

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO GENE *GNAS* EM PACIENTES COM
FENÓTIPO PRADER-WILLI *LIKE* E UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE
FENÓTIPO PRADER-WILLI *LIKE***

INGRID CAMILA POSSA PARANHOS

**Rio de Janeiro
2020**

Ingrid Camila Possa Paranhos

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO *GNAS* EM PACIENTES COM FENÓTIPO
PRADER-WILLI *LIKE* E UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE FENÓTIPO
PRADER-WILLI *LIKE***

Dissertação a ser apresentada a curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

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

Co-orientadora: Dr^a Catielly Ferreira Rocha

Rio de Janeiro

2020

Ingrid Camila Possa Paranhos

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO *GNAS* EM PACIENTES COM FENÓTIPO
PRADER-WILLI *LIKE* E UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE FENÓTIPO
PRADER-WILLI *LIKE***

Profª Drª Carmen Lucia Antão Paiva

Orientadora

Profª Drª Kênia Balbi El-Jaick

Profª Drª Joelma Freire de Mesquita

Prof Dr Carlos Fernando de Araujo Lima de Oliveira

Drª Fabrícia Lima Fontes-Dantas (Suplente interno)

Profª Drª Taissa de Matos Kasahara (Suplente externo)

Rio de Janeiro

2020

Dedico a todos os graduandos, pós-graduandos e cientistas do nosso país.

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo, à minha mãe (Ednéa), avó (Luzia) e ao meu padrasto (Edgard). Se hoje tenho a oportunidade de estar onde estou é graças a vocês e a todos os sacrifícios e à importância que deram e dão para a minha educação. Também agradeço à minha tia (Lú), pelas melhores comidas e que me salvaram por muitas vezes durante meus anos morando sozinha. Também aos meus primos, Jéssica, Fernando e Caroline por compartilharmos juntos nossas vidas na universidade e agora ano mestrado, sendo meus irmãos de coração e agradeço aos meus tios por todo apoio.

Agradeço a amizade e compreensão da Isabella, que por mais que as nossas vidas acadêmicas nos impedissem de nos encontrarmos com frequência, sempre que estávamos juntas era uma saída da minha rotina e me mostrando as minhas raízes e origens. Ao Cameron por ter tido paciência e me escutado falar tanto sobre meu estresse e preocupações durante toda essa caminhada. Minhas amizades que começaram graças à biomedicina da Barbara, Lana e Taissa e pelos amigos que o mestrado me deu, Marcos e Ana. Todos vocês fizeram essa experiência ser ainda mais incrível, com todo apoio, risadas e trocas de experiências.

Serei eternamente grata pela oportunidade e experiência dada pelas minhas orientadoras, Prof^a Dr^a Carmen Paiva e co-orientadora, Dr^a Catielly Rocha. Não tenho palavras para descrever a diferença feita por todo o apoio de vocês nesta importante etapa da minha vida, obrigada por acreditarem em mim. Especialmente a Professora Carmen, por não medir esforços para eu conseguir começar e terminar o mestrado, mesmo com todas as dificuldades, e me apoiar por todos estes anos. Agradeço à Prof^a Dr^a Kênia El-Jaick, por todo o apoio, ajuda e orientação e à Dr^a Suely Rodrigues. Eu tive muita sorte de ter sido rodeada e orientada por tantas cientistas e mulheres incríveis, sem a ajuda de todas vocês, este trabalho não existiria.

Por fim, agradeço à UNIRIO, ao PPGBMC e à CAPES pelo auxílio e suporte financeiro do estudo.

*"Science and everyday life cannot
and should not be separated."
(Rosalind Franklin)*

RESUMO

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) é considerada a mais frequente causa de obesidade sindrômica e ocorre devido a mutações que levam à inibição da expressão de genes da região 15q11-q13 de origem paterna. Porém, existe uma gama de indivíduos obesos com deficiência mental e outras características fenotípicas bastante semelhantes à SPW, que não apresentam as alterações genéticas na região 15q11-q13, conhecidos como portadores de fenótipo Prader-Willi *like* (PWL).

Os objetivos deste estudo foram: (1) investigar no gene *GNAS*, em amostras de DNA de pacientes obesos sindrômicos, com fenótipo PWL, acompanhados no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário Gaffrée Guinle; (2) realizar revisão sistemática da literatura sobre fenótipo Prader-Willi *like* e mutações associadas a este. A revisão foi elaborada seguindo-se o protocolo PRISMA.

Foram investigados 35 pacientes entre os quais dois revelaram alterações no número de cópias de éxons do *GNAS*, por meio da técnica de MS-MLPA utilizando-se o kit ME031. O primeiro foi o paciente 95, do sexo feminino, com 8 anos de idade, que apresentou uma aparente deleção do éxon 7 e a paciente 101, do sexo feminino, com 27 anos, que apresentou deleção dos éxons 1A e 1. O *GNAS* é importante para o sistema melanocortina-leptina, que tem relação com a sensação de saciedade e, conseqüentemente, obesidade. Essa relação leva à sugestão de que os sintomas e os sinais clínicos apresentados foram conseqüência das mutações encontradas.

Quanto à revisão sistemática, dos 23 artigos encontrados, foram descritos 56 casos de pacientes com fenótipo PWL com mutações em 1p36, 1p31.1, 2p25, 3p26.3, 6q, 8q, 10p11.21p11.1 e no cromossomo X, além de translocações. Dentre as características do fenótipo PWL descritas, com maior frequência, foi encontrado o atraso no desenvolvimento intelectual, presente em 78% dos casos seguido de obesidade.

Os relatos da revisão sistemática mostram a importância de se fazer diagnóstico genético de pacientes obesos sindrômicos, o que embasa a identificação de alterações no *GNAS* encontradas neste estudo como mais uma importante informação para o entendimento das intrincadas vias metabólicas, que determinam obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual.

Palavras chave: fenótipo Prader-Willi like; GNAS; fenótipo Prader-Willi

ABSTRACT

The Prader-Willi Syndrome (PWS) is considered the most frequent cause of syndromic obesity and it is caused by mutations which inhibit the expression of genes located on segment 15q11-q13 in the paternal chromosome. However, there are many individuals with obesity, mental delay and other characteristics similar to PWS who do not have mutations in the 15q11-q13 region, therefore, presenting with Prader-Willi like phenotype (PWL).

The objectives of this study were: (1) to investigate *GNAS* gene in patients with PWL phenotype who attended the University Hospital (HUGG/UNIRIO) Outpatient Genetic Clinic; and (2) to conduct a systematic review of the literature on PWL phenotype and associated mutations. The review was built according to the PRISMA protocol.

We investigated 35 patients by the means of Methylation Specific Multiplex Ligation Probe Amplification (MS-MLPA) kit ME031, which led to the identification of two alterations in the copy numbers of *GNAS* exons: an apparent deletion of the exon 7 in patient 95 (female, 8-years-old), and a deletion of the exons 1A and 1 in patient 101 (female, 27--years-old). It is important to mention that *GNAS* has a role in the melanocortin-leptin system, related to satiety and, consequently, obesity. This led to the suggestion that the clinical symptoms and signs present in the patients are consequence of copy number variants (deletions) of some regions in *GNAS*.

Concerning the systematic review, from the 23 papers found, 56 patient cases were described with PWL phenotype, with mutations in 1p36, 1p31.1, 2p25, 3p26.3, 6q, 8q, 10p11.21p11.1 and X chromosome, as well as translocations. Among the PWL phenotypic characteristics described, the most frequent one was intellectual developmental delay in 78% of the cases, followed by obesity, present in 75% of the patients.

The results of this systematic review and the importance of having the syndromic obese patients' correct diagnose point towards the importance of identifying *GNAS* mutations, as performed in this study, which is another important information for understanding the metabolic pathways which cause obesity and mental delay.

Keywords: Prader-Willi like; GNAS; Prader-Willi phenotype

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema das alterações genéticas no *locus* 15q11-q13 que resultam na Síndrome de Prader-Willi, representando o cromossomo de origem paterna em azul, o de origem materna em rosa e o quadrado preto representando a metilação da região. Fonte: Acervo da autora. 18
- Figura 2: Região 15q11-q13 e seus genes. A região da SPW em azul, os genes relacionados com a SA em laranja e o centro de *imprinting* (IC) em laranja e azul. Os genes em verde não sofrem *imprinting* e são expressos bialelicamente. As 5 linhas verticais tortuosas nomeadas BP1, BP2, BP3, BP4, BP5 são os pontos de quebra, sendo o BP1, BP2 e BP3 os locais de quebras mais comuns em casos de SPW e SA, produzindo deleções que variam de 5 até 6Mb. Já as quebras em BP4 e BP5 são mais raras de acontecer. T1D e T2D são as deleções de tipo 1 e tipo 2, respectivamente. Fonte: Adaptado de Cassidy e colaboradores (2012) 20
- Figura 3: Esquema dos éxons do *GNAS*, seus promotores, padrões de metilação e os RNAm transcritos. As setas representam os promotores de transcrição em estado ativo. Os éxons em vermelho são os que se encontram metilados. A seta roxa indica que o éxon é expresso na maioria das vezes bialelicamente, porém em alguns tecidos o mesmo encontra-se metilado. Fonte: Acervo da autora, baseado em Weinstein e colaboradores (2010) 27
- Figura 4: Proteína G em sua forma inativa. (A) Esquema ilustrativo da proteína na forma trimérica com as subunidades α , β e γ . (B) Estrutura tridimensional, também indicando as mesmas subunidades e sítio de ligação à GDP. Fonte: Alberts et al. (2017)..... 29
- Figura 5: Esquema da ativação da proteína G a partir do GPCR. Fonte: Alberts et al. (2017)..... 30
- Figura 6: Esquema do sistema melanocortina-leptina e a sua sinalização hipotalâmica. MC4R: receptor de melanocortina 4; ARC: núcleo arqueado do hipotálamo; POMC: pró-opiomelanocortina; NPY: neuropeptídeos Y; AgRP: neuropeptídeos orexígenos relacionados com o agouti; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; α -MSH: hormônio estimulador de melanócitos-alfa. Fonte: Adaptado de Ranadive e Vaisse, (2008)..... 34

Figura 7: Fluxograma do desenvolvimento do estudo com as etapas para diagnóstico dos pacientes com SPW e fenótipo PWL para aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.	37
Figura 8: Ilustração da técnica de MLPA e suas etapas. Adaptado de: MRC-HOLLAND (2019).....	38
Figura 9: Ilustração dos dois tipos de análise para detecção de variação do número de cópias (esquerda) e padrão de metilação (direita), por MLPA e MS-MLPA, respectivamente. Adaptado de MRC-HOLLAND (2019)	41
Figura 10: Resultados, obtidos após a MS-MLPA seguida de eletroforese capilar, gerados pelo <i>software</i> Coffalyser.NET ilustrando a aparente deleção do éxon 7 do <i>GNAS</i> , indicada pela seta amarela (Apêndice A). (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação.	46
Figura 11: Eletroferograma gerado pelo <i>software</i> Coffalyser.NET do paciente 95, padrão que auxilia na verificação da qualidade da amostra e da eletroforese capilar (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação. Seta preta: pico 92 para comparação, setas roxas: picos 64, 76 e 82 para análise da ligação, setas azuis: picos 88 e 96 para análise da desnaturação e setas verdes: picos dos cromossomos sexuais	47
Figura 12: Resultados, obtidos após a MS-MLPA seguida de eletroforese capilar, gerados pelo <i>software</i> Coffalyser.NET ilustrando a deleção dos éxons 1A e 1 do <i>GNAS</i> , indicada pela seta amarela (Apêndice B) e padrão de metilação normal. (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação.	50
Figura 13: Eletroferograma gerado pelo <i>software</i> Coffalyser.NET do paciente 101, padrão que auxilia na verificação da qualidade da amostra e da eletroforese capilar (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação. Seta preta: pico 92 para comparação, setas roxas: picos 64, 76 e 82 para análise da ligação, setas azuis: picos 88 e 96 para análise da desnaturação e setas verdes: picos dos cromossomos sexuais	51
Figura 14: Diagrama do PRISMA apresentando a metodologia de seleção dos artigos. Fonte: na imagem	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Possíveis causas da SPW, suas frequências relativas ao número de afetados e risco de recorrências na família.	19
Quadro 2: Fases nutricionais da SPW e suas características clínicas.	22
Quadro 3: Algumas das técnicas para teste genético da Síndrome de Prader-Willi.	25
Quadro 4: Doenças relacionadas com mutações no <i>GNAS</i> , suas causas e fenótipos.	32
Quadro 5: Programa de desnaturação do DNA.....	39
Quadro 6: Programa de hibridação do DNA.....	39
Quadro 7: Programa para ligação	39
Quadro 8: Programa de PCR	40
Quadro 9: Éxons investigados pelo kit SALSA MLPA probemix ME031 <i>GNAS</i>	43
Quadro 10: Bases de dados e os termos utilizados de busca em cada.	63
Quadro 11: Resumo dos resultados dos artigos selecionados, as mutações envolvidas, as características do fenótipo PWL e métodos de investigação celular.	67
Quadro 12: Mutações descritas nos artigos selecionados.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características fenotípicas segundo Holm e colaboradores (1993) dos 35 pacientes investigados pelo kit MS-MLPA ME031-B2.....	44
Tabela 2: Características clínicas da SPW encontradas nos pacientes 95 e 101 que apresentaram alterações em GNAS, segundo os critérios de Holm e colaboradores (1993).....	45
Tabela 3: Comparação entre o paciente estudado com outros encontrados na literatura que apresentam mutações no gene <i>GNAS</i> , utilizando-se os critérios para o diagnóstico clínico proposto por Holm e colaboradores (1993) adaptado	48
Tabela 4: Resultado da aplicação dos critérios sugeridos por Gunay-Aygun e colaboradores (2001), para solicitação do exame molecular para diagnóstico da SPW, destacada em negrito as características presentes no paciente 95	49
Tabela 5: Comparação entre o paciente estudado com outros encontrados na literatura que apresentam mutações no gene <i>GNAS</i> , utilizando-se os critérios para o diagnóstico clínico, propostos por Holm e colaboradores (1993) adaptado.	52
Tabela 6: Resultado da aplicação dos critérios sugeridos por Gunay-Aygun e colaboradores (2001), para solicitação do exame molecular para diagnóstico da SPW, destacada em negrito as características presentes no paciente 101.	53
Tabela 7: Frequência relativa, em porcentagem, das características presentes em pacientes deste estudo (n=35) que apresentaram as características da SPW. Destacadas estão as características mais prevalentes.....	54

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A: Resultado gerado pelo Coffalyser.NET do paciente 95.....	101
Apêndice B: Resultado gerado pelo Coffalyser.NET do paciente 101.....	102

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Cadastrado plataforma Brasil.....	103
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	105
Anexo C: Ficha do paciente do Ambulatório de Genética	109
Anexo D: Ficha com os critérios de Holm (1993) e Gunay-Aygun e colaboradores (2001).....	110
Anexo E: Descrição do kit SALSA MLPA probemix ME031-B2.....	112
Anexo F: Síndromes detectadas pelo kit de MLPA P064	122
Anexo G: Regiões investigadas pelo kit de MS-MLPA ME032.....	123
Anexo H: Regiões investigadas pelo kit de MLPA P147	124
Anexo I: Regiões investigadas pelo kit de MLPA P220	125
Anexo J: Regiões investigadas pelo kit de MLPA P224	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: grau Celsius

µL: microlitro

ACP1: fosfatase ácida 1

a-CGH: do inglês “array-Comparative Genomic Hybridization”

AgRP: neuropeptídeos orexígenos relacionados com o agouti

AHO: osteodistrofia hereditária de Albright

AMP: adenosina monofosfato

AMPc: AMP cíclico

ARC: núcleo arqueado do hipotálamo

ATP10A: ATPase transportadora de fosfolípido 10A

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BLAST: do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”

BMIQ3: índice de massa corporal QTL 3

BP: do inglês “break-point”

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CHL1: molécula de adesão celular-*like*

CHSY1: condroitina sulfato-sintase 1

CI: centro de imprinting

CMA: microarray cromossomal

CNTN6: contactina 6

CTDP1: subunidade CTD fosfatase 1

CYF1P: Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1

DGCR8: subunidade do complexo microprocessador 8

DI: defeito no imprinting

DIO3: iodotironina deiodinase 3

DMRT1: do inglês “Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1”

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DUPm: dissomia uniparental materna

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ENPP1: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1

EUA: Estados Unidos da América

FISH: Hibridação in situ com Fluorescência
FMR1: do inglês "Fragile X Mental Retardation"
FSH: hormônio folículo estimulante
GABA: ácido gama-aminobutírico
GDP: guanosina difosfato
GHRH: hormônio liberador de hormônio do crescimento
GNAS: proteína de ligação do nucleotídeo guanina alfa estimuladora
GPCR: receptor acoplado à proteína G
G α : subunidade alfa da proteína G estimuladora
GTP: guanosina trifosfato
HDAC4: histona desacetilase 4
HUGG: Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
IGFR1: fator de crescimento semelhante à insulina 1
IKK- β : fator de transcrição nuclear κ B
IMC: Índice de Massa Corporal
INCA: Instituto Nacional do Câncer
ISCN: do inglês "System for Human Cytogenomic Nomenclature"
KCTD13: domínio de tetramerização do canal de potássio
LEP: Leptina
LEPR: Receptor da Leptina
LH: hormônio luteinizante
lncRNA: RNA longo não codificante
MAGEL2: do inglês "melanoma antigen family L2"
MC4R: Receptor de Melanocortina-4
MCHR2: receptor do hormônio concentrador de melanina
MECP2: proteína ligadora de metil-CpG 2
MEF2A: fator de aumento do miócito
MEG: gene maternalmente expresso
MKRN3: do inglês "Makorin Ring Finger Protein 3"
MLPA: do inglês "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification"
MRAP2: gene parálogo à proteína acessória do receptor de melanocortina 2
MS-MLPA: do inglês "methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification"

MYT1L: fator de transcrição semelhante ao de mielina 1
NESP55: proteína neuroendócrina específica de 55kDa
NF-κB: fator nuclear kappa-B
ng: nanograma
NIBP: proteína ligadora de NIK e IKK-β
NIK: quinase indutora de NF-κB
NIPA: do inglês “Non-Imprinted In Prader-Willi”
NPY: neuropeptídeo Y
NTRK2: Receptor Neurotrófico de tirosina quinase do tipo 2
OCA2: albinismo oculocutâneo tipo 2
p: braço curto do cromossomo
PCR: reação em cadeia da polimerase
PCR-ME: reação em cadeia da polimerase metilação-específica
PHP-1A: pseudohipoparatiroidismo tipo-1A
PHP-1B: pseudohipoparatiroidismo tipo-1B
POMC: pró-opiomelanocortina
PPARG: Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma gama
PPHP: pseudo-pseudohipoparatiroidismo
PRISMA: do inglês “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses”
PROSPERO: do inglês “International prospective register of systematic reviews”
PTH: paratormônio
PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo
PWL: Prader-Willi-*like*
q: braço longo do cromossomo
RNA: ácido ribonucleico
RTL1: do inglês “retransposon gag like 1”
SH2B1: SH2B proteína adaptadora 1
SIM1: homólogo I do gene minded de Drosófila
snoRNAs: do inglês “small nucleolar RNAs”
SNRPN: pequena ribonucleoproteína nuclear polipeptídeo N
SNTG2: sintrofina gama 2
SNURF: do inglês “SNRPN Upstream Reading Frame”

SPW: Síndrome de Prader-Willi

SXF: Síndrome do X-Frágil

TACC3-4: do inglês "Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 3"

TANGO2: homólogo 2 do transporte e organização do complexo de Golgi

TM2D3: domínio 3 contendo TM2

TMEM18: proteína transmembrana 18

TNF α : fator de necrose tumoral

TRAPPC9: partícula da proteína de tráfego do complexo 9

TSH: hormônio estimulador da tireoide

UBE3A: ubiquitina ligase E3A

WGS: Sequenciamento completo do genoma, do inglês "Whole Genome Sequencing"

WHO: Organização Mundial da Saúde, do inglês "World Health Organization"

XLas: subunidade alfa extragrande

α -MSH: hormônio estimulador de melanócitos-alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Síndrome de Prader-Willi.....	18
1.1.1 Genética	18
1.1.2 Manifestações clínicas.....	20
1.1.3 Diagnóstico da SPW.....	23
1.2 Fenótipo Prader-Willi <i>like</i>	25
1.3 <i>GNAS</i>	26
1.3.1 Sobre o Gene	26
1.3.2 Proteína G e a sinalização celular	28
1.3.3 Doenças associadas com mutações no gene <i>GNAS</i>	30
1.3.4 <i>GNAS</i> e seu papel na obesidade.....	32
CAPÍTULO I - Investigação molecular do gene <i>GNAS</i> em pacientes com fenótipo Prader-Willi <i>like</i>	35
2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO I	35
2.1 Objetivos gerais.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3. METODOLOGIA	36
3.1 Pacientes.....	36
3.2 Extração de DNA.....	37
3.3 MLPA – análise do número de cópias	37
3.4 MS-MLPA – Análise do perfil de metilação.....	40
4. RESULTADOS	43
4.1 Pacientes.....	43
4.1.1 Paciente 95.....	45
4.1.2 Paciente 101.....	49
5. DISCUSSÃO	54
5.1 Amostragem geral	54
5.2 Paciente 95	56
5.3 Paciente 101	57
6. CONCLUSÃO	61

	17
CAPÍTULO II - Revisão sistemática sobre fenótipo PWL	62
2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO II	62
2.1 Objetivos gerais	62
2.2 Objetivos específicos	62
3. METODOLOGIA	63
4. RESULTADOS	65
5. DISCUSSÃO	78
5.1 Genes encontrados em 6q: gene <i>homólogo 1 do gene minded de Drosófila (SIM1)</i> , gene da <i>proteína 2 acessória do receptor 2 de melanocortina (MRAP2)</i> e gene do <i>receptor 2 do hormônio concentrador de melanina (MCHR2)</i>	79
5.2 <i>Gene antígeno melanoma L2 (MAGEL2)</i>	81
5.3 Monossomia do 1p36	82
5.4 2p25	82
5.5 8p24	83
5.6 Cromossomo X	84
5.7 Translocação	84
5.8 Mutações em mais de um <i>loci</i>	85
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIA	88
8. APÊNDICE	101
9. ANEXOS	103
10. APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS	127
10.1 47th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology	127
10.2 XXII International Congress of Genetics	128
10.3 12th European Cytogenomics Conference	129

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Síndrome de Prader-Willi

1.1.1 Genética

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) apresenta incidência de 1:25.000 nascimentos, sendo considerada a causa mais frequente de obesidade sindrômica. Três alterações genéticas diferentes são conhecidas como as principais causadoras para a síndrome, todas levando à falta da expressão do segmento 15q11-q13 de origem paterna com perda do *SNRPN/SNURF*. Esta região no cromossomo de origem materna encontra-se normalmente metilada e não é expressa. Em indivíduos normais os genes, de tal região SPW, somente se expressam no cromossomo de origem paterna (Figura 1). A causa mais frequente da SPW é a deleção do locus 15q11-q13 paterno, que ocorre em aproximadamente 70% dos casos, a segunda causa mais comum é a dissomia uniparental materna (DUPm) do cromossomo 15, que significa que ambos cromossomos 15 são de origem materna, e a terceira causa, menos comum, é a falta de expressão dos genes, em 15q11-q13, do cromossomo de origem paterna causado por defeito de *imprinting* (Quadro 1) (KOUSTA et al., 2009; VARELA et al., 2005).

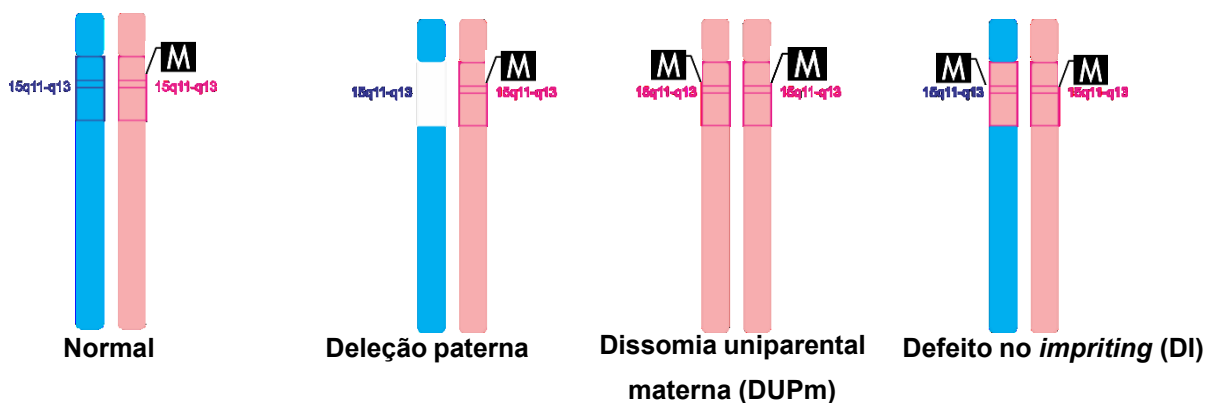


Figura 1: Esquema das alterações genéticas no *locus* 15q11-q13 que resultam na Síndrome de Prader-Willi, representando o cromossomo de origem paterna em azul, o de origem materna em rosa e o quadrado preto representando a metilação da região. Fonte: Acervo da autora.

Quadro 1: Possíveis causas da SPW, suas frequências relativas ao número de afetados e risco de recorrências na família.

Classe	Frequência	Mecanismo genética	Chance de recorrência
Ia	65-75%	Deleção de 5-6Mb	<1%
Ib	<1%	Rearranjo cromossômico	50%
IIa	20-30%	DUP materna	<1%
IIb	<1%	DUP materna com translocação	Aproximadamente 100% se a mãe apresentar translocação Robsoniana 15;15
IIIa	<0,5%	Defeito no <i>imprinting</i> com deleção do CI	50% se o pai apresentar uma deleção do centro de <i>imprinting</i> (CI)
IIIb	2%	Epimutação – defeito no <i>imprinting</i> sem a deleção do CI	<1%

DUP: dissomia uniparental; CI: centro de *imprinting*

Fonte: Adaptado de Cassidy e colaboradores (2012)

A região 15q11-q13 é uma região bastante complexa de genes com diferentes e importantes papéis na célula. Ela apresenta quatro regiões distintas que são delimitadas por 3 pontos comuns de quebra: (1) uma região proximal que não sofre *imprinting*, entre dois locais comuns de quebra (BP1 e BP2) contendo quatro genes, *Non-Imprinted In Prader-Willi 1 e 2 (NIPA1 e NIPA2)*, *Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 (CYFIP1)* e genes codificadores das *proteínas do complexo tubulina-gama (GCP5)*, que são expressos em ambos cromossomos; (2) a região cromossômica associada à SPW, que normalmente apresenta genes que só se expressam no cromossomo de origem paterna e contém cinco genes: *Makorin Ring Finger Protein 3 (MKRN3)*, *melanoma antigen family L2 (MAGEL2)*, o gene que codifica a proteína Necdin (*NDN*) e o bicistrônico denominado *pequena proteína N associada à ribonucleoproteína nuclear (SNRPN)* e *SNRPN Upstream Reading Frame (SNURF)*, o gene *C15orf2* expresso bialelicamente nos testículos e expresso apenas no alelo paterno no cérebro, um *cluster* de *small nucleolar RNAs (snoRNAs)* e vários transcritos *anti-sense*. Nesta região também se encontra a região da Síndrome de Angelman (SA), que contém os genes expressos nos cromossomos maternos *UBE3A* e o que codifica para *ATPase transportadora de cátions 10A (ATP10A)*; (3) uma região distal contendo um *cluster* de três genes de receptores do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), o gene *albinismo oculocutâneo tipo 2 (OCA2)*, *HECT*

and RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase (*HERC2*) e o ponto distal de quebra comum (BP3) (Figura 2) (CHAI et al., 2003; CHRISTIAN et al., 1995; GLENN et al., 1996).

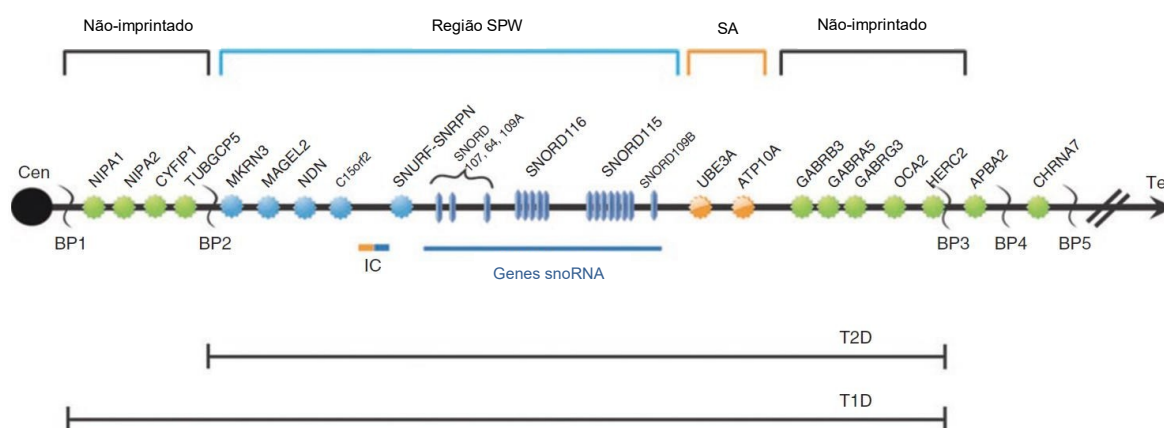


Figura 2: Região 15q11-q13 e seus genes. A região da SPW em azul, os genes relacionados com a SA em laranja e o centro de *imprinting* (IC) em laranja e azul. Os genes em verde não sofrem *imprinting* e são expressos bialelicamente. As 5 linhas verticais tortuosas nomeadas BP1, BP2, BP3, BP4, BP5 são os pontos de quebra, sendo o BP1, BP2 e BP3 os locais de quebras mais comuns em casos de SPW e SA, produzindo deleções que variam de 5 até 6Mb. Já as quebras em BP4 e BP5 são mais raras de acontecer. T1D e T2D são as deleções de tipo 1 e tipo 2, respectivamente. Fonte: Adaptado de Cassidy e colaboradores (2012).

1.1.2 Manifestações clínicas

A SPW é caracterizada por um conjunto de sintomas físicos e mentais, em sua maior parte relacionados com a deficiência hipotalâmica, incluindo baixa estatura, mãos e pés pequenos, hipogonadismo, hiperfagia com consequente obesidade na infância, retardo mental, dificuldades na fala, baixo desenvolvimento cognitivo e psicomotor, problemas comportamentais, além de problemas de sucção, hipotonia neonatal e características faciais como frente estreita, lábios voltado para baixo, olhos amendoados e saliva viscosa (BUTLER, 2011; KOUSTA et al., 2009; VARELA et al., 2005).

Inicialmente foram estabelecidas duas fases nutricionais distintas da SPW. O primeiro estágio é a presença de problemas de sucção e hipotonia, comumente

acompanhando por problemas de crescimento. O estágio 2 é caracterizado por hiperfagia (compulsão alimentar e fome persistente) e consequente obesidade. A etiologia da mudança do estágio 1 para o estágio 2 ainda não está claramente elucidada, porém acredita-se estar relacionada com anormalidades nas conexões hipotalâmicas e na sinalização de saciedade periférica. Outra possível causa para a mudança dos estágios 1 para o 2 são os altos níveis de obestatina (hormônio anorexígeno) na primeira infância, enquanto no início da juventude e vida adulta eles apresentam altos níveis de grelina (um hormônio orexígeno). Essas altas de hormônios anorexígenos e orexígenos em diferentes fases da vida podem explicar a mudança entre alterações na ingestão de alimentos no início da vida, seguida de hiperfagia e obesidade quando mais velhos (GUNAY-AYGUN et al., 2001; HINTON et al., 2010; MILLER et al., 2011). Miller e colaboradores (2011), a partir da observação e acompanhamento de pacientes com SPW, identificaram mais fases nutricionais clínicas além das anteriormente descritas, totalizando sete fases, sendo cinco principais e duas subfases (Quadro 2).

Quadro 2: Fases nutricionais da SPW e suas características clínicas.

Fases	Características
0	<p>Diminuição dos movimentos fetais e baixo peso ao nascer:</p> <p>Peso ao nascer 15-20% menor que dos irmãos; Idade gestacional normal; 85% dos casos apresentam diminuição dos movimentos fetais.</p>
1a	<p>Hipotonia com dificuldade de alimentação (0-9 meses):</p> <p>Sucção fraca, na maioria dos casos não consegue ser amamentado; Necessita de assistência, como tubos nasais ou orais, podendo chegar a óbito se não houver ajuda; Alimentação lenta; Apetite severamente diminuído, não demonstra fome; Choro fraco.</p>
1b	<p>Sem dificuldades de alimentação e seguindo a curva de crescimento (9 - 25 meses):</p> <p>Não necessita mais de auxílio para se alimentar; Crescimento estável, seguindo a curva de crescimento; Apetite normal.</p>
2a	<p>Peso aumentado sem aumento do apetite ou excesso de calorias (2,1 – 4,5 anos):</p> <p>Criança começa a cruzar as linhas de percentis; Sem aumento do apetite e normal para a idade; Ficará obeso se oferecidas as calorias diárias recomendadas para uma pessoa normal;</p>
2b	<p>Aumento do peso com aumento do apetite (4,5 – 8 anos):</p> <p>Aumento no interesse por comida; Irá ingerir mais comida que uma criança normalmente, se permitido; Sente-se saciado; Para de comer voluntariamente.</p>
3	<p>Hiperfágico, raramente sente-se saciado (8 anos - adulto):</p> <p>Continuará comendo se a porção de alimento não for limitada; Não se sente saciado; Atos de roubar comida e se alimentar de não-comestíveis; Ganhará uma quantidade considerável de peso em um curto período (exemplo: pacientes que ganharam aproximadamente 10kg em um final de semana); Problemas comportamentais relacionados à comida</p>
4	<p>Apetite não é mais insaciável (adulto):</p> <p>Apetite pode ser maior, normal ou menor que o normal; Consegue sentir saciedade; Apetite pode ser inconstante nesta fase, porém há uma melhora no controle quando comparado à infância; Ausência de problemas comportamentais relacionados à comida; Muitos adultos podem não chegar a esta fase por óbito.</p>

Fonte: Adaptado de Miller e colaboradores (2011).

Outra razão que pode contribuir para os problemas de apetite dos pacientes são anomalias cerebrais tais como os problemas estruturais da hipófise, descritos por Iughetti e colaboradores (2008) e demonstrado em Miller e colaboradores (2007a) com resultados de ressonância magnética funcional. Tais resultados indicam que esses indivíduos apresentam um aumento nos sinais de recompensa relacionados à comida, com aumento da atividade nas áreas que controlam comportamentos alimentares.

1.1.3 Diagnóstico da SPW

O diagnóstico clínico da SPW pode ser feito a partir dos critérios maiores e menores estabelecidos por Holm e colaboradores (1993), que levam em consideração o fenótipo físico e características neurocomportamentais. Assim, o diagnóstico clínico leva em consideração critérios que utilizam somatório dos pontos atribuídos aos critérios maiores (hipotonia neonatal; dificuldade de alimentação na infância ou retardo no desenvolvimento neuropsicomotor; ganho excessivo de peso a partir de um ano e seis meses; hipogonadismo; deficiência mental/problemas de aprendizado; hiperfagia/obsessão por comida; características faciais – olhos amendoados, lábio superior fino e voltado para baixo e deleção do *locus* 15q11-q13 em análise citogenética), cuja presença de cada critério acrescenta um ponto. No caso dos critérios menores, tais como diminuição dos movimentos fetais; problemas de comportamento (cinco dentre eles: fúria, acesso de violência; transtorno obsessivo-compulsivo, argumentativo, rígido, possessivo, teimoso, mentiroso, cleptomania); apneia do sono; baixa estatura; hipopigmentação dos cabelos, olhos e pele quando comparados aos pais; mãos e pés pequenos; mãos estreitas; miopia; saliva viscosa; defeito na articulação das palavras e lesões na pele por autoagressão será adicionado 0,5 ponto para cada critério encontrado. Os critérios clínicos de Holm e colaboradores (1993) são baseados na idade do paciente. Se o paciente tiver ≤ 3 anos, para ser clinicamente positivo é preciso ter ao menos 5 pontos, sendo 4 deles em critérios maiores. Se o paciente tiver > 3 anos, é necessário que ele apresente pelo menos 8 pontos, sendo 5 de critérios maiores, para ser considerado positivo.

Gunay-Aygun e colaboradores (2001) propuseram novos critérios para solicitação do teste molecular para SPW. Tais critérios são categorizados por faixas etárias e em cada uma existem manifestações clínicas características da SPW. Da faixa etária de 0 a 2 anos, é necessário que seja observado o quadro de hipotonia

neonatal com má sucção; entre 2 e 6 anos, além do quadro de hipotonia, é necessário que exista atraso no desenvolvimento global; entre 6 e 12 anos, além do histórico de hipotonia com má sucção e atraso no desenvolvimento global, é preciso ter sido observado um quadro de ingestão alimentar excessiva com consequente obesidade; já para pacientes com mais de 12 anos, os critérios são: funções cognitivas prejudicadas e geralmente deficiência mental moderada, hiperfagia com obesidade e hipogonadismo hipogonadotrófico, incluindo transtornos obsessivos-compulsivos.

As técnicas mais eficientes de se iniciar a investigação molecular para SPW são a reação em cadeia da polimerase-metilação específica (PCR-ME) e/ou a técnica de *methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification* (MS-MLPA).

A técnica PCR-ME se baseia na presença de diversos genes no cromossomo de origem materna que estão metilados e correspondem à região mutada no cromossomo de origem paterna na SPW. Esta é uma técnica capaz de detectar as três classes etiológicas da SPW, além de poder diferenciar da SA. O teste de PCR-ME mais comumente usado é o que tem como alvo a ilha 5'CpG do *SNURF-SNRPN*, que indica o éxon 1 e íntron 1 não metilados no alelo paterno e metilados no materno. Sendo assim, indivíduos normais apresentam os dois alelos íntegros, sendo o materno metilado e o paterno não, enquanto os pacientes com SPW, nos casos de deleção de 15q11-q13, somente apresentam o alelo metilado de origem materna.

Outras técnicas que também podem ser utilizadas para diagnosticar molecularmente a SPW são a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) com sondas para *SNRPN* e o microarray cromossomal (CMA, do inglês *chromosomal microarray*). Esta última permite se detectar o tamanho da deleção, uma informação importante para se poder correlacionar o genótipo com o fenótipo, porém apresenta custos mais altos (Quadro 3) (CASSIDY et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016).

Quadro 3: Algumas das técnicas para teste genético da Síndrome de Prader-Willi.

Método	Mutações detectadas	Usos e limitações
PCR-ME	Deleções, DUPm e defeito no <i>imprinting</i> (DI)	Capaz de identificar mais que 99% dos casos de SPW, porém não distingue essas três classes.
MS-MLPA	Deleções, DUPm e DI	Capaz de identificar >99% dos casos de SPW e distinguir entre deleção e DUPm. Porém não é capaz de diferenciar entre DUPm e DI. Pode mostrar o tamanho aproximado da deleção e indicar se é uma deleção do tipo 1 ou 2. Kits mais novos são capazes de detectar microdeleções.
Cariótipo	Deleções mais típicas	Podem detectar deleções grandes, porém com a limitação de precisar de um profissional experiente; não detecta DUPm e DI.
FISH	Praticamente todas as deleções de 4 a 6 Mb	Capaz de identificar 65-75% dos casos de SPW. Pode não ser capaz de identificar deleções pequenas e não distinguir entre uma pessoa normal, com DUPm ou com DI.
Microarray cromossomal (CMA)	Deleções	Semelhante ao FISH nas estatísticas, porém é capaz de informar o tamanho da deleção dependendo do tipo de <i>array</i> utilizado. Também informa sobre deleções e duplicações no resto do genoma. Mais preciso que o FISH, porém com custos mais elevados.
Sequenciamento	Deleções no centro de <i>imprinting</i>	Tem um papel específico em DI e consegue distinguir deleções no centro de <i>imprinting</i> de epimutações. Região investigada com tamanho limitado.

Fonte: Adaptado de Cassidy e colaboradores (2012) e Smith e Hhung. (2016)

1.2 Fenótipo Prader-Willi *like*

Existe uma gama de indivíduos obesos com deficiência mental e presença de outras características fenotípicas bastante semelhantes à SPW, conhecidos como portadores do fenótipo Prader-Willi *like* (PWL). Normalmente estes pacientes são encaminhados para fazerem os testes genéticos para SPW e não apresentam as alterações genéticas na região 15q11-q13 (ROCHA; PAIVA, 2014).

As alterações genéticas encontradas nos pacientes com fenótipo PWL podem estar relacionadas com as vias de sinalização ou a outros mecanismos importantes para o desenvolvimento da SPW, por isso as semelhanças fenotípicas entre

indivíduos com genótipos diferentes. Assim, a causa genética para essas desordens raras são diferentes e a falta de diagnóstico correto pode piorar o prognóstico desses pacientes; sendo um desafio para o profissional da saúde determinar quando é necessário pedir um teste molecular específico para diagnóstico da síndrome. O diagnóstico genético correto propicia explicações genéticas para a correlação genótipo-fenótipo o que pode levar ao aconselhamento genético e ao tratamento (se houver) adequados da síndrome (CHEON, 2016).

Exemplos de casos de fenótipo PWL são os descritos por Öiglane-Shlik e colaboradores (2014), que diagnosticaram pacientes com mutações em 1p36, o que determina fenótipo de hipotonia, atrasos no desenvolvimento motor e intelectual, problemas de comportamento e obesidade. Também há casos de pacientes com fenótipo PWL portando mutações em diferentes regiões do genoma, por exemplo, dissomia uniparental materna do cromossomo 14, deleção do 6q, inversão paracêntrica do cromossomo X, deleções subteloméricas, X frágil, dentre outras (Capítulo II) (BONAGLIA et al., 2008; FLOREZ; ANDERSON; LACASSIE, 2003; HOSOKI et al., 2009; NOWICKI et al., 2007; STANKIEWICZ et al., 2007; VARELA et al., 2006).

1.3 GNAS

1.3.1 Sobre o Gene

O gene que codifica a proteína de ligação do nucleotídeo guanina alfa estimuladora (GNAS) (OMIM: 139320) está localizado em 20q13.2-q13.3 e, originalmente, foi definido por 13 éxons, que codificam a subunidade alfa da proteína G estimuladora (G α). *Splicing* alternativos do éxon 3 geram 4 isoformas da proteína que são funcionalmente semelhantes. Atualmente já se sabe que o GNAS tem, pelo menos, cinco promotores e éxons localizados antes dos éxons que dão origem à proteína G α . Esses promotores estão *upstream* ao NESP, à subunidade alfa extragrande (XLAs), ao 1A e ao 1, que, juntamente com os éxons (2-13) codificam para diferentes proteínas e o éxon da fita *antisense* AS1 codifica um RNA longo não codificante (lncRNA), que regula a metilação do *locus* NESPAS em ambos os alelos (Figura 3) (BAUER et al., 1999; KANDURI, 2016; LEVINE; MODI; O'BRIEN, 1991; LIU et al., 2000b; PETERS et al., 1999).

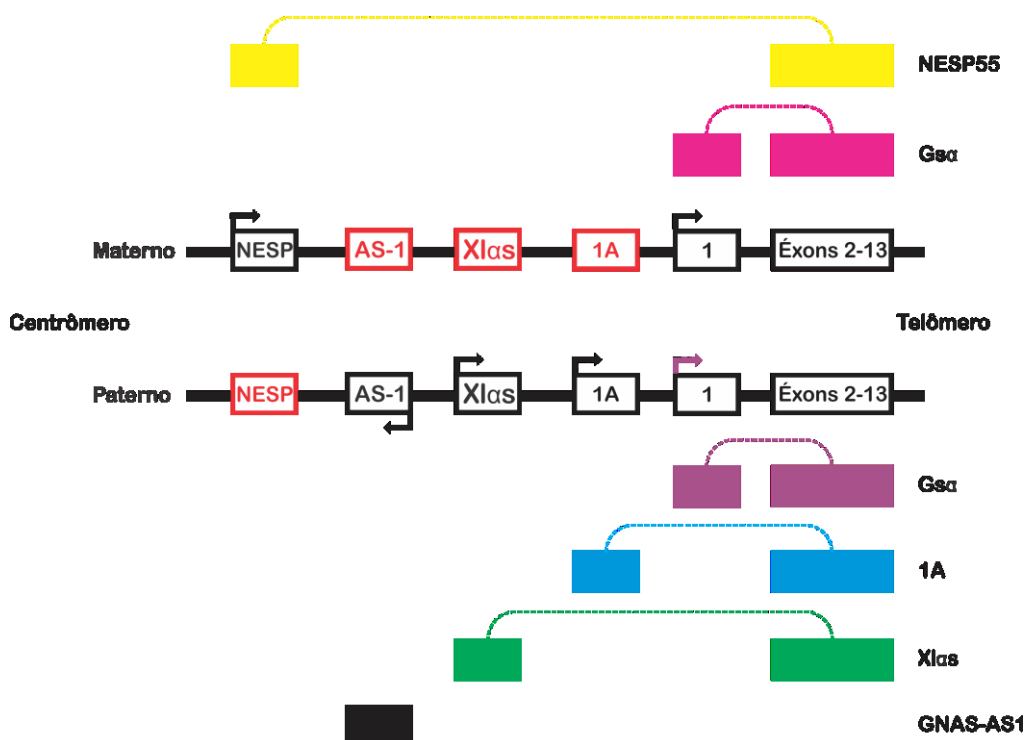


Figura 3: Esquema dos éxons do *GNAS*, seus promotores, padrões de metilação e os RNAm transcritos. As setas representam os promotores de transcrição em estado ativo. Os éxons em vermelho são os que se encontram metilados. A seta roxa indica que o éxon é expresso na maioria das vezes bialelicamente, porém em alguns tecidos o mesmo encontra-se metilado. Fonte: Acervo da autora, baseado em Weinstein e colaboradores (2010)

O promotor da *Gsa* fica localizado no meio de uma ilha CpG não-metilada, porém os éxons que codificam a proteína podem ser encontrados de forma metilada ou não, dependendo do tecido, sendo expresso principalmente pelo alelo de origem materna em tecidos como túbulos proximais renais, núcleo paraventricular do hipotálamo, tireoide e pituitária (CHEN et al., 2009; DAVIES; HUGHES, 1993; KOZASA et al., 1988; LIU; ERLICHMAN; WEINSTEIN, 2003; WEINSTEIN et al., 2001).

O primeiro promotor encontra-se *upstream* ao *NESP*, que está metilado apenas no alelo paterno. Sendo assim, normalmente, somente o alelo materno é transcrito para o RNAm da proteína neuroendócrina específica de 55kDa (NESP55). A NESP55 é uma proteína semelhante à cromogranina encontrada em células secretoras e não

apresenta relação com a proteína G. Sua expressão ocorre principalmente em tecidos neuroendócrinos (BAUER et al., 1999; PETERS et al., 1999).

O *Xlas* está aproximadamente 11kb após o *NESP55*, gera o transcrito para a proteína da subunidade alfa extragrande (*Xlas*), uma isoforma da $G\alpha$, com uma longa sequência amino-terminal, codificada pelo seu primeiro éxon (*Xlas*), enquanto o resto da proteína é produto dos éxons 2-13, idêntica à proteína $G\alpha$. O *Xlas* está metilado de forma oposta ao promotor *NESP*, sendo expresso apenas no alelo paterno e metilado no materno. Assim como o *NESP*, sua expressão é principalmente em tecidos endócrinos e pouco se sabe sobre as funções biológicas de ambas as proteínas (BASTEPE et al., 2002; HAYWARD; BONTHRON, 2000; PASOLLI et al., 2000; PETERS et al., 1999; PLAGGE et al., 2004).

O éxon 1A, também conhecido como A/B, está localizado aproximadamente 2,5 kb anteriormente aos éxons do $G\alpha$ e encontra-se metilado no cromossomo materno e não-metilado no cromossomo paterno. O papel biológico do 1A ainda é incerto, entretanto estudos com ratos com deleção do mesmo mostraram que houve uma inversão no padrão de metilação dos éxons que codificam a proteína $G\alpha$, sendo então expresso bialelicamente em todos os tecidos. O éxon 1A em células transfectadas é transcrito para RNAm de uma isoforma truncada da proteína $G\alpha$, com menos 59 aminoácidos, que fazem parte de uma das regiões de interação com o receptor acoplado à proteína G e da ligação com as subunidades do complexo $\beta\gamma$. Como o resto da proteína está conservada, incluindo a região terminal COOH- que interage com o receptor acoplado à proteína G (GPCR), é possível que esta isoforma truncada da proteína possa competir com a $G\alpha$ (ISHIKAWA et al., 1990; LIU et al., 2000a, 2000b, 2005; PUZHKO et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2004).

1.3.2 Proteína G e a sinalização celular

Dentre as três principais classes de receptores proteicos de superfície celular a maior delas é a dos GPCRs. Eles são responsáveis pela maior parte das respostas a sinais externos às células como, por exemplo, mediadores locais, outras células, hormônios e neurotransmissores. Vale ressaltar que a mesma molécula pode ativar diferentes tipos de receptores induzindo diferentes respostas. Eles atuam, como seu próprio nome diz, ligados à proteína trimérica de ligação à guanosina trifosfato (proteína G).

Existem vários tipos de proteína G, que se diferenciam por suas subunidades α . A subunidade α , quando inativa, está ligada à guanosina difosfato (GDP) e forma um trímero com as subunidades β e γ , que estão ligadas à membrana plasmática (Figura 4). Com a ativação do receptor associado ao trímero, a subunidade α é induzida a dissociar-se do GDP, dando lugar para que uma molécula de guanosina trifosfato (GTP) se ligue nesta mesma posição. Essa nova ligação causa uma mudança na conformação da proteína, fazendo com que a mesma se dissocie, dando origem ao heterodímero $\beta\gamma$ ativado (Figura 5) (ALBERTS et al., 2017; WEINSTEIN; CHEN; LIU, 2002).

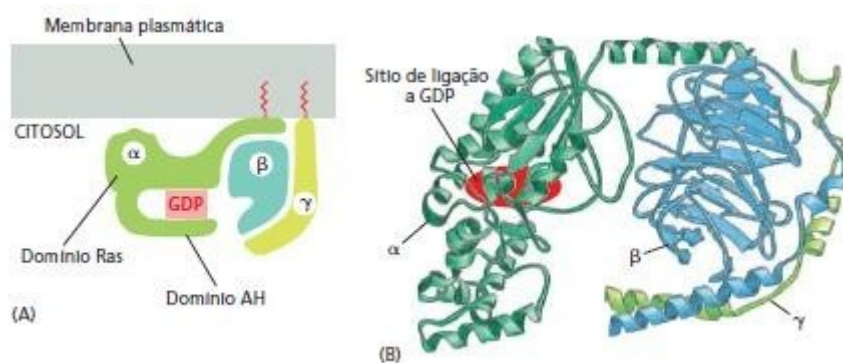


Figura 4: Proteína G em sua forma inativa. (A) Esquema ilustrativo da proteína na forma trimérica com as subunidades α , β e γ . (B) Estrutura tridimensional, também indicando as mesmas subunidades e sítio de ligação à GDP. Fonte: Alberts et al. (2017).

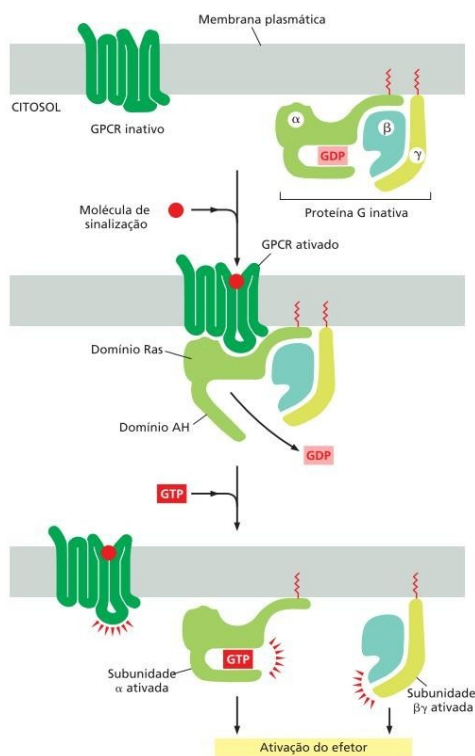


Figura 5: Esquema da ativação da proteína G a partir do GPCR. Fonte: Alberts et al. (2017).

Diferentes sinais celulares atuam aumentando a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, que por sua vez atua como um segundo mensageiro de diversas vias de sinalização. Este aumento de AMPc se deve a estímulos que ativam os GPCRs acoplados à proteína G estimuladora (Gs), que por sua vez ativa a enzima adenilciclase, que sintetiza AMPc a partir de ATP. O AMPc ativa a proteína-quinase dependente de AMPc (PKA) e esta atua em proteínas-alvo em diversas células, gerando diferentes respostas celulares ao estímulo (ALBERTS et al., 2017; WEINSTEIN; CHEN; LIU, 2002).

A proteína G_{α} apresenta dois domínios: o *ras-like*, onde se localizam o domínio de ligação com a guanina e de interação com o efetor, e um domínio mais variável, que é produto de *splicing* alternativo dos éxons, produzindo diferentes isoformas da proteína G_{α} (KOZASA et al., 1988).

1.3.3 Doenças associadas com mutações no gene *GNAS*

A osteodistrofia hereditária de Albright (AHO) foi primeiramente descrita em 1942, por Fuller Albright, a partir de uma paciente de 27 anos que apresentava

características típicas de hipoparatiroidismo, além de retardo mental, baixa estatura, rosto redondo, metacarpo e metatarso pequenos e calcificação de tecidos moles. Mesmo com o quadro de deficiência do paratormônio (PTH), a paciente não respondeu ao extrato bovino do hormônio. Então a doença foi descrita como pseudohipoparatiroidismo tipo-1A (PHP-1A). Esta é uma doença caracterizada pela presença de baixa estatura e anormalidades neurocomportamentais, causada por mutação heterozigótica que modifica a expressão e/ou função da proteína Gs- α . (ALBRIGHT; BURNETT; SMITH, 1942; WILSON, 2009)

PHP-1A tem como característica clássica a incapacidade de aumentar o AMPc nas células do trato urinário e excretar fosfato em resposta à administração do PTH. Os afetados também apresentam resistência a múltiplos hormônios relacionados aos GPCR, como hormônio estimulador da tireoide (TSH), hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH). Além disso, pacientes com PHP-1A do sexo feminino apresentam frequentemente hipogonadismo com maturação sexual atrasada ou incompleta (GERMAIN-LEE, 2019; WEINSTEIN; CHEN; LIU, 2002).

Pacientes com AHO nos quais o cromossomo que apresenta a mutação é de origem paterna não apresentam a multiresistência hormonal e esta condição é chamada de pseudo-pseudohipoparatiroidismo (PPHP). Estes pacientes apresentam níveis de PTH e TSH normais, além de não terem problemas nas respostas ao AMPc no trato urinário quando é administrado PTH e não apresentam quadro de obesidade (Quadro 4) (CHEN et al., 2017; GERMAIN-LEE, 2019; PODYMA et al., 2018).

O pseudohipoparatiroidismo tipo-1B (PHP-1B) é caracterizado pela resistência ao PTH, porém sem outras características de AHO ou resistências hormonais, sendo que em alguns casos foram observadas braquidactilia e resistência ao TSH. Uma das características considerada como mais marcante do PHP-1B é a obesidade que se inicia cedo, entretanto as ossificações subcutâneas são raras e não é observado quadro de problemas cognitivos. PHP-1B é consequência de defeitos de metilação em um ou mais regiões promotoras do *GNAS* (CHU et al., 2018; GRÜTERS-KIESLICH et al., 2017; HALDEMAN-ENGLERT; HURST; LEVINE, 2017; HAYWARD et al., 1998).

Quadro 4: Doenças relacionadas com mutações no *GNAS*, suas causas e fenótipos.

	AHO		Não-AHO
	PHP-1A	PPHP	PHP-1B
Herança	Inativação do alelo materno; Raramente por defeito no <i>imprinting</i>	Inativação do alelo paterno	Perda da expressão do alelo materno por <i>imprinting</i> , deleções ou inversões; autossômica dominante.
Fenótipo	Obesidade, muitas vezes severa, com início cedo; Peso ao nascer baixo; Apneia noturna; Ossificações subcutâneas; Baixa estatura; Déficits cognitivos	Não obeso; Ossificações subcutâneas; Baixa estatura; Baquidactilia; Déficits cognitivos	Sobrepeso/ obesidade podem ocorrer, mas menos que em PHP-1A, com início cedo; Macrossomia ao nascer; Raras ossificações subcutâneas; Estatura normal; Alguns casos de braquidactilia leve; Sem déficits associados
Resistências hormonais	PTH, TSH, GHRH, Gonadotrofinas, Calcitonina e Glucagon.	Não ocorrem	PTH, TSH (em alguns casos) e calcitonina

Fonte: Adaptado de Germain-Lee, (2019)

1.3.4 *GNAS* e seu papel na obesidade

O *GNAS* é importante para o sistema melanocortina-leptina por causa do MC4R, que é um GPCR que ativa a cascata de sinalização do AMPc. A relação entre sistema melanocortina-leptina e hipotálamo com a obesidade se deve ao controle do balanço energético, pela inibição da ingestão de alimentos e estímulo à atividade do sistema nervoso simpático e ao gasto energético. O hormônio leptina é secretado pelos adipócitos e é proporcional à quantidade de lipídeo corporal. Ele se liga aos seus receptores em dois tipos diferentes de neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC): os neurônios anorexígenos que expressam pró-opiomelanocortina (POMC) e neurônios orexígenos que contêm os neuropeptídeos Y (NPY) e neuropeptídeos orexígenos relacionados com o agouti (AgRP). O NPY é um estimulante de apetite com importante papel no aumento da ingestão de alimentos, diminuição do gasto energético e aumento da lipogênese. O AgRP é um antagonista dos efeitos

anorexígenos do MC4R e é expresso nos mesmos neurônios que expressam NPY. Esses neurônios anorexígenos e orexígenos se projetam para diferentes regiões do cérebro, dentre elas o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que apresenta uma grande quantidade de neurônios que expressam MC4R. Quando a leptina se liga aos seus receptores localizados em neurônios que expressam POMC, é liberado um produto da clivagem da POMC, o hormônio estimulador de melanócitos-alfa (α -MSH). O α -MSH, então, ativa o MC4R no PVN gerando sinais de saciedade e, conseqüentemente, diminui a ingestão de alimentos. O AgRP compete com o α -MSH pela ligação do MC4R, porém com efeito antagonista, causando um aumento do consumo alimentar. Em suma, a leptina leva à ativação dos neurônios POMC, agindo indiretamente no aumento da ativação de MC4R por α -MSH, diminuindo o seu antagonismo pelos neurônios AgRP e aumentando os sinais de saciedade. Sendo assim, mutações nos genes relacionados tanto com o sistema melanocortina-leptina quanto com desenvolvimento do hipotálamo podem levar ao desequilíbrio das sinalizações das reservas de energias corporais e balanço energético, levando a um quadro de obesidade (Figura 6) (RANADIVE; VAISSE, 2008; RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003; WEINSTEIN et al., 2010; YU et al., 1995).

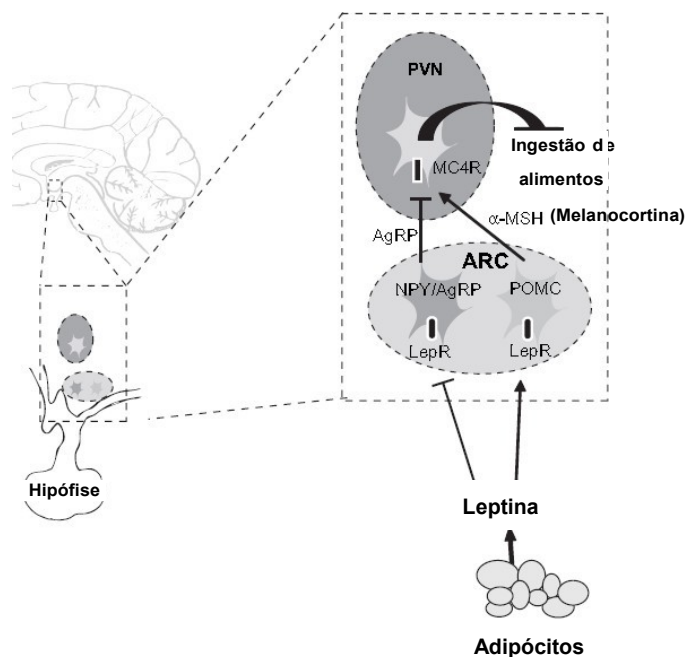


Figura 6: Esquema do sistema melanocortina-leptina e a sua sinalização hipotalâmica. MC4R: receptor de melanocortina 4; ARC: núcleo arqueado do hipotálamo; POMC: pró-opiomelanocortina; NPY: neuropeptídeos Y; AgRP: neuropeptídeos orexígenos relacionados com o agouti; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; α -MSH: hormônio estimulador de melanócitos-alfa. Fonte: Adaptado de Ranadive e Vaisse, (2008).

CAPÍTULO I - Investigação molecular do gene *GNAS* em pacientes com fenótipo Prader-Willi *like*

2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO I

2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral do estudo foi investigar o gene *GNAS*, quanto à variação do número de cópias e metilação, por meio da técnica de MS-MLPA em 35 pacientes que apresentam obesidade, deficiência mental e fenótipo Prader-Willi *like*, porém negativos para PCR-ME da SPW e para os kits de MLPA: P064 – Síndrome de Microdeleção; ME032 – Dissomia uniparental do cromossomo 14; P147 – 1p36, P220 – Obesidade e P224 – *PPARG* (Anexo F - Anexo J).

2.2 Objetivos específicos

- I. Realizar levantamento das características clínicas dos 35 pacientes com obesidade e deficiência mental, a partir de prontuários do Ambulatório de Genética, da UNIRIO.
- II. Aplicar os critérios de Holm e colaboradores (1993) e de Gunay-Aygun e colaboradores (2001), para diagnóstico de SPW, aos 35 investigados.
- III. Correlacionar os fenótipos com os genótipos identificados pelo MS-MLPA.
- IV. Comparar o fenótipo dos indivíduos citados na literatura portadores de tais mutações com o fenótipo dos pacientes desta dissertação, para correlação genótipo-fenótipo.

3. METODOLOGIA

3.1 Pacientes

Este trabalho foi elaborado seguindo os padrões vigentes de ética em pesquisa com seres humanos, segundo a resolução 466/12 CNS/MS.

A atual investigação é uma extensão do estudo intitulado: “Investigação Molecular da Síndrome de Prader-Willi em pacientes suspeitos” (ROCHA, 2011) e posteriormente denominado “Investigação Molecular em Paciente com Obesidade e Deficiência Mental e/ou Fenótipo Prader-Willi *like*” (ROCHA, 2017), cuja aprovação consta nos registros da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée Guinle, de número 04/2009 e está cadastrado na plataforma Brasil sob o número CAAE 25858314.9.0000.5258 (Anexo A).

Com base nos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 35 pacientes de ambos os sexos. Todos já faziam acompanhamento no ambulatório de genética do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) (Anexo C) e tiveram suas fichas clínicas preenchidas com seus sintomas e sinais clínicos (Anexo D).

Todos os pacientes foram informados dos objetivos do estudo juntamente com a entrega dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), que foram assinados em duas vias, uma entregue ao responsável pelo paciente e outra ao pesquisador responsável pela pesquisa.

Critérios de inclusão: pacientes com presença de obesidade/sobrepeso e atraso no desenvolvimento intelectual com diagnóstico molecular negativo para a Síndrome de Prader-Willi e para os kits de MLPA P064, ME032, P147, P220 e P224, que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE.

Critérios de exclusão: pacientes positivos no exame molecular para Síndrome de Prader-Willi utilizando-se a técnica PCR-ME do *SNRPN* (ROCHA, 2011) (Figura 7).

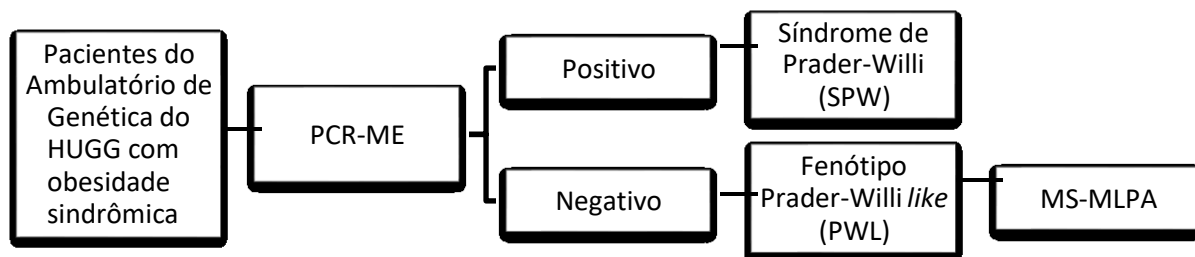


Figura 7: Fluxograma do desenvolvimento do estudo com as etapas para diagnóstico dos pacientes com SPW e fenótipo PWL para aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.

3.2 Extração de DNA

Foram coletados aproximadamente 4 ml de sangue periférico em tubo com EDTA (frasco Vacuette® EDTA). A extração do DNA foi feita a partir de linfócitos de sangue periférico utilizando-se o kit Axygen® (Union City, California, EUA) em conformidade com o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por meio de espectrofotômetro (Spectrophotometer NanoDrop® 2000, Thermo Scientific).

Depois de quantificado o DNA foi armazenado em freezer a -18°C e, posteriormente, submetido à técnica de MLPA (do inglês: “*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*”) e MS-MLPA (do inglês: “*Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*”) com o Kit ME031 B2 SALSA MS-MLPA probemix (MRC Holland, Amsterdã, Holanda; Anexo E).

As técnicas de MLPA e MS-MLPA foram feitas de forma concomitante, utilizando as mesmas extrações de DNA, porém, para uma melhor explicação e clareza, elas serão explicadas separadamente a seguir.

3.3 MLPA – análise do número de cópias

A MLPA é uma técnica com a qual é possível investigar o número de cópias dos genes e ocorre por meio de cinco etapas: (1) desnaturação do DNA e hibridação das sondas, (2) reação de ligação, (3) amplificação por PCR, (4) separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar e (5) análise de dados.

As duas semi-sondas são capazes de reconhecer sequências-alvo contíguas e específicas com as quais se hibridam e sofrem ligação, sendo que amplificam somente as regiões alélicas que sofreram ligação. A amplificação por PCR foi

realizada utilizando um par de iniciadores, sendo um deles marcado por fluorescência. Por apenas a sonda perfeitamente ligada ser amplificada durante a PCR subsequente, o número de produtos de ligação da sonda é uma medida do número de sequências alvo na amostra. Os produtos de PCR foram então separados por tamanho utilizando-se a eletroforese capilar (ABI3500, Applied Biosystem) em condições de desnaturação e a análise feita pelo *software* Coffalyser® (versão: v.140721.1958) (STUPPIA et al., 2012) (Figura 8).

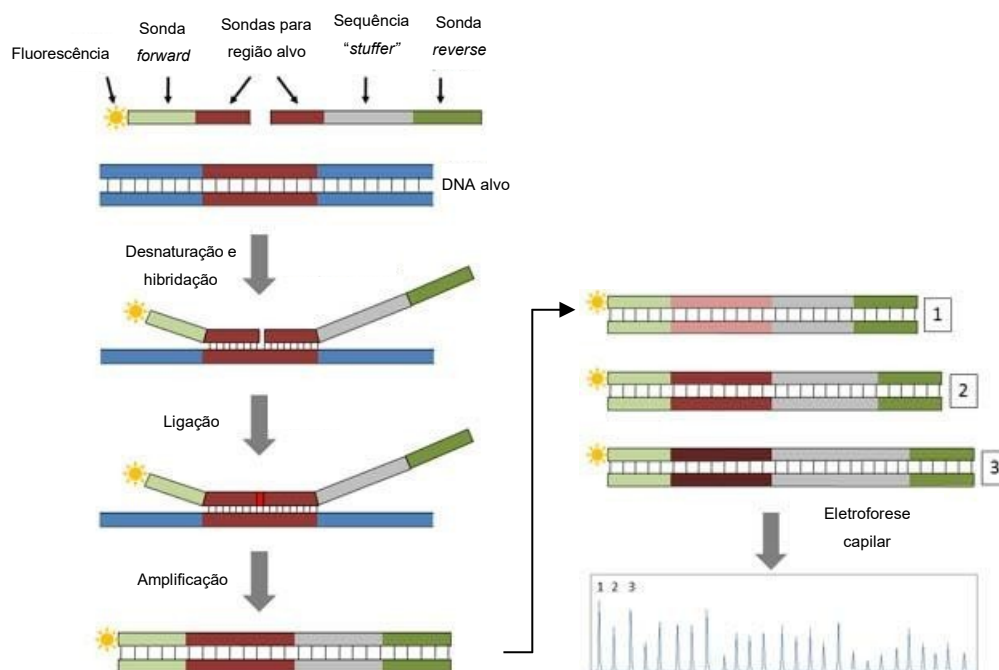


Figura 8: Ilustração da técnica de MLPA e suas etapas. Adaptado de: MRC-HOLLAND (2019).

Etapa 1 – Desnaturação e hibridação: no dia 1 foi feita a desnaturação do DNA e a reação de hibridação. Cada tubo do tipo Eppendorf® de 0,2mL foi identificado com o número da amostra do paciente e dos controles negativos. Foram adicionados 5µL de cada amostra de DNA extraído e quantificado com a concentração ajustada a aproximadamente 100ng/µL de DNA. Os tubos contendo DNA foram colocados no termociclador ABI® VERITI-Well 384 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e o programa de desnaturação foi iniciado (Quadro 5).

Quadro 5: Programa de desnaturação do DNA

1: 98°C – 5 minutos
2: 25°C – pausa

Paralelamente à etapa de desnaturação, a mistura (*mix*) para a reação de hibridação foi preparada, sendo composta de: 1,5µL de MLPA *buffer* (kit do fabricante) e 1,5µL das semi-sondas (solução do fabricante).

Após o término do período de desnaturação de DNA, foram adicionados 3µL do *mix* de hibridação em cada tubo tipo Eppendorf® e homogeneizados por pipetagem. Logo depois, foi iniciado o programa da reação de hibridação (Quadro 6).

Quadro 6: Programa de hibridação do DNA

1: 95°C – 1 minuto
2: 60°C – 16 horas

Etapa 2 – Ligação: no dia 2, após 16h da segunda etapa da hibridação, o ciclo foi finalizado à temperatura de 20°C e então adicionados 10µL de água DNAase *free* e 3µL de *buffer* de ligase A (do fabricante) em todas as amostras. Foram transferidos 10µL das amostras para um segundo tubo identificado para cada amostra. Foi preparado o *mix* de Ligação a partir do kit ME031, composto por 8,25µL de água DNAase *free*, 1,5µL de Ligase *buffer* B e 0,25µL de Ligase-65.

Foi iniciado então o programa da reação de ligação (Quadro 7), durante o qual foi feita uma pausa na primeira etapa de 48°C para que fossem adicionados 10µL do Mix de Ligação às amostras, as quais estavam sendo testadas para a presença de variação no número de cópias, como deleção ou duplicações de regiões do gene *GNAS*.

Quadro 7: Programa para ligação

1: 48°C – pausa para adição do mix de ligação e/ou digestão
2: 48°C – 15 minutos
3: 98°C – 5 minutos
4: 20°C – pausa

Etapa 3 – Amplificação por PCR: após a reação de ligação, foi dado início à amplificação por PCR, realizada utilizando-se apenas um par de iniciadores, um dos quais marcado por fluorescência.

Primeiramente, o SALSA PCR *primer mix* foi homogeneizado em agitador tipo vortex. Em seguida foi preparado o *mix* da DNA polimerase, utilizando-se: 3,75µL de água DNAase free, 1µL de SALSA PCR *primer mix* e 0,25µL SALSA polimerase.

Após a última etapa da reação de Ligação, à temperatura ambiente, foram adicionados 10µL do mix da polimerase às amostras a serem amplificadas. Estas foram submetidas à PCR cujo programa de ciclos de temperatura está apresentado no Quadro 8.

Quadro 8: Programa de PCR

1: 95°C – 30 segundos	35 ciclos
2: 60°C – 30 segundos	
3: 72°C – 60 segundos	
4: 72°C – 20 minutos	
5: 15°C – pausa	

Etapa 4 – Eletroforese capilar: os produtos de PCR foram separados por tamanho por eletroforese capilar no analisador genético 3730XL DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) (Massachusetts, EUA) e a fluorescência emitida pelos fluoróforos, contidos nos produtos de PCR, foi medida.

Etapa 5 – Análise e interpretação dos resultados: para tal foi utilizado o software Coffalyser.Net (Amsterdã, Holanda), que faz a comparação entre as amostras dos pacientes e amostra-controle de indivíduos normais (fornecidas pelo fabricante do kit) (STUPPIA et al., 2012).

3.4 MS-MLPA – Análise do perfil de metilação

A MS-MLPA é uma variante da técnica da MLPA descrita acima, com a qual se investiga o perfil de metilação. Esta é realizada em cinco etapas: (1) desnaturação do DNA e hibridação das sondas, (2) reação de ligação e digestão das regiões não-metiladas, (3) amplificação por PCR, (4) separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar e (5) análise de dados (Figura 9) (SCHOUTEN et al., 2002).

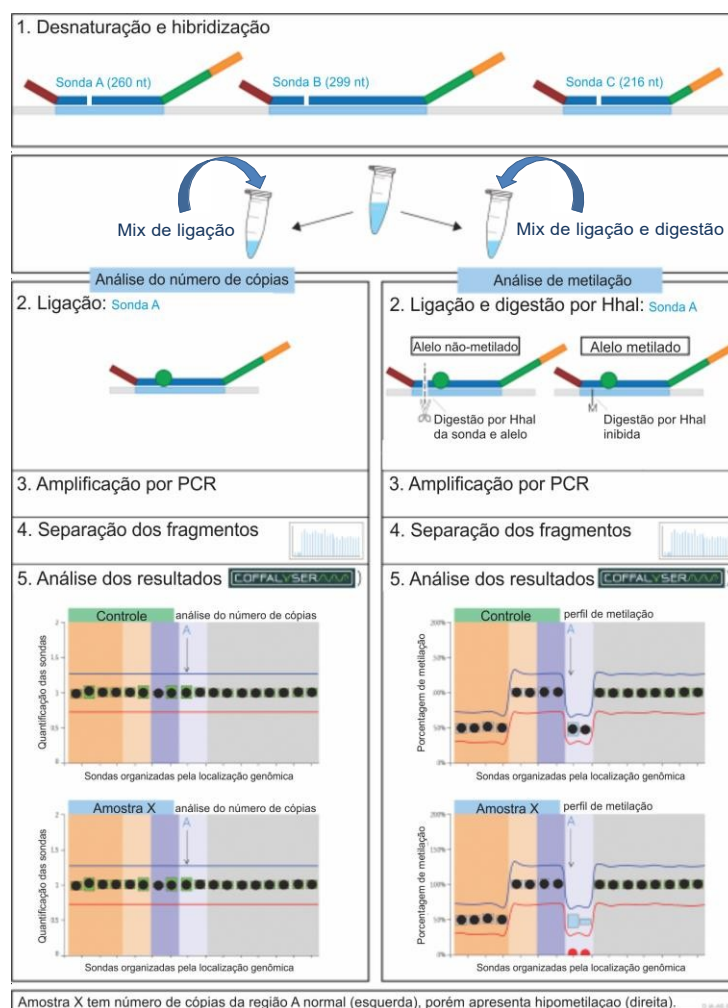


Figura 9: Ilustração dos dois tipos de análise para detecção de variação do número de cópias (esquerda) e padrão de metilação (direita), por MLPA e MS-MLPA, respectivamente. Adaptado de MRC-HOLLAND (2019).

Para a execução da técnica de MS-MLPA todas as etapas descritas em 3.3 foram seguidas, porém a diferença entre as técnicas ocorreu na “Etapa 2 – Ligação” descrita anteriormente. O ciclo de hibridação (Quadro 6) foi finalizado à temperatura de 20°C e então adicionados 10µL de água DNAase *free* e 3µL de buffer de ligase A (do fabricante) em todas as amostras. Foram transferidos 10µL das amostras para um outro tubo identificado para cada amostra e foi preparado o mix de Ligação-Digestão contendo 7,75µL de água DNAase *free*, 1,5µL de Ligase buffer B, 0,25µL da Ligase-65 e 0,5µL da enzima de digestão HhaI (New england Biolabs Ipswich, MA, EUA).

Após 16 horas da segunda etapa da hibridação do DNA, foi iniciado o programa da reação de ligação e digestão, como descrito anteriormente no Quadro 7, sendo feita uma pausa na primeira etapa de 48°C para que fossem adicionados 10µL do mix de Ligação-Digestão às amostras investigadas quanto ao perfil de metilação do gene GNAS. As duas semi-sondas podem reconhecer as sequências-alvo específicas, hibridam-se e são ligadas. As regiões não-metiladas sofrem a digestão pela enzima de restrição HhaI e somente as regiões que sofreram ligação e não foram digeridas foram amplificadas.

A amplificação por PCR foi realizada também como descrito em 3.3 (Quadro 8) utilizando-se um par de iniciadores, sendo um deles marcado por fluorescência. Apenas a região genômica alvo da sonda não metilada e perfeitamente ligada à sonda foi amplificada metilada foi amplificada durante a reação de PCR.

As etapas de identificação dos amplicons por eletroforese capilar e análise dos resultados foram realizadas como descritas em 3.3 (Etapas 4 e 5).

4. RESULTADOS

4.1 Pacientes

Das 75 amostras de obesos com atraso no desenvolvimento global, anteriormente investigadas, 29 foram diagnosticados por meio de PCR-ME como portadores de SPW. As demais 46 amostras foram investigadas para fenótipo PWL com diferentes kits de MLPA (P064, ME032, P147, P220 e P224) voltados para obesidade e atraso no desenvolvimento. Dessas 46, 11 testaram positivo para alterações identificadas com algum dos cinco kits MLPA acima.

Assim, 35 pacientes apresentavam resultados negativos para SPW e para alterações nos outros genes investigados com os kits de MLPA citados acima e fazem parte da casuística desta dissertação.

Portanto, foi realizada busca na literatura no sentido de se encontrar outros genes envolvidos com obesidade e atraso no desenvolvimento, que pudessem ser investigados quanto ao padrão do número de cópias e de metilação. Tal busca apontou para o gene *GNAS* como mais um gene envolvido com obesidade e atraso no desenvolvimento global, que poderia ser investigado pelo kit ME031.

O Quadro 9 mostra as regiões do *GNAS* que foram avaliadas pelo Kit ME031 B2 SALSA MS-MLPA quanto à variação do número de cópias e padrão de metilação dos éxons 1A e 1-13.

Quadro 9: Éxons investigados pelo kit SALSA MLPA probemix ME031 *GNAS*

Tamanho (nt)	Éxon
238	<i>Upstream</i> (Éxon1A)
402	<i>Upstream</i> (Éxon 1A)
223	Éxon 1
490	Éxon 2
438	Éxon 3
307	Éxon 4
373	Éxon 6
454	Éxon 7
215	Éxon 9
330	Éxon 11
283	Éxon 13

Todos os 35 pacientes investigados neste trabalho tiveram suas características clínicas avaliadas de acordo com o fenótipo SPW, obtidas dos prontuários do Ambulatório de Genética, da UNIRIO, que estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características fenotípicas segundo Holm e colaboradores (1993) dos 35 pacientes investigados pelo kit MS-MLPA ME031-B2.

Amostra	4	5	6	8	20	22	26	28	30	50	51	52
Sexo	M	F	M	F	M	M	F	M	M	M	F	F
Nascimento	08.07.98	06.03.01	01.11.01	02.08.06	15.10.79	11.04.07	NA	01.04.03	NA	30.01.99	14.08.97	07.02.02
Crítérios Maiores												
Hipotonia neonatal	+	+	-	+	-	NA	+	-	-	-	-	-
Dificuldade de alimentação	+	-	NA	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Atraso psicomotor	+	+	NA	+	-	+	+	-	+	-	-	+
Ganho de peso	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	+	+
Hipogonadismo	NA	-	-	NA	NA	NA	-	-	NA	-	NA	-
Deficiência mental	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hiperfagia	+	+	+	+	+	NA	+	+	+	-	+	+
Características faciais	+	-	NA	-	NA	+	-	-	+	-	-	-
Crítérios Menores												
Diminuição movimentos fetais	-	-	NA	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Problemas comportamento	+	+	NA	+	+	-	-	+	NA	-	+	+
Apnéia	NA	NA	NA	-	-	NA	-	-	-	-	-	-
Baixa estatura	-	NA	NA	-	NA	+	NA	-	NA	NA	-	-
Hipopigmentação	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mãos e pés pequenos	NA	NA	-	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Mão estreita	NA	NA	-	+	-	-	NA	+	NA	-	+	-
Miopia	-	+	NA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Saliva viscosa	-	+	NA	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Problema de fala	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Lesões de pele	+	+	NA	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Amostra	53	54	61	63	64	66	70	71	74	75	77	84
Sexo	F	M	F	F	M	F	M	M	F	F	F	M
Nascimento	24.09.03	14.02.00	04.04.01	14.01.02	25.09.07	25.01.89	25.10.00	04.04.07	18.01.73	14.10.07	15.04.94	06.01.11
Crítérios Maiores												
Hipotonia neonatal	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Dificuldade de alimentação	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Atraso psicomotor	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Ganho de peso	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
Hipogonadismo	-	-	-	NA	-	-	+	+	-	-	-	-
Deficiência mental	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	-	+
Hiperfagia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Características faciais	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Crítérios Menores												
Diminuição movimentos fetais	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Problemas comportamento	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Apnéia	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Baixa estatura	NA	NA	-	NA	-	-	NA	-	+	-	-	-
Hipopigmentação	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Mãos e pés pequenos	NA	-	-	-	+	NA	NA	-	NA	-	+	NA
Mão estreita	-	NA	+	-	-	NA	-	-	-	-	-	-
Miopia	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Saliva viscosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Problema de fala	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Lesões de pele	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Amostra	85	89	90	91	95	96	97	100	101	104	105	
Sexo	M	M	M	F	F	M	F	M	M	M	M	
Nascimento	21.06.07	21.05.00	08.07.97	29.03.99	17.06.07	06.09.04	26.09.85	14.04.97	16.05.89	29.03.15	19.04.09	
Crítérios Maiores												
Hipotonia neonatal	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
Dificuldade de alimentação	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	
Atraso psicomotor	-	+	NA	+	-	-	+	+	-	-	-	
Ganho de peso	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	
Hipogonadismo	+	NA	NA	+	-	-	-	-	-	-	-	
Deficiência mental	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	
Hiperfagia	+	+	+	-	+	+	-	-	+	NA	+	
Características faciais	+	-	NA	-	+	-	-	+	-	-	-	
Crítérios Menores												
Diminuição movimentos fetais	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Problemas comportamento	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
Apnéia	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Baixa estatura	-	NA	NA	NA	+	-	NA	NA	-	-	-	
Hipopigmentação	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
Mãos e pés pequenos	-	+	NA	NA	+	-	NA	-	-	-	-	
Mão estreita	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Miopia	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Saliva viscosa	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
Problema de fala	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
Lesões de pele	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

NA: não avaliado

O kit ME031-B2 foi capaz de detectar dois pacientes dentre os 35 testados, que apresentavam mutações no *GNAS*, aparentemente do tipo deleção: a paciente 95, do sexo feminino, com 8 anos de idade à época da avaliação clínica, e a paciente 101, do sexo feminino e com 27 anos. As características clínicas dos pacientes 95 e 101 relacionadas à SPW encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Características clínicas da SPW encontradas nos pacientes 95 e 101 que apresentaram alterações em *GNAS*, segundo os critérios de Holm e colaboradores (1993).

Critério Maiores	Paciente 95	Paciente 101
Hipotonia neonatal	-	-
Dificuldade de alimentação na infância/retardo do desenvolvimento neuropsicomotor	-	-
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano	+	+
Hipogonadismo	-	-
Deficiência mental, problemas de aprendizado	+	+
Hiperfagia	+	+
Características faciais	+	-
Critérios Menores		
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	+	+
<i>Skin piking</i> / Conduta Auto-Lesiva	-	-

4.1.1 Paciente 95

A técnica de MS-MLPA (ME031) detectou uma aparente deleção heterozigota do éxon 7 do *GNAS* na paciente 95 (Figura 10). Tal paciente havia previamente apresentado teste PCR-ME negativo para SPW, assim como para os kits de MLPA anteriormente usados e citados na metodologia (Resultados do arquivo da Dr^a Catielly Ferreira Rocha).

A qualidade dos resultados, aqui apresentados, pode ser verificada a partir do eletroferograma (Figura 11), no qual o pico 92 é um comparador, que deve estar menor que os picos 88 e 96 indicando uma adequada desnaturação das amostras, e maior que os picos 64, 76 e 82 indicativo de uma eficiente reação de ligação entre as duas semi-sondas.

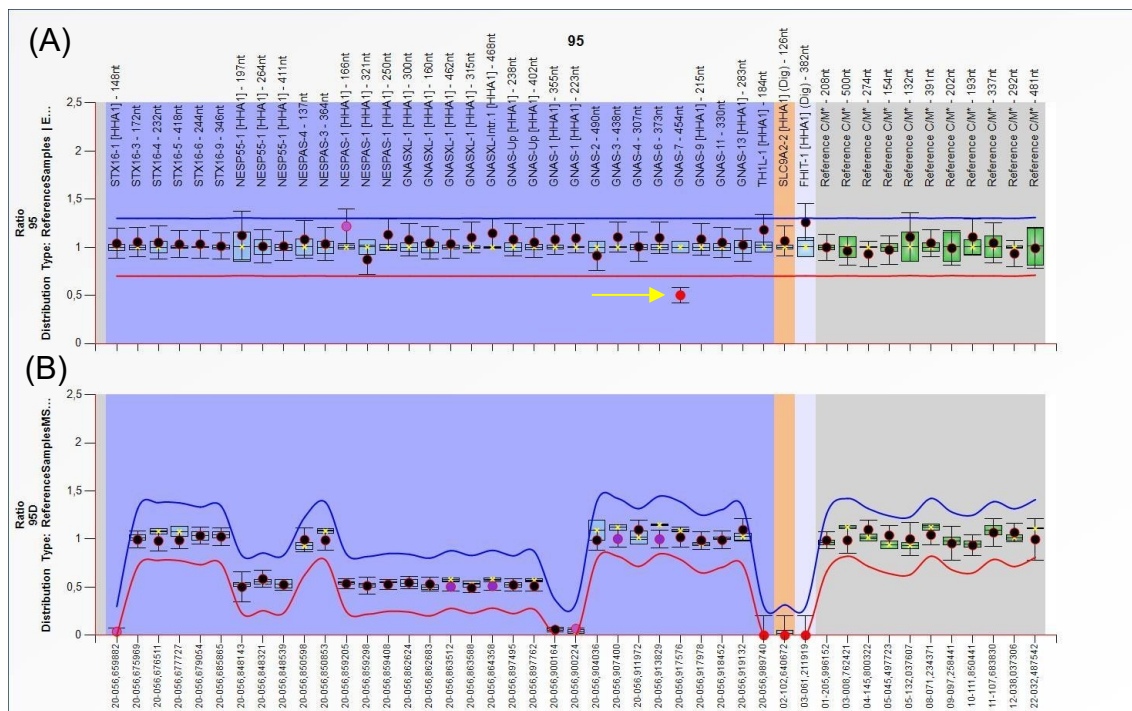


Figura 10: Resultados, obtidos após a MS-MLPA seguida de eletroforese capilar, gerados pelo *software* Coffalyser.NET ilustrando a aparente deleção do éxon 7 do *GNAS*, indicada pela seta amarela (Apêndice A). (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação.

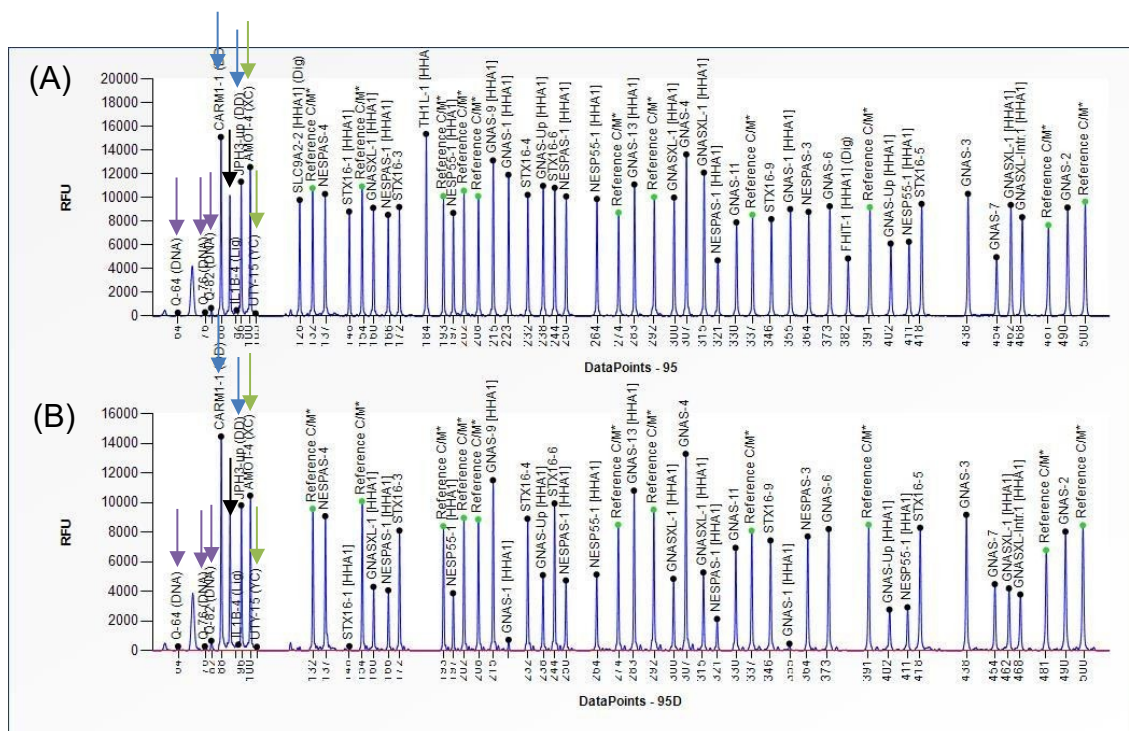


Figura 11: Eletroferograma gerado pelo *software* Coffalyser.NET do paciente 95, padrão que auxilia na verificação da qualidade da amostra e da eletroforese capilar (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação. Seta preta: pico 92 para comparação, setas roxas: picos 64, 76 e 82 para análise da ligação, setas azuis: picos 88 e 96 para análise da desnaturação e setas verdes: picos dos cromossomos sexuais.

Além dos testes moleculares, foram aplicados os critérios para diagnóstico clínico proposto com Holm e colaboradores (1993) (Tabela 3) e os critérios posteriormente criados por Gunay-Aygun e colaboradores (2001) para solicitação do exame genético dos pacientes (Tabela 4), tanto em relação ao Paciente 95 como também aos dois casos já descritos na literatura de pacientes com deleções no éxon 7 do *GNAS*.

Tabela 3: Comparação entre o paciente estudado com outros encontrados na literatura que apresentam mutações no gene *GNAS*, utilizando-se os critérios para o diagnóstico clínico proposto por Holm e colaboradores (1993) adaptado.

Crítérios Maiores (1 ponto)	Paciente 95 – 8 anos	Gelfand et al. (2007) – 4 meses	Ham et al. (2014) – 16 anos
Hipotonia neonatal	-	-	-
Dificuldade de alimentação na infância/retardo do desenvolvimento neuropsicomotor	-	NA	NA
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano	+	- (sobrepeso com 4 meses)	+
Hipogonadismo	-	NA	NA
Deficiência mental, problemas de aprendizado	+	NA	NA
Hiperfagia	+	NA	NA
Características faciais	+	+	+
Crítérios Menores (0,5 ponto)			
Diminuição dos movimentos fetais	-	NA	-
Problemas de comportamento	+	NA	NA
Apneia do sono	+	NA	NA
Baixa estatura	+	NA	+
Cabelos, olhos e pele mais claros	+	NA	NA
Mãos e pés pequenos	+	+	+
Mãos estreitas	-	NA	NA
Miopia	-	NA	NA
Saliva viscosa	-	NA	NA
Defeito na articulação das palavras	+	NA	NA
<i>Skin picking</i> / Conduta Auto-Lesiva	-	NA	NA
Total	7	1,5	3,0
Diagnóstico clínico por Holm e colaboradores (1993)	Negativo	Negativo	Negativo

Crítérios de diagnóstico:

Paciente com até 3 anos: 5 pontos, sendo destes, 4 pontos de critérios maiores

Pacientes com > 3 anos: 8 pontos, sendo 5 pontos de critérios maiores.

NA: não avaliado

Tabela 4: Resultado da aplicação dos critérios sugeridos por Gunay-Aygun e colaboradores (2001), para solicitação do exame molecular para diagnóstico da SPW, destacada em negrito as características presentes no paciente 95.

Idade	Crítérios	Paciente 95 – 8 anos	Gelfand et al. (2007) – 4 meses	Ham et al. (2014) – 16 anos
Nascimento até 2 anos	1. Hipotonia com má sucção.		-	
2 –6 anos	1. Hipotonia com histórico de má sucção 2. Atraso geral de desenvolvimento.			
6–12 anos	1. Hipotonia com histórico de má sucção 2. Atraso geral de desenvolvimento 3. Hiperfagia (excesso da ingestão alimentar) com obesidade se não controlado.	-		
A partir de 13 anos	1. Problemas cognitivos; retardo mental moderado. 2. Hiperfagia (excesso da ingestão alimentar) com obesidade se não controlado 3. Hipogonadismo e/ou problemas de comportamento (incluindo ataques de raiva e transtorno obsessivo-compulsivo)			-
Indicação para realização do exame molecular para SPW		Não	Não	Não
Legenda: (+) todos critérios de cada faixa etária presentes no paciente (-) não apresentaram todos critérios de cada faixa etária				

4.1.2 Paciente 101

A técnica de MS-MLPA (kit ME031) detectou uma deleção em heterozigose envolvendo dois éxons o 1A e o 1 do *GNAS* na paciente 101 (Figura 12), que teve o resultado negativo para SPW por PCR-ME assim como para os kits de MLPA anteriormente usados e citados na metodologia (Resultados do arquivo da Dr^a Catielly Ferreira Rocha). A qualidade dos resultados foi também verificada, como descrito acima para a Paciente 95, a partir do eletroferograma (

Figura 13).

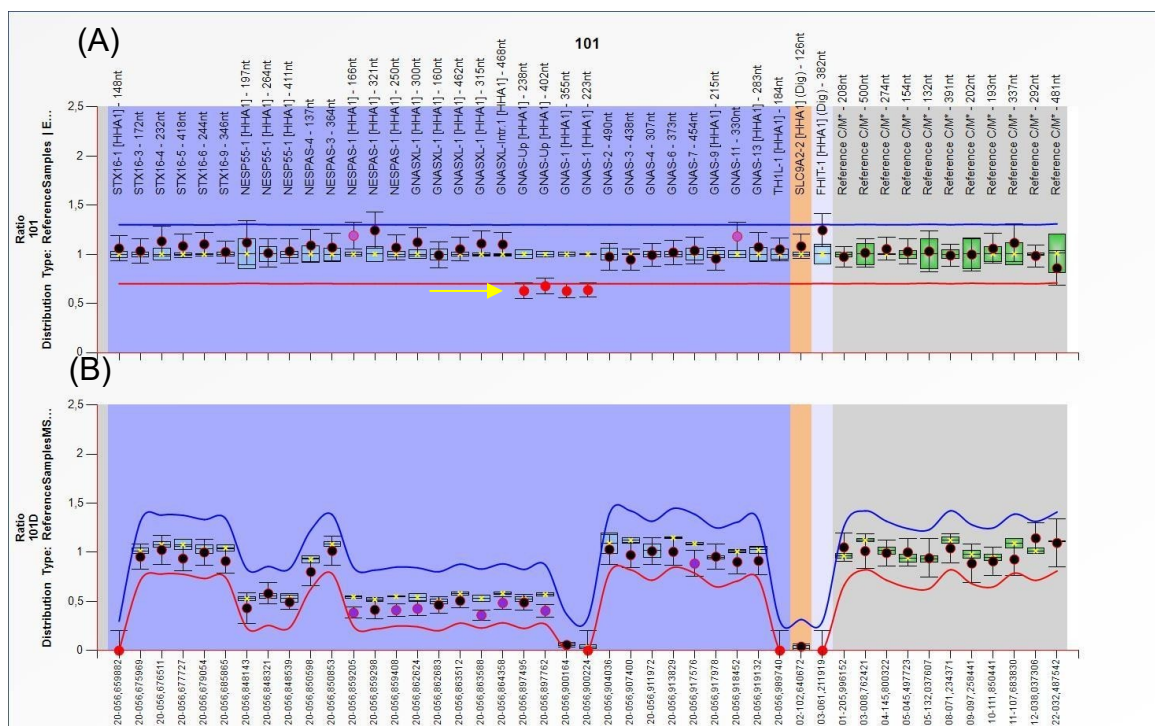


Figura 12: Resultados, obtidos após a MS-MLPA seguida de eletroforese capilar, gerados pelo *software* Coffalyser.NET ilustrando a deleção dos éxons 1A e 1 do GNAS, indicada pela seta amarela (Apêndice B) e padrão de metilação normal. (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação.

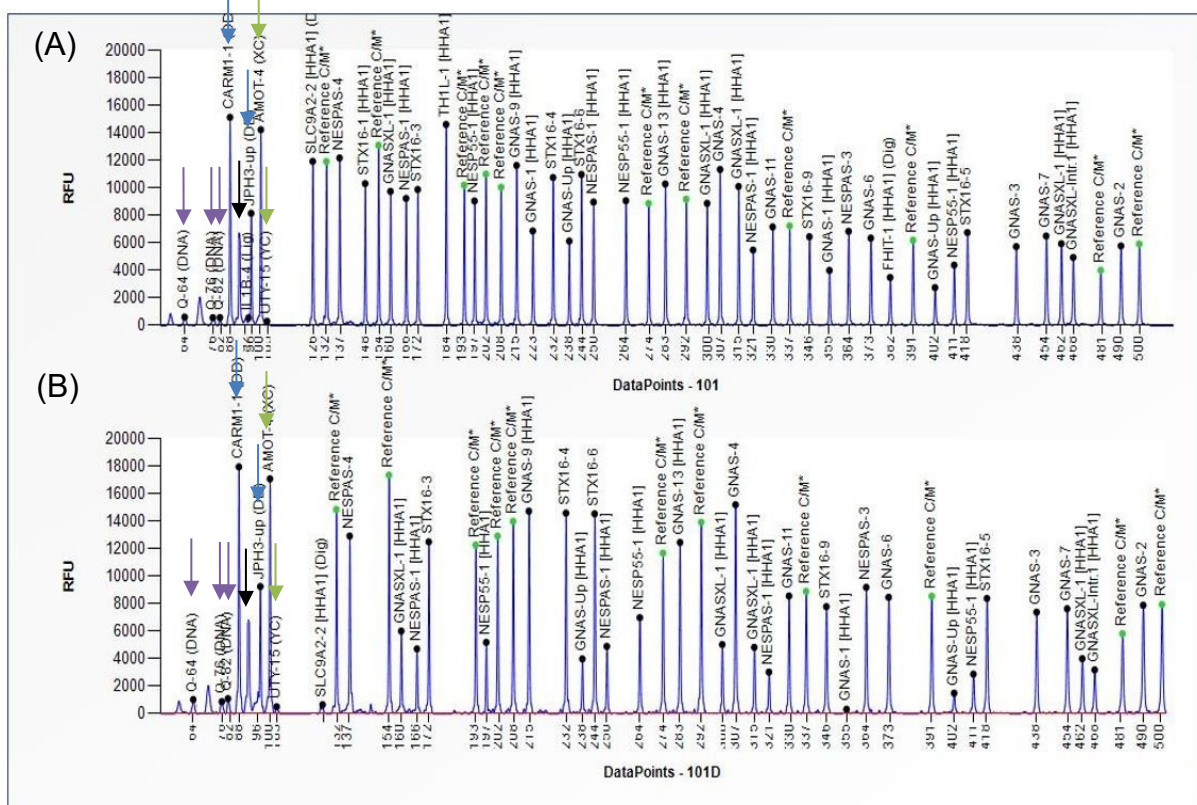


Figura 13: Eletroferograma gerado pelo *software* Coffalyser.NET do paciente 101, padrão que auxilia na verificação da qualidade da amostra e da eletroforese capilar (A) resultado da análise do número de cópias (B) resultado da análise de metilação. Seta preta: pico 92 para comparação, setas roxas: picos 64, 76 e 82 para análise da ligação, setas azuis: picos 88 e 96 para análise da desnaturação e setas verdes: picos dos cromossomos sexuais.

Além dos testes moleculares, foram aplicados os critérios, para diagnóstico clínico, propostos por Holm e colaboradores (1993) (Tabela 5) e os critérios de Gunay-Aygun e colaboradores (2001) para pedido do exame genético (Tabela 6), tanto em relação ao Paciente 101 como também aos dois casos já descritos na literatura de pacientes com deleção no éxon 1A (FERNANDEZ-REBOLLO et al., 2010) e no éxon 1 (REYES et al., 2017) do GNAS.

Tabela 5: Comparação entre o paciente estudado com outros encontrados na literatura que apresentam mutações no gene *GNAS*, utilizando-se os critérios para o diagnóstico clínico, propostos por Holm e colaboradores (1993) adaptado.

Crítérios Maiores (1 ponto)	Paciente 101 – 27 anos	Reyes et al. (2017) – 36 anos	Fernandez-Rebollo et al. (2010) – 15 anos
Hipotonia neonatal	-	NA	-
Dificuldade de alimentação na infância/retardo do desenvolvimento neuropsicomotor	-	NA	NA
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano	+	+	-
Hipogonadismo	-	-	-
Deficiência mental, problemas de aprendizado	+	-	+
Hiperfagia	+	NA	NA
Características faciais	-	-	-
Crítérios Menores (0,5 ponto)			
Diminuição dos movimentos fetais	-	NA	NA
Problemas de comportamento	-	NA	NA
Apneia do sono	-	NA	NA
Baixa estatura	-	NA	NA
Cabelos, olhos e pele mais claros	-	NA	NA
Mãos e pés pequenos	-	+	+
Mãos estreitas	-	NA	NA
Miopia	-	NA	NA
Saliva viscosa	-	NA	NA
Defeito na articulação das palavras	+	NA	NA
<i>Skin picking</i> / Conduta Auto-Lesiva	-	NA	NA
Total	3,5	1,5	1,5
Diagnóstico clínico por Holm e colaboradores (1993)	Negativo	Negativo	Negativo

Crítérios de diagnóstico:

Paciente com até 3 anos: 5 pontos, sendo destes, 4 pontos de critérios maiores

Pacientes com > 3 anos: 8 pontos, sendo 5 pontos de critérios maiores.

NA: não avaliado

Tabela 6: Resultado da aplicação dos critérios sugeridos por Gunay-Aygun e colaboradores (2001), para solicitação do exame molecular para diagnóstico da SPW, destacada em negrito as características presentes no paciente 101.

Idade	Crítérios	Paciente 101 – 27 anos	Reyes et al. (2017) – 36 anos	Fernandez- Rebollo et al. (2010) – 15 anos
Nascimento até 2 anos	1. Hipotonia com má sucção.			
2 –6 anos	1. Hipotonia com histórico de má sucção 2. Atraso geral de desenvolvimento.			
6–12 anos	1. Hipotonia com histórico de má sucção 2. Atraso geral de desenvolvimento 3. Hiperfagia (excesso da ingesta alimentar) com obesidade se não controlado.			
A partir de 13 anos	1. Problemas cognitivos; retardo mental moderado. 2. Hiperfagia (excesso da ingestão alimentar) com obesidade se não controlado 3. Hipogonadismo e/ou problemas de comportamento (incluindo ataques de raiva e transtorno obsessivo-compulsivo)	-	-	-
Indicação para realização do exame molecular para SPW		Não	Não	Não

**Legenda: (+) todos critérios de cada faixa etária presentes no paciente
(-) não apresentaram todos critérios de cada faixa etária**

5. DISCUSSÃO

5.1 Amostragem geral

A partir dos dados coletados das fichas clínicas dos pacientes deste estudo (n=35), foram identificadas quais características daquelas dos critérios estabelecidos por Holm e colaboradores (1993) estavam presentes entre os mesmos (Tabela 7). Dentre os critérios maiores, 91% dos pacientes apresentaram atraso no desenvolvimento mental, 80% tinham quadro de hiperfagia e ganho de peso, a partir de 1 ano de idade, estava presente em 69% deles. Em relação aos critérios menores, as características mais presentes entre os pacientes eram problemas de fala (57%) e lesões de pele (54%). Os critérios maiores, principalmente, explicam o fato de esses pacientes terem sido referidos ao Ambulatório de Genética do HUGG para investigação genética de SPW, assim como fazerem parte do nosso estudo, pois a SPW é a principal causa de obesidade síndrômica. Vale ressaltar que as características mais presentes dos pacientes participantes deste estudo estavam relacionadas com esta condição.

Tabela 7: Frequência relativa, em porcentagem, das características presentes em pacientes deste estudo (n=35) que apresentaram as características da SPW. Destacadas estão as características mais prevalentes.

Características	Porcentagem de pacientes
Hipotonia neonatal	40%
Dificuldade de alimentação	40%
Atraso psicomotor	49%
Ganho de peso a partir de 1 ano	69%
Hipogonadismo	14%
Deficiência mental	91%
Hiperfagia	80%
Características faciais	34%
Diminuição movimentos fetais	17%
Problemas comportamento	49%
Apneia	11%
Baixa estatura	11%
Hipopigmentação	14%
Mãos e pés pequenos	11%
Mão estreita	14%
Miopia	17%
Saliva viscosa	23%
Problema de fala	57%
Lesões de pele	54%

O kit ME031-B2 GNAS foi escolhido a partir de pesquisa na literatura sobre genes e as características de suas mutações que determinam fenótipos semelhantes ao da SPW, principalmente obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual. É importante ressaltar que o nosso grupo já havia investigado por meio de outros kits relacionados com obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual, disponibilizados pelo MRC Holland, sendo eles: Kit P064 – Síndrome de Microdeleção; ME032 – Dissomia uniparental do cromossomo 14; P147 – Alterações no segmento 1p36, P220 – Genes relacionados com obesidade e com a sinalização melanocortina-leptina; e P224 – alterações no PPARG (Anexo F a Anexo J).

A evidência mais direta da importância do *GNAS* na regulação do balanço energético foi verificada a partir de pacientes com AHO. Recentemente foi mostrado que o desenvolvimento da obesidade nesses pacientes somente acontece quando a mutação está no cromossomo de origem materna e geralmente começa no primeiro ano de vida. Esta se torna severa no início da infância e cursa com atraso no desenvolvimento e retardo mental. O que é similar a outras formas de obesidade síndrômica (SPW) e monogênica, como mutações no receptor de melanocortina 4 (MC4R), também relacionadas com o fenótipo PWL (HALDEMAN-ENGLERT; HURST; LEVINE, 2017; WEINSTEIN et al., 2010).

O *GNAS*, como explicitado anteriormente em 1.3.4, tem grande importância para o balanço energético e para o sistema melanocortina-leptina, responsável pela sinalização de saciedade que ocorre no hipotálamo. O início da sinalização de saciedade ocorre pela produção de leptina pelos adipócitos, que por sua vez se ligam aos seus receptores nos neurônios POMC presentes no ARC. A partir da ligação da leptina aos LEPR, a POMC é clivada em α -MSH, um hormônio da família melanocortina, e este se liga a seus receptores no PVN. O receptor do α -MSH é o MC4R, um GPCR que ativa a sinalização G α /AMPc gerando a sensação de saciedade (Figura 6) (RANADIVE; VAISSE, 2008; RODRIGUES; SUPPLY; RADOMINSKI, 2003; WEINSTEIN et al., 2010; YU et al., 1995).

Mutações em genes relacionados com a via de sinalização do sistema melanocortina-leptina podem levar a alterações na sensação de saciedade, levando a um quadro de hiperfagia e, conseqüentemente, obesidade, como é presente nas pacientes 95 e 101.

A técnica utilizada para a detecção das mutações nos pacientes foi a MS-MLPA, uma técnica de PCR multiplex capaz de detectar o aumento ou diminuição do número de cópias do material genético e sua metilação, podendo incluir até 40 sondas que hibridam em diferentes regiões do DNA e são amplificadas por um único par de primers.

5.2 Paciente 95

A paciente 95, do sexo feminino e 8 anos de idade, nasceu com aproximadamente 3.000g e 51cm, de uma gestação a termo, sem intercorrência, cuja mãe negou tabagismo e etilismo. A paciente começou a sentar com 8 meses e andou com 1 ano e 2 meses. O parto foi cesáreo por conta de distocia (anormalidade de tamanho ou posição feral, resultando em dificuldades no parto) e teve alta com a mãe. Na época da consulta a paciente tinha 43,5 kg, 129 cm e 54 cm de perímetro cefálico.

Dentre as características principais da SPW, a paciente apresentava o critério “ganho excessivo de peso a partir de 1 ano e 6 meses”, que na paciente teve início aos 4 anos, problemas de aprendizado, hiperfagia, olhos amendoados e lábio superior fino, problemas de comportamento como fúria, acessos e violência, comportamento obsessivo compulsivo, teimosia e possessividade, apneia do sono, baixa estatura, cabelos, olhos e pele mais claros que os pais e defeito na articulação das palavras.

A Tabela 3 mostra as características descritas por Holm e colaboradores (1993), presentes ou ausentes na paciente 95 e em outros pacientes descritos anteriormente na literatura com deleções do éxon 7 do *GNAS* (GELFAND et al., 2007; HAM et al., 2014). Dentre os critérios maiores, os três pacientes apresentaram características faciais semelhantes à SPW e o paciente de Ham e colaboradores (2014) também apresentou ganho de peso excessivo a partir de 1 ano. Quanto aos critérios menores, todos apresentaram mãos e pés pequenos e o paciente descrito por Ham e colaboradores (2014) também apresentava baixa estatura.

É importante destacar que muitas características não foram avaliadas com os critérios de Holm e colaboradores (1993) nos casos da literatura, como é possível se observar na Tabela 3, o que dificulta a comparação entre os pacientes quanto às características para SPW. Somando-se a pontuação dos pacientes nenhum teve diagnóstico positivo de SPW segundo Holm e colaboradores (1993). O nosso paciente e o caso descrito por Ham e colaboradores (2014) precisariam alcançar 8 pontos e

eles obtiveram 7 e 3 pontos respectivamente, e o caso descrito por Gelfand e colaboradores (2007) precisaria de pelo menos 5 pontos, porém este só obteve 1,5. Ressaltamos que os três pacientes não apresentaram as características clínicas completas conforme Holm e colaboradores (1993) para SPW.

Utilizando-se os critérios para solicitação do exame genético para SPW sugeridos por Gunay-Aygun e colaboradores (2011) (Tabela 4), estratificado de acordo com a idade dos pacientes, é possível se observar que os dois pacientes descritos na literatura e a Paciente 95 não apresentaram os sintomas e sinais necessários para que fossem indicados para realização do teste molecular PCR-ME, todos pela ausência de hipotonia e no caso da Paciente 95 também por não apresentar atraso geral de desenvolvimento.

Faz-se necessário ressaltar que a técnica de MS-MLPA apresenta limitação. Assim, a presença de polimorfismos ou de mutações que alterem a sequência de nucleotídeos pode impedir a ligação das referidas meia-sondas, não havendo amplificação da região alvo. Por isso, pode ser gerado um resultado semelhante a uma deleção. No caso da Paciente 95, pela sua suposta deleção ter ocorrido em apenas um éxon, não se pode descartar essa possibilidade, ou seja, uma falsa deleção. Vale ressaltar, entretanto, que o resultado do MLPA mostra a não amplificação completa da região alvo em um dos cromossomos homólogos, pois o valor 0,5 indica presença de deleção em heterozigose da região em questão. Sendo assim, uma segunda técnica de biologia molecular, como a-CGH (do inglês: *array-Comparative Genomic Hybridization*), seria necessária para a confirmação do achado, isto é, se seria confirmada a deleção ou não. De qualquer forma foi encontrada uma alteração no éxon 7.

5.3 Paciente 101

A Paciente 101, do sexo feminino e com 27 anos, nasceu a termo, com aproximadamente 2.600g e chorou logo ao nascer. Falou e andou com 1 ano de idade e sua menarca foi aos 9 anos. Na época da consulta a paciente tinha 110kg, 160cm e 58cm de perímetro cefálico.

Dentre as características principais da SPW, a paciente apresentou “ganho excessivo de peso a partir de 1 ano e 6 meses”, a obesidade teve início aos 3 anos, apresentou também deficiência mental e problemas de aprendizado, hiperfagia,

comportamento obsessivo-compulsivo, teimosia e defeito na articulação das palavras. Algumas outras observações feitas foram o hábito de chupar o dedo, cair com frequência e falta de interesse em aprender.

Para ser feita a comparação das características descritas por Holm e colaboradores (1993) da Paciente 101 com a dos outros pacientes descritos anteriormente na literatura somente foi realizada com portadores de deleções individuais do éxons 1A e 1 do *GNAS*, visto que não foi encontrado na literatura, até o momento, o relato de um indivíduo que apresentasse deleção de ambos os éxons 1 e 1A.

Foram observadas algumas características de SPW presentes e outras ausentes na Paciente 101 e nos casos apresentados por Fernandez-Rebollo e colaboradores (2010) e Reyes e colaboradores (2017). Dentre os critérios maiores, a Paciente 101 apresentou ganho excessivo de peso a partir de 1 ano, característica também presente no caso descrito por Reyes e colaboradores (2017). Já no caso descrito por Fernandez-Rebollo e colaboradores (2010) o paciente apresentou um quadro de obesidade a partir dos 5 meses de idade. A Paciente 101 e o paciente de Fernandez-Rebollo e colaboradores (2010) também apresentaram deficiência mental moderada. É interessante ressaltar também a ausência nos três casos de hipogonadismo e características faciais. Nos critérios menores não houve características presentes em comum a todos, a Paciente 101 apresentava defeito na articulação das palavras e os pacientes da literatura tinham mãos e pés pequenos.

É importante destacar que muitas características não foram avaliadas nos casos da literatura, como é possível se observar na Tabela 5, o que dificulta a comparação entre os pacientes quanto às características da SPW. Somando-se as pontuações dos pacientes nenhum teria sido positivo para este diagnóstico clínico, visto que precisariam alcançar 8 pontos e a Paciente 101 teve 3,5 pontos e os casos da literatura somaram 1,5 pontos cada.

Utilizando-se os critérios para solicitação do exame genético para SPW sugeridos por Gunay-Aygun e colaboradores (2011) (Tabela 6), estratificado de acordo com a idade dos pacientes, é possível se observar que os dois pacientes descritos na literatura e a Paciente 101 não apresentaram os sintomas e sinais necessários para que fossem encaminhados para realização do teste molecular PCR-ME, todos pela ausência de hipotonia.

Mesmo com a limitação da técnica de MS-MLPA em relação a polimorfismos e possível resultado de falso positivo para deleção, a deleção da Paciente 101 foi identificada em éxons adjacentes e que foram investigados utilizando quatro sondas, duas para cada éxon. Sendo assim, é possível ser sugerida a presença de deleção da região, afetando os éxons 1A e 1, pois é mais provável do que a existência de polimorfismos em pelo menos dois dos quatro locais de hibridação das quatro sondas, o que impediria a ligação das mesmas nas regiões alvo, impedindo a amplificação da região por PCR.

É interessante a comparação entre os casos 95 e 101. É possível se observar uma diferença dos quadros clínicos entre os Pacientes 95 e 101: tendo o primeiro apresentado um quadro com características e fenótipo mais semelhantes à SPW (7 pontos) do que o 101. Essa diferença pode se dar pelo fato de as mutações nos éxons 1A e 1 no 101 não comprometerem tanto a transcrição e consequentes tradução e funcionamento da proteína $G\alpha$. Mesmo em ambos os casos serem possíveis deleções em heterozigose, uma deleção do éxon 7 (Paciente 95) pode levar a uma completa não-funcionalidade da proteína. Ressaltamos que os éxons 2 a 13 são essenciais para a síntese de outras proteínas codificadas na região, como o $Xlas$, $NESP55$ e $1A$ (Figura 3). Já uma deleção dos éxons 1A e 1 em heterozigose, além de ter o alelo normal para compensação, somente o éxon 1 estaria comprometendo a expressão proteína $G\alpha$. Além disso, a proteína 1A é uma forma truncada da proteína $G\alpha$, sem a região de ligação com as subunidades β e γ , porém ela pode interagir com o GPCRs. Sendo assim, uma das ações da proteína 1A seria a ligação com os GPCRs, competindo com a $G\alpha$ e diminuindo a sua ação (ISHIKAWA et al., 1990; LIU et al., 2000a, 2000b, 2005; PUZHKO et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2004).

Também é interessante ressaltar no caso da paciente 101 que, como o padrão de metilação do éxon 1A estava normal (Figura 12), a mutação possivelmente ocorreu no cromossomo paterno, já que no cromossomo de origem materna o éxon 1A encontrava-se metilado e este último foi detectado pela MS-MLPA normalmente.

A partir destes resultados, é possível se iniciar o aconselhamento genético com maior foco para as questões endócrinas, principalmente os hormônios relacionados aos GPCR, como TSH, LH, FSH e GHRH de ambas as pacientes. Assim, será possível se investigar PHP e PPHP, visando a possibilidade de tratamento, com

atenção para possíveis complicações relacionadas com mutações do *GNAS*, como ossificações subcutâneas.

Finalmente, a partir dos resultados deste estudo, ficou clara a dificuldade do diagnóstico clínico e molecular de obesidade síndrome. Dos 75 pacientes que apresentaram o quadro de obesidade síndrome e foram investigados com o teste de PCR-ME para SPW, apenas 29 foram positivos para SPW. Isso significa que os demais 46 pacientes que apresentaram o quadro não tinham confirmação de SPW por diagnóstico molecular. Destes 46 pacientes, 11 foram diagnosticados por meio dos kits P064, ME032, P147, P220, e P224 (POSSA-PARANHOS, 2017; ROCHA, 2011, 2017), restando os 35 que foram testados neste estudo. Neste trabalho foi possível se sugerir uma hipótese diagnóstica para dois dos 35 pacientes, utilizando-se da técnica de MS-MLPA para mutações no *GNAS*. Entretanto, para confirmação da hipótese, é necessário que seja realizada a-CGH dos pacientes e seus pais.

6. CONCLUSÃO

No início do desenvolvimento deste projeto, foi verificado que dos 75 pacientes iniciais apenas 38% (n=29) que apresentaram o quadro de obesidade sindrômica foram positivos para SPW. Dentre os restantes que foram negativos para SPW (n=46), só foram encontradas alterações no número de cópias (com cinco diferentes kits de MLPA para retardo mental e obesidade) em 11 deles (24%), restando 35 pacientes sem diagnóstico genético.

No presente estudo foi possível se identificar mais um gene envolvido com obesidade sindrômica, o *GNAS*.

A técnica de MS-MLPA (kit ME031 para o *GNAS*) foi capaz de detectar mais dois pacientes com fenótipo PWL, sendo encontradas uma aparente deleção do éxon 7 no Paciente 95 e deleção dos éxons 1A e 1 no Paciente 101. Portanto, 33 pacientes ficaram ainda sem diagnóstico genético. Os dois pacientes identificados como portadores das mutações encontradas apresentam características fenotípicas similares aos pacientes com a Síndrome de Prader-Willi, sendo utilizado os critérios para diagnóstico clínico para a síndrome por Holm et al. (1993) e os critérios sugeridos Gunay-Aygun et al. (2001) para indicação de solicitação do exame molecular da síndrome.

Sendo assim, ficou evidente a dificuldade do diagnóstico genético de obesidade sindrômica, havendo necessidade da realização de outros testes moleculares, como por exemplo a-CGH (do inglês *array-Comparative Genomic Hybridization*) e WGS (do inglês, *Whole Genome Sequencing*) para se poder fazer mais correlações genótipo-fenótipo, favorecendo o aconselhamento genético e o tratamento adequado quando disponível.

CAPÍTULO II - Revisão sistemática sobre fenótipo PWL

2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO II

2.1 Objetivos gerais

Realizar revisão sistemática da literatura dos trabalhos publicados sobre fenótipo Prader-Willi *like*, suas mutações e características clínicas, por meio do protocolo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) e submissão ao *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO).

2.2 Objetivos específicos

- I. Analisar os artigos dos últimos 10 anos de casos de fenótipo PWL encontrados por meio de revisão sistemática e correlacionar os fenótipos com os genótipos desses casos.
- II. Discutir sobre as regiões cromossômicas, genes e suas funções para entender as prováveis causas das características fenotípicas de Prader-Willi *like*.

3. METODOLOGIA

A revisão sistemática foi iniciada com o estabelecimento do PICO: População (pacientes com fenótipo PWL), Intervenção (diagnóstico molecular para as mutações que causaram o fenótipo dos pacientes), Comparador (optativo, como é um estudo baseado em diagnósticos e muitas vezes casos isolados, não há uma população para comparar) e *Outcome* (desfecho: relacionar o genótipo com o fenótipo dos pacientes com fenótipo PWL e comparar as características presentes e ausentes de SPW). As informações e objetivos da revisão foram enviados para a plataforma PROSPERO, com número de registro CRD42020149136.

A pesquisa dos artigos foi feita em três bases de dados diferentes: Pubmed, Web of Science e Scielo. As palavras-chaves podem ser observadas no Quadro 10.

Quadro 10: Bases de dados e os termos utilizados de busca em cada.

Base de dados	Termos
Pubmed	"Prader-Willi like" [title/abstract] or "Prader-Willi syndrome phenotype"[title/abstract]. Publication dates: 10 years.
Web of Science	TÓPICO: ("prader-willi like") OR TÓPICO: ("prader-willi phenotype") Tempo estipulado: 2009-2019. Índices: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI.
Scielo	(prader-willi like) OR (Prader-Willi syndrome phenotype) Todos os índices e anos a partir de 2009

Os critérios de inclusão para a escolha dos artigos foram estudo de casos e estudos de coorte de pacientes com fenótipo PWL, que incluíssem caracterização fenotípica e genotípica dos pacientes. Os critérios de exclusão foram: resumos de congressos, artigos em outras línguas diferentes de inglês, espanhol e francês, estudos com animais, artigos de revisão ou qualquer tipo de artigo que apresentasse casos sem que fossem feitos testes moleculares para confirmar as mutações relacionadas com os genes *SNRPN-SNURF*, que determinam SPW, e não fenótipo PWL.

Após a busca nas bases de dados, a seleção dos artigos passou por três etapas (Figura 14 de Resultados). A primeira etapa de seleção foi a exclusão dos artigos que se apresentaram em duplicidade nas diferentes fontes de busca. Posteriormente foram verificados os títulos e resumos que não estavam relacionados com os objetivos da revisão. A etapa seguinte foi a leitura completa dos artigos e a exclusão dos artigos que não seguiam os critérios de inclusão.

4. RESULTADOS

Foram encontrados um total de 78 artigos com a busca dos termos nas três bases de dados, sendo 32 na Pubmed, 2 na Scielo, 44 na Web of Science e 1 artigo, que se enquadrava nos critérios, selecionado a partir da lista de referências de outros artigos (Figura 14).

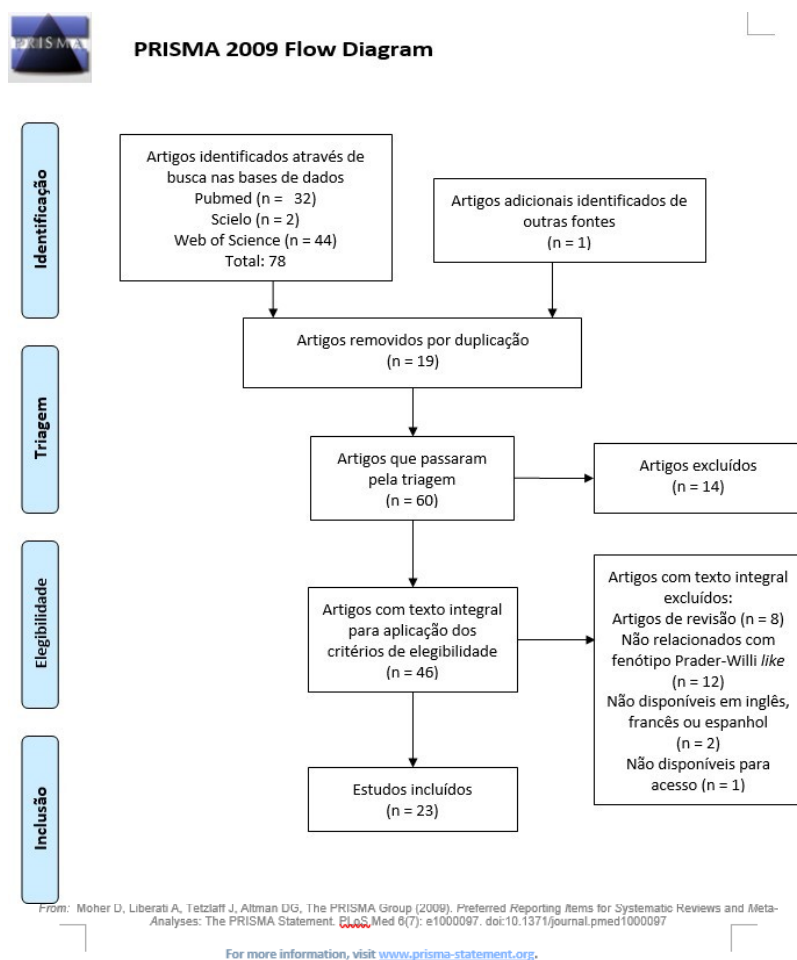


Figura 14: Diagrama do PRISMA apresentando a metodologia de seleção dos artigos. Fonte: na imagem.

Na etapa de exclusão dos artigos duplicados foram removidos 19, permanecendo 60 artigos. Dentre estes, 14 foram excluídos pela verificação do título e resumo. A leitura dos artigos restantes possibilitou a exclusão de mais 23, tendo como principais razões artigos não disponíveis em inglês, francês ou espanhol, artigos que não estavam disponíveis para acesso e casos clínicos que não eram relacionados com o fenótipo PWL, ou que as mutações estavam diretamente relacionados com a

região da SPW, sendo os pacientes descritos e classificados como SPW e não como fenótipo PWL. Assim, 23 artigos foram incluídos na revisão. O Quadro 11 mostra os artigos finais selecionados, as mutações e os fenótipos dos pacientes descritos.

Quadro 11: Resumo dos resultados dos artigos selecionados, as mutações envolvidas, as características do fenótipo PWL e métodos de investigação celular.

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Hidalgo-Santos e colaboradores (2018)	A Novel Mutation of <i>MAGEL2</i> in a Patient with Schaaf-Yang Syndrome and Hypopituitarism.	Pubmed	2 anos e 9 meses	F	Sequenciamento	Mutação <i>nonsense</i> (c.3019 C>T) no alelo paterno do <i>MAGEL2</i>	Baixa estatura, rosto redondo, hipotonia, problemas de comunicação, atraso no desenvolvimento, deficiência de GH.
Candelo e colaboradores (2018)	First Case Report of Prader-Willi-Like Syndrome in Colombia.	Pubmed	9 anos	M	Cariótipo e microarray cromossomal (CMA)	Deleção de 14,97Mb em 6q16-q21	Hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento psicomotor, estrabismo, baixa estatura, atraso na fala e obesidade.
Enya e colaboradores (2018)	Three patients with Schaaf-Yang syndrome exhibiting arthrogryposis and endocrinological abnormalities	Pubmed	P1: 6 anos P2: 1 ano P3: 15 anos	P1: F P2: M P3: F	<i>Whole Genome Sequence</i> (WGS)	<i>MAGEL2</i> P1: <i>nonsense</i> c.1912 C>T P2: c.1912 C>T P3: c.3131C>A	P1: Hipotonia neonatal e olhos amendoados P2: hipotonia neonatal P3: hipotonia neonatal
Geets e colaboradores (2018)	DNA sequencing and copy number variation analysis of <i>MCHR2</i> in a cohort of Prader Willi like (PWL) patients.	Pubmed	P1: 9 anos P2: 19 anos	P1: F P2: F	<i>Genome-wide microarray</i> e sequenciamento Sanger	Mutações do <i>MCHR2</i> P1: c.139A>G P2: c*16 A>G	P1: Obesidade e problemas de aprendizado P2: Obesidade e problemas de aprendizado

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Fountain e colaboradores (2017)	The phenotypic spectrum of Schaaf-Yang syndrome: 18 new affected individuals from 14 families.	Pubmed	P1: 15 anos P2: 6 anos	P1: M P2: F	Sequenciamento sanger	Ambos mutação do tipo deslocamento de fase de leitura no <i>MAGEL2</i> (c.1996dupC)	P1: Hipotonia neonatal e dificuldade de alimentação, hipogonadismo, problemas cognitivos e comportamentais. P2: hipotonia neonatal e dificuldade de alimentação, sem hiperfagia.
Dello Russo e colaboradores (2016)	Microdeletion 15q26.2qter and Microduplication 18q23 in a Patient with Prader-Willi-Like Syndrome: Clinical Findings.	Pubmed	23 anos	M	FISH, MLPA e array-CGH	46, XY, +der(15)t(15;18)(q26.12;q23)	Hiperfagia, baixa estatura, obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual
Geets e colaboradores (2016)	Copy number variation (CNV) analysis and mutation analysis of the 6q14.1-6q16.3 genes <i>SIM1</i> and <i>MRAP2</i> in Prader Willi like patients.	Pubmed	4 casos	-	<i>Genome-wide microarray</i>	Região: 6q14.1–q16.3. <i>SIM1</i> : p.P352S <i>MRAP2</i> : c.603C>T (p.H201H), c.477C>T (p.N159N), c.374G>A (p.R125H)	Paciente com mutação no <i>SIM1</i> : obesidade, problemas de comportamento e atraso no desenvolvimento intelectual. Pacientes com mutações no <i>MRAP2</i> : obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual.

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Desch e colaboradores (2015)	6q16.3q23.3 duplication associated with Prader-Willi-like syndrome.	Pubmed	NA	NA	FISH, array-CGH	Duplicação de 30,9 Mb em 6q16.3q23.3 e duplicação de 3.5 Mb em 10p11.21p11.1	Obesidade, mãos e pés pequenos, baixa estatura, hipotonia e características faciais.
El Khattabi e colaboradores (2014)	Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including <i>SIM1</i> .	Pubmed	15 pacientes	P1: M P2: F P3: M P4: M P5: M P6: F P7: M P8: F P9: F P10: M P11: M P12: M P13: M P14: M P15: M	Microarray cromossomal e FISH	Deleções em 6q16 P1: 14Mb P2: 5,11Mb P3: 5,1Mb P4: 4,2Mb P5: 3,64Mb P6: 3,64Mb P7: 7,47Mb P8: 2,89Mb P9: 2,2Mb P10: 11Mb P11: 7,84Mb P12: 2,2Mb P13: 5,49Mb P14: 1,73Mb P15: 3,42Mb	Hipotonia: 3/15 Dificuldades de alimentação: 4/15 Atraso psicomotor: 13/15 Atraso no desenvolvimento intelectual: 14/15 Problemas de comportamento: 10/15 Problemas de sono: 4/15 Hiperfagia: 5/15 Obesidade: 9/15 Rosto redondo e outras características faciais: 11/15 Mãos e pés pequenos: 2/15 Miopia: 3/15 Estrabismo: 2

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Õiglane-Shlik e colaboradores (2014)	Monosomy 1p36 - a multifaceted and still enigmatic syndrome: four clinically diverse cases with shared white matter abnormalities.	Pubmed	NA	NA	Microarray cromossomal	4 mutações em 1p36	<p>Obesidade: P1</p> <p>Mãos e pés pequenos: P1</p> <p>Hipotonia: P2, P3</p> <p>Problemas de visão: P1, P2, P3, P4</p> <p>Atraso psicomotor: P1, P2, P3, P4</p> <p>Atraso no desenvolvimento intelectual: P1, P2, P3, P4</p> <p>Problemas na fala: P1, P2, P3, P4</p> <p>Problemas de comportamento: P1, P2, P4</p>
Stagi e colaboradores (2014)	Type II diabetes and impaired glucose tolerance due to severe hyperinsulinism in patients with 1p36 deletion syndrome and a Prader-Willi-like phenotype.	Pubmed	NA	NA	Array-CGH	<p>Deleções na região 1p36.33</p> <p>P1: 1,5Mb</p> <p>P2: 2,5Mb</p>	<p>P1 e P2: características faciais, mãos e pés pequenos, atraso psicomotor, atraso no desenvolvimento intelectual, hipotonia, estrabismo, problemas de comportamento, baixo peso ao nascer, hiperfagia e obesidade</p>

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Doco-Fenzy e colaboradores (2014)	Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the <i>ACP1</i> , <i>TMEM18</i> , and <i>MYT1L</i> genes.	Pubmed	P1: 5 anos P2: 14 anos P3: 9 anos P4: 13 anos P5: 6 anos	P1: F P2: F P3: M P4: F P5: F	Array-CGH e FISH	Deleção em 2p25 P1: 1,98Mb P2: 2,36Mb P3: 2,46Mb P4: 2,90Mb P5: 1,34Mb	Todos: Atraso psicomotor e intelectual, problemas na fala, hiperfagia e obesidade. P1: hipotonia, mãos e pés pequenos, características faciais e apneia noturna P2: hipotonia e características faciais, P3: estrabismo P4: mãos e pés pequenos, características faciais e apneia noturna P5: hipotonia, mãos e pés pequenos e características faciais
Izumi e colaboradores (2013)	Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving <i>SIM1</i> and Prader-Willi syndrome-like features.	Pubmed	18 anos	M	SNP-microarray	Deleção em 6q16.1-q21	Características faciais, hipotonia, problemas de comportamento, hipogonadismo, déficit cognitivo e obesidade.

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Marangi e colaboradores (2013)	<i>TRAPPC9</i> -related autosomal recessive intellectual disability: report of a new mutation and clinical phenotype.	Pubmed	P1: 5 anos P2: 3 anos	P1: F P2: F	Array-CGH, MS-MLPA, SNP array e sequenciamento do exoma	<i>Stretch</i> de homozigidade de 13,8Mb em 8q24, causando alteração do éxon 18 do <i>TRAPPC9</i>	P1: hipotonia, obesidade, características faciais, problemas de comportamento e atraso no desenvolvimento mental e fala P2: atraso psicomotor, obesidade, hipotonia, características faciais, problemas de comportamento e atraso no desenvolvimento mental e fala
Ben-Abdallah-Bouhjar e colaboradores (2012)	Chromosomal microarray analysis of functional Xq27-qter disomy and deletion 3p26.3 in a boy with Prader-Willi like features and hypotonia.	Pubmed	2 anos	M	FISH e array-CGH	Duplicação em Xq27 e deleção em 3p26.3	Atraso no desenvolvimento psicomotor, hipotonia, problemas na fala, características faciais e hipogonadismo.

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Wentzel e colaboradores (2010)	Interstitial Deletions at 6q14.1-q15 Associated with Obesity, Developmental Delay and a Distinct Clinical Phenotype.	Pubmed	P1: 17 anos P2: 3 anos	P1: F P2: M	Array-CGH, MLPA, FISH	P1: deleção de 8.73 Mb em 6q14.1-q15 P2: duplicação de 2.55Mb em 1p31.1 e deleção de 4.50Mb em 6q14.1-q15	P1: hipotonia neonatal com problemas de sucção, atraso no desenvolvimento psicomotor, características faciais, mão e pés pequenos e obesidade, problemas de comportamento P2: hipotonia neonatal com problemas de sucção, atraso no desenvolvimento intelectual, obesidade, hiperfagia, problemas de comportamento e atraso psicomotor

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Tsuyusaki e colaboradores (2010)	1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype.	Pubmed	P1: 9 anos P2: 10 anos	P1: F P2: M	FISH	Deleção na região 1p36 P1: entre 4,17 e 4,36Mb P2: entre 4.89 e 6.09Mb	Ambos: hipotonia neonatal, rápido ganho de peso após 1 ano, hipogonadismo, problemas cognitivos, atraso psicomotor, hiperfagia, características faciais, hipopigmentação, obesidade, hiperfagia, baixa estatura e problema na articulação das palavras P1: mão e pés pequenos, mão estreita, P2: miopia e problemas de comportamento
Martínez-Cerdeño e colaboradores (2017)	<i>FMR1</i> premutation with Prader-Willi phenotype and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome	Web of Science	55 anos	M	NA	Permutação com 73 repetições de CGG no <i>FMR1</i> (X-frágil)	Problemas de aprendizado, hiperfagia, atraso psicomotor e obesidade. Mudanças cerebrais descritas anteriormente em SPW, como córtex mais espesso com decréscimo da espessura nas camadas IV-VI, com menor número de neurônios corticais.

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Linhares e colaboradores (2016)	Inherited Xq13.2-q21.31 duplication in a boy with recurrent seizures and pubertal gynecomastia: Clinical, chromosomal and a-CGH characterization	Web of Science	16 anos	M	FISH, teste de inativação do cromossomo X e array-CGH	Duplicação de herança materna de ~18.3 Mb em Xq13.2-q21.31	Atraso no desenvolvimento e crescimento, hipotonia, atraso no desenvolvimento intelectual, conduta auto lesiva e características faciais.
Rosenfeld e colaboradores (2012)	Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases	Web of Science	P3: 12 anos P9: 12 anos P10: 3 anos P11: 11 anos	P3: F P9: M P10: F P11: F	Array-CGH e FISH	Deleção na região 6q	Todos: obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual P3: hipotonia e problemas motores P9: hipotonia e mãos e pés pequenos P11: hipotonia

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Pramyothin, Pithukpakorn e Arakaki. (2010)	A 47, XXY patient and Xq21.31 duplication with features of Prader-Willi syndrome: results of array-based comparative genomic hybridization	Web of Science	20 anos	M	Array-CGH e FISH	47, XXY, dup(X) (q21.31)	Obesidade, baixa estatura, hipogonadismo e atraso no desenvolvimento intelectual.
Vandersteen e colaboradores (2009)	Genetic diagnosis in clinical psychiatry: A case report of a woman with a 47, XXX karyotype and Fragile X syndrome	Web of Science	41 anos	F	Bandeamento G, MLPA e QF-PCR	47, XXX	Problemas cognitivos, problemas de comportamento, obesidade consequente de hiperfagia e baixa estatura.

Autores e ano	Título do artigo original	Base de dados	Idade	Sexo	Técnica	Mutação	Fenótipo PWL
Schaaf e colaboradores (2013)	Truncating mutations of <i>MAGEL2</i> cause Prader-Willi phenotypes and autism.	Outras fontes	P1: 12 anos P2: 8 anos P3: 5 anos P4: 17 anos	P1: M P2: M P3: M P4: M	WGS	<p>Mutações em <i>MAGEL2</i>:</p> <p>P1: c.1652delT p.Val551fs</p> <p>P2: c.1802delC Pro601fs</p> <p>P3: c.3181_3182del p.Ile1060fs</p> <p>P4: c.3124C>T p.Gln1024</p>	<p>Hipotonia neonatal: P1, P2 e P3</p> <p>Dificuldade de alimentação na infância: P2, P3 e P4</p> <p>Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano: P1, P2 e P3</p> <p>Hipogonadismo: P1, P2 e P3</p> <p>Deficiência mental, problemas de aprendizado: P1, P2, P3 e P4</p> <p>Hiperfagia: P2 e P4</p> <p>Características faciais: P2</p> <p>Problemas de comportamento: P3 e P4</p> <p>Apneia do sono: P2 e P4</p> <p>Baixa estatura: P3 e P4</p> <p>Mãos e pés pequenos: P4</p> <p>Mãos estreitas: P4</p> <p>Problemas de visão: P2, P3 e P4</p> <p>Saliva viscosa: P3 e P4</p> <p>Defeito na articulação das palavras: P2, P3 e P4</p> <p>Conduta auto lesiva: P3 e P4</p>

5. DISCUSSÃO

Nos 23 artigos selecionados, foram descritos 56 casos de pacientes com fenótipo PWL e suas mutações em 11 regiões e genes diferentes: 1p36, 1p31.1, 2p25, 3p26.3, 6q, 8q, 10p11.21p11.1, 15q11.2 (*MAGEL2*), Cromossomo X e translocações entre os cromossomos 15 e 18 (Quadro 12).

Quadro 12: Mutações descritas nos artigos selecionados.

Genes/regiões mutadas	Mutações
<p>6q (<i>SIM1</i>, <i>MCHR2</i> e <i>MRAP2</i>)</p>	<p>4 deleções na região 6q (ROSENFELD et al., 2012) deleção 6q14.1–q15 (WENTZEL et al., 2010) 6q14.1–q16.3: p.P352S (GEETS et al., 2016) 15 deleções em 6q16, (EL KHATTABI et al., 2014) deleção em 6q16-q21, (CANDELO et al., 2018) deleção em 6q16.1-q21, (IZUMI et al., 2013) <i>MCHR2</i>: c.139A>G, (GEETS et al., 2018) <i>MCHR2</i>: c*16 A>G (GEETS et al., 2018) <i>MRAP2</i>: c.374G>A (p.R125H) (GEETS et al., 2016) <i>MRAP2</i>: c.477C>T (p.N159N), (GEETS et al., 2016) <i>MRAP2</i>: c.603C>T (p.H201H), (GEETS et al., 2016)</p>
<p><i>MAGEL2</i> (15q11.2)</p>	<p>c.1652delT p.Val551fs (SCHAAF et al., 2013) c.1802delC Pro601fs (SCHAAF et al., 2013) sem sentido c.1912 C>T, (ENYA et al., 2018) c.1912 C>T, (ENYA et al., 2018) 2 mutações mudança da matriz de leitura c.1996dupC, (FOUNTAIN et al., 2017) mutação sem sentido (c.3019 C>T), (HIDALGO-SANTOS et al., 2018) c.3124C>T p.Gln1024 (SCHAAF et al., 2013) c.3131C>A, (ENYA et al., 2018) c.3181_3182del p.Ile1060fs (SCHAAF et al., 2013)</p>
<p>1p36</p>	<p>2 deleções 1p36 (TSUYUSAKI et al., 2010) 2 deleções em 1p36.33 (STAGI et al., 2014) 4 casos de fenótipo PWL de monossomia do 1p36 (ÖIGLANE-SHLIK et al., 2014)</p>
<p>2p25</p>	<p>5 deleções (DOCO-FENZY et al., 2014)</p>
<p>8q</p>	<p>8q24 (MARANGI et al., 2013)</p>

Genes/regiões mutadas	Mutações
Cromossomo X	47, XXX (VANDERSTEEN et al., 2009) 47, XXY, dup(X) (q21.31) (PRAMYOTHIN; PITHUKPAKORN; ARAKAKI, 2010) duplicação Xq13.2q21.31 (LINHARES et al., 2016) permutação com 73 repetições de CGG no <i>FMR1</i> (X-frágil) (MARTÍNEZ-CERDEÑO et al., 2017)
Translocações	t(15; 18)(q26.1 ~ 2;q23), (DELLO RUSSO et al., 2016)
Outros	Duplicação em Xq27 e deleção em 3p26.3 (BEN-ABDALLAH-BOUHJAR et al., 2012) Duplicação 6q16.3q23.3 e duplicação em 10p11.21p11.1, (DESCH et al., 2015) Duplicação do 1p31.1 e deleção do 6q14.1–q15 (WENTZEL et al., 2010)

A característica relacionada à SPW descrita com maior frequência foi o atraso no desenvolvimento intelectual, que esteve presente em 78,6% dos casos, seguida de obesidade (75%), problemas de comportamento (62,5%), hipotonia e atraso no desenvolvimento psicomotor (ambos 60,7%), características faciais (48,2%), hiperfagia (37,5%), baixa estatura (35,7%), atraso na fala ou problema na articulação das palavras (30,3%), mãos e pés pequenos (26,8%) e hipogonadismo (16%).

As características mais frequentes citadas acima também foram observadas dentre os 35 pacientes descritos no Capítulo I desta dissertação, como as relacionadas com atraso no desenvolvimento intelectual, hiperfagia e consequente obesidade, além do atraso no desenvolvimento psicomotor e problemas de comportamento que em ambos os grupos ficaram com frequências próximas.

5.1 Genes encontrados em 6q: gene *homólogo 1 do gene minded de Drosófila (SIM1)*, gene da *proteína 2 acessória do receptor 2 de melanocortina (MRAP2)* e gene do *receptor 2 do hormônio concentrador de melanina (MCHR2)*

A região cromossômica com maior ocorrência de mutações que ocasionaram fenótipo PWL foi a 6q, que compreende o gene *SIM1*, que foi descrito em 28 pacientes. Foi proposto por Hopkin e colaboradores (1997) que diferentes locais de deleção do *locus* 6q podem levar a diferentes fenótipos. Deleções proximais, abrangendo 6q11-q16 estão relacionadas com pálpebras arqueadas, lábios finos e hérnias, já deleções medianas em 6q16-25 são mais associadas com retardo de crescimento intrauterino,

problemas respiratórios, hipertelorismo ocular e malformação dos membros superiores, já as deleções terminais no *locus* 6q25-qter estão relacionadas com problemas de retina, lábio leporino e hipoplasia genital.

Alterações no *SIM1*, localizado na região 6q16.3, têm sido associadas com a obesidade de etiologia cromossômica e sua deleção resulta em fenótipo Prader-Willi *like*. O papel desse gene é fundamental na diferenciação neuronal dentro do núcleo paraventricular do hipotálamo, responsável pela saciedade alimentar. As semelhanças fenotípicas entre pacientes com deficiência em *SIM1* e deficiência em *MC4R* sugerem que alguns dos efeitos da deficiência do *SIM1* são mediados por sinalização de melanocortina alterada, já que o *MC4R* apresenta papel fisiológico no sistema melanocortina-leptina. Em alguns casos, a alteração genética nos transportadores do *SIM1* pode determinar características neurocomportamentais do espectro autista. Essas características não são típicas da deficiência em *MC4R*, mas mostram alguma sobreposição clínica com o fenótipo comportamental observado em pacientes com SPW (BARSH; FAROOQI; RAHILLY, 2000).

Dos artigos selecionados, El Khattabi e colaboradores (2014) diagnosticou 15 pacientes com fenótipo PWL com deleções do segmento 6q16 que variavam entre 1,73Mb e 14Mb que incluíam o *SIM1*. Os pacientes descritos apresentaram diferentes características de fenótipo PWL, dentre elas hipotonia, dificuldades de alimentação, atraso psicomotor, atraso no desenvolvimento intelectual, problemas de comportamento, problemas de sono, hiperfagia, obesidade, rosto redondo e outras características faciais, mãos e pés pequenos, miopia e estrabismo.

O *MRAP2*, localizado no *locus* 6q14.2, é um gene parálogo ao gene que codifica a proteína acessória do *MC2R* (*MRAP*) e este último é importante para o transporte do *MC2R* para a superfície das células para sinalização. O *MRAP2* é expresso predominantemente no cérebro, principalmente nas regiões relacionadas com homeostase energética como o hipotálamo. No PVN os RNAm *MRAP2* e *MC4R* são ambos expressos. Asai e colaboradores (2013) hipotetizou que o *MRAP2* também pode ter um papel importante na modulação da sinalização do *MC4R* e, a partir de um estudo de coorte, foram identificadas variantes no gene que estão relacionadas com obesidade severa não-sindrômica. O artigo Geets e colaboradores (2016) foi o único encontrado na busca para esta revisão sobre *MRAP2* que descreveu três pacientes

com mutações neste gene que provocaram em todos os portadores obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual.

O *MCHR2* é outro gene localizado na região 6q (6q16.2) que foi reportado como causador de fenótipo PWL quando mutado. Ele é bastante expresso no cérebro, principalmente no PVN e codifica um GPCR para o hormônio concentrador de melanina (MCH), que é um neuropeptídeo com importante papel no controle da ingestão de alimentos e metabolismo energético, pois age como antagonista funcional do α -MSH. Apenas um artigo foi encontrado descrevendo pacientes com mutações no *MCHR2* (GEETS et al., 2018), que apresenta dois pacientes com obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual, e reporta duas variações: c.139A>G (p.T47A) e c*16A>G.

Dos artigos encontrados com mutações na região 6q (CANDELO et al., 2018; EL KHATTABI et al., 2014; GEETS et al., 2016; IZUMI et al., 2013; ROSENFELD et al., 2012; WENTZEL et al., 2010), a maior parte das mutações descritas foi na região proximal (6q14-q16), havendo apenas um caso (CANDELO et al., 2018) de deleção de 14,97Mb na região mediana em 6q16-q21. A característica do fenótipo PWL mais observada nos pacientes com mutações na região 6q foi a obesidade, porém estes também apresentaram quadros de hipotonia, atraso no desenvolvimento intelectual e motor, hiperfagia e problemas de comportamento.

5.2 Gene antígeno melanoma L2 (*MAGEL2*)

MAGEL2 é um gene expresso somente pelo alelo paterno e que se encontra na região de SPW em 15q11.2. Por mais que seja na região da SPW, mutações relacionadas com o gene foram citadas primeiramente por Schaaf e colaboradores (2013), sendo reportada a partir de então como causadoras da Síndrome de Schaaf-Yang (SYS, OMIM 615547), em que os pacientes com mutações específicas neste *locus* apresentam vários aspectos do fenótipo PWL, com atraso no desenvolvimento intelectual e autismo. Foram aqui citados quatro artigos com mutações no *MAGEL2* (ENYA et al., 2018; FOUNTAIN et al., 2017; HIDALGO-SANTOS et al., 2018; SCHAAF et al., 2013) e todos esses descrevem pacientes com mutações de ponto, podendo ser mudança da matriz de leitura sem sentido ou deleção.

Nos 10 casos descritos, a característica mais presente foi hipotonia, que apareceu em nove dos pacientes. Também foram citados a presença de baixa

estatura, as características faciais, os problemas de comunicação e articulação das palavras e os problemas cognitivos e comportamentais. É interessante ressaltar que apenas dois pacientes apresentaram hiperfagia, característica clássica e comumente presente na SPW, que foram os pacientes com as mutações c.1802delC (p.Pro601fs) e c.3124C>T (p.Gln1024*).

5.3 Monossomia do 1p36

A monossomia do 1p36 (OMIM 607572) apresenta incidência de 1 em 5.000 a 10.000 nascimentos e é a síndrome causada por deleção subtelo mérica mais comum em humanos. Esta mutação está associada com o fenótipo de hipotonia, atraso no desenvolvimento e crescimento, microcefalia, obesidade, problemas cardíacos e epilepsia. Alguns genes localizados na região do 1p36, como o *PRKCZ* e *PLCH2* têm papel no metabolismo de carboidrato e sinalização da insulina, e podem ter implicações no fenótipo PWL de pacientes com mutações por mecanismos de haploinsuficiência ou epistasia (D'ANGELO et al., 2009, 2013; HEILSTEDT et al., 2003; SHAPIRA et al., 1997; SLAVOTINEK; SHAFFER; SHAPIRA, 1999; STAGI et al., 2014).

Õiglane-Shlik e colaboradores (2014), Stagi e colaboradores (2014) e Tsuyusaki e colaboradores (2010) descreveram pacientes com deleções na região 1p36 e mostraram que todos os oito pacientes apresentavam atraso no desenvolvimento intelectual ou déficit cognitivo e cinco eram obesos. Outras características presentes em alguns dos pacientes foram problemas de comportamento, hipotonia neonatal e atraso no desenvolvimento psicomotor.

5.4 2p25

Doco-Fenzy e colaboradores (2014) apresentou o quadro de cinco pacientes com deleção do 2p25. De acordo com os autores, dois genes são candidatos a causadores do quadro de obesidade dos pacientes: o *fosfatase ácida 1 (ACP1)* e o *proteína transmembrana 18 (TMEM18)*, que se encontraram deletados nos pacientes 1-4. O *ACP1* é expresso em adipócitos e seus polimorfismos foram relacionados com obesidade severa e altos níveis de colesterol e triglicerídeos. O *TMEM18* é expresso em todo o cérebro e já foi mostrada uma associação entre um SNP na região do gene

e obesidade, porém as consequências da haploinsuficiência deste gene ainda são incertas. Quanto à questão do atraso do desenvolvimento intelectual e problemas de comportamento dois genes podem ser candidatos como causa: *sintrofina gama 2 (SNTG2)* e *fator de transcrição semelhante ao de mielina 1 (MYT1L)*. O primeiro é expresso no cérebro e é suspeito de estar relacionado com espectro autista. O segundo gene codifica um fator de transcrição expresso em grande quantidade em células neuronais em desenvolvimento e quando duplicado tem relação com a esquizofrenia (ALMÉN et al., 2010; DE LORENZO et al., 2009; KIM et al., 1997; THORLEIFSSON et al., 2009; YAMAKAWA et al., 2007).

Todos os pacientes descritos por Doco-Fenzy e colaboradores (2014) apresentam atraso psicomotor e intelectual, problemas na fala, hiperfagia e obesidade. Todos os pacientes, exceto os Pacientes 3 e 4, apresentaram hipotonia, porém é interessante ressaltar que o Paciente 4 é aquele no qual foi encontrada a maior região deletada e o que apresentou, além das características já citadas, mãos e pés pequenos, características faciais e apneia noturna.

5.5 8p24

O gene *partícula da proteína de tráfego do complexo 9 (TRAPPC9)*, localizado em 8p24, codifica a proteína de mesmo nome, também conhecida como proteína ligadora de NIK e IKK- β (NIBP). Esta proteína já foi demonstrada *in vitro* como importante para aumentar a ativação do NF- κ B induzida por TNF α e está envolvida na diferenciação neuronal induzida pelo fator de crescimento nervoso. A sinalização por NF- κ B está associada com diferentes processos biológicos como plasticidade sináptica e está relacionada com neurogênese em adultos (DENIS-DONINI et al., 2008; HU et al., 2005).

Marangi e colaboradores (2013) descreveram o caso de duas irmãs com um aumento em homozigose de aproximadamente 13Mb do *locus* 8q24, que ocasionou a alteração do éxon 18 do gene. Dentre as características do fenótipo PWL, ambas as irmãs apresentaram obesidade, características faciais semelhantes à SPW, problemas de comportamento, atraso no desenvolvimento mental e na fala. A paciente mais velha, com 5 anos, também apresentou hipotonia e a irmã mais nova atraso no desenvolvimento psicomotor.

5.6 Cromossomo X

Como consequência de mutações no cromossomo X temos a Síndrome do X-Frágil (SXF), que é uma doença relacionada com neurodesenvolvimento causada pela expansão CGG no gene *FMR1*. A proteína codificada pelo gene *FMR1* interage com moléculas de RNAm que regulam a tradução do CYFIP1 e CYFIP2, sendo o primeiro localizado na região 15q11-q13 da SPW. Pacientes com Síndrome do X-Frágil já foram relacionados com fenótipo PWL em alguns casos na literatura, com indivíduos com quadro de obesidade iniciado na infância, hiperfagia, problemas de comportamento e atraso no desenvolvimento intelectual. Outras cromossomopatias relacionadas com o cromossomo X também estão relacionadas com o fenótipo PWL, como Síndrome de Klinefelter (XXY) e duplicação Xq (BARDONI; MANDEL, 2002; CHAI et al., 2003; MARTÍNEZ-CERDEÑO et al., 2017; NOWICKI et al., 2007; ROCHA; PAIVA, 2014; SCHENCK et al., 2003).

Quatro estudos relacionando mutações no cromossomo X e fenótipo PWL foram encontrados. Um caso, descrito por Martínez-Cerdeño e colaboradores (2017) de Síndrome de X-Frágil com 73 repetições de CGG no *FMR1*, em que o paciente apresentava problemas de aprendizado, hiperfagia, atraso psicomotor e obesidade. Os outros três casos estão descritos a seguir.

Linhares e colaboradores (2016) diagnosticaram um paciente com duplicação do segmento Xq13.2-q21.31 que apresentava, dentre as características do fenótipo PWL, atraso no desenvolvimento e crescimento, hipotonia, atraso no desenvolvimento intelectual, conduta auto lesiva e características faciais.

Pramyothin, Pithukpakorn e Arakaki, (2010) descreveram um caso de um paciente 47, XXY com duplicação da região Xq21.31 com fenótipo PWL com obesidade, baixa estatura, hipogonadismo e atraso no desenvolvimento intelectual.

Outro estudo que trata de mutações do cromossomo X é o de Vandersteen e colaboradores (2009), em que uma paciente com cariótipo 47, XXX apresentou problemas cognitivos, problemas de comportamento, obesidade consequente à hiperfagia e baixa estatura.

5.7 Translocação

Dello Russo e colaboradores (2016) descreveram um caso de translocação com fenótipo PWL. O primeiro se trata de uma translocação envolvendo uma microdeleção

da região distal do cromossomo 15q e uma microduplicação da região distal do cromossomo 18q, em que o paciente [cariótipo: 46, XY,+der(15)t(15; 18)(q26.12;q23)] apresentou hiperfagia, baixa estatura, obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual. A região do cromossomo 15q afetada tem os seguintes genes que podem contribuir com o fenótipo do paciente: *IGFR1*, *MEF2A*, *CHSY1* e *TM2D3*. Já no segmento do cromossomo 18q afetado somente o gene *CTDP1* é considerado patogênico.

O gene *IGFR1* tem importância em diversos processos de desenvolvimento do sistema nervoso central. Outro gene com provável correlação com atraso no desenvolvimento é o *MEF2A*, que, em sua forma selvagem, está envolvido na morfogênese de neurônios pós-sinápticos; já *CHSY1* tem papel na proliferação celular na deposição da matriz extracelular e morfogênese. Por último, o *TM2D3* codifica uma proteína que está relacionada com GPCRs e é importante no processo de morte celular e sinalização de proliferação celular. Em relação com o cromossomo 18, mutações no gene *CTDP1* estão relacionadas com dimorfismo facial, atraso no desenvolvimento psicomotor e hipogonadismo (DELAFONTAINE; SONG; LI, 2004; MAHR et al., 2006; PERRIMON; BERNFIELD, 2000; SHALIZI et al., 2006; TOURNEV et al., 1999).

5.8 Mutações em mais de um loci

Quatro diferentes estudos mostraram indivíduos com fenótipo PWL que apresentavam duplicações e deleções de diferentes segmentos ao mesmo tempo. Um dos pacientes discutido por Wentzel e colaboradores (2010) foi diagnosticado com uma deleção em 6q14.1-q15 e duplicação do segmento 1p31.3.

A primeira mutação citada foi discutida anteriormente em 5.1. Em relação à região 1p31.3, é onde está localizado o gene *receptor da leptina (LEPR)*. Como explicado anteriormente, a secreção do hormônio leptina leva à ativação dos neurônios POMC no núcleo arqueado do hipotálamo, aumentando os sinais de saciedade (Figura 6 do Capítulo I). Sendo assim, a relação entre sistema melanocortina-leptina com a obesidade se deve à importância do sistema no controle do balanço energético. Mutações nos genes relacionados com a sua sinalização podem levar a um desequilíbrio das sinalizações relacionadas com a saciedade, no qual se inclui a leptina e seu receptor *LEPR* (RANADIVE; VAISSE, 2008).

Outro caso encontrado, com mutações em diferentes cromossomos, é o de duplicações dos segmentos 6q16.3-q23.3 e 10p11.21-p11.1. De acordo com Desch e colaboradores (2015), nenhum gene mutado com relação ao fenótipo do paciente ou importância patogênica foi encontrado na região duplicada do cromossomo 10. A região 6q, já discutida anteriormente em 5.1, foi a única região associada com o fenótipo do paciente de obesidade, mãos e pés pequenos, baixa estatura, hipotonia e características faciais. Dois casos da literatura com duplicação em 6q21-q22.1 mostraram fenótipo de obesidade síndrome. O *TCBA1* mutado é o candidato a causador de atraso do desenvolvimento intelectual e alterações em *BMIQ3* e *ENPP1* estão relacionados com o quadro de obesidade (ATWOOD et al., 2002; BOCCIARDI et al., 2005; PAZOOKI et al., 2007; YUE et al., 2006).

Ben-Abdallah-Bouhjar e colaboradores (2012) diagnosticaram uma criança com duplicação Xq27-qter e deleção telomérica do 3p que apresentava atraso no desenvolvimento psicomotor, hipotonia, problemas na fala, características faciais e hipogonadismo.

O segmento Xq27-qter é uma região complexa quanto aos genes presentes na mesma, incluindo o gene *MECP2*. Uma duplicação deste gene já foi reportada como a causa de um fenótipo de atraso no desenvolvimento intelectual, hipotonia, convulsões e infecções recorrentes, todas as características identificadas no paciente discutido por Ben-Abdallah-Bouhjar e colaboradores (2012). Os genes afetados pela deleção do segmento 3p são *CHL1* e *CNTN6*. O *Chl1* é normalmente expresso no sistema nervoso central e medula espinhal durante o desenvolvimento de camundongos e o *CNTN6* também está relacionado com o sistema nervoso, sendo codificante para moléculas de adesão neuronal (BAUTERS et al., 2008; LEE et al., 2000; RAMOCKI; TAVYEV; PETERS, 2010; VANDEWALLE et al., 2009; WEI et al., 1998).

6. CONCLUSÃO

A partir da revisão sistemática da literatura, utilizando-se os critérios de inclusão e exclusão, foram encontrados 23 artigos, com 56 casos de pacientes com fenótipo PWL descritos com mutações em genes localizados em diferentes regiões cromossômicas tais como: 6q 1p36, 1p31.1, 2p25, 3p26.3, 8q, 10p11.21-p11.1, Cromossomo X e translocações que compreendem os cromossomos 15, 18 e X. A região com maior ocorrência de mutações que ocasionaram fenótipo PWL foi a 6q, que compreende os genes *SIM1*, *MCHR2* e *MRAP2*, onde foram descritas mutações em 28 pacientes.

Dentre as características do fenótipo PWL descritas com maior frequência foi encontrado o atraso no desenvolvimento intelectual, que esteve presente em 78,6% dos casos, seguido de obesidade, descrita em 75% dos pacientes. É importante ressaltar que a falta de diagnóstico correto desses pacientes com fenótipo PWL pode piorar seus respectivos prognósticos, sendo necessário solicitar testes moleculares específicos para se diagnosticarem os diferentes genótipos causadores do fenótipo PWL. Diagnósticos conclusivos, com a correlação genótipo-fenótipo, são fundamentais para que se possa fornecer aconselhamento genético adequado e tratamento correto se houver.

Com base nos conhecimentos relatos nesta revisão sistemática (Capítulo II) e na importância de se fazer diagnóstico genético diferencial de pacientes obesos com atraso no desenvolvimento intelectual, a identificação de alterações no *GNAS* (Capítulo I) em indivíduos com fenótipo PWL se mostra relevante como mais uma informação importante para o entendimento das intrincadas vias metabólicas que determinam obesidade e atraso no desenvolvimento intelectual e para favorecer mais uma possibilidade de correlação genótipo fenótipo.

7. REFERÊNCIA

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALBRIGHT, F.; BURNETT, C. H.; SMITH, P. H. Pseudohypoparathyroidism-an example of «Seabright-Bantam» syndrome. **Endocrinology**, v. 30, p. 922–932, 1942.

ALMÉN, M. S. et al. The obesity gene, TMEM18, is of ancient origin, found in majority of neuronal cells in all major brain regions and associated with obesity in severely obese children. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 1, 2010.

ASAI, M. et al. Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. **Science**, v. 341, n. 6143, p. 275–278, 2013.

ATWOOD, L. D. et al. Genomewide linkage analysis of body mass index across 28 years of the Framingham Heart Study. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 5, p. 1044–1050, 2002.

BARDONI, B.; MANDEL, J. L. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 12, n. 3, p. 284–293, 2002.

BARSH, G. S.; FAROOQI, I. S.; RAHILLY, S. O. Interplay between genetics and environment. v. 404, n. April, p. 644–651, 2000.

BASTEPE, M. et al. Receptor-Mediated Adenylyl Cyclase Activation Through XL α s, the Extra-Large Variant of the Stimulatory G Protein α -Subunit. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 8, p. 1912–1919, 1 Ago. 2002.

BAUER, R. et al. Localization of neuroendocrine secretory protein 55 messenger RNA in the rat brain. **Neuroscience**, v. 91, n. 2, p. 685–694, 1 Jun. 1999.

BAUTERS, M. et al. Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. **Genome Research**, v. 18, n. 6, p. 847–858, 2008.

BEN-ABDALLAH-BOUHJAR, I. et al. Chromosomal microarray analysis of functional

Xq27-qter disomy and deletion 3p26.3 in a boy with Prader-Willi like features and hypotonia. **European Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 8–9, p. 461–465, 2012.

BOCCIARDI, R. et al. Molecular characterization of a t(2;6) balanced translocation that is associated with a complex phenotype and leads to truncation of the TCBA1 gene. **Human Mutation**, v. 26, n. 5, p. 426–436, 2005.

BONAGLIA, M. C. et al. Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: Narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. **European Journal of Human Genetics**, v. 16, n. 12, p. 1443–1449, 2008.

BUTLER, M. G. Known Clinical Epigenetic Disorders with an Obesity Phenotype: Prader–Willi Syndrome and the GNAS Locus. Em: LUSTIG, R. H. (Ed.). . **Obesity Before Birth: Maternal and Prenatal Influences on the Offspring**. [s.l.] Springer, 2011.

CANDELO, E. et al. First case report of prader-willi-like syndrome in Colombia. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. MAR, p. 1–4, 2018.

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

CHAI, J. H. et al. Identification of Four Highly Conserved Genes between Breakpoint Hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman Syndromes Deletion Region That Have Undergone Evolutionary Transposition Mediated by Flanking Duplicons. **American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 4, p. 898–925, 2003.

CHEN, M. et al. Central nervous system imprinting of the G protein G(s)alpha and its role in metabolic regulation. **Cell metabolism**, v. 9, n. 6, p. 548–55, Jun. 2009.

CHEN, M. et al. G s a deficiency in the dorsomedial hypothalamus underlies obesity associated with G s a mutations Find the latest version: The Journal of Clinical Investigation G s α deficiency in the dorsomedial hypothalamus underlies obesity associated with G s α mut. v. 127, n. 2, p. 500–510, 2017.

CHEON, C. K. Genetics of prader-willi syndrome and prader-will-like syndrome.

Annals of Pediatric Endocrinology and Metabolism, v. 21, n. 3, p. 126–135, 2016.

CHRISTIAN, S. L. et al. Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, n. 1, p. 40–48, 1995.

CHU, X. et al. Bone Mineral Density and Its Serial Changes Are Associated With PTH Levels in Pseudohypoparathyroidism Type 1B Patients. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 4, p. 743–752, 2018.

D'ANGELO, C. S. et al. Extending the phenotype of monosomy 1p36 syndrome and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 152, n. 1, p. 102–110, 2009.

D'ANGELO, C. S. et al. Obesity with associated developmental delay and/or learning disability in patients exhibiting additional features: Report of novel pathogenic copy number variants. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 161, n. 3, p. 479–486, 2013.

DAVIES, S. J.; HUGHES, H. E. Imprinting in Albright's hereditary osteodystrophy. **Journal of medical genetics**, v. 30, n. 2, p. 101–3, Feb. 1993.

DE LORENZO, A. et al. A study of acid phosphatase locus 1 in women with high fat content and normal body mass index. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 58, n. 3, p. 351–354, 2009.

DELAFONTAINE, P.; SONG, Y. H.; LI, Y. Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 3, p. 435–444, 2004.

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.

DENIS-DONINI, S. et al. Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF- κ B p50-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 15,

p. 3911–3919, 2008.

DESCH, L. et al. 6q16.3q23.3 duplication associated with Prader-Willi-like syndrome. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 4–8, 2015.

DOCO-FENZY, M. et al. Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 4, p. 471–479, 2014.

DOS SANTOS, J. F. et al. A modified MS-PCR approach to diagnose patients with Prader-Willi and Angelman syndrome. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 11, p. 1221–1225, 2016.

EL KHATTABI, L. et al. Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including SIM1. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 8, p. 1010–1018, 2014.

ENYA, T. et al. Three patients with Schaaf–Yang syndrome exhibiting arthrogryposis and endocrinological abnormalities. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 176, n. 3, p. 707–711, 2018.

FERNANDEZ-REBOLLO, E. et al. Intragenic GNAS deletion involving exon A/B in pseudohypoparathyroidism type 1A resulting in an apparent loss of exon A/B methylation: Potential for misdiagnosis of pseudohypoparathyroidism type 1B. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 2, p. 765–771, 2010.

FLOREZ, L.; ANDERSON, M.; LACASSIE, Y. De novo paracentric inversion (X)(q26q28) with features mimicking Prader-Willi syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 121A, n. 1, p. 60–64, 2003.

FOUNTAIN, M. D. et al. The phenotypic spectrum of Schaaf-Yang syndrome: 18 new affected individuals from 14 families. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 45–52, 2017.

GEETS, E. et al. Copy number variation (CNV) analysis and mutation analysis of the 6q14.1-6q16.3 genes SIM1 and MRAP2 in Prader Willi like patients. **Molecular**

Genetics and Metabolism, v. 117, n. 3, p. 383–388, 2016.

GEETS, E. et al. DNA sequencing and copy number variation analysis of MCHR2 in a cohort of Prader Willi like (PWL) patients. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 12, n. 2, p. 158–166, 2018.

GELFAND, I. M. et al. Progressive osseous heteroplasia-like heterotopic ossification in a male infant with pseudohypoparathyroidism type Ia: A case report. **Bone**, v. 40, n. 5, p. 1425–1428, 2007.

GERMAIN-LEE, E. L. Management of pseudohypoparathyroidism. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 31, n. 4, p. 537–549, 2019.

GLENN, C. C. et al. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 2, p. 335–346, 1996.

GRÜTERS-KIESLICH, A. et al. Early-onset obesity: Unrecognized first evidence for GNAS mutations and methylation changes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 8, p. 2670–2677, 2017.

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.

HALDEMAN-ENGLERT, C. R.; HURST, A. C.; LEVINE, M. A. **Disorders of GNAS Inactivation**. [s.l.] University of Washington, Seattle, 2017.

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. 8, p. 585–590, 2014.

HAYWARD, B. E. et al. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15475–15480, 1998.

HAYWARD, B. E.; BONTHRON, D. T. An imprinted antisense transcript at the human GNAS1 locus. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 5, p. 835–841, 22 Mar. 2000.

HEILSTEDT, H. A. et al. Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. **Clinical Genetics**, v. 64, n. 4, p. 310–316, 2003.

HIDALGO-SANTOS, A. D. et al. A novel mutation of MAGEL2 in a Patient with Schaaf-Yang Syndrome and Hypopituitarism. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 3, p. 3–6, 2018.

HINTON, E. C. et al. Excessive appetitive arousal in Prader-Willi syndrome. **Appetite**, v. 54, n. 1, p. 225–228, 2010.

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

HOPKIN, R. J. et al. New insights into the phenotypes of 6q deletions. **American Journal of Medical Genetics**, v. 70, n. 4, p. 377–386, 1997.

HOSOKI, K. et al. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. **Journal of Pediatrics**, v. 155, n. 6, p. 900- 903.e1, 2009.

HU, W. H. et al. NIBP, a novel NIK and IKK β -binding protein that enhances NF- κ B activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 32, p. 29233–29241, 2005.

ISHIKAWA, Y. et al. Alternative promoter and 5' exon generate a novel Gs alpha mRNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 15, p. 8458–62, 25 Mai. 1990.

IUGHETTI, L. et al. Pituitary height and neuroradiological alterations in patients with Prader-Labhart-Willi syndrome. **European Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 6, p. 701–702, 2008.

IZUMI, K. et al. Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving SIM1 and Prader-Willi syndrome-like features. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 161, n. 12, p. 3137–3143, 2013.

KANDURI, C. Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 102–111, 2016.

KIM, J. G. et al. Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 50, n. 2, p. 272–290, 1997.

KOUSTA, E. et al. Pleiotropic genetic syndromes with developmental abnormalities associated with obesity. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 7, p. 581–592, 2009.

KOZASA, T. et al. Isolation and characterization of the human Gs alpha gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 7, p. 2081–2085, 1 Abr. 1988.

LEE, S. et al. Expression and regulation of a gene encoding neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup in mouse brain. **Gene**, v. 245, n. 2, p. 253–266, 2000.

LEVINE, M. A.; MODI, W. S.; O'BRIEN, S. J. Mapping of the gene encoding the α subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase (GNAS1) to 20q13.2-q13.3 in human by in situ hybridization. **Genomics**, v. 11, n. 2, p. 478–479, 1991.

LINHARES, N. D. et al. Inherited Xq13.2-q21.31 duplication in a boy with recurrent seizures and pubertal gynecomastia: Clinical, chromosomal and aCGH characterization. **Meta Gene**, v. 9, n. 0007, p. 185–190, 2016.

LIU, J. et al. A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type IB. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 9, p. 1167–1174, 2000a.

LIU, J. et al. Identification of a methylation imprint mark within the mouse Gnas locus. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 16, p. 5808–17, Ago. 2000b.

LIU, J. et al. Identification of the control region for tissue-specific imprinting of the

stimulatory G protein α -subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 15, p. 5513–5518, 12 Abr. 2005.

LIU, J.; ERLICHMAN, B.; WEINSTEIN, L. S. The Stimulatory G Protein α -Subunit Gs α Is Imprinted in Human Thyroid Glands: Implications for Thyroid Function in Pseudohypoparathyroidism Types 1A and 1B. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 9, p. 4336–4341, Set. 2003.

MAHR, S. et al. Cis- and trans-acting gene regulation is associated with osteoarthritis. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, n. 5, p. 793–803, 2006.

MARANGI, G. et al. TRAPPC9-related autosomal recessive intellectual disability: Report of a new mutation and clinical phenotype. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, n. 2, p. 229–232, 2013.

MARTÍNEZ-CERDEÑO, V. et al. FMR1 premutation with Prader-Willi phenotype and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. **Clinical Case Reports**, v. 5, n. 5, p. 625–629, 2017.

MILLER, J. L. et al. Enhanced activation of reward mediating prefrontal regions in response to food stimuli in Prader-Willi syndrome. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 78, n. 6, p. 615–619, 2007.

MILLER, J. L. et al. Nutritional Phases in Prader–Willi Syndrome. **American Journal of Medical Genetics. Part a**, v. 155A, n. 5, p. 1040, Mai. 2011.

MRC-HOLLAND. **Methylation-Specific MLPA**® (**MS-MLPA**). Disponível em: <https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_hS-AvFINWhIbFWPPknqNphX9-xVdaKkXMRc5dDdoAz7wBpmhIqEkxw..>. Acesso em: 8 dez. 2019.

NOWICKI, S. T. et al. The Prader-Willi Phenotype of Fragile X Syndrome. **J Dev Behav Pediatr**, v. 28, n. 2, p. 133–138, 2007.

ÕIGLANE-SHLIK, E. et al. Monosomy 1p36 - A multifaceted and still enigmatic syndrome: Four clinically diverse cases with shared white matter abnormalities.

European Journal of Paediatric Neurology, v. 18, n. 3, p. 338–346, 2014.

PASOLLI, H. A. et al. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. I. Tissue distribution and subcellular localization. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33622–32, 27 Out. 2000.

PAZOOKI, M. et al. Pure familial 6q21q22.1 duplication in two generations. **European Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 1, p. 60–65, 2007.

PERRIMON, N.; BERNFIELD, M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 725–728, 2000.

PETERS, J. et al. A cluster of oppositely imprinted transcripts at the Gnas locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3830–5, 30 Mar. 1999.

PLAGGE, A. et al. The imprinted signaling protein XLas is required for postnatal adaptation to feeding. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 818–826, 25 Ago. 2004.

PODYMA, B. et al. The stimulatory G protein Gs α is required in melanocortin 4 receptor– expressing cells for normal energy balance, thermogenesis, and glucose metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 28, p. 10993–11005, 2018.

POSSA-PARANHOS, I. C. **Investigação molecular de pacientes com obesidade e deficiência mental suspeitos de fenótipo Prader-Willi like pela técnica nde MLPA**. [s.l.] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

POSSA-PARANHOS, I. C. et al. Investigation of copy number variation and genomic imprinting alteration in 49 Prader Willi like patients by means of MLPA. **Molecular Cytogenetics - Abstracts of the 12th European Cytogenomics Conference 2019**, v. 12, n. S1, p. 19, 2019.

PRAMYOTHIN, P.; PITHUKPAKORN, M.; ARAKAKI, R. F. A 47, XXY patient and Xq21.31 duplication with features of Prader-Willi syndrome: Results of array-based comparative genomic hybridization. **Endocrine**, v. 37, n. 3, p. 379–382, 2010.

PUZHKO, S. et al. Parathyroid hormone signaling via Gas is selectively inhibited by an NH2-terminally truncated Gas: Implications for pseudohypoparathyroidism. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 10, p. 2473–2485, 2011.

RAMOCKI, M. B.; TAVYEV, Y. J.; PETERS, S. U. The MECP2 duplication syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152A, n. 5, p. 1079–1088, Mai. 2010.

RANADIVE, S. A.; VAISSE, C. Lessons from Extreme Human Obesity: Monogenic Disorders. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 733–751, 2008.

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. **Bone**, v. 103, p. 281–286, 2017.

ROCHA, C. F. **Investigação molecular da Síndrome de Prader-Willi em pacientes suspeitos**. [s.l.] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

ROCHA, C. F. **Investigação Molecular em Pacientes com obesidade e deficiência mental e/ou fenótipo Prader-Willi like**. [s.l.] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

ROCHA, C. F.; PAIVA, C. L. A. Prader-Willi-like phenotypes: A systematic review of their chromosomal abnormalities. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 2290–2298, 2014.

RODRIGUES, A. M.; SUPLICY, H. L.; RADOMINSKI, R. B. Controle neuroendócrino do peso corporal: implicações na gênese da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 4, p. 398–409, 2003.

ROSENFELD, J. A. et al. Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: A report of 12 new cases. **Neurogenetics**, v. 13, n. 1, p. 31–47, 2012.

SCHAAF, C. P. et al. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. **Nature Genetics**, v. 45, n. 11, p. 1405–1409, 2013.

SCHENCK, A. et al. CYFIP/Sra-1 Controls Neuronal Connectivity in Drosophila and Links the Rac1 GTPase Pathway to the Fragile X Protein the postsynaptic site of most excitatory synapses in mammalian brains (for review see Luo, 2002). Fragile X syndrome, the most frequent cau. **Neuron**, v. 38, p. 887–898, 2003.

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, Jun. 2002.

SHALIZI, A. et al. A Calcium-Regulated MEF2 Sumoylation Switch Controls Postsynaptic Differentiation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 311, p. 1012–1017, 2006.

SHAPIRA, S. K. et al. Chromosome 1p36 deletions: The clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 61, n. 3, p. 642–650, 1997.

SLAVOTINEK, A.; SHAFFER, L. G.; SHAPIRA, S. K. Monosomy 1p36. **Journal of Medical Genetics**, v. 36, n. 9, p. 657–663, 1999.

SMITH, A.; HUNG, D. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome. **Translational Pediatrics**, v. 6, n. 1, p. 46–56, 2016.

STAGI, S. et al. Type II diabetes and impaired glucose tolerance due to severe hyperinsulinism in patients with 1p36 deletion syndrome and a Prader-Willi-like phenotype. **BMC Medical Genetics**, v. 15, n. 1, p. 2–7, 2014.

STANKIEWICZ, P. et al. Clinical Report A Girl With Deletion 9q22 . 1 – q22 . 32 Including the PTCH and ROR2 Genes Identified by. **American Journal of Medical Genetics**, v. 1889, p. 1885–1889, 2007.

STUPPIA, L. et al. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 3245–3276, Mar. 2012.

THORLEIFSSON, G. et al. Genome-wide association yields new sequence variants at

seven loci that associate with measures of obesity. **Nature Genetics**, v. 41, n. 1, p. 18–24, 2009.

TOURNEV, I. et al. Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome, a novel complex genetic disease in Balkan Gypsies: Clinical and electrophysiological observations. **Annals of Neurology**, v. 45, n. 6, p. 742–750, 1999.

TSUYUSAKI, Y. et al. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. **Pediatrics International**, v. 52, n. 4, p. 547–550, 2010.

VANDERSTEEN, A. M. et al. Genetic diagnosis in clinical psychiatry: A case report of a woman with a 47,XXX karyotype and Fragile X syndrome. **European Journal of Psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 31–36, 2009.

VANDEWALLE, J. et al. Dosage-Dependent Severity of the Phenotype in Patients with Mental Retardation Due to a Recurrent Copy-Number Gain at Xq28 Mediated by an Unusual Recombination. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 6, p. 809–822, 2009.

VARELA, M. C. et al. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: Study of 75 patients. **Clinical Genetics**, v. 67, n. 1, p. 47–52, 2005.

VARELA, M. C. et al. A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader-Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. **European Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 4, p. 298–305, 2006.

WEI, M. H. et al. In silico-initiated cloning and molecular characterization of a novel human member of the L1 gene family of neural cell adhesion molecules. **Human Genetics**, v. 103, n. 3, p. 355–364, 1998.

WEINSTEIN, L. S. et al. Endocrine Manifestations of Stimulatory G Protein α -Subunit Mutations and the Role of Genomic Imprinting. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 5, p. 675–705, Oct. 2001.

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, 2010.

WEINSTEIN, L. S.; CHEN, M.; LIU, J. Gs α mutations and imprinting defects in human disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 968, p. 173–197, 2002.

WENTZEL, C. et al. Interstitial deletions at 6q14.1-q15 associated with obesity, developmental delay and a distinct clinical phenotype. **Molecular Syndromology**, v. 1, n. 2, p. 75–81, 2010.

WILLIAMSON, C. M. et al. A cis-acting control region is required exclusively for the tissue-specific imprinting of Gnas. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 894–899, 25 Ago. 2004.

WILSON, L. C. Albright Hereditary Osteodystrophy, Pseudohypoparathyroidism, and Other GNAS-Associated Syndromes. Em: BEALES, P. L.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. (Eds.). . **Genetics of Obesity Syndromes**. 1^a ed. New York, NY: Oxford University Press, 2009. p. 91–132.

YAMAKAWA, H. et al. Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin- γ 2, and the interactions are affected by autism-related mutations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 1, p. 41–46, 2007.

YU, S. et al. A deletion hot-spot in exon 7 of the G8 α gene (GNAS1) in patients with aibright hereditary osteodystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 10, p. 2001–2002, 1995.

YUE, Y. et al. Disruption of TCBA1 associated with a de novo t(1;6)(q32.2;q22.3) presenting in a child with developmental delay and recurrent infections. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 2, p. 143–147, 2006.

8. APÊNDICE

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

Sample report: 95

Machine: ABI-5790 | Report date: 17/12/2018 | Run date: 29/11/2018 | Software Version: v140211998 | Normal range: 0.7 - 1.3

Sample type: GNAS Experiment GNAS Dye: 6-FAM | Performed by: Admin

MI PA probe mix:	ME031-GNAS	MI of test probes:	4545
Lot number:	BS-0816	MI of ref probes:	11711
Sheet date:	06/12/2018 11:17:17	DNA denaturation:	Bad
Control fragments:	CF-003-(bom) CDx2 (A2-0)	Expected gender:	Female
Analysis method:	Block SSC: On	Residual primer %:	OK 7%
Used metric:	Peak height	CAS:	Bad 55%
Reference Samples:	CAT1 CT		

FRS:	OK 100%
FRMS:	Bad 15%
RSU.P:	OK 10%
RSQ:	Warning
RPO:	OK
CAS:	Bad 55%

D [nt]	Gene-Exon	Ch-band hg18loc.	Height	Area	Ratio ^a	Stdev	[REF]	[Sum]	Width [dnt]
148	STX16-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.659682	8821	54542	1.04	0.08	=	28	0.0
172	STX16-3	20q13.32 20-056.675989	9206	69076	1.05	0.08	=	44	-0.1
232	STX16-4	20q13.32 20-056.676511	10239	70592	1.05	0.09	=	46	-0.1
418	STX16-5	20q13.32 20-056.67721	9472	84207	1.03	0.07	=	50	-0.2
518	STX16-6	20q13.32 20-056.678254	10031	79131	1.03	0.07	=	50	-0.2
544	STX16-9	20q13.32 20-056.679584	10751	87729	1.03	0.07	=	50	-0.2
744	STX16-10	20q13.32 20-056.681873	8708	68519	1.02	0.13	=	51	-0.2
1197	NEPSP5-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.848833	6272	56226	1.01	0.09	=	38	-0.2
1254	NEPSP5-2 [HHA1]	20q13.32 20-056.848833	6272	56226	1.01	0.09	=	38	-0.2
4111	NEPSP5-3 [HHA1]	20q13.32 20-056.850588	10313	70703	1.08	0.1	=	44	-0.1
1373	NEPSPAS-4	20q13.32 20-056.850588	8800	73566	1.03	0.08	=	48	-0.1
364	NEPSPAS-3	20q13.32 20-056.850583	8550	65386	1.21	0.09	=>	50	-0.1
666	NEPSPAS-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.859298	4702	38556	0.87	0.08	=	53	-0.1
520	NEPSPAS-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.859298	10109	70570	1.13	0.08	=	24	-0.2
700	GNAS-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.862624	9097	74938	1.08	0.08	=	45	-0.3
462	GNAS-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.863572	5387	83485	1.04	0.07	=	35	-0.2
315	GNAS-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.863588	12113	90275	1.17	0.08	=	52	-0.2
468	GNAS-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.864358	8351	79208	1.15	0.08	=	49	-0.2
238	GNAS-UP [HHA1]	20q13.32 20-056.867455	10997	78408	1.08	0.08	=	48	-0.2
402	GNAS-UP [HHA1]	20q13.32 20-056.867455	6124	55469	1.05	0.08	=	52	-0.1
355	GNAS-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.900164	9031	74476	1.08	0.08	=	58	-0.2
223	GNAS-2	20q13.32 20-056.900224	11929	84049	1.09	0.07	=	63	-0.1
490	GNAS-3	20q13.32 20-056.904038	9171	91841	0.92	0.07	=	79	-0.2
238	GNAS-3	20q13.32 20-056.907400	10323	92983	1.11	0.09	=	47	-0.2
307	GNAS-4	20q13.32 20-056.911932	13954	104628	1.1	0.07	=	47	-0.1
307	GNAS-4	20q13.32 20-056.911932	4674	46732	0.5	0.04	<<	34	-0.2
454	GNAS-9	20q13.32 20-056.917876	6914	46732	0.5	0.04	<<	34	-0.2
715	GNAS-9 [HHA1]	20q13.32 20-056.917876	13148	91762	1.08	0.08	=	51	-0.1
330	GNAS-13 [HHA1]	20q13.32 20-056.918452	7912	61830	1.05	0.08	=	58	-0.1
283	GNAS-13 [HHA1]	20q13.32 20-056.919132	11112	80683	1.02	0.08	=	45	-0.1
184	TH1-1 [HHA1]	20q13.32 20-056.969740	15381	100326	1.18	0.08	=	40	-0.1
726	SI-COVA-2 [HHA1]	02q12.2 02-102.640672	9806	63969	1.06	0.08	=	34	1.8
892	FH1-1 [HHA1]	02q14.2 03-061.211919	4854	43795	1.26	0.09	=	57	-0.1
208	Reference CPM	01632.2 01-206.965152	10126	88518	1	0.07	=	54	-0.1
200	Reference CPM	03925.3 03-308.762421	9656	96516	0.97	0.07	=	54	-0.2
714	Reference CPM	04631.21 04-145.800727	7025	64077	0.93	0.06	=	49	-0.1
714	Reference CPM	04631.21 04-145.800727	7025	64077	0.93	0.06	=	49	-0.1
133	Reference CPM	05631.1 05-132.037607	10803	71281	1.17	0.13	=	37	0.0
391	Reference CPM	08013.3 08-017.234371	9191	78291	1.05	0.07	=	50	-0.1
202	Reference CPM	09822.32 09-819.258441	10689	69090	0.99	0.09	=	28	-0.1
193	Reference CPM	11022.3 11-107.850441	10128	65110	1.17	0.1	=	47	-0.1
337	Reference CPM	11822.3 11-107.850441	8552	68473	1.04	0.1	=	52	-0.1
292	Reference CPM	12412.3 12-038.037306	10054	77265	0.93	0.07	=	47	0.0
481	Reference CPM	22412.3 22-032.487542	7885	73558	1	0.1	=	33	-0.3

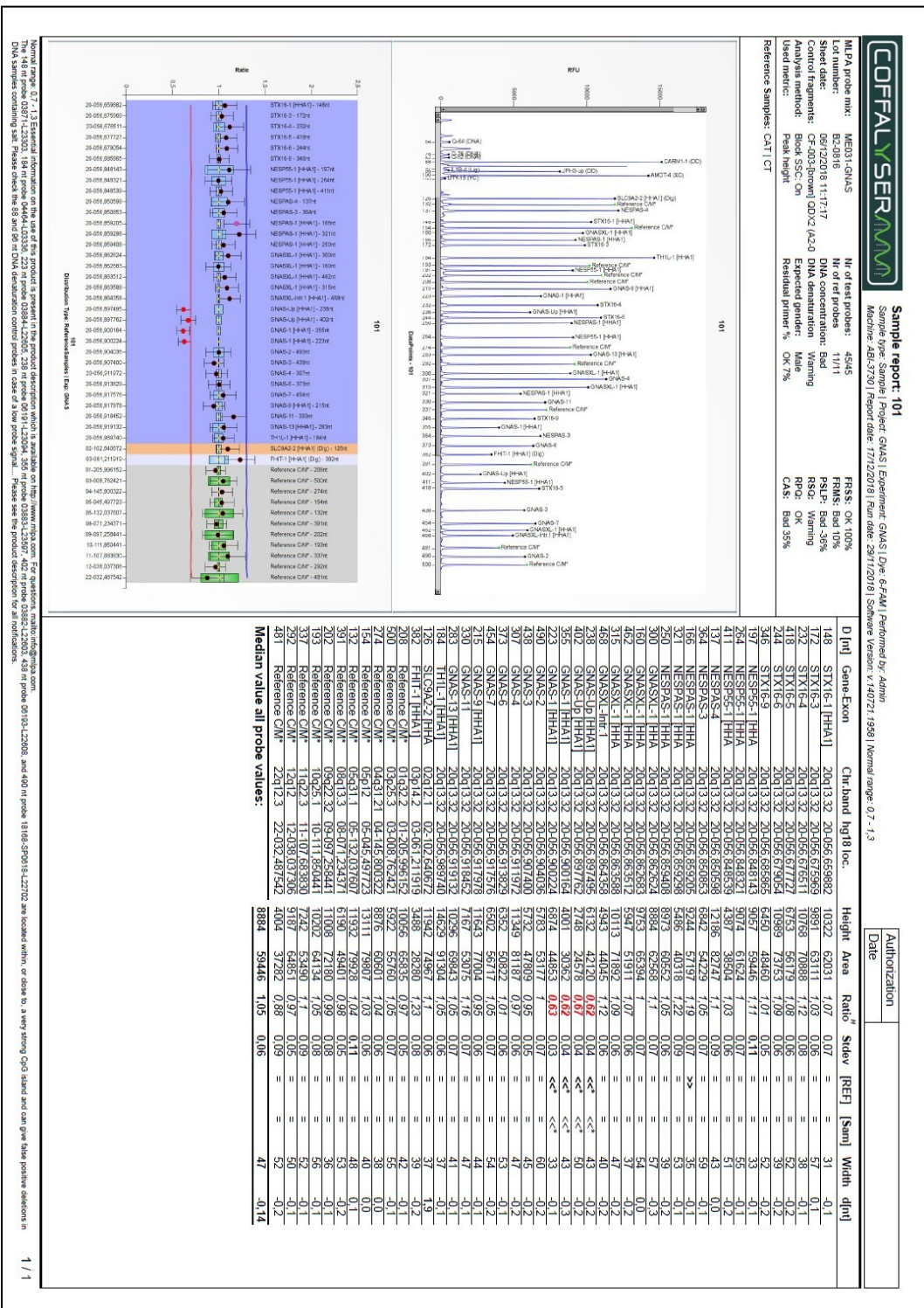
Median value all probe values: **3472 71281 1.05 0.08**

Authorized on: _____

Date: _____


1 / 1

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



9. ANEXOS

Anexo A: Cadastrado plataforma Brasil

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFREE E GUINLE/HUGG/UNIRIO</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>								
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								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775</td> <td>CEP: 22.270-004</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Tijuca</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: RJ</td> <td>Município: RIO DE JANEIRO</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (21)1264-5317</td> <td>Fax: (21)1264-5177 E-mail: cephugg@gmail.com</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775	CEP: 22.270-004	Bairro: Tijuca		UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	Telefone: (21)1264-5317	Fax: (21)1264-5177 E-mail: cephugg@gmail.com
Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775	CEP: 22.270-004							
Bairro: Tijuca								
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO							
Telefone: (21)1264-5317	Fax: (21)1264-5177 E-mail: cephugg@gmail.com							
Página 01 de 02								

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIPIO



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 utilizada, 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 com os critérios de Holm (1993) e Gunay-Aygun e colaboradores (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.

Nome do Paciente:

Tabela 2. Critérios Sugeridos Para Solicitação da Análise Genética para SPW

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 (a hipotonia geralmente persiste) 2. Atraso global do desenvolvimento 3. Excessiva ingesta alimentar (hiperfagia, obsessão por alimento) com obesidade central resultante se não controlada
Maiores de 12 anos	1. Funções cognitivas prejudicadas; geralmente deficiência mental moderada 2. Excessiva 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 diagnóstica de Prader-Willi apresentem todos os critérios correspondentes à sua faixa etária.

Referência Bibliográfica

Gunay-Aygun, M.; Schwartz S.; Heeger S.; Oriordan M. A.; Cassidy S. B.; **The changing purpose of Prader-Willi syndrome: clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria.** Pediatrics. 2001

Anexo E: Descrição do kit SALSA MLPA probemix ME031-B2



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_sα activity expressed in specific cell types. GNAS encodes the G_sα protein, which is the α-subunit in the heterotrimeric G protein. G_sα 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_sα 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_sα 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

MRC-Holland
MLPA

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.

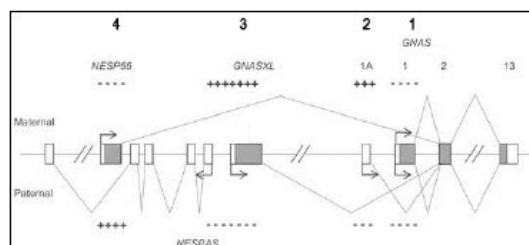


Figure 1. DMR 1, 2, 3 and 4 of GNAS locus depicted as '-----' for the unmethylated allele and '++++' for the methylated allele:

1. Unmethylated, promoter GNAS;
2. Maternally methylated, GNAS exon 1A;
3. Maternally methylated, covers GNASXL and NESPAS promoters;
4. Paternally methylated, covers NESP55 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 Ib (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 Ib 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 hemimethylated 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).

^ *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.

Ж 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 « ^	03871-L23303	Exon 1	+	191-192	20q13.32	16.1 kb
172	03872-L03320	Exon 3		942-943	20q13.32	0.5 kb
232 Ж	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 Ж	18126-SP0007-L22614	Exon 1	+	180-181; 209-210	20q13.32	0.2 kb
411 Ж	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 Ж	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 « ^	03883-L23597	Exon 1	+	446-445 reverse	20q13.32	0.1 kb
223 « ^	03884-L22605	Exon 1	+	498-499	20q13.32	3.8 kb
490 « Ж	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		895-896	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.

^ 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.

Ж 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- ATTCCATTGGCATTGGGGTGTCTTTGTTAAGTGCCTGGCCAGT AGCG CTGCTCTGT
132	00797-L23139	CCTCACATTGTCACTGCAAAATCSACACCTAT-TAATGGGTCTCACCTCCCACTGCTTCCCCCT
137	18104-L23354	GTCGAGGAGAGCACGCTTCCCTCCGA-AGGTGCGTTACCAGATTGCTGCCCTTTTGTGCTGGG
148	03871-L23303	CGCAGGGCCTCAGCAGGTTCAAGACA-AGTCCCAAGAAAGGGAGCTGCAG CG CTCCGAGT
154	05751-L05189	TCCACTGGGATGGTTGCTTCACTTCT-TAGTACCACTACTGCAGGACTTCCACAGATTGCTGGGT
160	18125-L25598	GCAAGGCTAATGCAGAGTCAACATGGACAGCCCCCAA-T CGCG TTGACGGCCCGCCATCAAGGT
166	03877-L23093	CCGCTCGCAACCTGTGGCATGAGGAAGA-GTACCCCAAG CGCG CTAGCGGTCTCGTGGTCTTCCA
172	03872-L03320	GGCACTGGTGTCAAGCATCAGCTTAGA-TCCAGAAGCAGCGATTGGTGTGACAAAACGGCCACT
184 [‡]	04464-L03336	GGCCGTGCCGG CGCG CATCAT-GGACGAGGACTACTACGGG AGCG GGCCGAGTGG
193	03217-L02642	CTCCAGCATGCCTCACAAGAGAGATTT-TTGACCGCATCAATGAAATGACCCAGAAATACATTAGGGAGAG
197	04870-L23097	CACGGCAGAAGTCCGG CGCG GCAACT-TCGCAGAACTCACTGCCCCCTCCCTCCGC
202	03709-L03163	CTGATGACGGTCGAGCTGTTGGCATG-ATGGCCCTCATCGSAATCAAGCTCAGTCCCGTGC
208	09086-L09145	GAGCAAGGCACCAAGATTGTGACACTA-CTGGACTGCCAAGCTATTCAGTGTGGCAGAGTAGGGC
215	03886-L22604	GTTTGACGTGGGTGGCC AGCGCG GATGA-ACGCCCAAGTGGATCCAGTCTTCAACGGTAGGATGC
223	03884-L22605	GAGGAGAAG CGCG AGCGTGAAGCCAAACAAA-GATCGAGAAGCAGCTGCAAGAAGGACAAGCAGTCTAC
232	18105-SP0610-L22532	CGCATTTAAACAGACCCCTGGATGACA-GCAGCGAAGGGAACATGCCATTGAGA-TA ACTACCCAAAGAGATCACTCAGGTGAGGAGTCAAAGTGAATCCTG
238	06191-L23094	CCAGTGCCTCCCGGTGGGCGGATT-T TGCGCT TCCCTTCGGTTATAGGGCCGCTGC
244	18195-L24186	CCATTTACCATCGGTAAGTSAACGGGCTGCA- AGCTGATGCTGTGTCTGTGCACCCCACTTGTGATCTTTCACCTCTAGACCTCGA
250	06190-L22606	CTCCGACCC AGCGCG CGGGTCAAGCCA-TTGGCAGGGGTTCATGCCAATCAAGGCTGCCT
264	18126-SP0007-L22614	CATCCCTTCTTCTGCTCAGAGAGGCA-AGCAAG CGCG GGAGCTTTAGAAAGTTCTT- AAGTGGTCAGGAAGTAGGTGCTCCCTTTT
274	15066-L22482	CACTGCATAGTGGGGATGGCTCGCAAGCTCTCTTCATTCTGGAA- AAAGAAAGTTATGTGAAGATACTTACCCTGAAAGGAGAAATTTTCAAAGGAGCC
283	03887-L03335	GAGGATCAGCACTGCCAGTGGAGA-TGGGCGTCACTACTGCTACCTCATTTCACCT CGCG GTG
292	15724-L17704	GAGGTCCAGAATTACACAGCTTGTAGTATC-AGGCCAACCATGTTCTTGGCAGAGCAGGTATGTGGTA
300	03879-L23095	CGATCTCCGACCCCGGTTCCAGAT-TGGCAG CGCG CCCGCTGGGGTGCAGACACTCCC
307	05210-L22675	CCTTTTCTTTTCAATCCCACTGCAAGTGAAGGCAACCAAGT- GCAGGACATCAAAAACAACCTGAAAGAGGCGATTGAAATACGT
315 [‡]	15645-L22676	CCTCCCAAGCCAAAGCT CGCG CTCTCTCA-AGGTCAAGAAAGTACCCTGGCCGAGAA CGCG CAGA
321	18127-SP0009-L25603	CCTCGATGGTGTACACCCCAAGCAGCACTCTTCCGGGCT- TCCAACGG CGCG CCCTATTGGACCTCCACCCATA-TCCGGTTTCCGGTGTGACGCCCCCTCGCTCAT
330	15648-L22678	CCTGCTGAGAAAGTCTTGTCTGGGAAATCGAAGA-TTGAGGACTACTTCCAGAATTTGCTGCTACACTCC
337	02664-L02131	CAGAGTCAGAGCACTTTTCCGATGC-TGTTGGATAAAAAATCAAAAAGAAATGCTTGTGTGGACTA
346	03874-L03322	GGACTGGGGCATCTTGACTAGGA-AGCTCCTCGTTTGTGTGAGCGTGGGTGAGACCGC
355	03883-L23597	CCTCGTT CGCG CTGTCTCGTCTT-ACTGTTCCCGAGGCGAGCCATGGCCGGCGGGGG
364	18106-L22533	CGACGCTTCTCAGGAATAGGTCT- GGAAGGAA ACCATTAAAGGTAATTTCTTCTATCATCCTTTCTT
373	04465-L01523	CATGCCAAGGCTCTGTGGAGGAT-GAAGGAGTGCCTGCTACGAAACGCTCCAAAGAGTACCAGC
382	18124-L23096	CCAGGG CGCG GGTCTGGGTTTCCACGC-GCGTCAGGTATCACCCCGGAGGCCAGTGGG
391	09941-L23598	CCTGAGACAAGGATTGGCATTCACTCAAT-CTATCGTTTCTTCTGTGTGACTCTTGTGCTG
402 [‡]	03882-L22603	CGGCGCGCAG CGCG CTGCTTGCCTT-GAGTGCACCTCACTCACATGTAAGTGGGG AGCGCG
411	18194-SP0008-L21093	CCTTCTCGGTGTGCTAAGAGGATGGATCGGAGGT-CCCGGCTCAGCAGT CGCG CGAGCTCGCCATA- ATTACAAGACCTGTGCCGCCATAGGCCGCGG
418	15646-L17515	CCTTGCCCTGAGCCTCGGGCTTGTCTT-AGCTCTTCCACAGGTGCCAGCTGCGCT
427	15730-L17710	CCTGCCCGCTCCATGAACCTGTGCA- ACTTCTT GGCCTGAGGAAGAACATCAGCATCCACCAAGCTAT
438	06193-L22608	CGGCGAAGGAGACCCGCAAGGTCGAA-GGAGCAACAGCGATGGGTAGGCACATTTCAAACC
454	06194-L22769	CCTGTGAACACCCCACTGCTTTCTTT-TTCTCCAGCTTCTGGACAAGATCGACGTGATC
462	07523-L17516	CGCGGAAAGCCCA AGCGCG CACTT- ACTCCG CACTTCTCGTGAAGCCTTCGGG
468	21010-L24075	CCAGTCGAGGTACCACAGAGTGTGCGAAGCAGGAAAGTTT- TTTGCCCGGGCCAT AGCGCG AAACCACAACACAGCCTGA
481	12461-L23226	CCTCTCCATAACTTACACCCATCCAGTGCT-AAGAAGTCAAGCCCTTCTCTTTGCTCTCTTTTCAGAGAG
490	18168-SP0618-L22702	CAATCCCCCTGCACAGATTTGACACTTACTCTCCATTAACCCATTAA-ACATGCAGGATCCTCATCTGCCTCACAA- TGGTCTTTTACCAGATTCTCCAGCACCTAGAAAATGAAAGTAAGTCTCAGGT
500	09682-L22509	CCTGCATTAAGAGCTACTGATCGAGATCCAGTGCATCAGCCACA- TCTACTCACTCTGCATCGCACCTTCTGCAACCCACTCTTC

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.

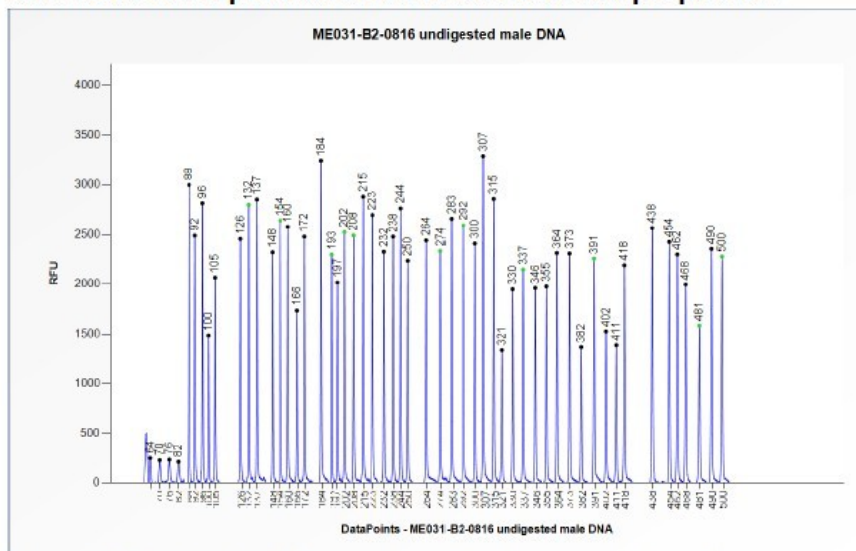
SALSA MS-MLPA probemix ME031-B2 GNAS sample pictures

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.

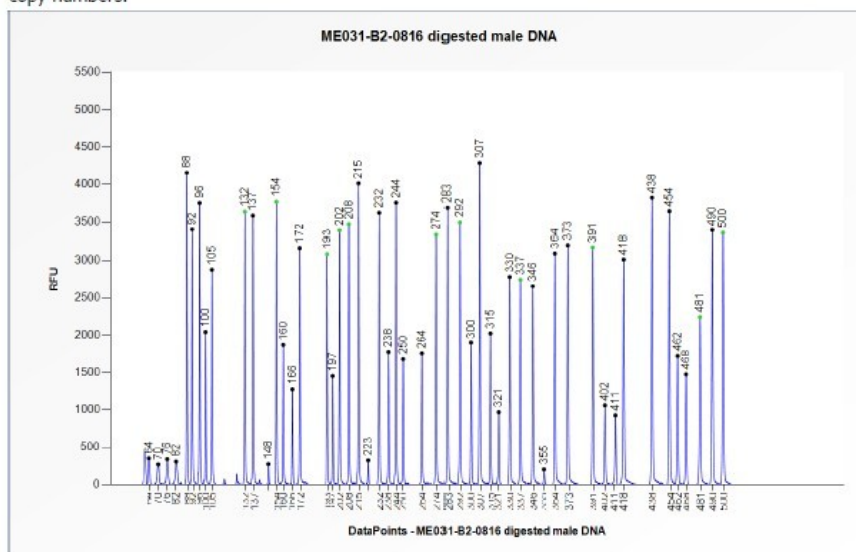


Figure 3. Capillary electrophoresis pattern of a sample of approximately 50 ng digested human male control DNA analysed with SALSA MLPA probemix ME031-B2 GNAS (lot B2-0816) to determine the methylation status.

Description version 19; 07 June 2017

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.

Anexo F: Síndromes detectadas pelo kit de MLPA P064

Syndromes that can be detected by the P064 probemix			
<i>Syndrome</i>	<i>Genetic locus</i>	<i>OMIM</i>	<i>Number of probes</i>
1p36 deletion syndrome	1p36	607872	4
Wolf-Hirschhorn syndrome	4p16.3	194190	4
Cri-du-Chat syndrome	5p15	123450	5
Sotos syndrome	5q35.3	117550	3
Saethre-Chotzen syndrome	7p21.1	101400	2
Williams-Beuren syndrome	7q11.23	194050	3
Williams-Beuren duplication syndrome	7q11.23	609757	
Langer-Giedion syndrome	8q24.11-q24.13	150230	3
WAGR syndrome	11p13	194072	3
Prader-Willi syndrome	15q11.2	176270	4
Angelman syndrome	15q11.2	105830	
Rubinstein-Taybi syndrome	16p13.3	180849	2
Miller-Dieker syndrome	17p13.3	247200	4
Lissencephaly-1	17p13.3	607432	

SALSA MLPA Probemix P064 Microdeletion Syndromes-1B

Page 1 of 14



Product Description version C2-04; Issued 8 November 2019

Syndromes that can be detected by the P064 probemix			
<i>Syndrome</i>	<i>Genetic locus</i>	<i>OMIM</i>	<i>Number of probes</i>
Smith-Magenis syndrome	17p11.2	182290	4
Potocki-Lupski syndrome	17p11.2	610883	
Alagille syndrome	20p12.2	118450	2
DiGeorge syndrome	22q11.21	188400	7
22q11.2 microduplication syndrome	22q11.2	608363	
Phelan-McDermid syndrome	22q13	606232	2

Anexo G: Regiões investigadas pelo kit de MS-MLPA ME032

Table 1. SALSA MS-MLPA Probemix ME032-A1 UPD7-UPD14

Length (nt)	SALSA MLPA probe	HhaI site	% methylated in normal blood-derived DNA	% expected signal reduction	Chromosomal position (hg18) ^a	
					Reference	Target
64-105	Control fragments – see table in probemix content section for more information					
115	Reference probe S0864-L24551				21q22	
124	MEG3 probe S0912-L25282	+	50%	50%		MEG3:TSS-DMR
130	Reference probe 00797-L21056				5q31	
135 «	GRB10 probe 15742-L18941	+	50%	50%		GRB10:alt-TSS-DMR
142 « Δ	PLAGL1 probe 18458-L24538	+	50%	50%		PLAGL1:alt-TSS-DMR
147	MEG3 probe 18332-L24736					MEG3/DLK1:IG-DMR
152 « Δ	GRB10 probe 15744-L24405	+	50%	50%		GRB10:alt-TSS-DMR
157 «	PLAGL1 probe 18460-L24410	+	50%	50%		PLAGL1:alt-TSS-DMR
161 « Δ	GRB10 probe 15746-L24414	+	50%	50%		GRB10:alt-TSS-DMR
168	Reference probe 08222-L24899				10q26	
174 n	Digestion control probe 18383-L24737	+	0%	100%	13q14	
176	MEG3 probe 18333-L23246					MEG3/DLK1:IG-DMR
184 «	MEST probe 15749-L17768	+	50%	50%		MEST:alt-TSS-DMR
190 «	MEST probe 15750-L17769	+	50%	50%		MEST:alt-TSS-DMR
196	Reference probe 16425-L18878				18q21	
202 Ж	MEST probe 18334-SP0642-L23247					Exon 12
208	Reference probe 09086-L09145				1q32	
214	Reference probe 07733-L07423				20q13	
220	MEG3 probe 15754-L18942	+	50%	50%		MEG3:TSS-DMR
226	Reference probe 15079-L24418				15q25	
231 « Δ	PLAGL1 probe 15755-L24417	+	50%	50%		PLAGL1:alt-TSS-DMR
238	PLAGL1 probe 18335-L23248					Exon 9
247	MIR380 probe 18481-L18864	+	100%	0%		Exon 1
256 «	MEST probe 15756-L17775	+	50%	50%		MEST:alt-TSS-DMR
265	Reference probe 06800-L02040				22q12	

SALSA MS-MLPA Probemix ME032-A1 UPD7-UPD14

Page 5 of 10



Product Description version A1-02; Issued 19 September 2019

Length (nt)	SALSA MLPA probe	HhaI site	% methylated in normal blood-derived DNA	% expected signal reduction	Chromosomal position (hg18) ^a	
					Reference	Target
274	RTL1 probe 18336-L23249					Exon 1
283 «	DLK1 probe 15758-L17777					Exon 3
292	Reference probe 15724-L17704				12q12	
300	MEG3 probe 15759-L17778	+	50%	50%		MEG3:TSS-DMR
310	PLAGL1 probe 18337-L23250					Exon 8
319 Δ	GRB10 probe 18338-L23251					Exon 4
332	Reference probe 08741-L25305				9q21	
340	RTL1 probe 15763-L17782					Exon 1
347	DLK1 probe 15762-L18818					Exon 4
356 « n	Digestion control probe 02801-L25300	+	0%	100%	6q25	
364	Reference probe 16564-L19055				11q13	
373	PLAGL1 probe 18340-L23253					Exon 4
383	MEG3 probe 18341-L23254					Exon 11
391	Reference probe 12928-L14079				2p23	
400	MEG3 probe 15766-L24901					Exon 13
409	GRB10 probe 18342-L24900					Exon 17
418	MEST probe 18343-L23256					MEST:alt-TSS-DMR
427	GRB10 probe 18381-L23252					Exon 8
436	Reference probe 10093-L10517				8q22	
445	Reference probe 15733-L17713				1p13	
454	Reference probe 11712-L20235				17q25	

Anexo H: Regiões investigadas pelo kit de MLPA P147

Table 1. SALSA MLPA P147-B2 1p36 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		reference	1p36
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		
130 «	TNFRSF4 probe 02269-L01761		1p36.33
136	Reference probe 05070-L04470	21q22	
142	Reference probe 02326-L01823	12q23	
148 «	GABRD probe 13354-L14784		1p36.33
154	Reference probe 17907-L22212	8p21	
160 «	GABRD probe 04690-L04068		1p36.33
166	TNFRSF1B probe 00553-L00122		1p36.22
178	GNB1 probe 02890-L02511		1p36.33
184	CASP9 probe 02880-L02347		1p36.21
191	ACTRT2 probe 04694-L04072		1p36.32
196 «	ISG15 probe 04689-L04452		1p36.33
202	SCNN1D probe 04692-L04070		1p36.33
208	Reference probe 18847-L24371	3p14	
214	AJAP1 probe 04704-L04082		1p36.32
222	KIF1B probe 04682-L04451		1p36.22
229 «	AGRN probe 04687-L04065		1p36.33
238	ICMT probe 04698-L04076		1p36.31
247 «	PANK4 probe 01122-L00680		1p36.32
256	Reference probe 02501-L01932	17q11	
263	GNB1 probe 13358-L15767		1p36.33
269 «	DVL1 probe 04688-L15768		1p36.33
276	MTOR probe 04679-L15769		1p36.22
283	NPHP4 probe 04700-L04078		1p36.31
292	Reference probe 04109-L03469	9q34	
301	PEX10 probe 04678-L04057		1p36.32
310	TNFRSF18 probe 02270-L04450		1p36.33
319	DFFB probe 04696-L04074		1p36.32
327 «	TP73 probe 01682-L01262		1p36.32
337	PLOD1 probe 04685-L04063		1p36.22
346	TNFRSF14 probe 04693-L04071		1p36.32
355 «	PRDM2 probe 04702-L04080		1p36.21
364	CAMTA1 probe 04695-L04073		1p36.23
373	Reference probe 03012-L03013	9q34	
382 «	PRDM2 probe 03423-L04457		1p36.21
391	SLC45A1 probe 04697-L04075		1p36.23
399 «	TNFRSF4 probe 09198-L15771		1p36.33
410	TNFRSF9 probe 02185-L15770		1p36.23
418	Reference probe 02670-L02137	11q22	
427	MTHFR probe 04684-L04062		1p36.22
436 «	SKI probe 02891-L02359		1p36.33
445	EPHA8 probe 03279-L02346		1p36.12
454	PARK7 probe 02189-L02365		1p36.23
463	KIF1B probe 04680-L04059		1p36.22
472	PRDM16 probe 04703-L04081		1p36.32
481	Reference probe 12461-L23226	22q12	
492 «	CHD5 probe 09114-L09174		1p36.31
500	Reference probe 17001-L22947	20q11	

Anexo I: Regiões investigadas pelo kit de MLPA P220

Table 1. SALSA MLPA Probemix P220-B3 Obesity

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position (hg18) ^a		
		Reference	Target exons	Target region
64-105	Control fragments – see table in probemix content section for more information			
130	Reference probe 13351-L14781	8q24		
137	SIM1 probe 07292-L19213		Exon 1	
142	MC4R probe 02848-L02278		Exon 1	
148 ↵	CDK19 probe 03945-L03403		6q21	
154	SIM1 probe 16068-L19470		Exon 1	
160	MC3R probe 08885-L08941		Exon 1	
166	Reference probe 12534-L14278	9q34		
171	SIM1 probe 07294-L17071		Exon 2	
178	LEPR probe 21572-L30446		Exon 11	
184	LEPR probe 08873-L19206		Exon 18	
196	LEPR probe 08867-L08923		Exon 5	
202	LEP probe 08880-L08936		Exon 2	
208	SEZ6L2 probe 11668-L12439		16p11.2	
214 ↵	COQ3 probe 16153-L19387		6q16.2	
220	POMC probe 08879-L08935		Exon 4	
226	SH2B1 probe 15155-L16929		16p11.2	
233	MC4R probe 15154-L25342		Exon 1	
238 ±	MC3R probe 08884-L08940		Exon 1	
244	Reference probe 08051-L07832	5p15		
250	LEPR probe 08868-L16799		Exon 7	
265	LEPR probe 08874-L19305		Exon 20	
270	SH2B1 probe 15158-L20075		16p11.2	
276	Reference probe 08545-L20076	3q24		
283	SIM1 probe 07299-L21259		Exon 7	
295	SH2B1 probe 15157-L19310		16p11.2	
302 ↵	NR2E1 probe 03939-L09973		6q21	
310 ^	LEP probe 15151-L21098		Exon 3	
316	SIM1 probe 07300-L21099		Exon 8	
322	LEPR probe 08875-L21100		Exon 23	
328	LEP probe 08881-L08937		Exon 3	
337	Reference probe 09073-L09242	19p13		
347	POMC probe 08877-L19217		Exon 2	
355	LEPR probe 08866-L08922		Exon 2	
364	SIM1 probe 07302-L06939		Exon 9	
373	POMC probe 08878-L08934		Exon 3	
382	LEPR probe 08872-L08928		Exon 16	
392	SIM1 probe 07303-L09975		Exon 10	
400	LEPR probe 08871-L08927		Exon 14	
409 ↵	GRIK2 probe 16154-L18338		6q16.3	
420	SIM1 probe 16155-L18783		Exon 11	
427	LEPR probe 08869-L08925		Exon 9	
436	MC2R probe 16156-L18688		Exon 2	
445	Reference probe 12526-L13576	4q25		
454	POMC probe 08876-L19667		Exon 1	
472	LEPR probe 15153-L17804		Exon 1	
484	Reference probe 11603-L12350	13q14		
495 *	Reference probe 22488-L24472	12q21		

Anexo J: Regiões investigadas pelo kit de MLPA P224

Table 1. SALSA MLPA P224-B1 PPARG probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		reference	PPARG
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		
160 *	Reference probe 12741-L13835	21q22	
179 * ↵	SYN2 probe 17006-L20053		Upstream
184	PPARG probe 06903-L07132		Exon 4
194	PPARG probe 06906-L07672		Exon 7
202 *	Reference probe 11142-L11826	10q25	
208 *	Reference probe 05765-L05203	14q11	
214 †	PPARG probe 06904-L21734		Exon 5
220	PPARG probe 06907-L07133		Exon 8
229 *	Reference probe 05737-L10370	18q11	
238	PPARG probe 06905-L06485		Exon 6
247 *	Reference probe 08189-L08083	11q12	
259	PPARG probe 06900-L06480		Exon 2
267 *	Reference probe 14110-L15943	8p21	
274 * ±	PPARG probe 16981-L20918		Exon 1
284 ‡	PPARG probe 06901-L07674		Intron 2
292 * ↵	XPC probe 06114-L05569		Downstream
301 ↵	GHRL probe 02266-L01752		Upstream
310	Reference probe 01293-L00838	9p21	
319	PPARG probe 06902-L06482		Exon 3
328 * ± ‡	PPARG probe 17008-L20055		Intron 1
337 *	Reference probe 01659-L01241	17p13	
346 *	Reference probe 04337-L20895	15q21	

10. APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

10.1 47th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology



I-26 - Investigation of patients with obesity and mental disability suspected of prader-willi like phenotype, with multiplex ligation-dependent probe amplification

Ingrid Camila Possa Paranhos ¹, Catielly Ferreira Rocha ^{2,2}, Carmen Lucia Antão Paiva ¹

¹ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, PPGBMC (RJ, Brazil), ² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, PPGNEURO (RJ, Brazil)

INTRODUCTION: Prader-Willi Syndrome (PWS) is a complex multi-organ disease caused by the lack of expression of paternal genes in 15q11-q13. Obesity can have different genetic causes. The monogenic forms (the one caused by mutations in genes with a role on the melanocortin-leptin system, related to the hypothalamic energy balance, and the one caused by mutations in genes involved in the development of the hypothalamus), and the chromosomal forms. In the latter, the patient presents, along with obesity, other clinical features, such as developmental delay and/or congenital characteristics such as PWS. PWS is the most frequent type of syndromic obesity. **OBJECTIVES:** The objective of this study was to further investigate 38 patients who had PW phenotype but were negative for alterations on 15q11-q13 using the MLPA technique. **MATERIALS AND METHODS:** All patients were tested with the methylation-specific PCR testing to exclude alterations on 15q11-q13. The subjects who had a negative result were tested with two MLPA kits (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MRC Holland, Amsterdam, Holland). Kit P224 was used for investigating eight exons of the PPARG gene and P220 the following genes: EIF3H, SIM1, MC4R, CDK19, MC3R, NUP214, LEPR, LEP, SEZ6L2, COQ3, POMC, SH2B1, DNAH5, ZIC4, NR2E1, CACNA1A, GRIK2, LEF1, MC2R, SUCLA2, RPGRIP1 and MYB. **DISCUSSION AND RESULTS:** Out of these 38 PW-like patients, two of them had positive MLPA results. One patient was an 18-year-old male, showing a deletion in the 1p31.3 region, where the leptin receptor gene (LEPR) is located. The other patient was a 12-year-old female, with a duplication of exon 6 of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) gene. Both genes have already been reported as having important role on energy balance. **CONCLUSION:** The results suggest that these mutations may contribute to obesity and other PW-like characteristics. Although, other molecular techniques should be used to test this hypothesis. **Keywords:** Prader-Willi like, LEPR gene, PPARG. **Supported by:** CAPES/ UNIRIO

10.2 XXII International Congress of Genetics



Investigation of Copy number variation (CNV) and genomic imprinting alteration in 75 Prader-Willi like patients by means of MLPA

Ingrid Camila Possa Paranhos ¹, Catielly Ferreira Rocha ², Lívia Leite Teixeira ³, Sônia Middleton ³, Suely Rodrigues dos Santos ^{2,3}, Carmen Lucia Antão Paiva ^{1,2,3}

Institution: ¹ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, PPGBMC (RJ, Brazil), ² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, PPGNEURO (RJ, Brazil), ³ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, DGBM (RJ, Brazil).

E-mail: ingridcparanhos@gmail.com

Key-words: Prader-Willi like, MLPA, Prader-Willi syndrome

ABSTRACT: INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Prader-Willi Syndrome (PWS) is a complex multi-organ disease caused by the lack of expression of paternal genes in 15q11-q13. Obesity can have different genetic causes. The monogenic forms and the chromosomal forms. In the latter, the patient presents, along with obesity, other clinical features such as developmental delay and/or congenital characteristics such as PWS. PWS is the most frequent type of syndromic obesity.

The objective of this study was to further investigate 75 patients who had PW phenotype but were negative for alterations on 15q11-q13, using the MLPA technique.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

All patients were investigated with the methylation-specific PCR testing to exclude alterations on 15q11-q13. The subjects who had a negative result were tested with various MLPA kits (MRC Holland, Amsterdam, Holland). We used eight MLPA kits (P224, ME028, P064, P036, ME032, P220, P070 and ME031) to identify changes in copy number, as well as in genomic imprinting,

RESULTS

Out of these 75 PW-like patients, 10 of them had positive MLPA results such as: deletion of the 1p31.3 region; duplication of exon 6 of *PPARG*; deletion of *SNRPN-u1b*; duplication of segment 4p16.3 and deletion 9p24.3; duplication of segment 22q11.21; deletion of segment 1p36; deletion of segment 2q37.3; hypomethylation pattern of segment 14q32.2 in patient and deletion in the locus 16p11.2.

CONCLUSION

These results suggest that these alterations may contribute to obesity and other PW-like characteristics. Although, other molecular techniques should be used to test this hypothesis.

Funding Agency: CAPES/UNIRIO

10.3 12th European Cytogenomics Conference

Molecular Cytogenetics 2019, 12(Suppl 1):30
<https://doi.org/10.1186/s13039-019-0439-z>

Molecular Cytogenetics

MEETING ABSTRACTS

Open Access

Abstracts of the 12th European Cytogenomics Conference 2019



Salzburg, Austria, 6-9 July 2019

Published: 5 July 2019

1.P2

Investigation of copy number variation and genomic imprinting alteration in 49 Prader Willi like patients by means of MLPA

Ingrid Camila Possa Paranhos¹, Catielly Ferreira Rocha², Livia Teixeira Leite³, Sônia Regina Middleton³, Suely Rodrigues Dos Santos², Carmen Lucia Antão Paiva¹

¹Universidade Federal Do Estado Do Rio De Janeiro, Programa De Pós-Graduação Em Biologia Molecular E Celular, Rio De Janeiro-Brazil;

²Universidade Federal Do Estado Do Rio De Janeiro, Programa De Pós-Graduação Em Neurologia, Rio De Janeiro-Brazil; ³Universidade Federal Do Estado Do Rio De Janeiro, Departamento De Genética E Biologia Molecular, Rio De Janeiro-Brazil

Correspondence: Carmen Lucia Antão Paiva (clapaiva1@gmail.com)

Molecular Cytogenetics 2019, **12(Suppl 1)**:1.P2

Prader-Willi Syndrome (PWS), the most frequent type of syndromic obesity, is a complex multi-organ disease caused by the lack of expression of paternal genes in 15q11-q13. Prader-Willi-like phenotype (PWL) is a condition which the patient presents, along with obesity, other clinical features such as developmental delay and/or other conditions compatible with PWS.

The objective of this study was to further investigate, with MLPA technique, 49 patients suspected of PWS who were negative for alterations on 15q11-q13 investigated with the methylation-specific PCR testing. The following MLPA kits (MRC Holland, Amsterdam, Holland) were used to identify changes in copy number and genomic imprinting: P224-PPARG, ME028-PWS, P064-Mental Retardation, P036-Subtelomeric region, ME032-DUP 14, P220-Obesity, P070-Subtelomeric and ME031-GNAS. Out of these 49 PW-like patients, 11 of them had positive MLPA results such as: 1) deletion of the 1p31.3 region; 2) duplication of exon 6 of PPARG; 3) deletion of SNRPN-u1b; 4) duplication of 4p16.3 and deletion 9p24.3; 5) duplication of 22q11.21; 6) deletion of 1p36; 7) deletion of 2q37.3; 8) hypomethylation pattern of segment 14q32.2, 9) deletion of 16p11.2, 10) deletion of GNAS exons 1A and 1; and 11) deletion of GNAS exon 7. It is important to mention that, as far as we know, these are the first reported cases of a duplication on PPARG exon 6, deletion on GNAS exon 1A and deletion of SNRPN-u1b, all leading to PWL. Array-CGH is going to be used to confirm these alterations of SNRPN-u1b, GNAS and PPARG. The other results reinforce the contribution of the mentioned cytogenetic and epigenetic alterations to obesity, energy balance and other PW-like characteristics.