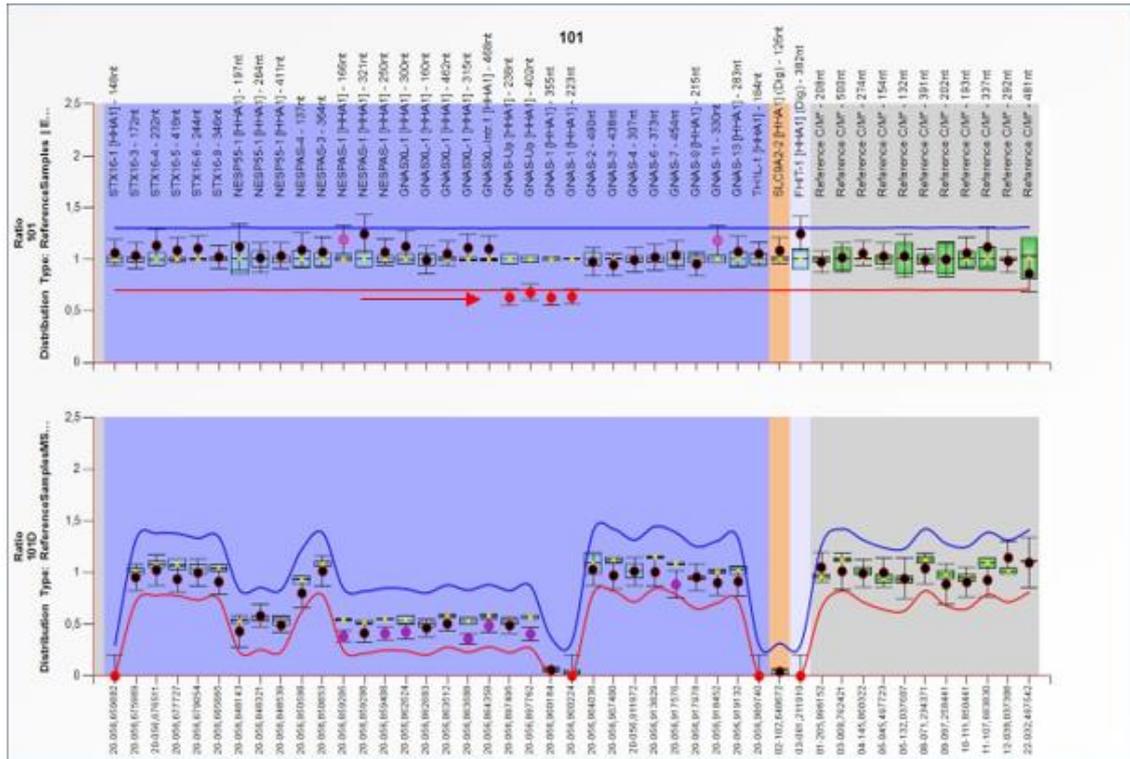


Figura 12: Resultado obtido pelo software Coffalyser.NET, indicando a deleção do éxon 1A e 1 do gene *GNAS*, indicada pela seta vermelha.

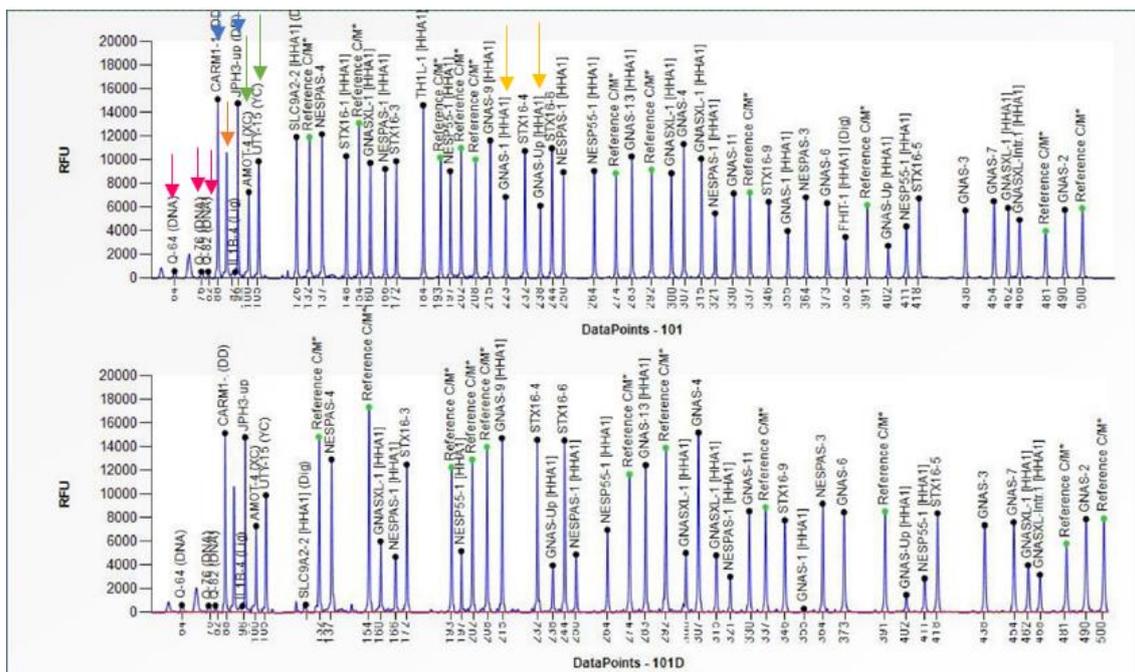


Figura 13: Resultado do eletroferograma gerado pelo software Coffalyser.NET do paciente 95, que auxilia na verificação da qualidade da amostra e corrida eletroforética capilar.

Também foi realizado a comparação entre o paciente 101 com relatos da literatura do Demura; Takeda; Yoneda et al. (2003) que também apresentou uma deleção do éxon 1A do *GNAS* e Reyes; Karaca; Bastepe et al. 2017) que apresentou deleção para o éxon 1

do gene *GNAS*, tanto para os critérios clínicos de Holm et al (1993) e Gunay-Aygun (2001) (Tabela 10) e (Tabela 11). É importante ressaltar que não foi encontrado nenhum estudo com as duas deleções no mesmo paciente, sendo o Paciente 101 o primeiro paciente descrito com deleções dos éxons 1 e 1A.

Tabela 10: Critérios de Holm et al (1993) aplicados para o paciente 101 e aos pacientes descritos Demura; Takeda; Yoneda et al. (2003) e Reyes; Karaca e Bastepe et al., 2017.

Critérios maiores (1 ponto)	Paciente 101	Demura 2003	Reyes 2017
Hipotonia neonatal	Não	Não avaliado	Não avaliado
Dificuldade de alimentação na infância ou retardo do desenvolvimento neuropsicomotor	Não	Não avaliado	Não avaliado
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano e 6 meses	Sim (3 anos)	Não avaliado	Não avaliado
Hipogonadismo	Não	Não avaliado	Não avaliado
Retardo mental, problemas de aprendizagem	Sim	Sim	Não
Hiperfagia, obsessão por comida	Sim	Não avaliado	Não avaliado
Características faciais	Não	Sim	Sim
Deleção do locus 15q11-q13 em análises citogenéticas	Não	Não	Não
Critérios menores (0,5 pontos)			
Diminuição dos movimentos fetais	Não	Não	NA
Problemas de comportamento	Não	Não avaliado	Não avaliado
Apneia do sono	Não	Não avaliado	Não avaliado
Baixa estatura	Não	Sim	Não avaliado
Cabelos, olhos e pele mais claros	Não	Não avaliado	Não avaliado
Mãos e pés pequenos	Não	Não avaliado	Não avaliado
Mãos estreitas	Não	Não avaliado	Não avaliado
Miopia	Não	Não avaliado	Não avaliado
Saliva viscosa	Não	Não avaliado	Não avaliado
Defeito na articulação de palavras	Sim	Não avaliado	Não avaliado
Lesões de pele (auto-agressão)	Não	Não avaliado	Não avaliado
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.	Diagnóstico: 3,5 pontos. Não indicado para o teste molecular.	Diagnóstico: 2,5 pontos. Não indicado para o teste molecular.	Diagnóstico: 1 ponto. Não indicado para o teste molecular.

Tabela 11: Critérios de Gunay-Aygun et al. aplicados para o paciente 101 e comparada com o paciente de Demura; Takeda; Yoneda et al. (2003) e Reyes; Karaca; Bastepe et al. (2017).

Idade	Critérios Gunay-Aygun	Paciente 101	Demura 2003	Reyes 2017
Nascimento até 2 anos	Hipotonia com má sucção			
2-6 anos	Hipotonia com história de má sucção Atraso global do desenvolvimento			
6-12 anos	Hipotonia com histórico de má sucção Atraso geral de desenvolvimento Hiperfagia (excesso da ingestão alimentar) com obesidade se não controlado			-
A partir de 13 anos	Problemas cognitivos; retardo mental moderado. Hiperfagia (excesso da ingestão alimentar) com obesidade se não controlado Hipogonadismo hipogonadotrófico e/ou problemas de comportamento (incluindo ataques de raiva e transtorno obsessivo-compulsivo)	-	-	
Indicação para realização do exame molecular para SPW		Não	Não	Não

5. Discussão

5.1 Discussão Paciente 95

O *GNAS* é responsável pela transcrição da subunidade alfa estimulatória ($G\alpha$) do complexo da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina (proteína G). Tal proteína ajuda a estimular a atividade da enzima adenilato ciclase, sendo responsáveis por desencadear complexas vias de sinalizações, que influenciam nas funções celulares, regulando a atividade dos hormônios, que ajudam a regular a atividade das glândulas endócrinas, como tireóide, hipófise, gônadas e supra-renais (Genome Decoration Page / NCBI)

A sua inativação desencadeia diferentes fenótipos, como PHP-Ia, -Ib, -Ic, PPHP, heteroplasia óssea progressiva (POH) e osteoma cútis (OC). PHP-Ia e -Ic estão caracterizadas por algumas características, dentre elas a resistência dos órgãos a alguns hormônios (PTH, TSH, LH, FSH, GHRH) e neurotransmissores do SNC, o que desencadeia graus diferentes de obesidade, deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento. Já o fenótipo de AHO apresentam como características a baixa estatura, face arredondadas, ossificações subcutâneas e braquidactilia tipo E (encurtamento do 4º e/ou 5º metacarpo). A PPHP é uma forma mais limitada de PHP-Ia, caracterizada por várias manifestações do fenótipo AHO, porém, sem resistência hormonal ou obesidade, e POH e OC variantes mais restritas de PPHP (HALDEMAN-ENGLERT; HURST et al., 2017).

Existe na literatura científica trabalhos publicados sobre as características clínicas de AHO, que compartilham semelhanças clínicas com outras síndromes, como a SPW, Síndrome de Silver-Russel, Beckwith-Wiedemann e Angelman. As características compartilhadas por essas síndromes são os defeitos no crescimento (baixa estatura), obesidade, alterações comportamentais e/ou desenvolvimento. Na clínica, por apresentarem características parecidas, é possível que o paciente seja enquadrado como SPWL, caso não haja a deleção no segmento 15q-11-q13, responsável pela SPW (IZZI; FRANCOIS; LABARQUE et al., 2012)

O Paciente 95 apresentou deleção no éxon 7 do gene *GNAS*, apresentando como características ganho de peso, retardo mental, hiperfagia, características faciais, problemas de comportamento, apneia do sono, cabelo e pele mais claros e problemas nas articulações das palavras. Ele nasceu com 2,300 g e 51 cm, não apresentava hipotonia

neonatal. O caso clínico publicado por Lecumberri; Fernandez-Rebollo; Sentschordi (2010), apresenta um homem de 20 anos de idade, diagnosticado com PHP-Ia por deleção do éxon 7 do gene *GNAS*. Ele apresentava rosto arredondado, baixa estatura (107 cm), macrocefalia, ossificação subcutânea, calcificações intracranianas, braquidactilia e comprometimento cognitivo, características observadas no paciente 95 também (LECUMBERRI; FERNANDEZ-REBOLLO; SENTCHORDI et al., 2010;).

O Paciente 95, de acordo com os critérios de Holm et al. (1993) (Tabela 8) apresentava características que o permitia seguir para o diagnóstico molecular de SPW, diferentemente do Paciente de Ham; Baek; Lee et al. (2014), que alcançou apenas 4 pontos nos critérios clínicos de Holm et al. (1993). Uma possível hipótese para isso, é que o diagnóstico clínico para a doença de PHP-Ia foi feita de forma correta, não analisando características de SPW.

Quando utilizado os critérios de Gunay-Aygun et al. (2012) para o Paciente 95, o mesmo apresentava 8 anos quando foi feita sua avaliação, e era positivo para o critério de atraso geral de desenvolvimento e hiperfagia, porém, não apresentando hipotonia com histórico de má-sucção, não sendo indicativo para avaliação molecular. No caso clínico de Ham; Baek; Lee et al. (2014), não foi descrito nenhuma característica que o permitiria ser diagnosticado clinicamente com SPW e seguir para o exame molecular.

5.2 Discussão Paciente 101

O Paciente 101 apresentou uma dupla deleção no gene *GNAS*, uma no éxon 1A e outra no éxon 1. É a primeira vez que se observa tal acontecimento, uma vez que, na literatura não foi encontrado nenhum paciente com as duas deleções.

O Paciente 101 não teve seu peso ao nascer e estatura ao nascer divulgados. Seguindo os critérios de Holm et al. (1993) (Tabela 11), o Paciente 101 obteve 3,5 pontos, apresentando os critérios maiores de ganho de peso excessivo a partir de 1 ano, retardo mental problemas de aprendizagem e hiperfagia. Já quanto aos critérios menores ele apresentava a dificuldade na articulação de palavras. Com isso, de acordo com os critérios de Holm et al. (1993), o mesmo não seria suspeito de SPW.

Porém, para os critérios de Gunay-Aygun et al. (2001), o Paciente com 27 anos por apresentar atraso geral de desenvolvimento e hiperfagia, porém não apresentar hipogonadismo hipogonadotrófico e/ou problemas de comportamento, não teria indicação para realizar os exames laboratoriais para SPW.

Quando se compara com a literatura, o Paciente de Demura; Takeda; Yoneda et al. (2003) apresentava também a deleção no éxon 1A do gene *GNAS*, compartilhando características como retardo mental e características faciais. Outras características do diagnóstico de SPW não foram relatadas.

Já quando se comparou com o Paciente de Reyes; Karaca; Bastepe et al. (2017), em que o mesmo apresentava a deleção no éxon 1 do gene *GNAS*, a única característica em comum eram facial, como rosto arredondado, que é comum na Síndrome de PHP-1A. Outros casos de deleção do éxon 1 são encontrados, como o Paciente do Yavropoulou; Chronopoulos e Trovas et al. (2019), que apresentou ao exame físico obesidade (IMC: 39,7), baixa estatura (165 cm), face arredondada e braquidactilia de mãos e pés.

As diferenças clínicas entre o nosso Paciente com os Pacientes encontrados na literatura pode ser um reflexo do não compartilhamento das deleções. Nosso Paciente apresentou uma deleção do éxon 1A e 1, não relatado na literatura, enquanto os outros Pacientes apresentavam ou uma deleção do éxon 1A ou uma deleção no éxon 1.

Capítulo 2: Revisão sistemática

3. METODOLOGIA

3.3 Revisão sistemática

Para realização da pesquisa, foi necessário o estabelecimento de uma estratégia de busca baseada no PICO: **P**opulação: População afetada com a síndrome de Prader Willi; **I**ntervenção (exposição): A eficiência terapêutica do hormônio do crescimento; **C** (intervenção de comparação): Terapêutica empregada e prognóstico e **O** (*outcomes*): relacionar os diferentes tratamentos com bom prognóstico da Síndrome de Prader-Willi.

Para tal, foram utilizadas duas plataformas eletrônicas de busca de artigos, como a MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online) via PubMeb e LILACS (Literatura Científica e Técnica da América Latina e Caribe/BVS – Biblioteca Virtual em Saúde).

Para a busca, foi necessário obter os descritores em saúde e os MeSH, que foram obtidos online junto ao DeCS (Descritores de Ciência da Saúde) e no pubmed, respectivamente. Os termos (Tabela 12) foram pesquisados na língua inglesa, portuguesa e espanhola, sendo restringida o tempo de 10 anos, por se tratar de uma doença rara. Além disso, na plataforma pubmed, os filtros “apenas em humanos” foi ativado.

Tabela 12: Termos utilizados para a pesquisa nas plataformas online.

BASES DE DADOS	TERMOS
PUBMED	(((“Prader-Willi Syndrome/diagnosis”[Mesh]) AND “Prader-Willi Syndrome/therapy”[Mesh]) AND “Prader-Willi Syndrome/genetics”[Mesh])
LILACS	(tw: (“Prader-Willi Syndrome” OR “Síndrome de Prader-Willi”)) AND (tw: (“Diagnosis” OR “Diagnóstico”)) AND (tw: (“Therapeutics” OR “Terapêutica” OR “Terapêutica”) AND (tw: (“Genetic Diseases” OR “Enfermedades Genéticas Congénitas” OR “Doenças Genéticas Inatas”))

Os estudos escolhidos seguiram critérios tanto de elegibilidade quanto de exclusão. Os artigos incluídos deveriam ser estudos observacionais e experimentais que investigam o diagnóstico diferencial das síndromes de Prader Willi e Prader Willi *like* diante das diferentes estratégias terapêuticas e causas genéticas publicados nos últimos 10 anos, realizados em humanos e nas línguas inglesa, portuguesa e espanhola. Os artigos que foram excluídos não abordavam o tratamento do paciente com a síndrome, ou que não abordasse a Síndrome de Prader Willi.

Tal seleção foi feita em quatro etapas. A primeira etapa foi a busca dos artigos utilizando os critérios expostos acima. Em seguida, foi lido o título e resumo de todos, o que se deu na segunda etapa, em que, após essa leitura, foi feita a primeira exclusão de artigos que não estavam dentro do proposto. A terceira etapa foi a leitura completa do texto. Artigos duplicados também foram desconsiderados, constituindo a quarta etapa.

4. Resultados

4.3 Revisão sistemática

Foram identificados 16 estudos na base de dados PubMed e sete estudos na base de dados LILACS, tendo um total de 23 artigos, onde não houve nenhuma duplicada (Tabela 13). Porém, cinco artigos não foram encontrados seus respectivos PDF para leitura (VILLAVICENCIO, T. M., 1995; SAITOH, S., 2010; YEARWOOD, E.L., et al., 2011; SARDA, P., 2013 e LOGUÉRCIO, M. V., et al., 1995), sendo, portanto, descartados.

Tabela 13: Os 23 artigos encontrados na busca no PubMed e no LILACS.

Título do artigo	Autores e ano	Plataforma
A model to characterize psychopathological features in adults with Prader-Willi syndrome.	Thuilleaux; Laurier; e Copet et al., 2018	Pubmed
Prader-Willi Syndrome: Background and Management.	Abdilla; Barbara; Calleja-Agius, 2017	Pubmed
A boy with Prader-Willi syndrome: unmasking precocious puberty during growth hormone replacement therapy.	Ludwig; Radaeli; e Silva et al., 2016	Pubmed
Prader Willi Syndrome: genetics, metabolomics, hormonal function, and new approaches to therapy.	Irizarry; Miller; Freemark et al., 2016	Pubmed
Approach to the Child with Prader-Willi Syndrome.	Miller, 2012	Pubmed
Prader-Willi syndrome.	Cassidy; Schawartz; e Miller et al., 2012	Pubmed
Early diagnosis and care is achieved but should be improved in infants with Prader-Willi syndrome.	Bar; Dienes; e Molina et al., 2017	Pubmed
Subclinical dysphagia in persons with Prader-Willi syndrome.	Gross; Gisser; e Cherpes et al., 2017	Pubmed
Hypotonia and Failure to Thrive in a 3-month-old Boy	Weeks; Vogt; e Kimball-Earys, 2016	Pubmed
Prader-Willi syndrome in 2015	Tauber; Thuilleaux; Bieth et al., 2015	Pubmed
A Case Study and Parent Perspective	Glaspy; Foge, 2015	Pubmed
Case report: neonatal Prader-Willi syndrome	Yan; He, 2014	Pubmed
Prader-Willi syndrome	Sarda, 2013	Pubmed
Genetic diseases: congenital central hypoventilation, Rett, and Prader-Willi syndrome.	Gallego, 2012	Pubmed
Care of the patient with Prader-Willi syndrome	Yearwood; McCulloch; e Tucker et al., 2011	Pubmed

Care continuity for patients with Prader-Willi syndrome during transition from childhood to adulthood	Saitoh, 2010	Pubmed
Informe Rápido de Evaluación de Tecnología Sanitaria sobre efectividad y seguridad de productos Biosimilares de Hormona de Crecimiento.	Amarilla; Tassara; e Chaves et al., 2016	Lilacs
Morbid obesity in an adolescent with Prader-Willi syndrome.	Santos; De Paula; Osterne et al., 2009	Lilacs
Impronta genómica en el síndrome de Prader-Willi y en el síndrome de Angelman.	Aguinaga; Rivera; Morán et al., 1997	Lilacs
Síndrome de Prader-Willi: criterio y guía para la atención odontopediátrica / Prader-Willi syndrome: criteria and guidelines for the pediatric dental care	Scagnet, 2011	Lilacs
Síndrome de Prader-Willi / Prader-Willy	Loguércio; Pacheco; e Neto et al., 1995	Lilacs
El síndrome de Prader-Willi / Prader-Willi syndrome	Villavicencio, 1995	Lilacs
Hipotonismo bucal. Exito terapéutico a propósito de 3 casos. Revisión del tema / Oral hypotonism. Therapeutic success a propos of three cases. Review of the issue	Rama; Mourier; e Czornyj, 1991	Lilacs

Para a seleção dos artigos, ocorreu uma triagem baseada em três etapas: A primeira, foi a leitura dos títulos e resumos dos artigos, excluindo aqueles que não se adequavam aos critérios da revisão. Tais artigos excluídos não abordavam o tema do tratamento com hormônio do crescimento em pacientes com Síndrome de Prader-Willi. Ao final dessa seleção, foram selecionados 18 artigos, sendo 9 excluídos (THUILLEAUX, D., et al., 2018; GROSS, R. D., et al., 2017; WEEKS, M. J., et al., 2015; TAUBER, M., et al., 2015; GLASPY, E., et al., 2015; YAN, G.; HE X., 2014; GALLEGO, J., 2012; SCAGNET, G., 2010; RAMA, M. S. de, et al., 1991). A próxima etapa foi a leitura do texto na íntegra de cada artigo, onde nessa etapa dois artigos foram excluídos (AGUINARA, M. R., et al., 1997 e SANTOS; DE PAULA e OSTERNE et al., 2009), por não se enquadrar nos critérios de elegibilidade. Além disso, foram incluídos 3 artigos extras, escolhidos a partir de referências de outros artigos, sendo eles (BEAULOYE; DIENE; KUPPENS et al., 2016; DEAL; TONY; HÖYBYE et al., 2013 e KUO; DITCHEKENIAN; MANNA et al., 2007), como mostrado na Figura 14 e Tabela 14, totalizando 10 artigos nesta revisão.

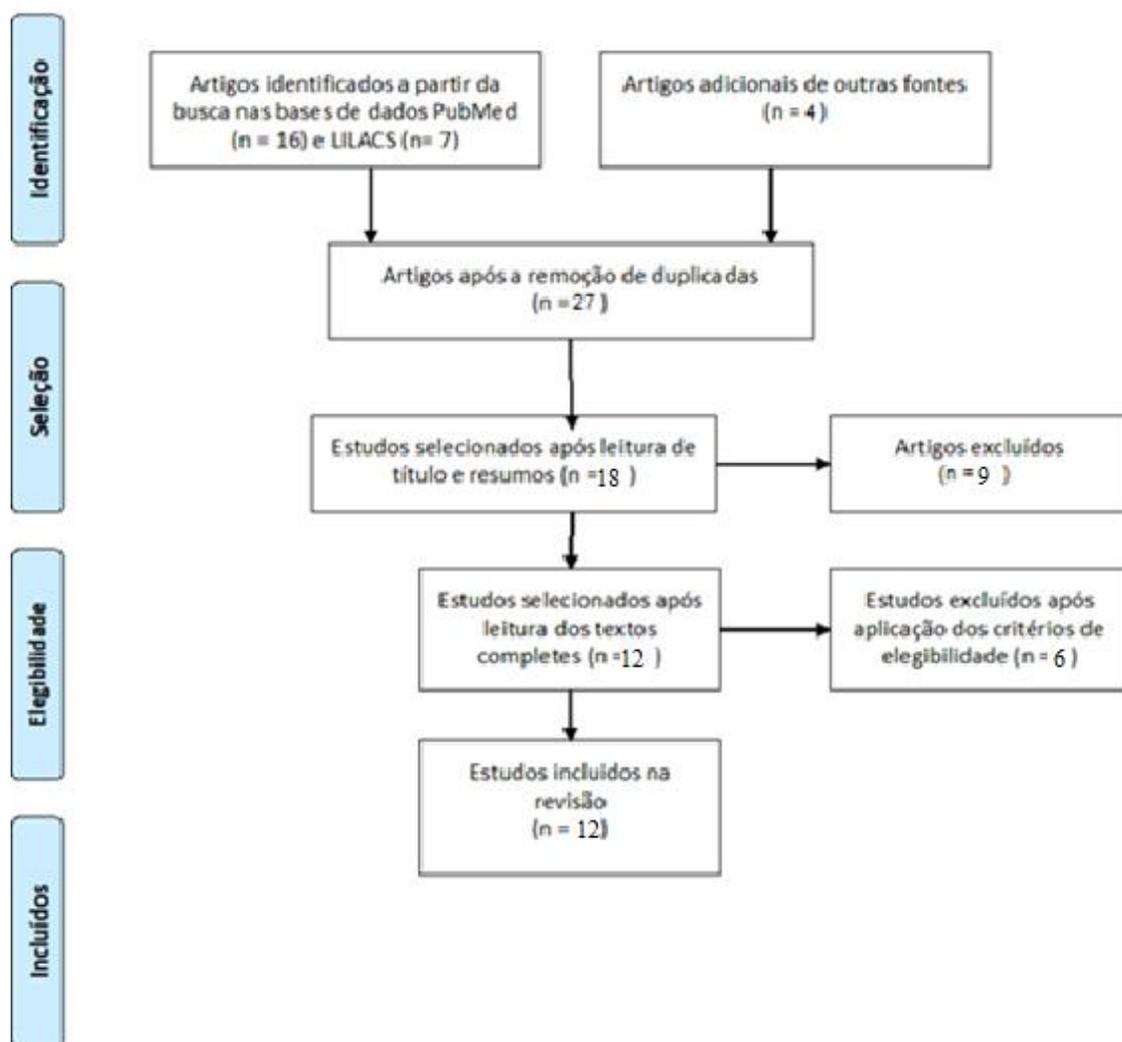


Figura 14: Fluxograma de identificação dos artigos utilizados. Fonte: Adaptado do PRISMA

Autores e ano	Benefícios do GH					Efeitos colaterais ou adversos	Outros
	Perda de peso / ganho de massa magra	Melhoras cognitivas	Aumento da força muscular	Habilidade motora	Melhora da estatura e densidade óssea		
Abdilla; Barbara; Calleja-Agius, 2017	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Aumento da escoliose; efeito diabetogênico	Resultado do GH melhor observado em pacientes que iniciaram o tratamento mais cedo; descreve as fases nutricionais, principais características dos pacientes com SPW e os diagnósticos da síndrome. Melhorias na circunferência da cabeça, melhorias na linguagem e progressão no comportamento.
Amarilla; Tassara; e Chaves et al., 2016	Sim	----	----	----	Sim	Desenvolvimento de anticorpos contra o GH; reações no local da injeção; dor de cabeça; hematúria; hipotiroidismo; hipocalcemia; diabetes e leucemia.	Dados epidemiológicos sobre a deficiência do GH; a tecnologia aplicada para a produção do rhGH; critérios para o seu uso e contra-indicações.
Bar; Dienes; e Molina et al., 2017	----	Sim	Sim	----	----	Não relatado	Mediana do início do tratamento com GH foi de 18,8 meses. Diagnóstico precoce permite a alteração do curso da doença
Beuloye; Diene;					Não se aplica		Grelina sendo um secretagogo de GH. Níveis aumentados de AG em pacientes com SPW hiperfágicos e AUG em pacientes recém-nascidos, indicativo de

Kuppens et al., 2016	Sim	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica		Não relatado	inibição alimentar. Níveis AG e UAG não diferem significativamente entre os tratados com GH e os não tratados
Cassidy; Schwartz; e Miller et al., 2012	Sim	Sim	----	Sim	Sim	Crise adrenal; acelera o metabolismo periférico do cortisol; morte súbita por problemas respiratórios; escoliose	Descreve as características fenotípicas, o diagnóstico da síndrome; GH melhora o perímetro cefálico, IMC em recém-nascidos; melhora o comportamento de fala em crianças e adolescentes; e melhora na qualidade de vida em adultos
Deal; Tony; Höybye et al., 2013	Sim	Sim	----	----	Sim	Diminui a sensibilidade à insulina; crescimento do tecido linfóide; escoliose; progressão de câncer; desenvolvimento de CAI; dor nas articulações; edema central; apneia do sono; diminuição de T ₄ ; epilepsia e derrames	Diretrizes de cuidados clínicos para a terapia com rhGH; tratamento deve-se iniciar antes do aparecimento da obesidade; Dosagem ideal para crianças, adolescentes e adultos; melhoras na circunferência da cintura e dobras cutâneas e condição puberal.
Irizarry; Miller; Freemark et al., 2016	Sim	Sim	----	----	Sim	Sensibilidade a insulina; morte súbita; aumento do tecido linfóide;	Descreve a genética e manifestação clínica da SPW. Tratamento com controle da ingestão alimentar e diferentes tratamentos para diferentes idades.

						escoliose e dores de cabeça	
Kuo; Ditchekenn; Manna et al., 2007	Sim	----	----	Sim	Sim	Edema nos membros inferiores; hipertensão arterial, e epifisiólise da cabeça do fêmur	Controle do ganho de peso e não a sua perda. Benefícios na aparência física, energia e resistência. Melhor inserção psicossocial das crianças. Queda de colesterol total e LDL e aumento de HDL.
Ludwig; Radaeli; e Silva et al., 2016	Sim	Sim	----	Sim	Sim	Aumento da secreção e a sensibilidade do hormônio liberador de gonadotropina	Uso de topiramato, e nível puberal precoce de testosterona total e hormônio luteinizante. Melhora no consumo de energia e qualidade de vida.
Miller, 2012	Sim	Sim	----	Sim	Sim	Morte súbita, escoliose e CAI	Revisa as características fenotípicas dos pacientes com SPW, as fases nutricionais, e que os benefícios do GH diferem conforme a idade. O paciente após administração do GH teve melhoras no estado de alerta e na alimentação.

Tabela 14: Resultados da Revisão Sistemática, com os artigos selecionados para a síntese do estudo . GH: Hormônio do crescimento; rhGH: Hormônio do crescimento recombinante humano; AG: Grelina acilada; AUG: Grelina não acilada; IMC: Índice de Massa Corporal; CAI: Insuficiência adrenal central; SPW: Síndrome de Prader-Willi

5. Discussão

5.3 Discussão Revisão Sistemática

A SPW é um distúrbio genético complexo que acomete o cromossomo 15q11.2-13, que contém vários genes que contribuem para o fenótipo da síndrome, dentre eles o gene *NDN*, *MAGEL2*, *SNURF* e *SNORD*. A taxa de mortalidade na SPW é estimada em 3%, sendo maior do que nos controles com apenas deficiência intelectual, sendo a obesidade um dos principais fatores para tal mortalidade. Dentre as causas que também estão inclusas na mortalidade desses pacientes, podemos citar a diabetes mellitus, tromboflebite e problemas de pele (edema crônico e infecção por apanha de pele) (CASSIDY; SCHWARTZ.; MILLER, 2012 e IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Mesmo os mecanismos genéticos exatos que levam à síndrome não sendo todos esclarecidos, as características clínicas da SPW variam conforme a idade e está bem estabelecido de acordo com Gunay-Aygun et al. (2001), como descrito anteriormente. As características mais marcantes são a hipotonia central, falta de desenvolvimento seguidas por hiperfagia progressiva e deposição de gordura no início da infância. Outras características são o atraso no desenvolvimento e disfunção hipotalâmica (desregulação da temperatura, tolerância à dor e apneia central e obstrutiva do sono). A disfunção hipotalâmica pode, ainda, resultar em hipotireoidismo central, insuficiência adrenal central, deficiência de GH e hipogonadismo hipogonadotrófico. Muitas crianças com SPW apresentam ainda distúrbios comportamentais (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

De acordo com Miller (2012), Cassidy; Schwartz e Abdilla; Barbara; Calleja-Agius (2017), existem cinco fases nutricionais a mais em pacientes de SPW além das conhecidas “fracasso em prosperar” seguida por “hiperfagia levando à obesidade”, existindo transições entre as fases nutricionais, sendo sete diferentes em que os pacientes progridem (Tabela 15). A fase 0 ocorre no útero quando o indivíduo ainda é um feto, onde apresenta diminuição dos movimentos fetais e restrição do crescimento quando se comparado aos irmãos não afetados; na fase 1, o indivíduo já é lactente e apresenta características de hipotonia e não obeso. Tal fase apresenta a subfase 1a caracterizada pela dificuldade de alimentação com ou sem déficit de crescimento, seguida da 1b,

quando o lactente cresce de forma constante ao longo de uma curva de crescimento e o peso aumenta numa taxa normal; A fase 2 está associada ao ganho de peso, com a subfase 2a, quando o peso aumenta sem mudança no apetite e ingesta calórica e subfase 2b, quando o ganho de peso está associado ao aumento do interesse pela comida. A fase 3 é caracterizada por hiperfagia, acompanhada de procura por alimentos e falta de saciedade. A fase 4 acontece em alguns adultos, em que o indivíduo não tem mais um apetite insaciável, e é capaz de se sentir satisfeito. Nem todos os pacientes com SPW apresentam todas as fases descritas acima, porém, acometem a grande maioria.

Tabela 15: Fases nutricionais na SPW. Adaptado MILLER (2012)

Fase	Idade média	Características clínicas
0	Pré-natal ao nascimento	Diminuição dos movimentos fetais e menor peso ao nascer que os irmãos
1a	0 a 9 meses	Hipotonia com dificuldade de alimentação e diminuição do apetite
1b	9 a 25 meses	Alimentação e apetite melhorados e crescendo apropriadamente
2a	2,1 a 4,5 anos	Aumento do peso sem aumento do apetite ou excesso de calorias
2b	4,5 a 8 anos	Aumento do apetite e calorias, mas pode se sentir satisfeito
3	8 anos para a idade adulta	Hiperfágico, raramente se sente satisfeito
4	Idade adulta	O apetite não é mais insaciável

O diagnóstico da síndrome é feito nos primeiros meses de vida, pelas características clínicas observadas, como a hipotonia grave. Tal diagnóstico possibilita uma orientação genética, tratamento adequado com um melhor prognóstico da síndrome, diminuindo o tempo de internação hospitalar. Quando se tem a ausência de um acompanhamento e tratamentos desde a infância, o que se observa é a obesidade precoce grave nesses pacientes, já nos 3-4 anos de idade (BAR; DIENE; MOLINAS et al., 2017).

O tratamento da obesidade em pacientes com SPW é o controle do ganho excessivo de peso, por meio de dietas hipocalóricas, medicamentos anoréticos e gastroplastias, que, infelizmente, são ineficazes a longo prazo. É sabido que nos obesos há um aumento da produção de fator de crescimento insulina símile (IGF-I), que são

produzidos pelos adipócitos, porém, nos pacientes com SPW, mesmo apresentando abundante tecido adiposo, não apresentam estímulos adequados para tal produção, indicando uma deficiência parcial de GH. Estudos revelam que a deficiência de GH varia de acordo com a forma genética da síndrome. Em adultos com SPW devido à dissomia uniparental materna tinham menor secreção de GH do que os pacientes que apresentavam deleção do segmento 15q11-13 (KURO; DITCHEKENIAN; MANNA et al., 2007; e MILLER, 2012).

Um dos tratamentos, portanto, para os pacientes com SPW, é o uso do hormônio do crescimento (GH), que otimiza o rastreamento da disfunção endócrina e previne o atraso no crescimento e início precoce da obesidade, sendo a dose recomendada durante a terapia é de 0,025 a 0,035 mg/kg de peso corporal por dia ou 0,7 a 1,0 mg / m² de área de superfície corporal por dia. O GH é administrado por via subcutânea, de 6 a 7 vezes por semana. O tratamento hormonal para deficiência de GH e hipogonadismo beneficiará o paciente com SPW nos aspectos que tangem os efeitos cognitivos, emocionais e social. Para o tratamento dos problemas obsessivo-compulsivo e de automutilação, são recomendados tratamento psiquiátricos, como os inibidores seletivos da recaptção da serotonina, como a fluoxetina (AMARILLA; TASSARA; e CHAVES et al., 2016; BAR; DIENE; MOLINAS et al., 2017).

Em virtude de a obesidade desencadear outros problemas como a diabetes, é necessário que haja um controle da ingestão de alimentos na SPW, quando tais pacientes, apresentam os níveis dos hormônios reguladores do apetite, a grelina, mais elevados do que em controles saudáveis. A grelina é um hormônio que tem demonstrado estimular o apetite e aumentar a adiposidade. Ela é encontrada nas formas aciladas (AG) e não acilada (UAG) na circulação, e uma das suas funções é aumentar a secreção do GH (BEAULOYE; DIENE; KUPPENS et al., 2016 e IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Irizarry; Miller; Freemark et al. (2016) demonstra que os níveis séricos de grelina em pacientes jovens com SPW são maiores do que em pacientes mais velhos, e que o declínio ao longo dos anos dos níveis séricos de grelina foram maiores nos controles, indicando assim que, pacientes com SPW tendem a manter o nível do hormônio sempre alto. Os níveis aumentados de AG foram descritos como causa potencial de hiperfagia e obesidade nos pacientes com SPW, principalmente crianças e adultos. Os níveis de UAG em indivíduos normais são mais elevados do que os de AG e são demonstrativos de

inibição na ingestão, e quando encontrados em altos níveis, são documentados indivíduos com anorexia. Curiosamente, os níveis de UAG são frequentemente encontrados mais elevados em pacientes lactentes com SPW, tendendo a diminuir da fase 1a para a fase 2b (BEAULOYE; DIENE; KUPPENS et al., 2016).

São conhecidos os efeitos da AG na plasticidade cerebral, memória e cognição. Irizarry; Miller; Freemark et al., (2016) presume então, que os níveis baixos de AG encontrados em bebês são um dos fatores para a deficiência intelectual dos portadores de SPW mais tarde na vida. Com um diagnóstico mais cedo, fornece a oportunidade de implementação do tratamento que pode modular a relação AG/UAG, melhorando, portanto, as dificuldades tanto alimentares quanto de cognição (BEAULOYE; DIENE; KUPPENS et al., 2016).

Além disso, há também indícios que a leptina plasmática esteja em níveis mais elevados em pacientes com SPW do que em controles, o que sugere um excesso relativo de gordura para massa corporal magra. Ou seja, mudanças nas vias centrais que controlam a regulação do apetite e a recompensa alimentar podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de hiperfagia na SPW (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Outra característica presente na síndrome é o seu retardo no crescimento pré-natal. Irizarry; Miller; Freemark et al. (2016) descrevem que tal retardo tem causa na deficiência de GH e em hormônios puberais, em que os pacientes do sexo masculino não tratados com o hormônio apresentam em média a altura de 155 cm e as do sexo feminino 145 cm. A deficiência nos hormônios sexuais juntamente com a sarcopenia, sedentarismo, baixo tônus muscular e deficiência em GH pode colocar o paciente em risco de osteopenia e fraturas. Abdilla; Barbara; Calleja-Agius (2017) destacam que a reposição com os hormônios sexuais é usada, principalmente, para a melhora das características sexuais secundárias e na prevenção da osteoporose. O tratamento com hormônios sexuais, embora possa melhorar a saúde óssea e a massa muscular, estudos recentes apontam que a terapia com GH melhora o tamanho e a força óssea, independentemente da reposição com esteroides sexuais. Entretanto, especialistas afirmam que a terapia com hormônios sexuais deve respeitar o tempo normal da puberdade, e que deve ser individualizada, sendo supervisionada por endocrinologista pediátrico (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

A deficiência em GH observada na síndrome é resultante da baixa secreção espontânea de GH e baixas concentrações séricas do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), tanto em crianças quanto adulto, e é independente da obesidade. Isso acarreta ao paciente uma diminuição da massa magra e aumento da massa de tecido adiposo (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

O paciente com SPW apresenta desde a infância baixa estatura, tendo desde a fase pré-natal o crescimento anormal e baixo peso, porém, com o passar da idade, a baixa velocidade de crescimento e aumento da gordura corporal são consequências da deficiência precoce do GH. Tais pacientes também apresentam hipotonia pré-natal, desencadeando diminuição dos movimentos fetais (ABDILLA; BARBARA; CALLEJA-AGIUS, 2017).

Abdilla; Barbara; Calleja-Agius (2017) revelam que aproximadamente 30% dos pacientes com SPW apresentam escoliose antes dos 10 anos de idade, decorrente da obesidade e hipotonia muscular. O tratamento com GH pode aumentar o risco da escoliose, uma vez que, o mesmo induz um crescimento rápido nos pacientes durante a adolescência. Independentemente do paciente com SPW fazer ou não o tratamento com GH, é recomendado que o mesmo pratique exames físicos e exames radiográficos anualmente (ABDILLA; BARBARA; CALLEJA-AGIUS, 2017).

Outra característica presente em lactentes portadores de SPW é a disfunção do eixo tireoidiano, sendo relatado que até $\frac{1}{3}$ das crianças com SPW apresentam hipotireoidismo, porém, a triagem do THS não pode ser usada para diagnosticar com precisão a disfunção no eixo da tireoide. Durante o tratamento com GH, o paciente é regularmente monitorado quanto aos níveis de T₄ livre, T₃ e TSH, uma vez que, 25% dos pacientes com SPW sofrem com hipotireoidismo, com níveis reduzidos de T₄, mas com níveis normais de TSH. Uma vez que o hipotireoidismo pode impedir a síntese e secreção de GH, a administração da terapia com GH em crianças só pode começar após a normalização da função tireoidiana. Contudo, o GH pode afetar a função tireoidiana, por isso, é necessário que a mesma seja monitorada durante a terapia com GH (ABDILLA; BARBARA; CALLEJA-AGIUS, 2017 e IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Até 25% dos pacientes com SPW apresentam diabetes mellitus tipo II, causado pela baixa taxa metabólica, hiperfagia, reduzida atividade física, obesidade, hipersonolência, e hipotonia persistente. Contudo, embora a terapia com GH seja benéfica

para pacientes com SPW, ele é um agente diabetogênico, ou seja, aumenta os riscos dos pacientes com SPW de desenvolverem diabetes. Por isso, é recomendado que antes do início da terapia com GH em crianças obesas de 12 anos ou mais, seja realizada uma avaliação do risco de se desenvolver diabetes (ABDILLA; BARBARA; CALLEJA-AGIUS, 2017).

Quando bebês com SPW recebem a terapia com GH, várias melhorias são observadas, dentre as quais: aumento da altura, progressão no IMC, perímetro cefálica, composição corporal (aumento na massa muscular magra), proporções corporais, obtenção de habilidades motoras e melhorias na linguagem e pontuações cognitivas. Em crianças mais velhas e adolescentes nem sempre os benefícios citados anteriormente serão vistos, porém, os mesmos mostrarão progressão no comportamento (ABDILLA; BARBARA; CALLEJA-AGIUS, 2017).

A lesão hipotalâmica presente nos pacientes com SPW desencadeiam a hiperfagia, que apresenta como consequência a obesidade, uma vez que, há um aumento atípico no apetite e ingestão de alimentos. Tal hiperfagia é consequência de um sistema de recompensa que é hiperresponsivo, levando a uma falta de consciência fisiológica interna, quando o paciente apresentará uma falta de saciedade, acarretando uma constante ingestão alimentar (ABDILLA; BARBARA; CALLEJA-AGIUS, 2017).

O tratamento com GH humana recombinante (rhGH) em pacientes com SPW se deve à compreensão das comorbidades vistas tanto na síndrome quanto em pessoas com deficiência no hormônio. Em 2000, foi aprovado nos Estados Unidos a terapia com GH recombinante para pacientes com SPW, e em 2001 foi aprovado na Europa. No Brasil, o medicamento é distribuído gratuitamente pelo SUS; porém, ainda não é aprovado em alguns países, como no Canadá (DEAL; TONY; HÖYBYE et al., 2013; IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016; LUDWIG; RADAELI; SILVA et al., 2016 e Ministério da Saúde).

Para que o seu uso seja aprovado, existem alguns critérios que o paciente deve cumprir, como apresentar obesidade grave, diabetes mellitus descontrolado, apneia obstrutiva do sono grave não tratada ou psicose, como mostrado na Tabela 16. Atualmente são utilizados gráficos de crescimento padronizado atualizados para indivíduos tratados com o GH sem a SPW, que servem para monitorar a resposta à terapia com o hormônio e avaliar o estado nutricional dos pacientes (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Tabela 16: Resumo das diretrizes de cuidados clínicos para terapia com rhGH em pacientes com SPW. Adaptado de DEAL; TONY; HÖYBYE et al., 2013

I.	Após confirmação genética do diagnóstico de SPW, o tratamento com rhGH deve ser considerado e, se iniciado, deve ser continuado enquanto os benefícios demonstrados superarem os riscos.
----	--

II.	O teste de estimulação do GH não deve ser exigido como parte do processo de tomada de decisão terapêutica em lactentes e crianças com SPW.
-----	--

III.	Adultos com SPW devem ter uma avaliação do eixo GH / IGF antes do tratamento com rhGH.
------	--

IV.	Antes do início da terapia com rhGH, os pacientes com SPW devem ter um diagnóstico geneticamente confirmado e uma avaliação multidisciplinar especializada.
-----	---

V.	Os critérios de exclusão para iniciar o rhGH em pacientes com SPW incluem obesidade grave, diabetes não controlada, apneia obstrutiva do sono grave não tratada, câncer ativo e psicose ativa
----	---

VI.	A escoliose não deve ser considerada uma contra-indicação ao tratamento com rhGH em pacientes com SPW.
-----	--

VII.	Bebês e crianças com SPW devem começar com uma dose diária de $0,5 \text{ mg} / \text{m}^2 \cdot \text{d}$ sc com ajustes subsequentes para $1,0 \text{ mg} / \text{m}^2 \cdot \text{d}$ a cada 3–6 meses de acordo com a resposta clínica e guiados pela manutenção dos níveis fisiológicos IGF-I.
------	---

VIII.	Os adultos com SPW devem receber uma dose inicial de 0,1 a 0,2 mg / d com base na idade, presença de edema, exposição e sensibilidade prévias à rhGH e uso concomitante de estrogênio oral. A subsequente titulação da dose deve basear-se na resposta clínica, nos níveis de IGF-I adequados à idade e ao sexo na faixa de 0 a +2 da SDS.
-------	--

IX.	Seleção de pacientes com SPW para terapia com rhGH e estratégia e dosagem não deve depender da classe genética da SPW.
-----	--

X.	Os níveis de IGF-I em pacientes com SPW no tratamento com rhGH devem ser mantidos dentro da faixa superior da faixa normal (máximo + 2 SDS) para indivíduos normais saudáveis, pareados por idade.
----	--

XI.	As prioridades dos resultados clínicos devem variar dependendo da idade e da presença de incapacidade física, mental e social.
-----	--

-
- XII. O monitoramento do tratamento com rhGH em pacientes com SPW deve abordar os benefícios e riscos específicos do tratamento nessa população e o impacto potencial de outras deficiências hormonais.
-
- XIII. Pacientes com PWS recebendo rhGH devem ser seguidos cuidadosamente para potenciais efeitos adversos durante o tratamento com GH.
-
- XIV. O tratamento com rhGH deve estar no contexto de intervenções dietéticas, ambientais e de estilo de vida apropriadas, necessárias para o atendimento de todos os pacientes com SPW.
-
- XV. O comprometimento cognitivo não deve ser uma barreira ao tratamento com rhGH para pacientes com SPW.
-

Nota: *IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina; *rhGH: Hormônio do crescimento humano recombinante; *SDS: escores de desvio padrão *SPW: Síndrome de Prader-Willi;

A justificativa para o seu uso em pacientes com SPW difere pela idade. Em bebês/crianças, a gordura corporal é aumentada e a massa magra é reduzida, mesmo antes do ganho progressivo de peso, justificando a utilização do GH desde novos. Estudos comprovam que, crianças que utilizam GH, em até dois anos, tiveram a sua altura mediana melhorada, além do perímetro cefálico normalizado, percentual de gordura corporal melhoradas com o impedimento da redução da massa magra e um aumento da proporção de lipoproteína de alta densidade: lipoproteína de baixa densidade (HDL:LDL). Outros estudos mostram que o tratamento com GH não interfere na homeostase da glicose ou na proteína de estimulação por acilação do plasma (ASP), que é um hormônio produzido pelos adipócitos, importante na manutenção da homeostase lipídica, que aumenta o armazenamento de triglicerídeos e a captação de glicose nas células adiposas e reduzindo a lipólise dos triglicerídeos pela inibição da lipase sensível aos hormônios. Em crianças, com o uso do GH, os autores relatam que os pacientes apresentaram uma melhora na cognição, em que o GH preveniu a deterioração das habilidades cognitivas, com melhora no raciocínio abstrato e habilidades visoespaciais (ABDILLA; BARBARA; CALLEJA-AGIUS, 2017 e IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Em crianças mais velhas, o tratamento com GH também é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), tendo como resultado a melhora na velocidade do crescimento e altura final, com conseqüente melhoria da composição corporal, densidade mineral óssea e aumento do gasto energético em repouso (GER), uma vez que se tem o

aumento da massa muscular esquelética e da oxidação de ácidos graxos. Além disso, são registrados também melhorias na força física, hipotonia do músculo respiratório e sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos ao dióxido de carbono. Outros estudos avaliados pelo autor relatam que o tratamento com GH pode melhorar a qualidade geral do sono, pela redução da apneia e hipopneia. Em crianças com mais de 11 anos de idade foi observado melhorias comportamentais moderadas e com redução dos sintomas depressivos (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

A terapia com GH deve ser seguida de especial atenção dos pais, principalmente para os pacientes que já apresentam apneia central ou apneia obstrutiva. Tal característica é comum em pacientes com SPW e pode ser acentuada pela obesidade ou por infecções do trato respiratório intercorrentes. O tratamento com GH pode levar ao crescimento do tecido linfóide em crianças, uma vez que se tem o aumento dos efeitos do IGF-I, podendo então levar a morte súbita durante o tratamento. A morte inesperada está inclusa no consentimento pré-tratamento, sendo então contraindicada para crianças que apresentam dificuldades respiratórias, até que a avaliação das dificuldades respiratórias seja analisada e o tratamento da obesidade comprometidora seja alcançado. Por essa razão, o tratamento não pode ser iniciado durante uma infecção aguda, mas não precisa ser interrompido durante os episódios de infecção respiratória, ao menos que haja o aparecimento de dificuldades respiratórias (DEAL; TONY; HÖYBYE et al., 2013).

Também foi avaliada a função adaptativa em crianças em um estudo randomizado, em que os resultados das crianças em iniciaram o tratamento desde mais cedo infância melhoraram significativamente o funcionamento adaptativo. Nenhuma mudança significativa no QI foi demonstrada em pacientes que iniciaram o tratamento mais tarde na infância (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Já o uso do hormônio em adultos ainda é estudado, os seus efeitos e segurança. Os resultados dos estudos em dois anos foram um aumento do volume muscular da coxa e da massa magra, enquanto o volume de gordura subcutânea abdominal e massa de gordura corporal diminuíram. Alguns pacientes com intolerância à glicose regrediram a tolerância normal (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Porém, mesmo com inúmeros benefícios, o tratamento com GH ainda traz alguns riscos, como por exemplo, a escoliose. Contudo, um estudo multicêntrico e randomizado com pacientes lactentes, pré-púberes e púberes que utilizavam GH, durante dois anos,

demonstrou que tanto o início quanto a progressão da escoliose não foram diferentes entre os que estavam em tratamento controle. A análise da pontuação de desvio padrão (SDS) de IGF-I em níveis basais foi associado a uma menor gravidade da escoliose, sugerindo um efeito protetor do GH. Outros estudos associam a terapia de GH com a morte súbita em crianças pequenas com história de obstrução/infecção respiratória ou obesidade grave. Essas mortes ocorreram no começo do tratamento, e a sua causa exata não foi determinada, o que não deixa claro se tal mortalidade pode ser explicada pelo começo do tratamento ou se encaixa na mortalidade esperada da SPW (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Já suas reações adversas, que são raras, incluem o desenvolvimento de anticorpos contra o GH, reação local da injeção (dor, queimação, fibrose, nódulos, vermelhidão, inflamação, pigmentação, sangramento ou lipoatrofia), dor de cabeça, hematúria, hipotireoidismo, hiperglicemia leve (necessitando de maior atenção nos pacientes já diabéticos ou com história de diabetes tipo II na família, para o controle e manutenção da dose, uma vez que o GH pode induzir um estado de resistência à insulina), pacientes pediátricos podem desenvolver leucemia. É possível observar edema nos membros inferiores, hipertensão arterial, epifisiólise da cabeça do fêmur (AMARILLA; TASSARA; e CHAVES et al., 2016; KUO; DITCHEKENIAN; MANNA et al., 2007).

Além disso, tal tratamento é contraindicado em algumas situações, como em pacientes em que se há evidências de tumor ativo, promoção do crescimento em crianças quando as epífises estão fechadas, pacientes com doença crítica aguda, hipersensibilidade à substância ativa (AMARILLA; TASSARA; e CHAVES et al., 2016).

Devido aos efeitos colaterais e a possível morte subita causada pelo tratamento, a atenção especial com a criança com SPW deve ocorrer não só durante o processo de consentimento e avaliação do pré-tratamento, mas durante todo tratamento. Alterações na respiração devem ser relatadas imediatamente. Na Tabela 17 podemos ver melhor os efeitos adversos causados pela terapia (DEAL; TONY; HÖYBYE et al., 2013).

Tabela 17: Efeitos colaterais que se deve monitorar em pacientes em tratamento com GH. Adaptado de DEAL; TONY; HÖYBYE et al., 2013

Efeitos colaterais do GH para monitorar
Alterações nas características físicas e proporções corporais (face, mãos, pés) ou crescimento ósseo
Edema periférico
Dores nas articulações
Apnéia do sono/distúrbio respiratório, como ronco, pausas respiratórias, sonolência diurna excessiva
Pseudotumor cerebral/hipertensão intracraniana benigna: cefaleia, alterações visuais, náuseas e tontura
Epifisiólise femoral elevada: dor no quadril e/ou joelho, distúrbio da mancha
Resistência à insulina (elevada em jejum)
Diminuição do nível de T ₄ , requerendo medição de T ₃ para se diferenciar do hipotireoidismo central verdadeiro
Escoliose
Vigilância a longo prazo em ou após cessação do rhGH
Intolerância à glicose
Epilepsia
Neoplasias
Derrame, sangramento intracraniano

Bebês e crianças com SPW apresentam disfunção hipotalâmica, podendo evoluir para uma insuficiência adrenal central. Para isso, no momento do diagnóstico, os níveis de ACTH e cortisol devem ser medidos, antes do início da terapia com o GH, uma vez que, o GH pode diminuir a conversão de cortisona em cortisol por inibir a 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1. Porém, o impacto do GH nessa via adrenal basal e a resposta adrenal ao estresse na SPW ainda não é clara. Por isso, os pais devem receber hidrocortisona parenteral para ser administrada em períodos de febre alta, vômitos ou traumas, e glicocorticoide por dose de estresse profilático deve ser administrado durante tais períodos (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016)

Ludwig; Radaeli; Silva et al., (2016) descreve o caso de um garoto que fazia reposição hormonal com doses de 0,15 ul/kg/dia de GH humano recombinante aos 7 anos.

Tal paciente apresentava uma taxa de crescimento inadequada, porém sem deficiências nutricionais ou hipotireoidismo. Durante o tratamento, o nível de IGF-I ficou normal médio/alto, e apresentou uma velocidade de crescimento de 6 cm / 10 meses. Além disso, após o início do tratamento, ele apresentou sinais precoces de desenvolvimento puberal, o que é bastante incomum em crianças com SPW a ativação simultânea do eixo pituitário-gonadal. Porém, tal resposta pode ser explicada pelo papel que o GH exerce sobre a função gonadal que pode influenciar a atividade reprodutiva, aumentando a secreção e a sensibilidade do hormônio liberador de gonadotropina. Além da melhora do crescimento, o paciente também teve uma melhora na composição corporal, densidade óssea, capacidade física, consumo de energia basal, cognição e qualidade de vida. (LUDWIG; RADAELI; SILVA et al., 2016)

Kuo; Ditchekenian; Manna et al. (2007) realizou testes com pacientes com SPW que apresentavam obesidade e compulsão alimentar, e nos testes de estímulo de GH com clonidina e insulina, nenhum paciente apresentou pico de GH acima de 10 ng/ml, considerando que o valor de corte de 5, três pacientes não foram responsivos. Isso pode ser explicado pela irregularidade neurosecretora presente nos pacientes com SPW (KUO; DITCHEKENIAN; MANNA et al., 2007).

Os pacientes com SPW apresentam massa adiposa extremamente elevados em virtude da falta de GH, associados à compulsão alimentar e distúrbios hipotalâmicos. A terapia dos pacientes com SPW utilizando GH melhora tanto a estatura final, como contribui para a melhora da composição corpórea, minimizando as consequências clínicas desta síndrome. Além do aumento da velocidade de crescimento, é possível observar um avanço proporcional na idade óssea. O tratamento não proporciona perda de peso, porém, o paciente apresenta um desaceleramento no ganho de peso durante o período, com discreta diminuição do índice de massa corpórea. Há também uma melhora no desempenho motor e agilidade, melhorando a inserção psicossocial das crianças afetadas, uma vez que, o indivíduo tratado apresenta maior energia e melhora no rendimento físico, podendo-se então praticar atividades cotidianas que antes não eram possíveis, como andar de bicicleta (KUO; DITCHEKENIAN; MANNA et al., 2007).

Estudos também citam uma melhora na função respiratória dos pacientes durante o tratamento com GH, aumentando a ventilação e a sensibilidade dos quimio-receptores periféricos ao dióxido de carbono. Esse fato sugere que o GH exerça um efeito no sistema

regulador respiratório central. Em relação ao perfil lipídico, houve uma normalização dos triglicérides (KURO; DITCHEKIAN; MANNA et al., 2007)

O tratamento com GH também melhora o perfil lipídico dos pacientes, com normalização dos triglicérides, com queda do LDL e aumento do HDL. Isso pode ser explicado pela atuação do hormônio diretamente no receptor hepático das apolipoproteínas B, promovendo a metabolização e remoção de tais lipoproteínas. O quadro do metabolismo dos carboidratos não há alterações significativas, onde estudos mostram que a glicemia tende a permanecer dentro da faixa da normalidade (KURO; DITCHEKIAN; MANNA et al., 2007).

Ainda existem controvérsias sobre a idade ideal para se iniciar a terapia com GH, e embora ainda não seja claro com que idade a criança deva começar o tratamento, cada vez existe mais evidências que sugerem que os benefícios do tratamento começar na primeira infância é maior. Existe um consenso da comunidade médica de que se deva começar antes do início da obesidade, que geralmente é por volta dos 2 anos de idade. Porém estudos mostram que a idade média para o início atualmente é por volta dos 7 anos, uma vez que se há um retardo no diagnóstico de algumas crianças. (IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016 e MILLER, 2012).

Contudo, cada vez mais o tratamento com GH é iniciado mais cedo, uma vez que os dados publicados apoiam os benefícios do tratamento se começado desde bebê, sendo atualmente iniciado por alguns especialistas desde os 6 meses de idade. Alguns estudos ainda devem ser feitos para se determinar a dose ideal, mas geralmente a usada é a dose diária de 0,05 a 1 mg/m² dia ou 0,1 a 0,15 mg/kg semana, com ajustes baseados na resposta clínica, na qual os níveis de IGF-1 encontram-se na faixa normal (BEAULOYE; DIENE; KUPPENS et al., 2016 e IRIZARRY; MILLER; FREEMARK et al., 2016).

Atualmente, com acesso à internet e a existência de grupos de apoio, os pais estão cada vez mais cientes dos benefícios potenciais do início do tratamento com GH na infância. Por essa razão, muitos estão solicitando o tratamento assim que o diagnóstico é feito. Portanto, é necessário que os endocrinologistas estejam cientes dos benefícios da terapia para os pacientes com SPW (MILLER, 2012).

Existe a concordância unânime de que a terapia deve ser acompanhada e supervisionada por endocrinologistas, garantindo a segurança e eficácia do tratamento. A

manutenção e ajustes de doses que eram rotineiramente atualizadas com base na resposta de crescimento e/ou aumento de peso vem sendo mudada, uma vez que dados epidemiológicos mostram uma ligeira ligação entre os níveis de IGF-I e alguns eventos adversos, levando aos especialistas a considerarem os níveis de IGF-I dentro do intervalo fisiologicamente normal (BEAULOYE; DIENE; KUPPENS et al., 2016).

Há também um debate sobre o monitoramento dos níveis de IGF-I durante a terapia, com o objetivo de otimizá-lo, uma vez que, a maioria dos indivíduos com SPW apresentam níveis elevados de IGF-I dois anos após o início do tratamento. Entretanto, ainda não há um consenso entre os endocrinologistas sobre como lidar melhor com os níveis elevados de IGF-I (MILLER, 2012).

A duração do tratamento depende do desfecho clínico primário, como a composição corporal, o metabolismo lipídico e funcionamento físico e psicossocial, além dos efeitos colaterais observados (BEAULOYE; DIENE; KUPPENS et al., 2016).

6. Conclusão

Os resultados mostraram que dois pacientes foram positivos para a técnica, um para o éxon 7 do gene *GNAS* e outro para os éxon 1A e 1. Ambos compartilhavam características fenotípicas semelhantes as características da Síndrome de Prader-Willi, sendo que o Paciente 95 foi negativo tanto nos critérios de diagnóstico clínico de Holm et al. (1993) quanto de Gunay-Aygun et al. (2001), assim como, o Paciente 101 foi negativo para ambos os critérios.

A revisão feita a partir da literatura para se encontrar outros pacientes com as mesmas deleções foi realizada, e a partir disto, possível a realização da comparação fenotípica entre os pacientes. Várias características clínicas semelhantes a Síndrome de Prader-Willi indicadas nos critérios de Holm et al. (1993) e Gunay-Aygun et al. (2001) não foram avaliados, uma vez que, tais pacientes foram atendidos por queixas hormonais (TSH) ou pela consequência da hipocalcemia, sendo então, difícil comparar os nossos pacientes com o da literatura.

É importante salientar que, outra dificuldade foi o fato do nosso Paciente 101, até onde sabemos, ser o primeiro a apresentar uma deleção no éxon 1A e 1, necessitando então de se comparar o mesmo com pacientes portadores de uma ou outra deleção e descritos por mais de um autor, não sendo possível uma relação das características fenotípicas compartilhadas entre si.

Com base na revisão sistemática acerca das principais características dos pacientes com Síndrome de Prader-Willi foi notado que as características mais frequentes são a obesidade, baixa estatura, hipotonia neonatal e retardo mental. É importante salientar que, diferentemente do que era estabelecido antigamente, a criança com Síndrome de Prader-Willi nascia com dificuldades para sugar e evoluía para a hiperfagia, existem 7 fases nutricionais, que vão evoluindo a partir dos 2 anos de idade.

O diagnóstico diferencial para a síndrome é de extrema importância, principalmente quando o assunto é o tratamento. Ainda não existe um consenso de qual a melhor idade para se começar o tratamento com GH, porém, é necessário o seu uso, para que o paciente apresente uma melhor qualidade de vida, uma vez que seus benefícios superam os seus riscos. Porém, mesmo que haja benefícios, é necessário que o tratamento seja orientado por especialistas e observação dos pais para as complicações, principalmente em crianças que apresentam apneia.

7. Referências

ABDILLA, Y.; BARBARA, M. A.; CALLEJA-AGIUS, J. Prader-Willi Syndrome: Background and Management. **Neonatal Network**, v. 36, n. 3, p. 134–141, 2017. Disponível em: <<http://connect.springerpub.com/lookup/doi/10.1891/0730-0832.36.3.134>>.

AMARILLA, A.; TASSARA, N. E CHAVES, C.; et al., 2016 . et al. Informe Rápido de Evaluación de Tecnología Sanitaria sobre efectividad y seguridad de productos Biosimilares de Hormona de Crecimiento. 2016.

AMARO, A. S. et al. Treinamento Físico Na Síndrome De Prader-Willi : Um Estudo De Revisão. **Universidade Presbiteriana Mackenzie**, v. 15, p. 55–65, 2013.

BAR, C.; DIENE, G.; MOLINAS, C.; BIETH, E.; CASPER, C.; TAUBER, M. Early diagnosis and care is achieved but should be improved in infants with Prader-Willi syndrome. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, p. 1–6, 2017.

BEAULOYE, V. et al. High unacylated ghrelin levels support the concept of anorexia in infants with prader-willi syndrome. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, n. 1, p. 56, 4 dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13023-016-0440-0>>.

BUTLER, M. G. Genomic *imprinting* disorders in humans: a mini-review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, n. 9–10, p. 477–486, 21 out. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10815-009-9353-3>>.

CANDELO, E. et al. First Case Report of Prader–Willi-Like Syndrome in Colombia. **Frontiers in Genetics**, v. 9, 21 mar. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00098/full>>.

CARVALHO, D. F. de et al. Abordagem terapêutica da obesidade na Síndrome de Prader-Willi. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 6, p. 913–919, ago. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302007000600004&lng=pt&tlng=pt>.

CASSIDY, S. B. .; SCHWARTZ, S.; MILLER, J. L.; DRISCOLL, D. J. Prader-Willi syndrome. **Genetics in medicine**, v. 14, n. 1, p. 10–26, 2012.

CHEON, C. K. Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 21, p. 126–135, 2016.

DAMIANI, D. Uso de hormônio de crescimento na síndrome de Prader-Willi. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 5, p. 833–838, jul. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302008000500015&lng=pt&tlng=pt>.

DEAL, C. L. et al. Growth Hormone Research Society Workshop Summary: Consensus Guidelines for Recombinant Human Growth Hormone Therapy in Prader-Willi Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 6, p. E1072–E1087, 1 jun. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article/98/6/E1072/2536743>>.

DELLO RUSSO, P. et al. Microdeletion 15q26.2qter and Microduplication 18q23 in a Patient with Prader-Willi-Like Syndrome: Clinical Findings. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 148, n. 1, p. 14–18, 2016. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/445923>>.

DEMURA, M. et al. Completely skewed X-inactivation in a mentally retarded young female with pseudohypoparathyroidism type IB and juvenile renin-dependent hypertension. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 7, p. 3043–3049, 2003.

DESCH, L. et al. 6q16.3q23.3 duplication associated with Prader-Willi-like syndrome. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 42, 25 dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13039-015-0151-6>>.

FRIDMAN, C; KOK, F; KOIFFMANN, C. P. Síndrome de Prader-Willi em lactentes hipotônicos Hypotonic infants and the Prader-Willi Syndrome. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 246–250, 2000.

GARZUZI, Y. et al. Perfil comportamental de crianças e adolescentes com síndrome de Prader-Willi e obesidade exógena. **Psicologia: Teoria e Prática**, v. 11, n. 1, p. 167–178, 2009.

GEETS, E.; MEUWISSEN, M. E. C; VAN HUL, W. Clinical , molecular genetics and therapeutic aspects of syndromic obesity. **Clinical Genetic**, p. 23–40, 2018.

2019.

GENECARD, GENE *POU3F2*. Disponível em <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=POU3F2>> Acessado dia 20 de março de 2019.

GENETICS HOME REFERENCE, GENE *GNAS*. Disponível em <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GNAS-AS1#location>> Acessado dia 20 de março de 2019.

GENETICS HOME REFERENCE, GENE *SIMI*. Disponível em <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SIMI#location>> Acessado dia 20 de março de 2019

GUNAY-AYGUN, M. et al. The Changing Purpose of Prader-Willi Syndrome Clinical Diagnostic Criteria and Proposed Revised Criteria. **Pediatrics**, v. 108, n. 5, p. 1–5, 2001. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/pediatrics/108/5/e92.full.pdf>>.

HALDEMAN-ENGLERT, C. R.; HURST, A. C.; LEVINE, M. A. **Disorders of *GNAS* Inactivation**. [s.l: s.n.]

HAM, H.-J. et al. Analysis of Aberrantly Spliced Transcripts of a Novel de novo *GNAS* Mutant in a Male with Albright Hereditary Osteodystrophy and PHP1A. **Hormone and Metabolic Research**, v. 47, n. 08, p. 585–590, 12 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1395678>>.

HENDRICKS, A. E. et al. Rare Variant Analysis of Human and Rodent Obesity Genes in Individuals with Severe Childhood Obesity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4394, 29 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-03054-8>>.

IRIZARRY, K. A. et al. Prader Willi Syndrome: genetics, metabolomics, hormonal function, and new approaches to therapy. **Advances in Pediatrics**, v. 63, n. 1, p. 47–77, ago. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065310116300056>>.

IZZI, B. et al. Methylation defect in imprinted genes detected in patients with an albright's hereditary osteodystrophy like phenotype and platelet gs hypofunction. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

PEDRALS, J. G.; MARCUSON, K. W; GALLEGOS, V. H. Escoliosis y síndrome de prader-willi : a propósito de 5 casos intervenidos quirúrgicamente scoliosis

and prader-willi syndrome : review of five cases. v. 11, n. 2, p. 127–130, 2012.

KUO, J. Y. et al. Síndrome de Prader-Willi: aspectos metabólicos associados ao tratamento com hormônio de crescimento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 1, p. 92–98, fev. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302007000100015&lng=pt&tlng=pt>.

LECUMBERRI, B. et al. Coexistence of two different pseudohypoparathyroidism subtypes (Ia and Ib) in the same kindred with independent Gs coding mutations and *GNAS* imprinting defects. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 4, p. 276–280, 1 abr. 2010. Disponível em: <<http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2009.071001>>.

LUDWIG, N. G. et al. A boy with Prader-Willi syndrome: unmasking precocious puberty during growth hormone replacement therapy. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 6, p. 596–600, dez. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972016000600596&lng=en&tlng=en>.

MANZARDO A.M, B. M. G. Examination of Global Methylation and Targeted Imprinted Genes in Prader-Willi Syndrome. **Journal of Clinical Epigenetics**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2016.

MESQUITA, M. L. G. de et al. Restrição alimentar e problemas de comportamento de crianças com Síndrome de Prader-Willi. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. XVI, n. 1, p. 30–40, 2014.

MESQUITA, M. L. G. et al. Fenótipo comportamental de crianças e adolescentes com síndrome de Prader-Willi. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 1, p. 63–69, 2010.

MILLER, J. L. Approach to the Child with Prader-Willi Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 11, p. 3837–3844, nov. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2012-2543>>.

MILLER, N. L. G.; WEVRICK, R.; MELLON, P. L. Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 2, p. 248–260, 22 out. 2009.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddn344>>.

Nelson, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PEREIRA, G. C. F.; PEREIRA, G. D. S. . M. M. C. et al. Síndrome de Prader-Willi nos gêneros feminino e masculino: Relato de dois casos. **Revista Ceciliana**, v. 1, n. 2, p. 71–75, 2009.

PORTARIA Nº 110, DE 10 DE MARÇO DE 2010 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. DISPONÍVEL EM <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0110_10_03_2010.html>.

Acessado dia 24 de abril de 2019.

REYES, M. et al. A novel deletion involving *GNAS* exon 1 causes PHP1A and further refines the region required for normal methylation at exon A/B. **HHS Public Access**, v. 5, n. 6, p. 1–8, 2017.

ROCHA, C. F. INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI EM PACIENTES SUSPEITOS. 2011.

SALSA MLPA ME031 PROBEIX *GNAS*. Disponível em < https://www.mrc-holland.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe_Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID=701hdzonzhLk.> Acessado dia 20 de março de 2019.

SANTOS, V. M. dos et al. Morbid obesity in an adolescent with Prader-Willi syndrome. **Revista médica de Chile**, v. 137, n. 2, fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872009000200012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57, 2002.

SIMONY, R. F; CHAUD, D. M. A; SPINELLI, M. G. N. et al. OBESIDADE , ASPECTOS METABÓLICOS E CONDUTA NUTRICIONAL NA SÍNDROME DE PRADER-WILLI OBESITY , METABOLIC ASPECTS AND NUTRITIONAL

MANAGEMENT IN PRADER-WILLI SYNDROME Rosana Farah Simony Daniela Maria Alves Chaud Mônica Glória Neumann Spinelli Alisson Diego M. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v. 12, n. 2, p. 77–82, 2012.

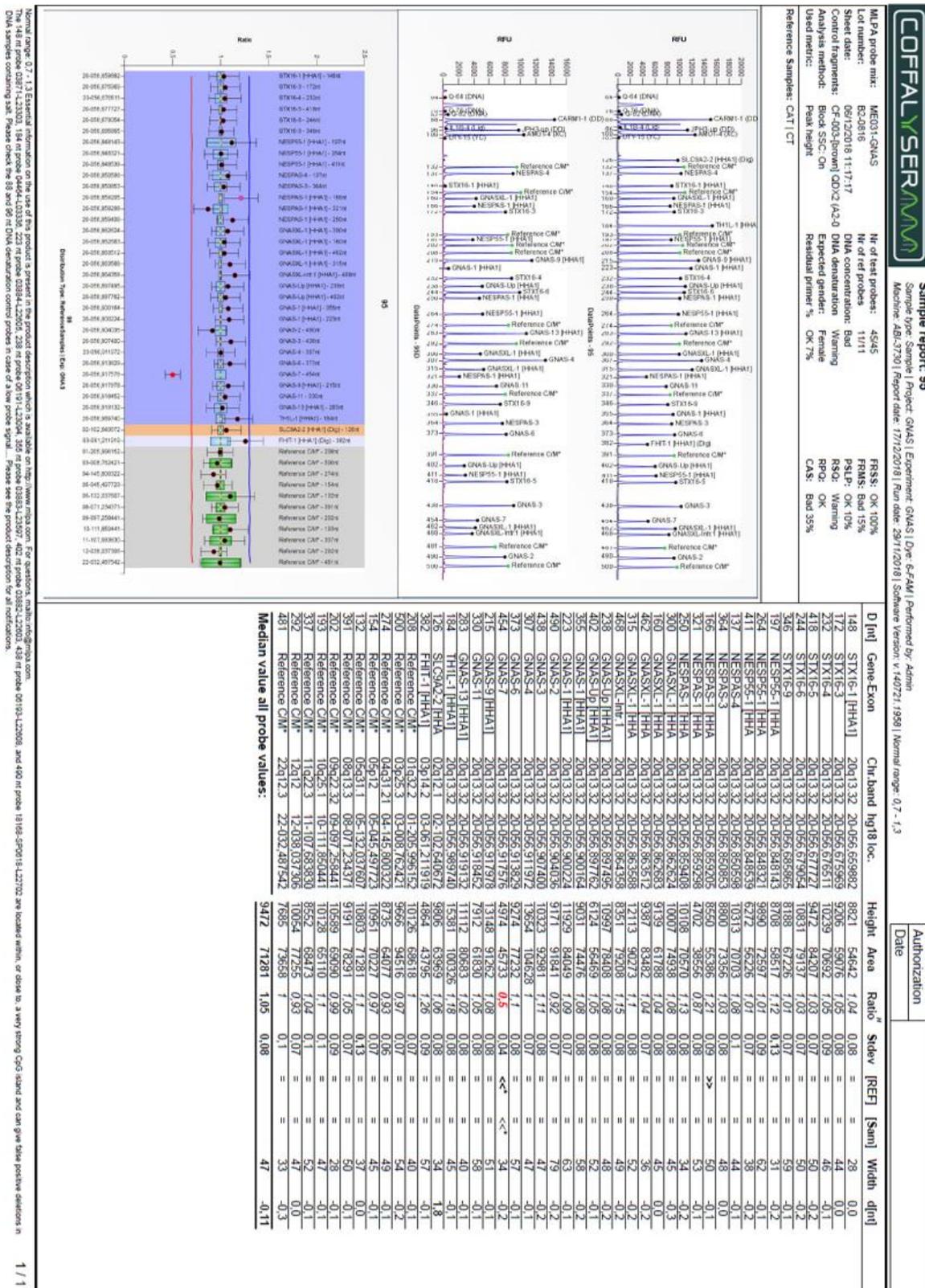
TECNICA MLPA: QUAIS SÃO AS PRINCIPAIS VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA MLPA? Disponível em <<https://support.mlpa.com/kb/articles/what-are-the-main-advantages-and-limitations-of-mlpa>> Acessado dia 7 de julho de 2019

WEINSTEIN, L. S. et al. The role of *GNAS* and other imprinted genes in the development of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 1, p. 6–17, 20 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ijo2009222>>.

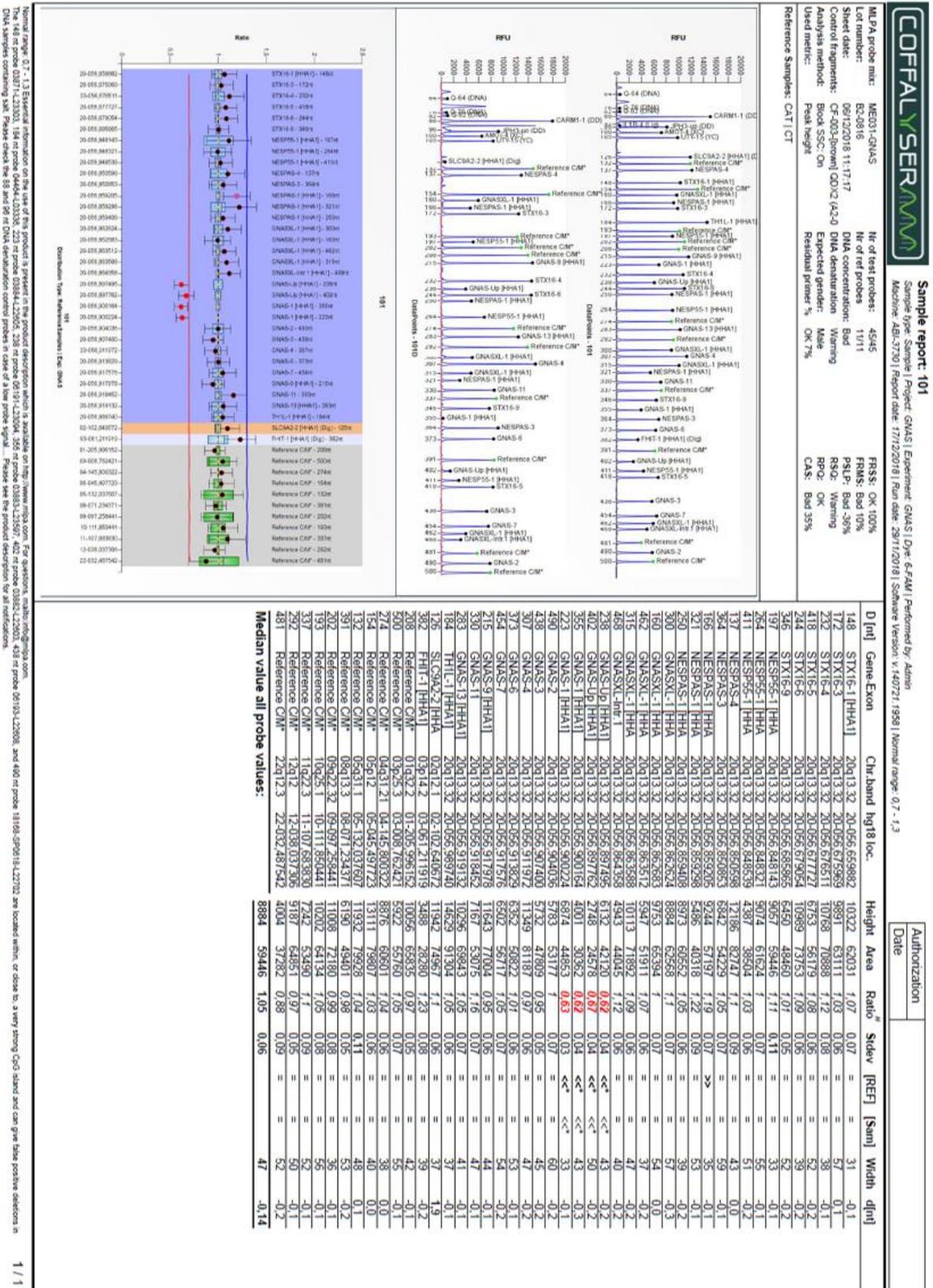
YAVROPOULOU, M. P. et al. Hypercalcitoninaemia in pseudohypoparathyroidism type 1A and type 1B. **Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports**, v. 2019, 31 jan. 2019. Disponível em: <<https://edm.bioscientifica.com/view/journals/edm/2019/1/EDM18-0125.xml>>.

8. Apêndices

Apêndice A: Resultado gerado pelo Coffalyser.NET do paciente 95



APÊNDICE B: Resultado gerado pelo Coffalyser.NET do paciente 101



9. Anexos

ANEXO A: Cadastrado plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação molecular de pacientes com obesidade e deficiência mental suspeitos de Síndrome de Prader-Willi ou fenótipo Prader-Willi-like.

Pesquisador: Catielly Ferreira rocha

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 25858314.9.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 755.857

Data da Relatoria: 24/07/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto aprovado anteriormente no CEP HUGG, a emenda versa sobre a inclusão de centro co-participante, no caso o Instituto de Endocrinologia e Diabetes - IEDE - RJ. A instituição que será co-participante é centro especializado na área da pesquisa em questão

Objetivo da Pesquisa:

Descrito anteriormente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descrito anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda de inclusão de centro co-participante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não há esta necessidade.

Recomendações:

Centro co-participante apto a participar desta pesquisa. Aprovado

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: cephugg@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



Continuação do Parecer: 755.857

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 19 de Agosto de 2014

Assinado por:
Pedro Eder Portari Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775
Bairro: Tijuca **CEP:** 22.270-004
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)1264-5317 **Fax:** (21)1264-5177 **E-mail:** cephugg@gmail.com

ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRÉE E GUINLE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA OS
PAIS OU RESPONSÁVEL LEGAL**

Convidamos seu filho (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: "Investigação molecular de pacientes com obesidade e deficiência mental suspeitos de Síndrome de Prader-Willi ou fenótipo Prader-Willi-like" do ambulatório de Genética e Biologia Molecular da UNIRIO e afiliados, e gostaríamos que vocês soubessem que:

- a) Ao participar deste projeto vocês terão como benefício o esclarecimento da causa da doença, além do aconselhamento genético que avalia o risco de novos casos na família, e também a melhoria de vida do paciente;
- b) Só serão realizados a coleta de sangue e os exames se o paciente, ou seu responsável, concordar em participar deste estudo assinando o presente termo de consentimento, que será entregue em duas vias, uma para o paciente ou seu responsável e outra que será mantida no Laboratório de Citogenética Molecular da UNIRIO;
- c) Participar deste projeto é uma opção de vocês. Caso vocês decidam não participar, ou desistam de participar a qualquer momento, não haverá perda de nenhum benefício ou tratamento que estiverem fazendo nesta instituição;
- d) A qualquer momento vocês podem buscar junto aos responsáveis pelo projeto esclarecimentos de qualquer natureza;
- e) Todos os procedimentos médicos e de diagnósticos laboratoriais pertinentes à pesquisa serão pagos pela instituição, exceto gastos correspondentes a passagens de transporte urbano coletivo e alimentação;

Rúbrica Pesquisador ou médico

Rúbrica Responsável Legal

- f) Os pacientes suspeitos e seus responsáveis serão submetidos ao preenchimento de um formulário de identificação e protocolo. Iremos coletar 5 ml de sangue do paciente e de seus pais se necessário. Em alguns casos pode ser solicitada nova coleta de sangue. Os pacientes, provenientes do ambulatório de genética do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) e outras instituições colaboradoras, terão todos os dados do estudo, anexados ao prontuário hospitalar.
- g) A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe o risco de ocorrer um hematoma (mancha roxa) na região da coleta de sangue.
- h) Os dados que você forneceu sobre o paciente poderão ser utilizados em pesquisas futuras.
- i) As amostras de DNA podem ser armazenadas no freezer do laboratório de citogenética da UNIRIO, caso haja a necessidade de repetição de algum exame ou a realização de outro exame que complemente o diagnóstico. O armazenamento da amostra só será realizado com a sua autorização e poderemos descartá-la quando você solicitar. A amostra de DNA que não for armazenada será descartada em recipiente adequado para material biológico.
- j) Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetido para aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.
- k) Se a amostra do paciente for armazenada e uma nova pesquisa for utilizá-la, você será informado e deverá assinar um novo TCLE.
- l) Os resultados poderão demorar alguns meses para ficarem prontos, e serão apresentados a vocês pelo médico responsável;
- m) Os resultados deste estudo serão publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais da área da saúde;
- n) O pesquisador responsável é Catielly Rocha, biomédica do ambulatório de genética do HUGG, com o seguinte número para contato (021) 98255 1773. 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, (21) 2264 1595 com horário de funcionamento das 8 às 11h nas segundas e quartas-feiras. Se houver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, deve-se entrar em contato com a Comissão de Ética do HUGG (021) 2264 5177 ou com a Comissão de Ética do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione (021) 2224 3261.

Rúbrica Pesquisador ou Médico

Rúbrica Responsável Legal

Eu, _____ responsável pelo paciente
_____ autorizo a realização de fotos sem a
tarja negra da face do paciente e

- () concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
() concordo que sejam apresentados em aulas para profissionais da saúde.
() não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou
apresentação.

Assinatura do responsável pelo paciente

Eu, _____
portador do R.G. nº _____,

- Autorizo
 Não autorizo

Que a amostra de sangue coletada fique depositada no Laboratório de
Citogenética Molecular da UNIRIO.

Assinatura do responsável pelo paciente

Rúbrica Pesquisador ou Médico

Rúbrica Responsável Legal

Eu, _____
portador do R.G. nº _____, responsável pelo paciente
_____ concordo
em participar do projeto de pesquisa "Investigação molecular de pacientes com
obesidade e deficiência mental suspeitos de Síndrome de Prader-Willi ou fenótipo
Prader-Willi-like". *Declaro haver recebido* as devidas explicações sobre o projeto,
estar ciente sobre os itens acima mencionados e minha participação é voluntária
por ação própria.

_____ Data:
Assinatura do responsável legal

_____ Data:
Assinatura da testemunha

_____ Data:
Assinatura da responsável pelo estudo

ANEXO C: Ficha do paciente do Ambulatório de Genética

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:		
COR DA PELE (CONSIDERANDO DUAS GERAÇÕES ANTERIORES DO PACIENTE):		
IDADE DA MÃE E DO PAI AO ENGRAVIDAR:		
RESULTADO DO CARIÓTIPO:		
OBSERVAÇÕES:		

ANEXO D: Ficha clínica com os critérios de Holm (1993) e Gunay-Aygun et al. (2001).

Nome do Paciente:

TABELA 1. Critérios Para Diagnóstico Clínico da SPW

Critérios Maiores (1 ponto)

	Hipotonia neonatal
	Dificuldade de alimentação na infância ou retardo do desenvolvimento neuro-psicomotor
	Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano e 6 meses
	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.

Referência Bibliográfica

Holm V. A.; Cassidy S. B.; Buther M. G.; Hanchett J. M.; Grenswag L. R.; Whitman B. Y. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics*, 1993.

ANEXO E: Descrição do kit MS-MLPA probemix ME031-B2 *GNAS*

Description version 19; 07 June 2017

SALSA MS-MLPA probemix ME031-B2 *GNAS*

Lot B2-0816. As compared to version B1 (lot B1-1012), one reference probe has been removed and one probe has been adjusted in length, but not in sequence detected.

This SALSA® MS-MLPA® probemix is intended for experienced MLPA users only! This probemix enables you to quantify genes or chromosomal regions in which the occurrence of copy number changes and methylation status of the *GNAS* locus are not yet well-established and the relationship between genotype and phenotype is not yet clear. Since it will not provide you with clear cut answers, interpretation of results can be complicated. MRC-Holland can only provide limited support with interpretation of results obtained with this product, and recommends thoroughly screening any available literature. Suggestions from specialists for improvement of this product or product description are highly appreciated.

Albright hereditary osteodystrophy (AHO) is a complex dysmorphology and endocrine syndrome characterised by short stature, round face, brachymetacarpia, subcutaneous ossification and various degrees of neurobehavioral defects and developmental delay. It is caused by heterozygous inactivating *GNAS* mutations. Some patients suffer from hormone resistance, mainly parathyroid hormone, leading to hypocalcemia, hyperphosphatemia, high plasma PTH levels and obesity and their condition is referred to as pseudohypoparathyroidism (PHPIa). AHO in the absence of hormone resistance is called pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP). In addition to PHPIa and PPHP, aberrations in the *GNAS* locus can cause PHPIb, which refers to cases in which some of the endocrine disturbances found in PHPIa occur in the absence of the physical features typical of AHO. Clinical overlap between PHPIa and PHPIb is thought to be caused by variable levels of G_{α} activity expressed in specific cell types. *GNAS* encodes the G_{α} protein, which is the α -subunit in the heterotrimeric G protein. G_{α} is expressed biallelically in most tissues but its expression is silenced from the paternal allele in a small number of tissues (S. Turan and M. Bastepe, 2013, *Horm Res Paediatr.* 80:229-241).

Maternally derived mutations are usually associated with PHPIa, while PPHP is caused by paternally derived mutations. PHPIb is caused by deletions in one or several of the four differentially methylated regions (DMRs, see Figure 1) of the *GNAS* locus or by deletions in the *STX16* gene.

The *GNAS* locus is a complex imprinted locus that generates multiple transcripts through the use of several alternative first exons that splice into a common set of downstream exons, see Figure 1. The *GNAS* gene (13 exons) spans ~58 kb of genomic DNA and is located on chromosome 20q13.32, 58.9 Mb from the p-telomere.

Due to differential methylation of their promoters, most gene products originate from one parental allele. Transcripts *GNASXL*, which encodes XLas, *GNAS1A* (also referred to as A/B) and the antisense transcript *NESPAS* (also referred to as *GNAS-AS1*) are transcribed from the paternal allele, while *NESP55* (also referred to as *NESP*, or *GNAS* transcript variant 4) is transcribed from the maternal allele. The most downstream promoter (*GNAS* exon 1) is not differentially methylated, which results in *GNAS* expression from both alleles in most tissues.

The G_{α} and XLas transcripts are involved in downstream signalling from parathyroid hormone (PTH), parathyroid hormone related protein (PTHrP) receptors and other hormone receptors like TSHR and GHRHR. The *GNAS1A* transcript and the antisense transcript *NESPAS* are not translated into proteins, but are thought to influence G_{α} expression via mechanisms that remain to be determined. The *STX16* gene, lastly, is a long range control element of methylation at the *GNAS* locus, located more than 220 kb centromeric of *GNAS*.

This SALSA® MS-MLPA® probemix is intended to provide information on deletions, duplications and aberrant methylation of sequences in the 20q13.32 *GNAS* region. Besides the detection of aberrant methylation, all 32 target probes present will give information on copy number changes in the analysed sample. The ME031-B2 *GNAS* probemix contains 25 probes specific for the *GNAS* locus, 6 for the *STX16* gene, located ~220 kb centromeric of *GNAS* and one for the *TH1L* (also referred to as *NELFCD*) gene, located 90 kb telomeric of *GNAS*. Of these, 18 contain a *HhaI* restriction site and provide information about the methylation status of the target sequence. The probe targeting the *TH1L* gene also contains a *HhaI* recognition site (unmethylated in normal blood-derived DNA).

Description version 19; 07 June 2017

In addition, 11 reference probes on different chromosomes and two MS-MLPA digestion control probes are included. The digestion control probes indicate whether or not restriction endonuclease digestion in the MS-MLPA reaction was complete.

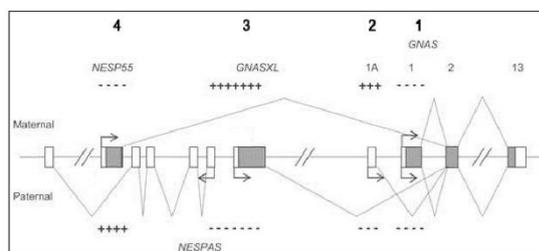


Figure 1. DMR 1, 2, 3 and 4 of GNAS locus depicted as '-----' for the unmethylated allele and '+++++' for the methylated allele:

1. Unmethylated, promoter GNAS;
2. Maternally methylated, GNAS exon 1A;
3. Maternally methylated, covers GNASXL and NESPAS promoters;
4. Paternally methylated, covers NESP5 promoter.

Exons are depicted as boxes, with filled boxes indicating coding and open boxes indicating non-coding exons or regions. Transcription start sites and direction of transcription are

indicated by arrows. Not all alternative splicing events of NESPAS are depicted. Furthermore, exons 3-12 of GNAS and minor alternatively spliced exons are omitted. Adapted from Kelsey 2010.

This SALSA® MS-MLPA® probemix can be used to detect *aberrant methylation* of one or more sequences within the GNAS complex locus. Methylation levels can be different for different tissues. Please use DNA derived from the same type of tissue and purified by the same method as reference samples. This SALSA® MS-MLPA® probemix can also be used to detect *deletions and duplications* of one or more sequences in the GNAS region in a DNA sample. Heterozygous deletions of recognition sequences should give a 35-50% reduced relative peak height of the amplification product of that probe. Note that a mutation or polymorphism in the sequence detected by a probe can also cause a reduction in relative peak height, even when not located exactly on the ligation site! In addition, some probe signals are more sensitive to sample purity and small changes in experimental conditions. Therefore, deletions and duplications detected by MLPA should always be confirmed by other methods. Not all deletions and duplications detected by MLPA will be pathogenic; users should always verify the latest scientific literature when interpreting their findings. We have no information on what percentage of defects in these genes is caused by deletions/duplications of complete exons. Finally, note that most defects in these genes are expected to be small (point) mutations which will not be detected by this SALSA® MLPA® test.

SALSA® MS-MLPA® probemixes and reagents are sold by MRC-Holland for research purposes and to demonstrate the possibilities of the MLPA technique. They are not CE/FDA certified for use in diagnostic procedures. Purchase of the SALSA® MS-MLPA® test probemixes and reagents includes a limited license to use these products for research purposes.

The use of this SALSA® MS-MLPA® probemix and reagents requires a thermocycler with heated lid and sequence type electrophoresis equipment. Different fluorescent PCR primers are available. The MLPA technique has been first described in Nucleic Acid Research 30, e57 (2002). The MS-MLPA method for the detection of both copy numbers and methylation changes was described in Nucleic Acid Research 33, e128 by Nygren et al. 2005.

References for SALSA® MS-MLPA® probemix ME031 GNAS

- de Lange, IM et al., 2016. Macrosomia, obesity, and macrocephaly as first clinical presentation of PHP1b caused by STX16 deletion. *Am J Med Genet Part A*. 170:2431-2435.
- Takatani, R et al., 2016. Analysis of Multiple Families With Single Individuals Affected by Pseudohypoparathyroidism Type 1b (PHP1B) Reveals Only One Novel Maternally Inherited GNAS Deletion. *J Bone Miner Res*. 31:796-805
- Garin, I et al., 2015. European guidance for the molecular diagnosis of pseudohypoparathyroidism not caused by point genetic variants at GNAS: an EQA study. *Eur J Hum Genet*. 23:438-444.
- Bakker, B et al., 2015. A girl with Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism Type 1B due to multiple imprinting defects. *J Clin Endocr Metab*. 100:3963-3966.
- Yuno, A et al., 2013. Genetic and epigenetic states of the GNAS complex in pseudohypoparathyroidism type 1b using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification assay. *Eur J Endocrinol*. 168:169-75.

- Jin, HY et al., 2011. Clinical characterization and identification of two novel mutations of the GNAS gene in patients with pseudohypoparathyroidism and pseudopseudohypoparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 75:207-13.

More information

Website : www.mlpa.com
 E-mail : info@mlpa.com (information & technical questions); order@mlpa.com (for orders)
 Mail : MRC-Holland bv; Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, the Netherlands

Methylation-specific MLPA

Please note that each MS-MLPA reaction generates two samples that need analysis by capillary electrophoresis: one undigested sample for copy number detection and one digested sample for methylation detection.

A modification of the MLPA technique, MS-MLPA allows the detection of both copy number changes and unusual methylation levels of 10-50 different sequences in one simple reaction. MLPA probes for methylation quantification are similar to normal MLPA probes, except that the sequence detected by the MS-MLPA probe contains the sequence recognized by the methylation-sensitive restriction enzyme *HhaI*. Similar to ordinary MLPA reactions, the MS-MLPA protocol starts with sample DNA denaturation and overnight hybridisation. The reaction then is split into two tubes. One tube is processed as a standard MLPA reaction. This reaction provides information on copy number changes. The other tube of the MLPA hybridisation reaction is incubated with the methylation-sensitive *HhaI* endonuclease while simultaneously, the hybridised probes are ligated. Hybrids of (unmethylated) probe oligonucleotides and unmethylated sample DNA are digested by the *HhaI* enzyme. Digested probes will not be exponentially amplified by PCR and hence will not generate a signal when analysed by capillary electrophoresis. In contrast, if the sample DNA is methylated, the hemi-methylated probe-sample DNA hybrids are prevented from being digested by *HhaI* and the ligated probes will generate a signal.

The MS-MLPA technique should always be internally validated before use in your laboratory. Results of MS-MLPA are highly dependent on the *HhaI* enzyme used. *HhaI* enzymes that are resistant to heat inactivation are NOT compatible with the MS-MLPA technique and will give aberrant results. These include, but may not be limited to, Thermo Fisher Scientific enzymes *HhaI*, ANZA 59 *HhaI*, and FastDigest *HhaI*. We recommend using Promega's *HhaI* enzyme (R6441) as this is the only restriction enzyme that has been validated for use with MS-MLPA by MRC-Holland.

Additionally, the results of methylation-specific MLPA probes tested on chorionic villi samples (CVS) might not reflect the actual epigenetic constitution of the foetus. This is because the locus of interest might not have reached its final imprinting status in CVS (Paganini et al., 2015). Furthermore, Paganini et al. demonstrated that the rate at which the imprinting is set may differ between and even within loci. Consequently, the use of this product on CVS samples should involve examining and validating the methylation status of each individual MS-MLPA probe.

More information about MS-MLPA can be found in the MS-MLPA protocol.

Please note that this product can not be used with an alternative protocol in which the genomic DNA is first digested with *HhaI*, followed by MLPA reactions on both digested and undigested genomic DNA.

Digestion control probes

The target sequences of the digestion control probes are unmethylated in most blood-derived DNA samples. The signals of the digestion control probes should be gone upon complete digestion by *HhaI*.

Data analysis

The ME031-B2 GNAS probemix contains 45 MLPA probes with amplification products between 126 and 500 nt. In addition, it contains 9 control fragments generating an amplification product smaller than 120 nt: four DNA Quantity fragments (Q-fragments) at 64-70-76-82 nt, three DNA Denaturation control fragments (D-fragments) at 88-92-96 nt, one X-fragment at 100 nt and one Y-fragment at 105 nt. More information on how to interpret observations on these control fragments can be found in the MLPA protocol.

The analysis of MS-MLPA probemixes consists of two parts: 1) determining copy numbers by comparing different undigested samples (all MLPA probemixes), and 2) determining methylation patterns by comparing each undigested sample to its digested counterpart (MS-MLPA probemixes only). The second part is unique for MS-MLPA probemixes and serves to semi-quantify the percentage of methylation within a given sample.

1) Copy number analysis

Intra-sample data normalisation (all samples)

For analysis of MLPA results, not the absolute fluorescence values but "intra-normalised" data are used (relative peak heights). The data generated in the digested and undigested sample should first be normalised intra-sample by dividing the signal of each probe by the signal of every reference probe in that sample, thus creating as many ratios per probe as there are reference probes. Subsequently, the median of all these produced ratios per probe should be taken; this is the probe's Normalisation Constant. This Normalisation Constant can then be used for sample to reference sample comparison, both for copy number and digestion determination.

Inter-sample normalisation (comparison with reference samples)

The final probe ratio, or ploidy status, of each probe in each sample is calculated by dividing a) the Normalisation Constant of each probe obtained on the undigested test sample by b) the average Normalisation Constant of that probe obtained on the undigested reference samples.

2) Methylation analysis (comparing digested and undigested samples)

The methylation status of each MS-MLPA probe* in each sample is calculated by dividing a) the Normalization Constant of each probe obtained on the digested test sample by b) the Normalization Constant of each MS-MLPA probe obtained on the corresponding undigested sample. Multiplying this value by 100 gives an estimation of the percentage of methylation. Aberrant methylation can then be identified by comparing the methylation status of one or more MS-MLPA probes in the sample in question to that obtained on reference samples.

***Notes:**

- Most MS-MLPA probes target a single *HhaI* site in a CpG island; if methylation is absent for a particular CpG-site, this does not necessarily mean that the whole CpG island is unmethylated!
- Rare cases are known in which an apparent methylation of a methylation sensitive probes proved to be due to a sequence change in, or very nearby an *HhaI* site.
- With this probemix no discrimination between uniparental disomy and imprinting defects can be made. For this, it is necessary to perform microsatellite analysis in the patient and parents.

Data normalisation should be performed within one experiment. Only samples purified by the same method should be compared. Confirmation of most exons deletions and amplifications can be done by e.g. Southern blotting, long range PCR, qPCR, FISH.

Note that Coffalyser, the MLPA analysis tool developed at MRC-Holland, can be downloaded free of charge from our website www.mlpa.com.

This probemix was developed at MRC-Holland.

Info/remarks/suggestions for improvement: info@mlpa.com.

Table 1. SALSA MS-MLPA ME031-B2 GNAS probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	HhaI site	% methylated in normal blood-derived DNA	% expected signal reduction	Chromosomal position	
					reference	GNAS region
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA					
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation					
100	X-fragment: Specific for the X chromosome					
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome					
126 #	Digestion control probe S0750-L21493	+	0%	100%	2q12	
132	Reference probe 00797-L23139				5q31	
137	NESPAS probe 18104-L23354				Exon 4	
148 « Λ	STX16 probe 03871-L23303	+	0%	100%	Exon 1	
154	Reference probe 05751-L05189				5p12	
160	GNASXL probe 18125-L25598	+	50%	50%	Exon 1	
166	NESPAS probe 03877-L23093	+	50%	50%	Exon 1	
172	STX16 probe 03872-L03320				Exon 3	
184 « ¬	TH1L probe 04464-L03336	+	0%	100%	Exon 1	
193	Reference probe 03217-L02642				10q25	
197	NESP55 probe 04870-L23097	+	50%	50%	Exon 1	
202	Reference probe 03709-L03163				9q22	
208	Reference probe 09086-L09145				1q32	
215	GNAS probe 03886-L22604	+	100%	0%	Exon 9	
223 « Λ	GNAS probe 03884-L22605	+	0%	100%	Exon 1	
232 Ж	STX16 probe 18105-SP0610-L22532				Exon 4	
238 «	GNAS probe 06191-L23094	+	50%	50%	Upstream	
244	STX16 probe 18195-L24186				Exon 6	
250	NESPAS probe 06190-L22606	+	50%	50%	Exon 1	
264 Ж	NESP55 probe 18126-SP0007-L22614	+	50%	50%	Exon 1	
274	Reference probe 15066-L22482				4q31	
283	GNAS probe 03887-L03335	+	100%	0%	Exon 13	
292	Reference probe 15724-L17704				12q12	
300	GNASXL probe 03879-L23095	+	50%	50%	Exon 1	
307	GNAS probe 05210-L22675				Exon 4	
315	GNASXL probe 15645-L22676	+	50%	50%	Exon 1	
321 Ж	NESPAS probe 18127-SP0009-L25603	+	50%	50%	Exon 1	
330	GNAS probe 15648-L22678				Exon 11	
337	Reference probe 02664-L02131				11q22	
346	STX16 probe 03874-L03322				Exon 9	
355 « Λ	GNAS probe 03883-L23597	+	0%	100%	Exon 1	
364	NESPAS probe 18106-L22533				Exon 3	
373	GNAS probe 04465-L01523				Exon 6	
382 #	Digestion control probe 18124-L23096	+	0%	100%	3p14	
391	Reference probe 09941-L23598				8q13	
402 «	GNAS probe 03882-L22603	+	50%	50%	Upstream	
411 Ж	NESP55 probe 18194-SP0008-L21093	+	50%	50%	Exon 1	
418	STX16 probe 15646-L17515				Exon 5	
438 «	GNAS probe 06193-L22608				Exon 3	
454	GNAS probe 06194-L22769				Exon 7	
462	GNASXL probe 07523-L17516	+	50%	50%	Exon 1	
468 ¥	GNASXL probe 21010-L24075	+	50%	50%	Intron 1	
481	Reference probe 12461-L23226				22q12	
490 « Ж	GNAS probe 18168-SP0618-L22702				Exon 2	
500	Reference probe 09682-L22509				3p25	

Description version 19; 07 June 2017

¥ Changed in version B2 (from lot B2-0816 onwards). Change in length, no change in sequence detected.
 # Digestion control probe: warns for insufficient digestion. Upon complete *HhaI* digestion, this probe should not give a signal. This is either because the target sequence is unmethylated in most blood-derived DNA samples (382 nt probe) or because the probe is digested regardless of the methylation status of target sequence (126 nt probe).
 Λ *HhaI*-digestion of this probe can be considered sufficient when <10% of the signal remains in the digested reaction compared to the undigested reaction.
 « This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.
 ✕ This probe consists of three parts and has two ligation sites.
 → Flanking probe. Included to facilitate the determination of the extent of a deletion/duplication. Copy number alterations of flanking and reference probes are unlikely to be related to the condition tested.

Notes

- **The GNAS exon numbering has changed.** From description version 17 onwards, we have adopted the NCBI exon numbering that is present in the NM_ sequence for this gene. This exon numbering used here may differ from literature! The exon numbering used in previous versions of this product description can be found between brackets in Table 2.
- The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

Table 2. GNAS probes arranged according to chromosomal location

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene / exon	<i>HhaI</i> site	Genbank Ligation site	Chromosomal position	Distance to next probe
		STX16 start codon		NM_001001433.2; <i>755-757 (exon 1)</i>		
148 « Λ	03871-L23303	Exon 1	+	191-192	20q13.32	16.1 kb
172	03872-L03320	Exon 3		942-943	20q13.32	0.5 kb
232 ✕	18105-SP0610-L22532	Exon 4		1097-1098, 1124-1125	20q13.32	1.2 kb
418	15646-L17515	Exon 5		2 nt before exon 5	20q13.32	1.3 kb
244	18195-L24186	Exon 6		19 nt after exon 6	20q13.32	6.8 kb
346	03874-L03322	Exon 9		2867-2868	20q13.32	162.3 kb
		STX16 stop codon		<i>1730-1732 (exon 9)</i>		
		NESP55 start codon		NM_016592.3; <i>390-392 (exon 1)</i>		
197	04870-L23097	Exon 1	+	4 nt before exon 1	20q13.32	0.2 kb
264 ✕	18126-SP0007-L22614	Exon 1	+	180-181; 209-210	20q13.32	0.2 kb
411 ✕	18194-SP0008-L21093	Exon 1	+	402-403; 435-436	20q13.32	2.1 kb
		NESP55 stop codon		<i>1125-1127 (exon 1)</i>		
		NESPAS		NR_002785.2		
137	18104-L23354	Exon 4		571-572	20q13.32	0.3 kb
364	18106-L22533	Exon 3		507-508	20q13.32	8.4 kb
166	03877-L23093	Exon 1	+	123-122 reverse	20q13.32	0.1 kb
321 ✕	18127-SP0009-L25603	Exon 1	+	19-18, 17 nt before exon 1 reverse	20q13.32	0.1 kb
250	06190-L22606	Exon 1	+	86 nt before exon 1	20q13.32	3.2 kb
		GNASXL start codon		NM_080425.3; <i>286-288 (exon 1)</i>		
300	03879-L23095	Exon 1	+	1217-1218	20q13.32	0.1 kb
160	18125-L25598	Exon 1	+	1273-1274	20q13.32	0.8 kb
462	07523-L17516	Exon 1	+	2105-2106	20q13.32	0.1 kb
315	15645-L22676	Exon 1	+	2188-2189	20q13.32	0.8 kb
468 ¥	21010-L24075	Intron 1	+	609 nt after exon 1 reverse	20q13.32	33.1 kb
		GNASXL stop codon		<i>3397-3399 (exon 13)</i>		

Description version 19; 07 June 2017

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene / exon	HhaI site	Genbank Ligation site	Chromosomal position	Distance to next probe
		GNAS start codon		NM_001077488.3; 425-427 (exon 1)		
238 «	06191-L23094	Upstream (Exon 1A)	+	2.3 kb before exon 1; NM_001309840.1; 54 nt before exon 1	20q13.32	0.3 kb
402 «	03882-L22603	Upstream (Exon 1A)	+	2 kb before exon 1; NM_001309840.1; 210-211	20q13.32	2.4 kb
355 « Λ	03883-L23597	Exon 1	+	446-445 reverse	20q13.32	0.1 kb
223 « Λ	03884-L22605	Exon 1	+	498-499	20q13.32	3.8 kb
490 «⋈	18168-SP0618-L22702	Exon 2		619-618; 591-590 reverse	20q13.32	3.4 kb
438 «	06193-L22608	Exon 3		665-666	20q13.32	4.6 kb
307	05210-L22675	Exon 4		702-703	20q13.32	1.9 kb
373	04465-L01523	Exon 6		895-8996	20q13.32	3.7 kb
454	06194-L22769	Exon 7		9 nt before exon 7	20q13.32	0.4 kb
215	03886-L22604	Exon 9	+	1116-1117	20q13.32	0.5 kb
330	15648-L22678	Exon 11		1349-1350	20q13.32	0.7 kb
283	03887-L03335	Exon 13	+	1488-1489	20q13.32	70.6 kb
		GNAS stop codon		1610-1612 (exon 13)		
184 «↔	04464-L03336	TH1L exon 1	+	NM_198976.2; 104-105	20q13.32	20q13.32

¥ Changed in version B2 (from lot B2-0816 onwards). Change in length, no change in sequence detected.

Λ HhaI-digestion of this probe can be considered sufficient when <10% of the signal remains in the digested reaction compared to the undigested reaction.

« This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

⋈ This probe consists of three parts and has two ligation sites.

↔ Flanking probe. Included to facilitate the determination of the extent of a deletion/duplication. Copy number alterations of flanking and reference probes are unlikely to be related to the condition tested.

The NM_001001433.2 sequence for STX16, the NM_001077488.3 sequence for GNAS, and the NR_002785.2 sequence for NESPAS are reference standards in the NCBI RefSeqGene project. The other NM_ sequences for NESP55, GNASXL and TH1L are no reference standards in the RefSeqGene project.

Notes

- **The GNAS exon numbering has changed.** From description version 17 onwards, we have adopted the NCBI exon numbering that is present in the NM_ sequence for this gene. This exon numbering used here may differ from literature! The exon numbering used in previous versions of this product description can be found between brackets in Table 2.
- The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

Table 3. Sequences detected by the ME031-B2 probes

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Partial sequence with <i>HhaI</i> site
126	S0750-L21493	GTATGCTGTGGTAGGGACACTTTGGA- ATTCCATTGGCATTGGGGTGTCTTTGTTAAGTGCTGGCCAGTAGCGCTGTCCTGT
132	00797-L23139	CCTCACATTGTCACTGCAATCGACACCTAT-TAATGGGTCTCACCTCCAACCTGCTCCCCCT
137	18104-L23354	GTCGAGGAGAGCAGCCTTCCCTCCGA-AGGTGCGTTACCAGATTGCTGCCGTTTTGTGCTGGG
148	03871-L23303	CGCAGGGCCTCAGCAGGTTGAGACA-AGTCCCAAGAAGGGAGCTGCAGGGCCCTCGAGT
154	05751-L05189	TCCACTGGGATGGTTGCTTCACTTCT-TAGTACCCTACTGCAGGACTTCCACCAGATTGCTGGGT
160	18125-L25598	GCAAGGCTAATGCAGAGAGTCAACATGGACAGCCCCCAA-TCGGCTTGACGGCCGCCCATCAAGT
166	03877-L23093	CCGCTCGCAACCTGTGGCATGAGGAAGA-GTACCCCAAGCGCTAGCGGTCTCTGTGGTCTCCA
172	03872-L03320	GGCACTGGTGCAGGCATCAGCTTAGA-TCCAGAAGCAGCGATTGGTGTGACAAAACGGCCACCT
184 [§]	04464-L03336	GGCCGTGCCGGCGGCATCAT-GGACGAGGACTACTACGGGAGCGCGGCCGAGTGG
193	03217-L02642	CTCCACGATGCTCACAAGAGAGATATT-TTGACCGCATCAATGAAAATGACCAGAAATACATTAGGGAGAG
197	04870-L23097	CACGGCAGAAGTCCGGGCGCAACT-TCGCAGAACCTCACTGCCCGTCCCTCCTCGC
202	03709-L03163	CTGATGACGGTGCAGCTGTTCCGGCATG-ATGGGCTCATCGGAATCAAGCTCAGTCCGCTGC
208	09086-L09145	GAGCAAAGGCACCAAGATGTGACACTA-CTGGACTGCCAAGCTATTCAAGTGTGGCAGAGTAGGGC
215	03886-L22604	GTTTGACGTGGGTGGCCAGCGGATGA-ACGCCCAAGTGGATCCAGTGTCTCAACGGTAGGATGC
223	03884-L22605	GAGGAGAAGGCGCAGCTGAGGCCAACAAAAA-GATCGAGAAGCAGCTGCAGAAAGCAACGAGGTCTAC
232	18105-SP0610-L22532	CGCATTTAAACAGACCCACCTGGATGACA-GCAGCGAAGAGGAACATGCCATTGAGA-TAACTACCAAGAGATCACTCAGGTGAGGATGCAAGTGAAGTCTG
238	06191-L23094	CCAGTGGCTCCCGGTGGCCGATTTT-TCGGCTTCCCTTCGGTTATAGGGGCCGCTGC
244	18195-L24186	CCATTTACCATCGGGTACGTGAACGGGCTGCAA- AGCTGATTGCTGTGCTGTGCACCCCACTTGCATCTTCCACCTCTAGACCTCGA
250	06190-L22606	CTCCGACCCCAAGCGCGGGTCAAGCA-TTGGGCAAGGGTCAATGCAATCAAGGCTGCC
264	18126-SP0007-L22614	CATCCCTTCTTCTGTCTCAGAGAGCA-AGCAAGCGCGGAGCTTAGAAAATTCTT- AAGTGGTCAGGAAGGTAGGTGCTTCCCTTTT
274	15066-L22482	CACTGCATAGTGGGGATGGCTCGCAACGTCTTCTATTCTGGAA- AAAGAAGTTATGTGAAGATACTTACCCTGAAGGAGAAATTTTCAAGGAGCC
283	03887-L03335	GAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGA-TGGGCGTCACTACTGCTACCCCTATTCACTCGCTGTG
292	15724-L17704	GAGTCCAGAATTACACAGCTTGTAGTGATC-AGGCCAACATGTTCTTCCAGCAGAGTATGTGGTA
300	03879-L23095	CGATCTCCGGACCCCGTTCGAGAT-TGGCAGCGCCCGCTGGGGTGCAGCACTCCC
307	05210-L22675	CCTTTCTTTTCAATCCCACTGCAAGTGAAGCAACAAAGT- GCAGGACATCAAAAACAACTGAAAGAGCGATTGAAGTACGT
315 [§]	15645-L22676	CCTCCCAAGCCAAAGCCTCGCGTCTCTCA-AGGTCAAGAAGGTACCCCTGGCGGAGAAGCGAGA
321	18127-SP0009-L25603	CCTCGACTGTTGACACCCAGCAGCACCTTTCGGGCGT- TCCAACCGCGCGCCCTATTGGACTCCCAACCCATA-TCCGGTTTCCGGTCTGACGCCCCCTCGCTCAT
330	15648-L22678	CCTGTGAGAAAGTCTTGTCTGGGAAATCGAAGA-TTGAGGACTACTTCCAGAATTTGCTCGCTACTACTCC
337	02664-L02131	CAGAGTCAGAGCACTTTTCCGATGC-TGTTGGATAAAAAATCACAAGAACAATGCTTGTGTTGTGGACTA
346	03874-L03322	GGACTGGGGCATCTTACTAGGA-AGCTCCTGTTTGTGTGAGCGTGGTGCAGACCCG
355	03883-L23597	CCTCGTTGCGCTGGTCTCGGTCTT-ACTGTTCCGAGGCAGCCATGGCGCGCGCGGG
364	18106-L22533	CGACGCCCTTCTACGGAATAGGTCTT-GGAAGGAAGACCATTAAGGATTTTCTTCTATCATCTTTTCTT
373	04465-L01523	CATGCCAAGCTCTGTGGGAGGAT-GAAGGAGTGCCTGCCTACGAACGCTCAACAGTACCAGC
382	18124-L23096	CCAGGGCGCGGGTCTGGGTTTCCACGC-GCGTCAGGTCACTACCCCGGAGCCAGTGGG
391	09941-L23598	CCTGAGACAAGGATTGGCATTCACTCAAAAT-CTATCGTTTTTCTTGTCTGATGGCACTTGTGGCTG
402 [§]	03882-L22603	CCGGCCGCAAGCGCTGCCTTGCCTGT-GAGTGCACCTCACTACATGTAAGTCGGGAGCGC
411	18194-SP0008-L21093	CCTTCTCGGTGTGTGCTAAGAGGATGGATCGGAGGT-CCCGGCTCAGCAGTGGCGCGAGCTCGCCATA- ATTACAACGACCTGTGCCGCCATAGGCCCGCG
418	15646-L17515	CCTTGCCTGAGCCTCGGCTTGTCTCTT-AGCTTCCACAGGTGCCAGCTGCCGT
427	15730-L17710	CCTGCCCCCTCCATGAACCTGTCGA-ACTTCTGGCTGAGGAAGAACATCAGCATCCACCAAGCCAT
438	06193-L22608	CGCGAAGAGGACCCGCAAGCTGCAA-GGAGCAACAGCGATGGGTAGGCACATTCAAAACC
454	06194-L22769	CCTGTGAACACCCACGTGCTTTCTTTT-TTCTCCAGCTTCTGGACAAGATCGACGTGATC
462	07523-L17516	CCGCCGAAAGCCCAAGCGCAACTT-ACTCCGCAACTTCTCGTGCAGCCCTCGGG
468	21010-L24075	CCAGTCGACGTACCACAGAGTGTGCGAACAGCGAAAGTTT- TTTGCCCGGCATGGCGAAACCAACAACAGCCTGA
481	12461-L23226	CCTTCCATAACTTACACCATCTCCAGTGT-AAGAACTCAGGCTTCTCTTTGCTCTTCTTTCAGAGAG
490	18168-SP0618-L22702	CAATTCCTCCGACAGATTTGACACTTACTCTCCATTAACCCATTA-ACATGCAGGATCCTCATCTGCTTCAAA- TGGTGTCTTACCAGATTTCCAGCACCTAGAAAATGAAAGTAAAGTCTCAGGT
500	09682-L22509	CCTGCATTAAGACTACCTGATCGAGATCCAGTGCATCAGCCACA- TCTACTCACTGTCATCCGACCTTCTGCAACCCACTCTTC

The *HhaI* sites are marked with grey. Ligation sites are marked with -.

[§] Please note that the 184 nt, 315 nt & 402 nt probes contain two *HhaI* sites.

SALSA MS-MLPA probemix ME031-B2 GNAS sample pictures

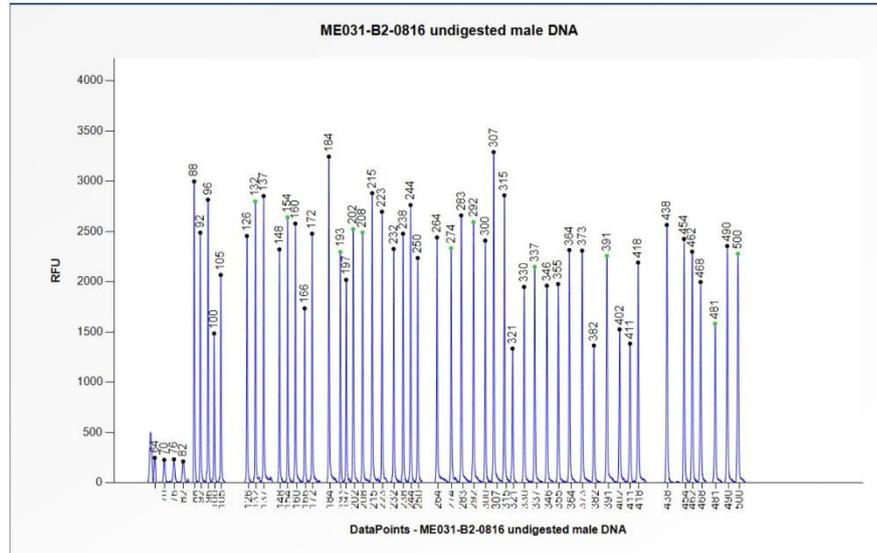


Figure 2. Capillary electrophoresis pattern of a sample of approximately 50 ng undigested human male control DNA analysed with SALSA MLPA probemix ME031-B2 GNAS (lot B2-0816) for the quantification of copy numbers.

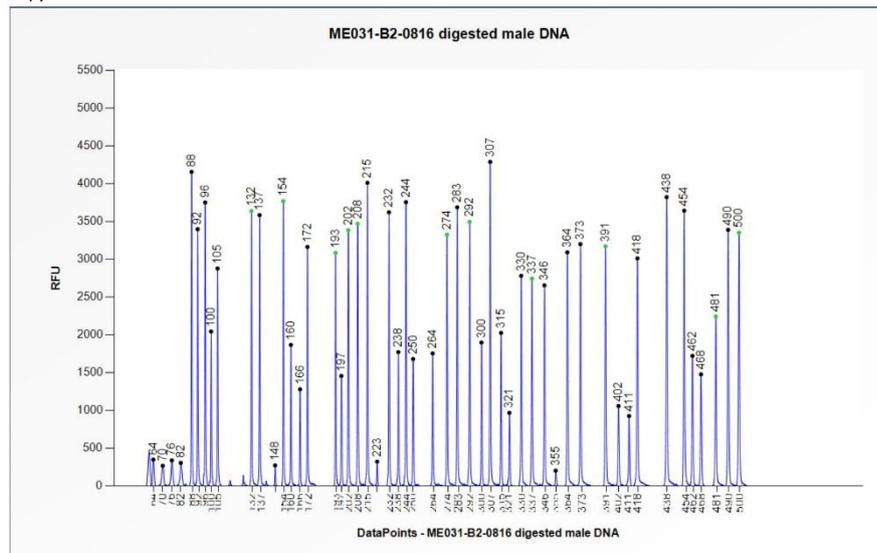


Figure 3. Capillary electrophoresis pattern of a sample of approximately 50 ng digested human male control DNA analysed with SALSA MLPA probemix ME031-B2 GNAS (lot B2-0816) to determine the methylation status.

Implemented Changes – the following has been altered compared to the previous product description version(s).
Version 19 – 07 June 2017 (16)

- Notification regarding the methylation status of CVS samples added under the Methylation-specific MLPA section on page 3.
- Adapted Figure 1 inserted.
- Double information about HhaI enzymes removed on page 3.

Version 18 – 05 December 2016 (15)

- Warning regarding HhaI enzymes that are resistant to heat inactivation added under Methylation-specific MLPA section.

Version 17 – 17 November 2016 (14)

- Product description adapted to a new product version (version number changed, lot number added, small changes in Table 1 and Table 2, new pictures included).
- New references added on page 2.
- Exon numbering of the GNAS gene has been changed in Table 1 and Table 2.
- Ligation sites of the probes targeting NESP55 and GNAS updated according to new versions of the NM_reference sequences.
- Small changes of probe lengths in Table 1 and 2 in order to better reflect the true lengths of the amplification products.

Version 16 – 29 May 2015 (13)

- Exon numbering for the 469 nt probe corrected in Table 1 and Table 2: correct location of probe is intron 1, or 609 nt after exon 1 reverse; Exon numbering for the 238 nt and 401 nt probes corrected from 1 to 1A in Table 1 and Table 2; Direction of 490 nt probe corrected to 'reverse' in Table 2.
- Updated information on page 1.
- Reference added on page 2.
- Information on digestion control probes added on page 3.
- Adjusted text on data analysis on page 3 and 4.
- Minor textual and layout changes.

Version 15 (11)

- Error in table 1: exon numbering of 232 nt STX16 probe 18105-SP0610-L22532, 364 nt NESPAS probe 18106-L22533 and 223 nt and 490 nt GNAS probes 03884-L22605 and 18168-SP0618-L22702 resp. changed.

Version 14 (11)

- Error in Table 2 corrected for 469nt probe. Correct location of probe is 609 nt after exon 2 reverse (instead of after exon 1 reverse).
- Minor textual changes.

Version 13 (10)

- Product description adapted to a new product version: version number changed, lot number added, changes in Table 1 and Table 2, new electropherogram pictures included. The electropherogram pictures generated with the 'old' MLPA buffer are omitted.
- Removed the paragraph about digestion control probes on page 3.
- Changed term relative peak area into relative peak height.
- Changed name of NESP gene into NESP55.
- Change in text on page 1: *MRC-Holland can only provide limited support with interpretation of results obtained with this product, and recommends thoroughly screening any available literature.*
- More elaborate description of GNAS locus and associated disorders on page 1.
- New references added on page 1.
- Changed exon numbering in Table 1 and Table 2.
- Changed information in Table 1 and Table 2 for the probes that show a change in length, but no change in sequence detected and the digestion control probes.
- Added information in Table 1 and Table 2 about the probes located within or close to a CpG island and about the TH1L flanking probe.
- NM-sequence and ligation site of 184 nt TH1L probe updated in Table 1 and Table 2.
- Corrected % methylated in normal blood-derived DNA and % expected signal reduction in Table 1 for 315 nt GNASXL probe 15645-L22676, 321 nt NESPAS probe 18127-SP0009-L25603, 401 nt GNAS probe 03882-L22603 and 411 nt NESP55 probe 18194-SP0008-L21093.
- Correction for 215 nt and 283 nt GNAS probes 03886-L22604 and 03887-L03335, respectively: *HhaI* site indicated in Table 1 and Table 2; % methylated in normal blood-derived DNA and % expected signal reduction added in Table 1.
- Changed information about reference standards in the NCBI RefSeqGene project on page 6.

Version 12 (06)

- Electropherogram pictures using the new MLPA buffer (introduced in December 2012) added.

Version 11 (06)

- Spelling mistake in gene name corrected on page 1.