Mariana Scheiner Dianesi

**Diagnóstico precoce da síndrome de Prader-Willi em neonatos
hipotônicos**

Early diagnosis of Prader-Willi syndrome in hypotonic neonates

São Paulo

2018

Mariana Scheiner Dianesi

**Diagnóstico precoce da síndrome de Prader-Willi em neonatos
hipotônicos**

Early diagnosis of Prader-Willi syndrome in hypotonic neonates

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Mestrado Profissional em
Aconselhamento Genético e Genômica Humana
do Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo.
Orientação: Prof^a Dra. Célia Priszkulnik Koiffmann

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

Dianesi, Mariana Scheiner

Diagnóstico precoce da síndrome de Prader-Willi em neonatos hipotônicos / Mariana Scheiner Dianesi; orientadora Célia Priskulnik Koiffmann, São Paulo, 2018.

53 f. + anexo

Dissertação (Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Diagnóstico precoce. 2. Hipotonia. 3. Síndrome de Prader-Willi. 4. Neonatos. 5. Teste de metilação

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Célia Priskulnik Koiffmann

Orientadora

Lista de Figuras

Figura 1: Representação da face de um paciente com a síndrome de Prader-Willi

Figura 2: População Brasileira com estimativa dos pacientes com PWS

Figura 3: Mapa genético do segmento cromossômico 15q11-q13

Figura 4: Estratégia diagnóstica aplicada no laboratório com os métodos utilizados para a detecção do subtipo genético específico da PWS

Figura 5: Teste de metilação: DNA modificado pelo tratamento com bissulfito e amplificação do exon 1 *SNRPN*

Figura 6: Teste de metilação. Resultados do controle normal, paciente 1 e paciente 2

Figura 7: Detecção de deleções por MLPA

Figura 8: Detecção, pelo kit P245, de três sondas deletadas

Lista de Tabelas

Tabela 1: Critérios clínicos diagnósticos da PWS

Tabela 2: Novos critérios sugeridos para solicitação da análise genética para síndrome de Prader-Willi

Tabela 3: Risco de recorrência baseado no mecanismo genético

Tabela 4: Cartão de corticoterapia distribuído aos pacientes portadores da síndrome de Prader-Willi

Tabela 5: Número de nascidos no Hospital e Maternidade Amador Aguiar

Tabela 6: Pacientes participantes do projeto

Tabela 7: Quadro clínico dos pacientes

Agradecimentos

A esta universidade e todo seu corpo docente, além da direção e a administração, que realizam seu trabalho com tanto amor e dedicação, trabalhando incansavelmente para que nós, alunos, possamos contar com um ensino de extrema qualidade.

A minha orientadora, Prof(a). Dr.(a). Célia Prizskulnik Koiffmann, pela paciência, dedicação, suporte e ensinamentos que possibilitaram que eu realizasse este trabalho.

As colegas Monica C. Varela e Cláudia I.E. de Castro por todo apoio e ensinamentos fundamentais na minha formação.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Walter e Leda, por não medirem esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante.

A minha irmã Ana Claudia, por ser fonte de inspiração para a realização deste trabalho.

Sumário

1. Introdução	9
1.1 Características clínicas gerais	10
1.2 Aspectos genéticos	14
1.2 Diagnóstico Clínico	17
1.3 Diagnóstico laboratorial	19
1.4 Aconselhamento genético	21
1.5 Associação Brasileira da síndrome de Prader-Willi	23
1.6 Diagnóstico precoce	25
2. Objetivos	27
3. Casuística e Metodologia	28
3.1 Casuística	28
3.1.1 Critérios de inclusão	28
3.1.2 Critérios de exclusão	28
3.2 Local de realização da pesquisa	28
3.3 Metodologia	29
3.3.1 Extração do DNA	30
3.3.2 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio	30
3.3.3 Amplificação por PCR	31
3.3.4 <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	31
4. Resultados	33
4.1 Pacientes	33
4.2 Teste de metilação	34
4.3 <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	35
5. Discussão	38
6. Conclusão	45
7. Referências	48
8. Anexos	54

JUSTIFICATIVA

A síndrome de Prader-Willi (PWS) é um distúrbio neurogenético e é considerada uma doença rara, sendo a forma mais comum de obesidade devida a causa genética. As principais características físicas encontradas na PWS são a hipotonia, o hipogonadismo, a baixa estatura, deficiência do hormônio do crescimento, hiperfagia, obesidade, distúrbios psiquiátricos, de comportamento e estereotípias.

Estima-se que existam de 350.000 a 400.000 portadores da síndrome no mundo. Para a PWS não há cura, mas existem tratamentos e terapias para redução dos sintomas que ocorrem no decorrer da vida desses indivíduos.

O risco de recorrência na PWS depende do mecanismo genético, sendo que na grande maioria dos casos o risco de recorrência é menor que 1%, (deleção e dissomia uniparental materna) e em um dos mecanismos (defeito do centro de *imprinting*) o risco de recorrência pode ser de 50%. O diagnóstico diferencial da hipotonia em recém-nascidos compreende doenças neuromusculares como amiotrofia espinal infantil e miopatias congênitas e para o estudo dessas doenças é recomendado a realização de eletroneuromiografia e biópsia muscular que são testes invasivos e podem ser inconclusivos.

O teste de metilação que será aplicado neste trabalho diagnostica aproximadamente 98% dos casos da síndrome e cerca de 94% dos portadores da síndrome de Prader-Willi possuem hipotonia durante o período neonatal. O principal objetivo deste trabalho é o de identificar a síndrome de Prader-Willi em neonatos, período que engloba do nascimento aos 28 dias de vida, que apresentam hipotonia de causa desconhecida em maternidades de São Paulo, além de reforçar a importância do diagnóstico precoce, o aconselhamento genético para estas famílias e orientações sobre a história natural da síndrome.

1. Introdução

A síndrome de Prader-Willi (PWS) é um distúrbio genético, que decorre da ausência de expressão de genes que sofrem o processo de *imprinting* na região cromossômica 15q11.2-q13, também conhecida como a região das síndromes de Prader-Willi e Angelman (PWS/AS), localizada no braço longo do cromossomo 15, próximo ao centrômero.

A síndrome de Prader-Willi foi descrita pela primeira vez por Prader, Labhart e Willi em 1956 por exame clínico em nove pacientes que apresentavam hipotonia neonatal, obesidade, baixa estatura e criptorquidismo (*in* Smith A., Hung D., 2017). A partir de então foram descritos inúmeros casos, sendo que naquela época o diagnóstico dos pacientes era apenas clínico.

A etiologia da síndrome era desconhecida até a década de 80 e os casos descritos ocorriam de maneira eventual, sendo raros os casos de recorrência entre irmãos, porém relatos de recorrência foram descritos por Diamant em 1996 (*in* Tamaki J. *et al*, 2015).

Em 1981 Ledbetter D.H. *et al* detectaram uma microdeleção no segmento cromossômico 15q11 - q13 em cromossomos prometafásicos de 4 dos 5 pacientes com suspeita de PWS. Análises citogenéticas convencionais detectavam aproximadamente 50 a 60% dos pacientes com a síndrome, que apresentavam uma deleção intersticial da parte proximal do braço longo do cromossomo 15; os demais casos ficavam em aberto (Turnpenny *et al*, 2009).

Atualmente a síndrome de Prader-Willi é a forma mais comum de obesidade com causa genética e muitos sinais e sintomas presentes são resultado da deficiência hipotalâmica, não sendo encontrado nenhum defeito estrutural no hipotálamo (Fridman C. *et al*, 2000), e sim uma disfunção que manifesta-se como: desregulação da temperatura corporal, uma maior tolerância a dor e apneia central do sono; também são vistos pacientes com deficiência do hormônio do crescimento, hipogonadismo hipogonadotrófico, além da hipotonia central e a insuficiência adrenal central (Anglin K., 2017).

1.1 Características clínicas gerais

A síndrome de Prader-Willi foi dividida em duas fases distintas por estudos clínicos, sendo que a primeira fase se caracteriza por graus distintos de hipotonia no período neonatal e na primeira infância (94%), hipogenitalismo (95%) e dificuldade de sucção (93%). A segunda fase se inicia geralmente com o início da obesidade que ocorre entre 1 a 6 anos de idade, sendo caracterizada por atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) (98%), hiperfagia acompanhada de obesidade (94%), baixa estatura (76%), mãos e pés pequenos (83%), diminuição da sensibilidade à dor, hipopigmentação de pele, cabelos e olhos e dificuldades de aprendizagem.

Além das características faciais como diâmetro bifrontal estreito (75%), estrabismo (52%), fissuras palpebrais amendoadas (75%), ponte nasal baixa e lábio superior fino com cantos curvados para baixo (Figura 1). Essas características faciais podem ou não estar presentes ao nascimento, mas evoluem lentamente no decorrer do crescimento da criança; apresentam também lesões na pele causadas por auto-agressão (skin picking) e algumas crianças podem apresentar problemas comportamentais e de personalidade como depressão, irritação, violência e mudanças de humor. (Fridman C., 1997; Cassidy S.B. *et al*, 2012; Araújo L.L., Ferreira P.L.F.T., Leite I.R., 2012).

Figura 1: Representação da face de um paciente com síndrome de Prader-Willi
(Fonte: Crescimento Infantil)

A prevalência de nascidos vivos anualmente é de 1 em 10.000 a 1 em 15.000, acomete ambos os sexos, diferentes etnias, classes socioeconômicas e regiões geográficas e é a síndrome de obesidade mais comum (Cassidy S.B. *et al*, 2012; Irizarry K.A. *et al*, 2016). A estimativa dos afetados pela síndrome é de 350.000 a 400.000 pessoas no mundo, sendo que nos Estados Unidos já foram relatados 3500 casos da síndrome (Tamaki J. *et al*, 2015). É considerada uma doença rara, não existe cura para este distúrbio neurogenético apenas tratamentos direcionados para a redução dos sintomas apresentados pelos pacientes.

Baseado no censo do IBGE de 2010 da população brasileira geral, a estimativa de portadores da síndrome foi de 12 a 18 mil no ano de 2010 número fundamentado na prevalência de nascidos vivos anualmente com a síndrome, de 1 em 10.000 a 1 em 15.000 (Figura 6).

Figura 2: População Brasileira com estimativa dos pacientes com PWS (Fonte: IBGE; Cassidy S.B. *et al*, 2012).

A hipotonia é a principal manifestação no recém-nascido, podendo ser observada no choro fraco, diminuição dos reflexos e da sucção, o que pode levar a dificuldade de ganho de peso e de crescimento na primeira infância. Essa característica ocorre na vida adulta em um grau menor, e é observada na redução da massa muscular. A hipotonia em PWS é de origem central, sendo que os estudos neuromusculares por biópsia mostram-se normais ou apresentam sinais inespecíficos (Cassidy S.B. *et al*, 2012; Araújo L.L., Ferreira P.L.F.T., Leite I.R., 2012).

Em relação ao hipogonadismo presente na síndrome de Prader-Willi, os pacientes do sexo masculino podem apresentar micropênis, hipoplasia escrotal, criptorquidia e pequenos testículos; já as pacientes do sexo feminino podem apresentar a hipoplasia de clitóris e amenorréia, além da ausência de sinais de puberdade, isso em ambos os sexos (Hutson J.M. *et al*, 2014). A deficiência do hipotálamo é responsável pelas principais manifestações como a deficiência na secreção do hormônio do crescimento (hrGH) que leva a baixa estatura, o próprio hipogonadismo, a hiperfagia, desregulação da temperatura corporal, distúrbios do sono, redução da densidade mineral óssea e a obesidade (Araújo L.L., Ferreira P.L.F.T., Leite I.R., 2012).

A hiperfagia tem origem hipotalâmica e resulta da falta da sensação de saciedade que pode levar à obesidade caso não seja controlada a alimentação do paciente, tem início entre 1 a 4 anos (Cassidy S.B., 2009). A obesidade decorre da baixa taxa metabólica aliada a um comportamento de compulsão alimentar. A síndrome tem uma condição de obesidade severa como principal ponto de fenótipo (Sabin M.A., Werther G.A., Kiess W., 2010). Além da obesidade estes pacientes apresentam baixa massa muscular por decorrência da hipotonia presente, o que dificulta ainda mais a perda de peso e a realização de atividade física que é primordial para esses indivíduos. (Anglin K.,2017).

Complicações da obesidade são as grandes causas de mortalidade e morbidade, como a insuficiência cardiorrespiratória, apneia obstrutiva, diabetes *melittus*, hipertensão, tromboflebite, edemas crônicos nas pernas, ingestão de alimentos apodrecidos que pode levando a necrose estomacal, ou até mesmo a sua ruptura (Cassidy S.B., 1997). Estes pacientes também apresentam insuficiência adrenal que já é considerada uma das causas mais frequentes de morte súbita conhecida nesta síndrome.

A deficiência cognitiva é de leve a moderada e os distúrbios de comportamento comumente observados são teimosia, birras, comportamentos obsessivos compulsivos, dificuldade de modificar a rotina, comportamentos de manipulação, e até mesmo roubo, mentira, agressividade, crises de raiva e violência e oposicionismo (Cassidy S.B., 1997; Cassidy S.B., Discoll D.J., 2009). Alterações neuropsicológicas relacionadas com a atividade do lobo frontal, tais como atenção, habilidades executivas e de organização viso espacial, que é a capacidade de visualizar mentalmente uma imagem, também foram descritas em pacientes com esta síndrome. Doenças psiquiátricas como transtorno de humor, hiperatividade com déficit de atenção e problemas na socialização também foram relatadas em crianças com PWS (Mesquita M.L. *et al*, 2010).

1.2 Aspectos genéticos

Diversas anomalias cromossômicas foram descritas no cromossomo 15, tais como translocações Robertsonianas, translocações recíprocas aparentemente equilibradas e não-equilibradas, isocromossomos de braço longo e presença de pequenos cromossomos marcadores. Menos de 5% dos pacientes com a síndrome de Prader-Willi apresentam anomalias cromossômicas (Ledbetter D.H. *et al*, 1981).

A síndrome de Prader-Willi foi muito estudada por ser a mais comum das síndromes causadas por microdeleção, a forma de obesidade mais comum devida a causa genética, o primeiro distúrbio conhecido causado por *imprinting* genômico no ser humano e o primeiro reconhecido como consequência de dissomia uniparental (UPD). Existe outra síndrome com sinais e sintomas distintos, a síndrome de Angelman (AS) (que tem como características a deficiência intelectual grave, epilepsia de difícil controle e crises de risos) que despertou interesse por terem sido descritos na literatura pacientes tendo uma deleção do cromossomo 15 no mesmo segmento cromossômico da PWS. Hoje se sabe que a AS possui mecanismos moleculares similares aos da PWS, porém com origem no segmento herdado da mãe. (Varela M.C., 1999).

Hoje sabemos que a PWS é causada pela ausência de genes do segmento 15q11-q13 herdados do pai, que são ativos na região, e estes mesmos genes no cromossomo materno se encontram inativos gerando esta diferenciação na expressão do material genético dependente da origem parental, este é o mecanismo chamado *imprinting*. (Carvalho D.F.D. *et al*, 2007; Mesquita M.L. *et al*, 2009) Existem diferentes mecanismos moleculares que causam a PWS: 70% dos pacientes tem a deleção da região 15q11-q13 herdada do pai que pode ser vista em 50 a 60% dos casos por citogenética tradicional e os outros 10 a 20% por FISH(Hibridação *in situ* por Fluorescência é uma técnica que utiliza sondas de DNA marcadas com fluorescência utilizadas para detectar anomalias cromossômicas que estão além da resolução da citogenética clássica como microdeleções e rearranjos complexos) por serem deleções submicroscópicas (microdeleção); 25% herdam duas cópias dos cromossomos 15 maternos e está é a chamada

dissomia uniparental materna (UPD mat); menos de 5% têm defeito no centro de *imprinting*, sendo que nesses casos são encontrados dois cromossomos íntegros de origem biparental, porém o cromossomo de origem paterna possui a marcação epigenética materna (Irizarry K.A. *et al*, 2016). Já foi descrito que a síndrome pode ser resultante de mutações epigenéticas ao acaso, com baixo risco de recorrência em 2 a 5% dos casos e translocações em cerca de 1% dos casos (Cassidy S.B. *et al*, 2012).

Existe um número considerável de doenças genéticas cujas características fenotípicas dependem da herança paterna ou materna, esta diferenciação sendo por conta da herança e não da alteração encontrada ou de diferentes genes, sendo estes casos conhecidos como decorrentes do *imprinting* genômico, e a metilação diferenciada destes alelos é vista como o principal mecanismo modificador de expressão dos genes (Tamaki J. *et al*, 2015).

O segmento cromossômico no qual fica localizada a região PWS/AS já foi mapeado e dividido em quatro segmentos (Figura 2), o primeiro, mais próximo ao centrômero, não sofre *imprinting*, já o segundo é paternalmente expresso, o terceiro é maternalmente expresso, e quarto segmento não sofre *imprinting*. Na região crítica para PWS existe um grande número de genes mapeados: *MAGEL2*, *MKRN3* (ou *ZNF127*), *NECDIN*, *C15ORF2*, *SNURF/SNRPN*, *NDN*, *IPW*, *SNORD116*, dentre outros; a maioria dos genes transcrevem RNAs principalmente snoRNAs (*Small nucleolar RNAs* que são uma classe de pequenas moléculas de RNA que conduzem modificações químicas como metilação em RNAs ribossomais, RNAs transportadores e outros pequenos RNAs nucleares), e não existe descrito um único gene responsável pela síndrome de Prader-Willi como o é o gene *UBE3A* na síndrome de Angelman (Smith A., Hung D., 2017).

Na figura abaixo podemos ver a região crítica da PWS, com cerca de 2Mb, a da AS, e genes que não estão sob ação do *imprinting*, e, dentro da região PWS encontra-se o centro responsável pelo *imprinting* (IC).

Figura 3: Mapa genético do segmento cromossômico 15q11-q13 (Driscoll D.J. *et al*, 2018)

1.2 Diagnóstico Clínico

Os critérios de diagnóstico clínico para a PWS foram desenvolvidos em 1993 por Holm V.A. *et al* e compreendem critérios maiores e menores aos quais são atribuídos pontos, sendo que é necessário a confirmação pelo teste genético molecular. Nestes critérios considera-se a soma de 5 pontos, sendo 4 dos critérios maiores em pacientes com idade menor ou igual há 3 anos, e 8 pontos sendo 5 dos critérios maiores quando o paciente for maior de 3 anos de idade (Tabela 1) (Carvalho D.F.D. *et al*, 2007; Cassidy S.B.,2009).

Critérios maiores (1 ponto)
Hipotonia neonatal, ausência de sucção
Dificuldade de alimentação na infância, retardo do desenvolvimento neuro-psicomotor
Ganho excessivo de peso a partir de 1 ano e 6 meses
Hipogonadismo
Deficiência intelectual, dificuldades no aprendizado
Hiperfagia, obsessão por comida
Características faciais (olhos amendoados, lábio superior fino)
Deleção do segmento 15q11-q13 em análise citogenética
Critérios menores (0,5 ponto)
Diminuição dos movimentos fetais
Problemas comportamentais (5 destes: fúria, acessos de violência, obsessivo-compulsivo, rígido, possessivo, teimoso, mentiroso, cleptomania)
Apneia do sono
Baixa estatura
Cabelos, olhos e pele mais claros que a família
Mãos e pés pequenos
Mãos estreitas
Miopia
Saliva viscosa
Defeito na articulação de palavras
Lesões de pele (auto-agressão)

Tabela 1: Critérios clínicos diagnósticos da PWS (Carvalho D.F.D. *et al*,2007).

Em 2001, foi proposto por Gunay-Aygun M. *et al*, uma nova abordagem desses critérios, com a divisão por faixas etárias (Tabela 2): fase 0 ocorre no período pré-natal com movimentos fetais diminuídos e um crescimento menor quando comparado com outras crianças sem a patologia; fase 1 (0 a 2 anos)

na infância, apresentam hipotonia de graus variados, ausência de sucção e não apresentam sobrepeso, já na fase 2 (2 a 6 anos) aumenta o apetite pela ingestão de alimentos calóricos, a fase 3 (6 a 12 anos) tem como principais características a hiperfagia, ligada a falta de saciedade, o que acaba levando grande parte das crianças à obesidade. Às vezes os adultos podem apresentar uma fase 4, onde passam a se sentir satisfeitos após a alimentação (Cassidy S.B. *et al* 2012; Irizarry K.A. *et al*, 2016).

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

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

Tabela 2. Novos critérios sugeridos para solicitação da análise genética para síndrome de Prader-Willi (Carvalho D.F.D. *et al*,2007)

1.3 Diagnóstico laboratorial

A síndrome de Prader-Willi é resultado de alterações moleculares na região 15q11-q13: 70% a 75% dos pacientes apresentam uma deleção cromossômica nesta região no cromossomo de origem paterna, 25% dos casos apresentam dissomia uniparental materna do cromossomo 15. Os demais casos apresentam defeito no centro de *imprinting* (Hutson J.M. *et al*, 2014).

Testes laboratoriais podem determinar os três principais mecanismos moleculares que resultam na PWS (deleção, dissomia uniparental materna e defeito no centro de *imprinting*), o teste do padrão metilação, quando alterado, já comprova a síndrome, porém, não identifica o mecanismo e para isso é necessário a realização do estudo de microssatélites da região PWS e de fora dessa região do paciente, mãe e pai, para confirmação dos casos de deleção, dissomia uniparental materna e defeito no centro de *imprinting*. Os testes de hibridação *in situ* com sonda de fluorescência (FISH) ou por *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) são utilizados para confirmação das deleções. O estudo do cariótipo tradicional é necessário para permitir a identificação de rearranjos cromossômicos envolvendo o segmento 15q11-q13.

Em nosso laboratório fazemos o teste de metilação quando existe suspeita diagnóstica para a síndrome de Prader-Willi, pois esse teste diagnóstica cerca de 98% dos casos; quando alterado fazemos análise de microssatélites do trio (pai, mãe e paciente) e utilizando esta técnica pode-se distinguir dissomia uniparental, deleção e defeito no centro de *imprinting*. Porém, caso não tenhamos a amostra dos pais fazemos MLPA no paciente que só é utilizado quando necessário, caso seja uma deleção poderemos visualizar, já os outros mecanismos não serão vistos por esta técnica. No laboratório seguimos o fluxograma abaixo descrito (Figura 3). Em casos de adoção e na ausência de um dos genitores só é realizado o teste de metilação para o diagnóstico da síndrome e o MLPA consegue distinguir casos de deleção, porem os demais mecanismos não são diagnosticados.

Figura 4: Estratégia diagnóstica aplicada no laboratório com os métodos utilizados para a detecção do subtipo genético específico da PWS.

1.4 Aconselhamento genético

Malformações congênitas são uma das primeiras causas de mortalidade infantil; estudos de morbidade em crianças mostram que doenças genéticas e defeitos congênitos representam de 10 a 25% das internações em assistência terciária nos centros urbanos da América Latina (Duarte L.C., 2009; Corrêa E.A., 2012). Quando uma pessoa é diagnosticada com um distúrbio, essa pessoa e seus familiares precisam entender a natureza e as consequências, se o problema for hereditário será preciso entender os riscos genéticos nesta família, para isso uma consulta de aconselhamento genético é indicada.

Uma das definições aceitas de Aconselhamento Genético (AG) é a adotada pela *American Society of Human Genetics* e segundo esta definição, trata-se do processo de comunicação que lida com problemas humanos associados com a ocorrência, ou risco de ocorrência, de uma doença genética em uma família, envolvendo a participação de uma ou mais pessoas treinadas para ajudar o indivíduo ou sua família a: compreender os fatos médicos, incluindo o diagnóstico, provável curso da doença e as condutas disponíveis; apreciar o modo como a hereditariedade contribui para a doença e o risco de recorrência para parentes específicos; entender as alternativas para lidar com o risco de recorrência; escolher o curso de ação que pareça apropriado em virtude do seu risco, objetivos familiares, padrões éticos e religiosos, atuando de acordo com essa decisão; ajustar-se, da melhor maneira possível, à situação imposta pela ocorrência do distúrbio na família, bem como à perspectiva de recorrência do mesmo (Brunoni D., 2002).

O aconselhamento genético previsto neste projeto visa o benefício ao paciente, embora o tratamento de uma doença genética não defira do tratamento de qualquer outro tipo de doença. Na síndrome de Prader Willi o tratamento existente hoje é o hormônio do crescimento que já tem benefícios comprovados para os pacientes.

O risco de recorrência na PWS depende do mecanismo genético (Tabela 3) sendo que os casos de deleção 15q-q13 são em sua maioria

esporádicos, ocorrendo de novo com recidiva menor que 1%, exceto nos raros casos em que um rearranjo cromossômico, podendo ser uma translocação ou inversão, está presente no pai. A dissomia uniparental materna também ocorre tipicamente de novo com risco de recorrência menor que 1%, salvante a possibilidade de uma translocação Robertsoniana estar presente em um dos pais. Os demais casos da síndrome ocorrem por defeito de *imprinting* sendo que em parte desses casos existe uma microdeleção no centro de *imprinting* podendo ser familiar com risco de recorrência de 50%. Porém a maior parte dos casos possuem uma mutação epigenética com risco de recidiva menor que 1% (Cassidy S.B., Driscoll D.J., 2009) Em um cenário onde a mãe possui uma translocação Robertsoniana 15/15, embora pouco provável seria teoricamente possível, o risco de recorrência seria de quase 100% (Driscoll D.J. *et al*, 2016).

O teste de metilação não diferencia o mecanismo genético, e a etiologia genética é importante para o aconselhamento genético e alguns estudos mostram que há associações entre o mecanismo genético e o comportamento do portador da PWS.

Mecanismos genéticos	Frequência	Risco de recorrência
Deleção <i>de novo</i> em 15q11-q13 no cromossomo paterno	65-75%	<1%
Rearranjos cromossômicos	<1%	% a estudar
Dissomia Uniparental Materna	20-30%	<1%
Epimutação (sem exclusão de IC)	<0,5%	<1%
Defeito no centro de <i>imprinting</i>	2%	50% (se presente no pai)

Tabela 3: Risco de recorrência baseado no mecanismo genético (Ramsden S.C. *et al*, 2010; Cassidy S.B. *et al*, 2012)

1.5 Associação Brasileira da síndrome de Prader-Willi

Em setembro de 2016 foi fundada a Associação Brasileira da Síndrome de Prader-Willi (SPW BRASIL) composta por pais e mães de pacientes com a síndrome que se uniram para garantir uma qualidade de vida melhor para seus filhos, hoje com sede no Rio de Janeiro (SPWBRASIL, 2016).

O objetivo principal da SPW BRASIL é o de garantir uma qualidade de vida melhor para os indivíduos com a síndrome; para isso é necessário que os organismos públicos, profissionais da saúde conheçam melhor as características, necessidades e peculiaridades, desses indivíduos, proporcionando a eles melhor qualidade de vida e inclusão social. Promover a defesa dos direitos das pessoas com a PWS, representando-os perante organismos públicos em prol de melhorias nos serviços prestados. Em maio de 2018 a associação contava com 180 pacientes cadastrados em seu site.

No site da SPW BRASIL podemos ter acesso a alertas médicos, guia básico da síndrome para médicos e profissionais da saúde (Anexo A) e cartão de cortocoterapia (Tabela 4) com suas condições de uso, essenciais para o atendimento principalmente de emergências médicas; neste cartão estão especificados os momentos e as doses de cortisona recomendadas nos casos de estresse do organismo já que os pacientes com a síndrome possuem insuficiência adrenal o que leva a deficiência na produção deste hormônio.

A Associação também disponibiliza aos pais, profissionais que possuem um maior conhecimento da síndrome em diversas áreas e espalhados por todo o país (todos estão cadastrados na SPW BRASIL) e possuem experiência com a síndrome e suas peculiaridades. Artigos também são encontrados no site, eventos realizados e caminhadas organizadas em prol da síndrome e de sua divulgação.

Hoje existe o núcleo de tratamento especializado da síndrome no Rio de Janeiro, o Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia (IEDE), e em São Paulo, no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com acompanhamento médico, nutricional, psicológico, psiquiátrico e neurológico.

Nível de estresse	Se seu filho consegue engolir o comprimido	Se seu filho não consegue engolir ou reter a medicação
Leve • Não está bem • Indisposto • Temperatura abaixo de 38°C	Não administre medicação	Método D e E são destinados aos cuidados agudos se o seu filho estiver vomitando ou não conseguir engolir absolutamente nenhum comprimido. A medicação deve sempre ser continuada sob a forma de comprimidos, em consulta com o pediatra.
Moderado • Gripe • Infecção • Vômito, diarreia • Temperatura entre 38°C e 39°C • Vacinação • Anestesia (dentista) • Provas (escolares), exames	Método A: Dose moderadamente alta de (hidro)cortisona 4 vezes ao dia 7,5 mg/m ² /dia (30 mg/m ² por dia) Dê a medicação por menos tempo possível. Às vezes, dar apenas uma vez já é o suficiente. Se o seu filho melhorar em 1 - 2 dias, pare de dar a medicação. Se seu filho ficar doente por mais tempo, consulte o pediatra para saber quando e como deve parar (ou se a dose deve ser retirada gradativamente).	Método D: Utilizar o supositório de hidrocortisona para cuidados agudos • Menos de 2 anos: 1 supositório de hidrocortisona de 50 mg • 2 - 10 anos: 1 supositório de hidrocortisona de 100 mg • 10 anos ou mais: 2 supositórios de 100 mg Se o vômito parar depois disso, volte imediatamente a tomar comprimidos (método B). Se o vômito não melhorar em 1 hora, você deve entrar em contato com o pediatra ou endocrinologista e o método E deve ser administrado (injeção por um médico ou enfermeiro).
Grave • Temperatura acima de 39°C • Muito doente • Cirurgia, anestesia • Acidente	Método B: Dose alta de (hidro)cortisona 4 vezes ao dia 15 mg/m ² /dia (60 mg/m ² por dia) ou Método C: Comprimido de Dexametasona • Menos de 10 anos: meio comprimido duas vezes por dia de dexametasona 0,5 mg. • 10 anos ou mais: duas vezes ao dia 1 comprimido de dexametasona de 0,5 mg. Consulte o pediatra para saber quando e como deve parar (ou se a dose deve ser retirada gradativamente).	ou Método E: Dar a injeção de Dexametasona (ampola 5 mg/ml), para um médico ou enfermeiro aplicar • Menos de 6 anos: Injetar 1/2 ampola de dexametasona (2,5 mg) no músculo • 6 anos ou mais: Injetar 1 ampola de dexametasona (5 mg) no músculo Se o seu filho se recompor em uma hora e meia, voltar para os comprimidos (método B). Se o seu filho não se recompor em uma hora e meia, voltar a ser avaliado pelo pediatra ou endocrinologista.

Tabela 4: Cartão de corticoterapia distribuído aos pacientes portadores da síndrome de Prader-Willi (SPW BRASIL).

1.6 Diagnóstico precoce

O diagnóstico diferencial da hipotonia em recém-nascidos compreende doenças neuromusculares como amiotrofia espinal infantil e miopatias congênicas e para o estudo dessas doenças é recomendado a realização de eletroneuromiografia e biópsia muscular e estes testes são invasivos e podem ser inconclusivos. Na síndrome de Prader-Willi a biópsia muscular pode mostrar achados não específicos (atrofia de fibras tipo II) (Fridman C. *et al*, 2000). O teste de metilação precoce evita procedimentos mais invasivos e garante o suporte inicial aos pacientes e seus familiares.

A maioria dos países em desenvolvimento pode chegar a um diagnóstico precoce, com cerca de 8,6 semanas de vida, porém mesmo em centros de referência a média do diagnóstico ocorre aos 3,9 anos (Passone C.B.G. *et al*, 2018)

O teste de metilação que será aplicado neste trabalho diagnóstica aproximadamente 98% dos casos da síndrome e cerca de 94% dos portadores da síndrome de Prader-Willi possuem hipotonia durante o período neonatal, período que consiste do nascimento ao vigésimo oitavo dia de vida. De 65 nascidos com hipotonia de causa desconhecida, 29 pacientes (45%) tiveram o teste positivo para a PWS (Gillesen- Kaeshach G. *et al*, 1995). Este trabalho mesmo com um número amostral pequeno mostra que a PWS é uma causa significativa de hipotonia em recém-nascidos.

O diagnóstico precoce viabiliza orientações antecipadas à história natural da síndrome e intervenções, principalmente esclarecer sobre as fases nutricionais aos familiares, alertar sobre o risco de obesidade e a necessidade de controle de ganho de peso com início aproximadamente entre 18 a 36 meses de vida (Driscoll D.J. *et al*, 2016). O início de tratamento precoce com hormônio do crescimento, controle dietético, estímulos à atividade física e terapias são indicados para o melhor desenvolvimento da criança.

O principal objetivo deste trabalho é o de averiguar a síndrome de Prader-Willi em crianças com até um mês de vida que apresentam hipotonia em maternidades de São Paulo, visando o diagnóstico precoce, podendo assim

realizar o aconselhamento genético, orientação e esclarecimento sobre riscos de recorrência, história natural, tratamentos e intercorrências médicas relacionadas a síndrome de Prader-Willi.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

- determinar em neonatos hipotônicos os afetados pela síndrome de Prader-Willi por meio do estudo do padrão de metilação no segmento 15q11-q13
- fornecer diagnóstico, prognóstico e aconselhamento genético às famílias.

3. Casuística e Metodologia

3.1 Casuística

3.1.1 Critérios de inclusão

- Neonatos com hipotonia sem causa conhecida;
- Concordância em participar do estudo. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO B);
- Paciente com o questionário respondido (ANEXO C);
- Neonatos com apgar maior que 5.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Neonatos com história familiar de doenças neuromusculares;
- Neonatos com má formação neuronal;
- Neonatos prematuros;
- Neonatos com apgar menor que 5;
- Anoxiados graves;
- Pacientes sem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Pacientes sem o questionário respondido.

3.2 Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada na sua parte laboratorial na Unidade de Aconselhamento Genético, Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento (CEPID), no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP, e a coleta do material biológico ocorreu em maternidades coparticipantes do projeto na cidade de São Paulo. Os materiais encaminhados de recém-nascidos com suspeita da síndrome que se adequaram aos critérios de inclusão foram analisados neste projeto.

3.3 Metodologia

O DNA foi extraído de *swab* de bochecha e depois foi feito o tratamento com bissulfito para a modificação do DNA, convertendo citosinas desmetiladas para uracilas, e a amplificação por PCR do exon 1 do *SNURF-SNRPN* para a análise da metilação diferenciada para o diagnóstico da síndrome de Prader-Willi (Varela M.C. *et al*, 2005). O gene *SNURF-SNRPN* é rico em dinucleotídeos CpG, as ilhas CpGs são metiladas nos cromossomos maternos, mas desmetiladas no cromossomo paterno e por conta desta metilação diferenciada podemos ver diferentes bandas no gel (Figura 4), a banda materna com 313bp e a banda paterna com 211bp.

Figura 5: Teste de metilação: DNA modificado pelo tratamento com bissulfito e amplificação do exon 1 *SNRPN*.

Os riscos associados com a coleta de *swab* de bochecha incluem: incômodo e/ou desconforto no local da coleta. Foi buscado minimizar esses riscos com uma pessoa capacitada realizando a coleta.

3.3.1 Extração do DNA

A extração do DNA de *swab* de bochecha, foi feita utilizando protocolo fornecido pelo fornecedor do kit de coleta ORAGEN. Neste protocolo para purificação manual de DNA de amostra de saliva com 0,5mL é necessário misturar a amostra no kit DNA Genotek através de inversão e agitar suavemente por alguns segundos, em seguida incubar a amostra a 50°C em banho-maria por pelo menos 1 hora. Transferir 500µL da amostra para um tubo de microcentrifuga, adicionar 20µL de PT-L2P e *vortexar* durante alguns segundos e incubar em gelo por 10 minutos. Centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos a 11.500rpm, transferir com cuidado o sobrenadante limpo para um novo tubo utilizando uma pipeta e eliminando o grânulo; neste sobrenadante adicionar 600µL de etanol a 95% (ou 100%) para limpar o sobrenadante, misturar por inversão suavemente por 10 vezes.

Esta amostra deve repousar em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugada durante 2 minutos à 11.500rpm, o sobrenadante deve ser eliminado cuidadosamente, e a seguir adicionar 250µL de etanol a 70% e deixar repousar durante um minuto, remover completamente o etanol sem perturbar o grânulo, centrifugar algumas vezes até que todo o etanol seque em temperatura ambiente. Adicionar 100µL de TE e *vortexar* a amostra. Incubar por 24 horas em temperatura ambiente.

3.3.2 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio

O DNA genômico extraído foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando o kit da Qiagen - "EpiTectBisulte Kit -. O tratamento consiste em converter as citosinas não metiladas em uracila pela perda do grupo amina da base citosina. As citosinas metiladas ficam protegidas e permanecem inalteradas. Como a desaminação por bissulfito ocorre somente em fita simples

do DNA, a etapa de desnaturação é primordial para a garantia da conversão, pois a presença de citosinas em fragmentos de fita dupla as protegem da desaminação (Martinelli C.M.S., 2015).

De 1ng a 2µg do DNA genômico para o tratamento foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante. Para a reação adiciona-se 5µl de DNA, 15 µl de H₂O, 85 µl de Bissulfito e 35 µl de DNA *Protect Buffer* presentes no kit, seguido de um programa no termociclador onde a amostra fica por 5 h e 07min, passando por um ciclo a 99 °C por 5min, seguida por 25min a 60 °C, 5min a 99°C, 1 h e 25min á 60 °C, 5min a 99°C, 2h e 55min a 60°C. Após o ciclo a amostra permaneceu em uma temperatura de 20°C.

3.3.3 Amplificação por PCR

O DNA modificado por tratamento de bissulfito passa por uma amplificação por PCR do exon1 de *SNURF-SNRPN*. Para a reação foram utilizados os seguintes reagentes: PCR buffer GE (100mM tris, HCl pH=9.0, 15mM MgCl₂ e 500mM KCl) 2.5 µl, dNTP (1.25mM) 4.5 µl, Primer MAT 1.0 µl, Primer PAT 0.25 µl, Primer COM 0.25 µl, Taq GE 0.2 µl, H₂O MilliQ 14.3 µl e 2 µl de DNA tratado. Esta reação foi colocada no termociclador em um programa já pré-determinado, onde por 5 min a amostra ficou a 94°C, seguida de 15 seg a 95°C, 15 seg à 62°C, 30 seg à 70°C, 7 min à 72°C após 35 ciclos a amostra ficou à 10°C. Este programa tem duração de aproximadamente 1h e 36min.

3.3.4 *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

O MLPA permite a identificação de deleções e duplicações cromossômicas associadas a doenças (D'Angelo C.S. et al, 2014). A reação tem cinco etapas fundamentais, que são a desnaturação do DNA genômico e incubação *overnight* com as sondas de MLPA; após a hibridação às

sequencias-alvo, cada sonda de MLPA passa pela reação de ligação e posteriormente ocorre a amplificação por reação de PCR. Os produtos são separados por eletroforese em um sequenciador automático e assim podem ser detectados pela marcação fluorocromática para realizar a análise dos dados no *software GeneMarker* (etapa realizada pela Mestre Cláudia I.E. de Castro).

4. Resultados

4.1 Pacientes

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo nos últimos três anos não teve casos de bebês hipotônicos em 2.400 partos por ano. No Hospital Maternidade Amador Aguiar (Tabela 5) o número de nascimentos médio nos últimos três anos foi de 5.091 e foram relatados alguns casos de hipotônicos nos registros dos últimos anos

Partos	2015	2016	2017
Normal	3344	3300	3205
Cesáreo	1652	1836	1771
Fórceps	13	11	11
Normal gemelar	2	2	5
Cesáreo gemelar	34	51	36
TOTAL	5045	5200	5028

Tabela 5: Número de nascimentos no Hospital Maternidade Amador Aguiar

Dados dos pacientes e materiais coletados para realizar o teste de metilação (Tabela 6)

Pacientes	Coletado/encaminhado	Material
Paciente 1	Coletado	Swab de bochecha
Paciente 2	Encaminhado	Swab de bochecha

Tabela 6: Pacientes participantes do projeto

4.2 Teste do padrão de metilação

A amostra final do estudo foi composta por dois casos com hipotonia neonatal e suspeita clínica da síndrome de Prader-Willi e tinham menos de um mês quando foram encaminhados para o diagnóstico. Os pacientes foram submetidos ao estudo molecular, o teste do padrão de metilação, e, quando houve resultado confirmatório da síndrome foi solicitada a presença dos pais para coleta de material e orientação sobre a síndrome e aconselhamento genético.

Figura 6: Teste do padrão de metilação. Resultados do controle normal, paciente 1 e paciente 2. (imagem cedida pela Dra Monica de Castro Varela)

Paciente UAG 2 confirmou a síndrome de Prader-Willi, e o paciente 1 teve resultado negativo para a síndrome.

Abaixo tabela com quadro clínico dos pacientes (Tabela 7).

Pacientes	1	2
Idade no teste	1mes	1mes
Idade Materna	22	30
Idade Paterna	25	39
Movimentos fetais	-	-
Hipotonia	++	++
Dificuldade de alimentação	+	++
Hipogonadismo	-	-

Tabela 7: Quadro clínico dos pacientes (- não alegaram anormalidade; + apresentaram este sintoma; ++ apresentam alto grau deste sintoma).

4.3 *Multiplex ligation-dependente probe amplification* (MLPA)

As reações de MLPA foram realizadas utilizando kits comerciais e seguindo o protocolo oferecido pelo fornecedor, MRC-Holland, com o objetivo de detectar desequilíbrios dos números de cópias nos genes localizados na região 15q. Os resultados foram analisados pelo *software GeneMarker* e os picos entre 0,750 e 1,250 foram considerados normais, ou seja, indicam a presença de duas cópias do gene (D'Angelo C.S. *et al*, 2014).

No paciente 2 foi empregada a técnica de MLPA com os kits P036 e P070; ambos detectam regiões subteloméricas e podem identificar a região crítica da síndrome de Prader-Willi pois existe uma sonda localizada no braço longo do cromossomo 15 (Figura 7). O kit P036-E3 detectou uma alteração cromossômica com um padrão de amplificação alterado (0,475) da sonda

07291-L08858, condizente com uma microdeleção no gene MKRN3, localizado no cromossomo 15 na região crítica para a síndrome de Prader-Willi (MRC-Holland). O kit P070-B3 também identificou uma alteração no paciente através da sonda 04026-L01542 que apresentou um valor de amplificação concordante com uma microdeleção (0,494) no gene NDN presente na região 15q11-q13(MRC-Holland).

A Paciente com gene MKRN3 deletado

B Paciente com gene NDN deletado

Figura 7: Detecção de deleções por MLPA

Também foi realizada a análise pelo kit P245-B1 (Figura 8) no paciente 2 onde foram detectadas três alterações cromossômicas pelas sondas 10877-L11547, 12178-L13826 e 01318-L23196 apresentando os seguintes valores, respectivamente, de amplificação nos seguintes genes UBE3A (0,500), SNRPN (0,456) e SNRPN (0,519). Essas sondas ficam localizadas no seguimento 15q11.2 e correspondem a deleção na região crítica da PWS (MRC-Holland).

Figura 8: Detecção, pelo kit P245, de três sondas deletadas

5. Discussão

A prevalência da síndrome de Prader-Willi varia entre 1:10.000 a 1:25.000 nascidos vivos sendo o diagnóstico precoce utilizando o teste de metilação de suma importância tendo em vista que o diagnóstico diferencial da hipotonia neonatal é de doenças em sua maioria de origem neuromuscular e com diagnóstico realizado por eletroneuromiografia e/ou biópsia muscular, que são exames invasivos e de difícil interpretação. E, sobretudo, permite que os pais já com o diagnóstico do seu filho tenham a oportunidade de prevenir o início da obesidade e se adequem à restrição alimentar e estímulos a atividade física.

A obesidade é o sintoma mais conhecido da síndrome e é considerado o principal problema de saúde desses pacientes; cerca de 1/3 dos portadores da síndrome pesam mais de 200% do seu peso ideal (Fridman C., 1995) e a obesidade pode acarretar diversas complicações como hipertensão e diabetes.

O projeto foi encaminhado para a Comissão de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, e como centros coparticipantes tivemos a maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo e o Hospital Maternidade Amador Aguiar (Plataforma Brasil: 69238917.6.0000.5464)

Neste trabalho em um prazo de doze meses foram encaminhados dois pacientes com suspeita da síndrome de Prader-Willi que apresentavam hipotonia neonatal de causa desconhecida; estes pacientes estavam dentro dos critérios de inclusão do projeto e foi realizado o teste de padrão de metilação em ambos os casos e em um dos pacientes foi constatada a síndrome.

A hipotonia é um aspecto tão significativo no recém-nascido, podendo ser observada no choro fraco, diminuição dos reflexos e da sucção, o que pode levar a dificuldade de ganho de peso e crescimento na primeira infância. A hipotonia é um critério para investigação específica mesmo sem outros sinais e

sintomas como o hipogonadismo e dismorfismos faciais. A hipotonia em PWS é de origem central, sendo que os estudos neuromusculares por biópsia se mostram normais ou apresentam sinais inespecíficos (Cassidy S.B. *et al*, 2012; Araújo L.L., Ferreira P.L.F.T., Leite I.R., 2012).

O paciente 2 teve resultado positivo no teste de metilação e em exame por MLPA realizado ficou evidenciada a deleção do segmento 15q11.2-13.

O diagnóstico precoce e o aconselhamento genético são muito importantes para o desenvolvimento da criança sob o ponto de vista educacional, terapêutico e para manter hábitos saudáveis, como uma alimentação equilibrada e a prática de atividades físicas. A conscientização obtida no aconselhamento é importante para mostrar as famílias que uma criança portadora da síndrome de Prader-Willi precisa de limites como outra criança qualquer e principalmente uma rotina bem estabelecida.

Aspectos emocionais dos genitores tais como: ansiedade, culpa, tristeza, negação, hostilidade ao companheiro, revolta e rejeição, devem ser abordados durante o aconselhamento genético.

No aconselhamento genético é preciso enfatizar que a dieta restritiva orientada por nutricionista deve ser aplicada desde cedo, mesmo que o bebê não tenha ainda obesidade; esse procedimento é muito difícil para mães e avós pois o fato do bebê ser hipotônico (fraquinho) as faz dar alimentação reforçada na tentativa de não “perder” a criança.

A intervenção precoce e o acompanhamento de equipe composta por profissionais da saúde como médicos endocrinologistas, pediatras e neonatologias orientam as famílias a fim de diminuir problemas relacionados com a obesidade e suas intercorrências como diabetes, hipertensão, problemas respiratórios e a insuficiência adrenal secundária, que são consideradas as principais causas de óbito nestes indivíduos. E terapias como equoterapia, terapia ocupacional, acompanhamento psicológico, fisioterapia, fonoaudiologia dentre outras que são necessárias durante o desenvolvimento do portador da síndrome auxiliando na evolução e aprendizado.

Além das terapias mencionadas acima, em 2000 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do hormônio do crescimento (hrGH) visando à melhora do metabolismo do paciente. Diversos estudos mostraram que o uso do hrGH melhora a relação entre a massa magra e a massa gorda, e ainda restabelece força muscular para melhorar a qualidade de vida e facilitar a atividade física e também pode ocorrer melhora da massa óssea e do perfil lipídico (Damiani D., 2008).

Festen D.A.M. *et al* em 2008 fizeram um estudo com 91 pacientes com PWS sendo que lactantes e crianças de 3 a 14 anos tiveram um aumento de altura de 1,9cm após dois anos de tratamento enquanto o grupo sem o hrGH não teve alteração de altura. No grupo que recebeu o tratamento hormonal houve elevação de massa magra e redução da porcentagem de gordura corpórea. O início do tratamento com o hrGH na PWS tem sido indicado o mais precoce possível.

Os benefícios do início do tratamento entre 4 a 6 meses têm sido demonstrados na melhora dos marcadores do desenvolvimento como cognição, linguagem, QI verbal, desempenho motor e aumento da mobilidade, e já foram relatadas melhoras nos níveis de colesterol. Alguns especialistas já indicam o início do tratamento aos 3 meses de vida, com uma dose igual ao de um indivíduo com *déficit* de hrGH, 1mg/m²/dia (Associação Brasileira da Síndrome de Prader-Willi).

Um grupo de pacientes com PWS que não faziam tratamento com hrGH foram investigados quanto a composição corporal e os peptídeos reguladores do apetite e comparados com controles saudáveis; os pacientes tinham uma quantidade maior de massa gorda e menor de massa magra quando comparados ao controle. As concentrações de leptina e proteína-C reativa foram elevadas nos pacientes com a síndrome e os níveis de adiponectina estavam dentro do intervalo de referência, níveis de resistina foram normais ou diminuídos nos pacientes, porém em obesos normais esses níveis são aumentados (Van Nieuwpoort I.C. *et al*, 2018).

O peptídeo grelina estimula a ingestão de alimentos e é reduzido após a ingestão alimentar em indivíduos normais, porém os níveis de grelina plasmática nos indivíduos com a síndrome de Prader-Willi são elevados quando comparados com controles obesos e saudáveis. A leptina é conhecida como o hormônio inibidor do apetite e é secretada preferencialmente pelo tecido adiposo; estudos sobre a concentração deste hormônio em pacientes com a síndrome são conflitantes pois mostram níveis normais ou elevados, sendo que em pessoas normais após o jejum existe uma redução dos níveis hormonais (Van Nieuwpoort I.C. *et al*, 2018).

Um estudo mostrou como um paciente de 6 anos de idade portador da síndrome, com contra indicação do tratamento com hrGH, após um ano de atividade física com estímulos diferenciados, tendo sido alocado para 3 tipos de atividades jiu-jitsu, futsal e treinamento funcional, , mostrou uma alteração da classificação no IMC de obesidade para sobrepeso, aumento significativo da massa magra com leve redução da massa gorda, apresentando o desenvolvimento muscular e a manutenção do peso mesmo sem o tratamento com o hrGH (da Silva M.V.P., da Souza L.P., 2017).

Planos alimentares hipoenérgicos com restrição energética igual ou inferior a 60% do padrão recomendado devem ser prescritos e aplicados ainda na fase anterior a hiperfagia e essencialmente durante esse período. O controle precoce do ambiente e do comportamento da criança portadora da síndrome faz parte do plano de intervenção onde existem estratégias que podem ser usadas como: supervisão no momento das refeições, não fazer uso do alimento como forma de recompensa positiva e manter horários bem definidos para as refeições (Machado A.D. *et al*, 2012).

Inúmeros trabalhos que analisaram hipotonia infantil em maternidades mostraram resultados extremamente variados, como no Canadá: de 1990 a 2000 foram relatados 89 neonatos hipotônicos e destes 5 foram diagnosticados com PWS, sendo assim 5,6% (Birdi K. *et al*, 2004). Na Eslovênia em um período de 10 anos foram descritos 138 casos de neonatos hipotônicos e destes casos 13 foram diagnosticados com a síndrome de Prader-Willi, uma incidência de 9,4% (Para-Panjan D, Neubawer D., 2008).

Na França de 1999 a 2005 um trabalho encontrou 144 neonatos hipotônicos, 4,2% dos 3455 recém-nascidos e destes 4 foram diagnósticos com PWS, sendo assim 2,7% (Laugel V. *et al*, 2008). No Canadá de 1989 a 1999 foram registrados 50 casos, destes 6 foram diagnosticados com PWS o que representa 12% dos neonatos hipotônicos neste período (Richer L.P., Shevell M.I., Miller S.P., 2005).

Em um trabalho publicado em 1995 Gillessen-Kaesbach G. *et al* encontraram no período de dois anos 65 neonatos hipotônicos dos quais 29 portadores da síndrome de Prader-Willi, uma prevalência de 45%.

Outras causas de hipotonia neonatal além da PWS compreendem doenças neuromusculares sendo o diagnóstico destas doenças realizado por exames invasivos, ao contrário do teste do padrão de metilação que pode ser realizado a partir da saliva do neonato.

Neste período neonatal, que consiste no intervalo entre o nascimento e o vigésimo oitavo dia de vida, a fase 1 da síndrome, existem algumas outras síndromes que podem causar hipotonia e podem ser confundidas com a PWS, como as miopatias congênitas, cuja diferenciação da síndrome da PWS são os elevados índices de creatino-quinase e a apresentação de oftalmoplegia externa; atrofia muscular espinal na qual os pacientes apresentam boa interação com o ambiente e dificuldade de alimentação apenas na fase final da doença; a miastenia neonatal na qual os pacientes apresentam hipotonia grave que pode ser revertida com o tratamento de anticolinesterase, a distrofia muscular congênita grave sendo que a diferenciação dessa síndrome com a PWS ocorre com base na presença de cardiomegalia extrema; a atrofia muscular peroneal cujo início da hipotonia é tardio com raros casos de hipotonia na infância. Outra causa de hipotonia neonatal são as lesões de medula ocasionadas por partos traumáticos e nestes casos os pacientes apresentam patologias cerebrais que podem ser vistas em exames detalhados, a síndrome de Zellweger na qual os pacientes apresentam catarata e/ou glaucoma, hepatomegalia e convulsões além da dificuldade de alimentação continuar, o que não ocorre na PWS, e a síndrome de Down na qual o

diagnostico diferencial ocorre pelas características físicas e estudo cromossômico (Fridman C., 1995).

A idade materna avançada aumenta a chance de ocorrência da síndrome pelo mecanismo da dissomia uniparental (UPD); sabemos que cerca de 25 a 30% dos casos de PWS são por UPD e portanto há um risco de 1:33.000 a 1:100.000 de nascimento de uma criança com UPD, que aumenta conforme a idade materna, assim como na síndrome de Down, atingindo 1:3400 em mulheres com mais de 40 anos (Robinson W.P. *et al*, 1996; Cho S.Y. *et al*, 2013).

Segundo a OMS, 10% da população brasileira é portadora de algum tipo de deficiência e dentre elas a deficiência intelectual representa um sério problema de saúde pública. Em 1992 a triagem neonatal foi introduzida no SUS e incluía teste para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito. Em 2001 incluíram testes para anemia falciforme, outras hemoglobinopatias e fibrose cística (Ministério Da Saúde Brasil, 2002).

Para uma doença ser introduzida na triagem neonatal deve ser um problema importante de saúde pública, ter sua história natural bem estabelecida, ser passível de diagnóstico no período pré-sintomático ou com sintomas iniciais, e o teste deve ser simples, seguro, confiável e barato, ter risco menor da triagem em relação ao risco da doença. E o tratamento deve ser efetivo e ser associado a um melhor prognóstico aos pacientes (Magalhães P.K.R. *et al*, 2009; Souza C.F.M., Schwartz I.V., Guigliani R., 2002).

O teste de metilação apesar de não ser de baixo custo, caso seja introduzido na triagem neonatal, não seria aplicado a todas as crianças apenas aos neonatos hipotonicos de causa desconhecida. A SPW é um problema de saúde pública já que as maiores intercorrências são resultados do diagnostico tardio, baixo conhecimento dos profissionais da saúde sobre a síndrome e as intercorrências decorrentes da obesidade. A história natural da síndrome já foi bem estabelecida e hoje se sabe que o tratamento com hrGH é comprovadamente efetivo podendo levar a um bom prognostico quando associado a terapias e dieta restritiva.

Hoje a Associação Brasileira da Síndrome de Prader-Willi é formada por mais de 180 pacientes cadastrados e cerca de 60 associados (dados fornecidos por responsáveis pela associação,). Estima-se que existam hoje no Brasil de 13.300 a 20.000 pacientes com a síndrome. O baixo número de pacientes cadastrados mostra que grande parte dos pacientes não tem acesso a informação e possivelmente não tenham o diagnóstico da síndrome.

6. Conclusão

O teste do padrão de metilação diagnostica aproximadamente 98% dos casos da síndrome de Prader-Willi e a hipotonia no período neonatal ocorre em 94% dos portadores. Apesar desta síndrome não ter cura, existe tratamento que pode melhorar o prognóstico dos pacientes quando o diagnóstico ocorre de maneira precoce.

Mesmo com um número amostral bem reduzido e um tempo de coleta de material bem menor do que dos outros trabalhos já publicados, foi diagnosticado um caso da síndrome de Prader-Willi, o que reforça a necessidade da inclusão deste teste como rotina em neonatos com hipotonia de causa desconhecida.

Houve outros encaminhamentos para realização do teste, porém os pacientes não estavam dentro dos critérios de inclusão, não estavam mais no período neonatal, e não puderam fazer parte dessa dissertação.

RESUMO

A síndrome de Prader-Willi é uma desordem complexa neurogenética associada a três mecanismos genéticos distintos: deleção paterna da região 15q11-q13, dissomia uniparental materna do cromossomo 15 e defeitos no centro de *imprinting* genômico. As principais características da síndrome na primeira fase são a hipotonia de causa desconhecida em neonatos, dismorfismos, dificuldades de alimentação e hipogonadismo.

O principal objetivo deste trabalho foi identificar portadores da síndrome de Prader-Willi em neonatos (pacientes com até 28 dias de vida) que apresentaram hipotonia neonatal em maternidades de São Paulo.

Neste estudo foram analisados por teste de metilação dois pacientes com suspeita da síndrome de Prader-Willi que apresentavam os requisitos de inclusão do trabalho. Para que o teste fosse feito de maneira menos invasiva possível foi realizada a coleta de saliva dos pacientes por *swab* de bochecha, para extração de DNA. Em um período de um ano, foi confirmada a síndrome em um paciente do grupo. Mesmo com um número amostral reduzido já esperado pelo curto período de coleta, foi diagnosticado um caso precocemente, o que reforça a importância da inclusão da pesquisa para a síndrome de Prader-Willi no grupo de neonatos hipotônicos de causa desconhecida.

ABSTRACT

Prader-Willi syndrome is a complex neurogenetic disorder associated with three distinct genetic mechanisms. They are: the 15q11-q13 paternal deletion, maternal uniparental disomy of chromosome 15 and defects in the imprinting center. The main characteristics of the syndrome in the first phase are the hypotonia of unknown cause in neonates, dysmorphisms, feeding difficulties and hypogonadism.

The main objective of this study was to identify neonates with Prader-Willi syndrome (patients up to 28 days old) that presented neonatal hypotonia. Two hospitals, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo and Hospital Maternidade Amador Aguiar, collaborate with this investigation.

In this study, two patients with hypotonia and poor suck satisfied the diagnostic criteria and were analyzed by methylation test. In order to make the test less invasive, saliva was collected from patients by swab. During a period of one year, the syndrome was confirmed in one patient in the group. Even with a reduced sample, already expected due to the short collection period, a case was early diagnosed, which reinforces the importance of including the genetic tests for Prader-Willi syndrome in the group of hypotonic neonates of unknown cause.

7. Referências

ANGLIN, K. Prader-Willi Syndrome 101: An Overview for Pediatric Nurses. **J Pediatr Nurs**, [S.L], v. 36, p. 263-264, set./out. 2017.

ARAÚJO, L L ; FERREIRA, P L F T; LEITE, I R. Síndrome de Prader-Willi: uma revisão atualizada. **Pediatria Moderna**, [S.L], v. 48, n. 8, ago./set. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA SÍNDROME DE PRADER WILLI. **A importância do tratamento com hormônio de crescimento em pessoas com a síndrome de prader-willi (spw)**. Disponível em: <<https://www.spwbrasil.com/>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

BARINI, R. et al. Desempenho da Ultra-sonografia Pré-natal no Diagnóstico de Cromossomopatias Fetais em Serviço Terciário. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, [S.L], v. 24, n. 2, p. 121-127, set./out. 2002.

BIRDI, K. et al. Congenital hypotonia: is there an algorithm?. **J Child Neurol**, [S.L], v. 19, n. 6, p. 439-442, mai./jun. 2004.

BRUNONI, D. Aconselhamento Genético. **Ciênc. saúde coletiva**, [S.L], v. 7, n. 1, p. 101-107, jan./fev. 2002.

CARVALHO, D. F. D. et al. Abordagem terapêutica da obesidade na síndrome de Prader-Willi. **Arq Brasil Endocrinol Metab.**, [S.L], v. 51, n. 6, p. 913-919, mai./jun. 2007.

CASSIDY, S B. Prader-Willi syndrome. **J Med genet**, [S.L], v. 17, n. 1, p. 3-13, jan./fev. 2009.

CASSIDY, S B. Prader-Willi syndrome. **J MED GENET**, [S.L], v. 34, n. 11, p. 917-923, nov./dez. 1997.

CASSIDY, S B; DRISCOLL, D J. Prader-Willi syndrome. **Eur J Hum. Genet**, [S.L], v. 17, n. 1, p. 3-13, set./jan. 2009.

CASSIDY, S. B. et al. Prader-Willi syndrome. **Genet Med**, [S.L], v. 14, n. 1, p. 10-26, set./jan. 2012.

CHO, S. Y. et al. The proportion of uniparental disomy is increased in Prader-Willi syndrome due to an advanced maternal childbearing age in Korea. **J Hum Genet**, [S.L], v. 58, n. 3, p. 150-154, dez./jan. 2013.

CORRÊA, E.A. Estudo do sono na síndrome de Prader-Willi com e sem tratamento com hormônio de crescimento humano recombinante. **Doctoral Thesis**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

CRESCIMENTO INFANTIL. **Doenças raras**. Disponível em: <<https://crescendoinfantil.wordpress.com/2016/04/13/crescer-criancainfantiljuvenilherancas-paternas-imprinting-igf-insulin-like-growth-factor-2/>>. Acesso em: 18 out. 2016.

DA SILVA, M V P; DE SOUZA, L P. Efeito da atividade física com estímulos diferenciados em uma criança com síndrome de Prader-Willi e com contra-indicação ao uso de rhGH. Ênfase no IMC e dados de massa corpórea: Um relato de caso. **Revista de Saúde**, [S.L], v. 8, n. 1, jan./jun. 2017.

DAMIANI, D. Uso de hormônio de crescimento na síndrome de Prader-Willi. **Arq Bras Endocrinol Metab**, [S.L], v. 52, n. 5, p. 833-838, jun./jul. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302008000500015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 jan. 2017.

DUARTE L.C. Incidência de malformações congênitas em recém-nascidos em hospital geral, Dourados-MS no período de 2003 a 2007. **Doctoral Thesis**. Universidade de Brasília. 2009

DRISCOLL, D. J. et al. Prader-Willi syndrome. **GeneReviews**, [S.L], v. 1, out./fev. 2016.

DRISCOLL, D. J. et al. Prader-Willi Syndrome. **GeneReviews® [Internet]**, [S.L], out./jan. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1330/>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

D'ANGELO, C. S. et al. Investigation of selected genomic deletions and duplications in a cohort of 338 patients presenting with syndromic obesity by

multiplexligation-dependent probe amplification using synthetic probes. **Molecular Cytogenetics**, [S.L], v. 7, n. 1, p. 67-75, mai./jun. 2014.

FESTEN, D. A. M. et al. Randomized controlled GH trial: effects on anthropometry, body composition and body proportions in a large group of children with Prader–Willi syndrome. **Clinical Endocrinology**, [S.L], v. 69, n. 3, p. 443-451, set./out. 2008.

FRIDMAN, C. Estudo Genético-clínico de síndromes associadas à região 15q11-q13. Master's Thesis Instituto de Biociências. V.1 jun/jul 1995.

FRIDMAN, C. et al. Paternal UPD15: further genetic and clinical studies in four Angelman syndrome patients. **Am. J. Med. Genet.**, [S.L], v. 92, p. 322-327, jan./fev. 2000.

FRIDMAN, C. Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Angelman: Imprinting Genômico na Espécie Humana. **Sociedade Brasileira de Genética, Série Monografias**, [S.L], n. 5, p. 1-55, jun./jul. 1997.

GILLESSEN-KAESBACH, G. et al. DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome. **J Med Genet**, [S.L], v. 32, p. 88-92, mar./abr. 1995.

GUNAY-AYGUN, M. et al. The changing purpose of Prader-Willi syndrome: clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. **Pediatrics**, [S.L], v. 108, n. 5, p. 92, jan./fev. 2001.

HOLM, V. A. et al. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. **Pediatrics**, [S.L], n. 91, p. 398-402, mai./jun. 1993.

HUTSON, J. M. et al. Malformation syndromes associated with disorders of sex development. **Nat. Rev. Endocrinol.**, [S.L], v. 10, n. 8, p. 476-487, jun./jul. 2014.

IBGE. **ibge. censos demográficos de 1980,1991,2000 e 2010 e contagem da população 1996.** Disponível em: <<https://brasilemsintese.ibge.gov.br/populacao/populacao-total-1980-2010.html>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

IRIZARRY, K. A. et al. Prader-Willi syndrome: genetics, metabolomics, hormonal function and new approaches to therapy. **Advances in Pediatrics**, [S.L], v. 63, n. 1, p. 47-77, set./out. 2016.

LAUGEL, V. et al. Diagnostic approach to neonatal hypotonia: retrospective study on 144 neonatal. **Eur. J. Pediatr.**, [S.L], v. 167, n. 5, p. 517-523, jun./jul. 2008

LEDBETTER, D. H. et al. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. **N. Engl. J. Med**, [S.L], v. 304, p. 325-329, fev./mar. 1981.

MACHADO, A. D. et al. OBESIDADE, ASPECTOS METABÓLICOS E CONDUTA NUTRICIONAL NA SÍNDROME DE PRADER-WILLI. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, [S.L], v. 12, n. 2, p. 77-82, mai./jun. 2012.

MAGALHÃES, P. K. R. et al. Programa Nacional de Triagem Neonatal. **Cad. Saúde Pública**, Universidade de São Paulo, Brasil, v. 25, n. 2, p. 445-454, jan./fev. 2009.

MARTINELLI, C M S. Avaliação do perfil de metilação de gene alvo candidato em tumores de células germinativas de testículos. **Master's Thesis**. Fundação Pio XII- Hospital de Câncer de Barretos, [S.L], v. 1, p. 1-105, jun./jul. 2015.

MESQUITA, M. L. et al. Fenótipo comportamental de crianças e adolescentes com síndrome de Prader-Willi. **Revista Paulista de Pediatria**, [S.L], v. 28, jan./fev. 2010.

MINISTERIO DA SAÚDE BRASIL. **Programa nacional de triagem neonatal**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/porta/saude/area.cfm?id_area=10612>. Acesso em: 16 jul. 2018.

MRC-HOLLAND. **Product description salsa® mlpa® probemix p036-e2 subtelomeres mix 1.** Disponível em: <https://mlpa.com/webforms/webformdbdata.aspx?fileoid=_mhcvtuu0upiy>. Acesso em: 02 out. 2018.

MRC-HOLLAND. **Product description salsa® mlpa® probemix p070-b3 subtelomeres mix 2b.** Disponível em: https://mlpa.com/webforms/webformdbdata.aspx?fileoid=_rg7snwhsfp0.>
Acesso em: 02 out. 2018.

MRC-HOLLAND. **SALSA MLPA probemix P245-B1 Microdeletion Syndromes-1.** Disponível em: https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_H5wqoO1LiFY..>. Acesso em: 02 out. 2018.

PARA-PANJAN, D; NEUBAUER, D. Diagnostic approach to neonatal hypotonia: retrospective study on 144 neonates. **Eur J Pediatr.**, [S.L], v. 167, n. 5, p. 517-523, jul./mai. 2008.

PASSONE, C. B. G. et al. Síndrome de Prader Willi: o que o pediatra geral deve fazer – uma revisão. **Rev Paul Pediatr.**, [S.L], v. 36, n. 3, p. 345-352, fev./mai. 2018.

RAMSDEN, S. C. et al. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. **BMC Medical Genetics**, [S.L], v. 11, p. 70, mar./abr. 2010.

RICHER, L P; SHEVELL, M I; MILLER, S P. The floppy infant: retrospective analysis of clinical experience (1990-2000) in a tertiary care facility. **J Child Neuro**, [S.L], v. 20, n. 10, p. 803-808, set./out. 2005.

ROBINSON, W. P. et al. Cytogenetic and age-dependent risk factors associated with uniparental disomy 15. **Prenat Diagn**, [S.L], v. 16, p. 837-844, mai./jun. 1996.

SABIN, M A; WERTHER, G A; KIESS, W. Genetics of obesity and overgrowth syndromes. **Best Pract Res Clin. Endocrinol Metab.**, [S.L], v. 25, n. 1, p. 207-220, jan./fev. 2011.

SMITH, A; HUNG, D. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi Syndrome. **Translational Pediatrics**, [S.L], v. 6, n. 1, p. 46-56, ago./set. 2017.

SOUZA, C F M; SCHWARTZ, I V; GUIGLIANI, R. Triagem Neonatal de Distúrbios Metabólicos. **Cienc. & Saúde Colet.**, [S.L], v. 7, n. 1, p. 129-137, jun./jul. 2002.

SPWBRASIL. **A associação.** Disponível em: <<https://www.spwbrasil.com/associacao>>. Acesso em 20 out.2017.

TAMAKI, J. et al. Síndrome de Prader-Willi: uma revisão da literatura. **Rev. CIF Brasil**, [S.L], v. 2, n. 2, p. 44-56, mai./jun. 2015.

TURNPENNY, et al. **Genética médica**. 13 ed. [S.L.]: Elsevier, 2009. 117 p.

VAN-NIEUWPOORT, I. C. et al. Body composition, adipokines, bone mineral density and bone remodeling markers in relation to IGF-1 levels in adults with Prader-Willi syndrome.. **Int J Pediatr Endocrinol**, [S.L], v. 1, jan. 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s13633-018-0055-4>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

VARELA, M C. Síndromes de Prader-Willi e Angelman: Análise cromossômica, espectro da variabilidade fenotípica e o papel dos cromossomos marcadores. **Master's Thesis**, Instituto de Biociências, v. 1, mar./abr. 1999.

VARELA, M. C. et al. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. **Clin Genet**, [S.L], v. 67, p. 47-52, out./nov. 2005.

8. Anexos

Anexo A

GUIA BÁSICO DA SÍNDROME DE PRADER-WILLI PARA MÉDICOS E DEMAIS PROFISSIONAIS DA SAÚDE

O QUE É A SÍNDROME DE PRADER-WILLI?

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) tem origem em um distúrbio genético, não hereditário, resultante da ausência ou não expressão de genes no cromossomo 15. Ocorre em 1:15 mil a 1:30 mil nascimentos vivos, em ambos os sexos e em todas as etnias. É uma síndrome grave, complexa e que, até o momento, não tem cura.

A SPW é caracterizada, principalmente, por:

- Hipotonia
- Hipogonadismo
- Hiperfagia
- Comprometimento cognitivo
- Transtornos comportamentais
- Obesidade potencialmente fatal.

A principal preocupação médica é a obesidade mórbida. Mas, por meio de diagnóstico e intervenção precoces, muitos indivíduos conseguem manter um peso saudável.

CAUSA E DIAGNÓSTICO DA SPW

A SPW ocorre, principalmente, a partir de três erros genéticos. Aproximadamente 70% dos casos apresentam uma deleção no cromossomo 15 paterno. Cerca de 25% têm disomia uniparental materna: dois cromossomos 15 maternos e nenhum cromossomo 15 paterno. E 2% a 5% têm um erro no processo de "imprinting", que deixa a contribuição paterna não funcional; esses defeitos de imprinting podem, raramente, ser herdados.

Diagnóstico Indivíduos que possuem certo número de características clínicas da síndrome devem ser encaminhados para avaliação genética. A análise de metilação do DNA confirma o diagnóstico de SPW. Outras técnicas de análise do DNA e de FISH podem identificar a causa genética específica e os possíveis riscos de recorrência na mesma família.

CARACTERÍSTICAS EM POTENCIAL

Todo recém-nascido com hipotonia global sem causa conhecida deve ser submetido a exame para SPW. As características a seguir aumentam as suspeitas para o diagnóstico de SPW:

- ✓ Movimentos fetais diminuídos, bebê letárgico, com choro fraco
- ✓ Dificuldade de sucção e pouco ganho de peso nos primeiros meses de vida
- ✓ Ganho de peso rápido ou excessivo entre 1 e 6 anos de idade; obesidade central se não houver intervenção
- ✓ Traços faciais distintivos – dolicocefalia em bebês, diâmetro bifrontal diminuído, olhos amendoados, boca pequena, com lábio superior fino e cantos curvados para baixo
- ✓ Hipogonadismo – hipoplasia genital, incluindo testículos que não desceram e pênis pequeno; puberdade tardia, com menstruação escassa ou inexistente
- ✓ Atraso no desenvolvimento global antes dos 6 anos de idade; deficiência cognitiva de leve a moderada ou problemas de aprendizagem em crianças mais velhas
- ✓ Hiperfagia; interesse e/ou obsessão por comida
- ✓ Possíveis acessos de raiva, comportamento obsessivo-compulsivo, opostor, rígido, possessivo, teimoso, mas também amável e aletuoso
- ✓ Distúrbios do sono, principalmente sonolência diurna e apnéia do sono
- ✓ Estatura baixa para a herança genética se não for tratado com hormônio do crescimento
- ✓ Hipopigmentação – pele e cabelo mais claros que os pais, principalmente nos casos de deleção
- ✓ Mãos e/ou pés pequenos. Borda ulnar reta
- ✓ Osteoporose – pode ocorrer cedo e causar fraturas; recomenda-se exame de densitometria óssea
- ✓ Diabetes mellitus do tipo 2 – secundário à obesidade; responde bem à perda de peso; necessária a avaliação periódica de pacientes obesos

- ✓ Problemas nos dentes – podem incluir hipoplasia do esmalte, saliva espessa, bruxismo
- ✓ Problemas de articulação dos sons da fala e apraxia de fala na infância
- ✓ Estrabismo – esotropia é comum; necessária intervenção precoce, possivelmente cirurgia
- ✓ Escoliose – pode ocorrer precocemente; cifose também é comum em adolescentes e adultos.

ALERTAS MÉDICOS COM RISCO DE VIDA

Reações a anestesia e a medicamentos: Reações incomuns a dosagens padrão de remédios e agentes anestésicos podem ocorrer por conta de diferenças metabólicas e da obesidade na SPW. O paciente pode ter uma via respiratória estreita. Muito cuidado ao medicar com substâncias que possam causar sedação: respostas exageradas ou prolongadas foram observadas. Vários genes para as subunidades do receptor GABA estão localizados na região cromossômica da SPW e, portanto, estão ausentes em pacientes com deleção. Isso pode alterar a resposta a agentes sedativos agonistas do receptor GABA (propofol, benzodiazepínicos).

Alto limiar de dor: A ausência de sinais típicos de dor é comum e pode mascarar infecção ou lesão. O indivíduo com SPW pode ter dificuldade de localizar a dor ou não reclamar de dor até que a infecção já esteja grave. Qualquer mudança súbita na saúde ou no comportamento da pessoa com SPW deve ser investigada.

Problemas respiratórios: O risco de dificuldades respiratórias pode ser maior em quem tem SPW. Obesidade, hipotonia, músculos peitorais fracos e apnéia do sono estão entre os possíveis complicadores. O exame de polissonografia para verificar apnéia central e/ou obstrutiva do sono e hipoventilação deve ser realizado.

Ausência de vômito: O reflexo do vômito raramente acontece. Ele pode ser sinal de doença potencialmente fatal. Emetícos talvez sejam ineficazes e doses repetidas podem causar intoxicação. A ausência de vômito é importante por causa da hiperfagia e da possível ingestão de alimentos crus, estragados ou de outros itens não saudáveis que possam ser ingeridos.

Variações na temperatura do corpo: Hiper- e hipotermia idiopáticas foram relatadas. Pode ocorrer hipotermia na presença de doenças comuns e em procedimentos que exigem anestesia. Pode não haver febre apesar da presença de infecção grave.

Doença gástrica severa: Distensão ou inchaço abdominal, dor e vômito podem ser sinais de inflamação gástrica ou necrose potencialmente fatais. Em vez de uma dor localizada, pode haver uma sensação generalizada de mal-estar. Tomografia computadorizada do abdômen e/ou endoscopia podem ser fundamentais para determinar a necessidade de cirurgia de emergência.

Insuficiência adrenal secundária: Estudos sugerem aumento na incidência de insuficiência adrenal secundária em indivíduos com SPW. Podem ser indicadas medições do nível de cortisol na presença de doença moderada a grave e suplementação de cortisol.

Lesões na pele e hematomas: "Cutucar" a pele é comum, o que acaba causando feridas abertas. Em algumas situações, o "cutucar" da pele ou do reto pode ser grave. Indivíduos com SPW também tendem a ter hematomas. A aparência de tais ferimentos e manchas roxas pode levar erroneamente à suspeita de maus-tratos.

Hiperfagia: O apetite insaciável pode levar ao ganho de peso muito rápido e ocorrer até em dietas pouco calóricas. Indivíduos com SPW precisam ser supervisionados o tempo todo onde a comida estiver disponível. O rígido controle da alimentação é fundamental. Intoxicação com água já ocorreu quando do uso de medicação com efeito antiulcerígeno, como por ingestão excessiva de líquidos.

Problemas relacionados com a obesidade incluem hipoventilação, hipertensão arterial, insuficiência do ventrículo direito, edema gravitacional, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, úlcera de estase e celulite.

QUALIDADE DE VIDA

Para alcançar o seu potencial máximo, o bebê ou a criança com SPW precisa, idealmente, do acompanhamento de médicos com experiência na síndrome (pediatra, endocrinologista, neurologista, ortopedista etc.) e de uma equipe multidisciplinar, que inclua fonoterapeuta, nutricionista, fisioterapeuta, terapeuta ocupacional, psicólogo. Se houver o controle rigoroso do peso, a expectativa de vida pode ser normal. A necessidade constante de restrição alimentar e de lidar com os problemas de comportamento pode ser muito estressante para a família. Cirurgias bariátricas não atuam na falta de saciedade ocasionada pela síndrome, não sendo, portanto, uma indicação na SPW. Estudos revelam a melhora no crescimento linear, na massa muscular, na força motora e no controle respiratório com o uso do **Hormônio do Crescimento (GH)** na SPW.

Associação Brasileira da Síndrome de Prader-Willi
Avenida Presidente Wilson, 231, Sala 1401
Centro – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 20.030-021
E-mail: info@spwbrasil.com.br
www.spwbrasil.com.br

A Associação Brasileira da Síndrome de Prader-Willi - SPW Brasil foi fundada em 2016 como uma organização sem fins lucrativos. Somos uma associação de famílias e profissionais que, juntos, trabalhamos para conscientizar e informar a sociedade sobre a síndrome, oferecer apoio a pais e cuidadores, divulgar pesquisas e descobertas médicas e lutar por uma melhor qualidade de vida de quem tem a SPW. Se você achou úteis as informações deste material, nos ajude doando qualquer quantia pelo site.

Anexo B:

TERM O DE CONSENTIM ENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: **Diagnóstico precoce da síndrome de Prader-Willi em neonatos hipotônicos**

Seu (Sua) filho(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Eu ....., RG ....., abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a) ..... nascido(a) em ____ / ____ / _____, participe do estudo "**Diagnóstico precoce da síndrome de Prader-Willi em neonatos hipotônicos**", e esclareço que obtive todas as informações necessárias.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir "**Diagnóstico precoce da síndrome de Prader-Willi em neonatos hipotônicos**".
- II) Será feita coleta de material biológico do(a) meu (minha) filho(a);
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); não causará nenhum problema, exceto a dor da picadinha da agulha no local da coleta;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais e nem o de meu filho sejam mencionados;

- VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa
- ☐ Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- ☐ Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,
- ☐ concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
- ☐ concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
- ☐ não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- IX) O material colhido será armazenado sob a responsabilidade do Instituto de Biociências, sob a guarda da Profª Dra. Célia Priszkulnik Koiffmann, pelo tempo necessário para a identificação e caracterização do mecanismo genético responsável pela doença observada na sua família.

São Paulo, de de 2017.

Assinatura do(a) Participante

Assinatura do(a) Pesquisador(a) Responsável
(Mariana Scheiner Dienes, aconselhamento genético, CRBM 26852)

No caso de haver dúvidas sobre aspectos éticos desse estudo, você poderá consultar:

Orientador(a): Profª Dra. Célia Priszkulnik Koiffmann

Endereço: Unidade de Aconselhamento Genético, IB-USP. Rua do Matão, 277, sala 204 1º andar - Cidade Universitária - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 05508-090

e-mail: marianascheiner@usp.br

Telefone para contato: (11) 3091-8093 / (11) 3091-75820

Para contato com o CEP-IB:

Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos (CEP) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Rua do Matão - travessa 14, 321 - Cidade Universitária, CEP: 05508-090 - São Paulo - SP

Telefone (11) 3091-8761 - e-mail: cepibusp@ib.usp.br

Anexo C

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Questionário

Os seguintes dados são importantes para o diagnóstico e para entrega do resultado, todos os dados serão mantidos em sigilo.

Registro: _____

Nome da Maternidade: _____

Data de nascimento: _____

Data de nascimento da mãe: _____

Data de nascimento do pai: _____

Tempo de gestação (em semanas): _____

Gestações anteriores: ( ) Não ( ) Sim, quantos _____

Abortos: ( ) Não ( ) Sim, quantos _____

Para contato:

Nome: _____

E-mail: _____

Telefone: _____

Endereço: _____

Caso ache importante mencionar mais algum fato, ou informação, por favor, escreva abaixo:

São Paulo, _____ de _____ de 201_.