

<http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.64823>

Artigo Original

## ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS METODOLOGIAS DE PCR METILAÇÃO-ESPECÍFICA (MSP), *SOUTHERN BLOT* (SB) E FISH UTILIZADAS NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO MOLECULAR DE PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DAS SÍNDROMES DE PRADER-WILLI OU ANGELMAN

### COMPARATIVE ANALYSIS OF METHYLATION-SPECIFIC PCR (MSP), *SOUTHERN BLOT* (SB) AND FISH IN MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH CLINICAL PICTURE SUGGESTIVE OF PRADER-WILLI OR ANGELMAN SYNDROMES

Bruna Oliveira<sup>1,2</sup>, Letícia da Cunha Veber<sup>1,3</sup>, Têmis Maria Félix<sup>1</sup>, Mariluce Riegel<sup>1,2</sup>, Isabel Cristina Bandeira da Silva<sup>1</sup>, Carla Streit<sup>3</sup>, Sandra Leistner-Segal<sup>1,2</sup>

#### RESUMO

**Introdução:** Prader-Willi (SPW) e Angelman (SA) são síndromes clinicamente distintas, causadas pela perda de expressão de genes na região cromossômica 15q11.2-q13, de origem paterna ou materna, respectivamente. Ambas compartilham os mesmos métodos diagnósticos. Nossos objetivos foram: a) analisar por PCR metilação-específica (MSP) pacientes com suspeita clínica de SPW/SA; b) comparar resultados de diferentes metodologias de diagnóstico molecular; c) aplicar a técnica MSP na rotina assistencial de pacientes encaminhados ao Serviço de Genética Médica/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA).

**Métodos:** Foram analisados 123 pacientes com suspeita clínica de SPW (n = 71) ou SA (n = 52) por MSP. Desses, 79 possuíam análise prévia por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e/ou *Southern blot* (SB).

**Resultados:** Foram detectados 21 casos positivos – 15 de SPW (12,19%) e 6 de SA (4,88%). Nove pacientes tiveram etiologia molecular determinada, sendo sete com diagnóstico de SPW (quatro dissomias uniparentais – UPD15 materna – e três deleções na região 15q11-13) e dois com diagnóstico de SA (um com UPD15 paterna e um com deleção na região 15q11-13). Foram observados resultados equivalentes entre MSP e SB e resultados discrepantes entre MSP e FISH (n = 4). Foram padronizados dois protocolos de MSP para confirmação dos resultados e controle interno de qualidade.

**Conclusão:** O perfil de detecção de cada técnica varia de acordo com o mecanismo etiológico presente. A análise por MSP detecta alterações no padrão de metilação geradas por deleção, UPD e defeitos de *imprinting*, sem identificar o mecanismo etiológico responsável. Contudo, mostrou ser eficiente para confirmação do diagnóstico clínico e *screening* dos pacientes com suspeita clínica sugestiva de SPW e SA. Diante de resultados positivos, é importante a identificação do mecanismo molecular subjacente para correlação genótipo-fenótipo e determinação do risco de recorrência familiar, fundamental para o aconselhamento genético.

**Palavras-chave:** Metilação; imprinting; Prader-Willi; Angelman

[Clin Biomed Res. 2016;36\(2\):71-79](#)

1 Serviço de Genética Médica (SGM), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Centro Universitário Metodista (IPA). Porto Alegre, RS, Brasil.

**Autor correspondente:**

Sandra Leistner-Segal  
ssegal@hcpa.edu.br  
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350.  
90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

## ABSTRACT

**Introduction:** Prader-Willi (PWS) and Angelman (AS) are clinically different syndromes caused by loss of expression of genes located on the chromosome 15q11.2-q13, of paternal or maternal origin, respectively. Both syndromes have the same diagnostic methods. The aims of the present study were: a) to perform a molecular analysis of 123 patients with clinical findings suggestive of PWS or AS using methylation-specific PCR (MSP); b) to compare the results obtained using different molecular diagnostic methodologies; c) to standardize MSP to be used in the routine care of patients at Medical Genetics Service/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA).

**Methods:** 123 patients with clinical findings suggestive of PWS (n = 71) or AS (n = 52) were analyzed by MSP. 79 had undergone previous laboratory analysis by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and/or Southern blot (SB).

**Results:** MSP detected 21 positive cases – 15 PWS (12,19%) and 6 AS (4,88%). Molecular etiology was determined in 9 patients only – 7 were diagnosed with PWS (4 had uniparental disomy – maternal UPD15 – and 3 had deletions at 15q11-13) and 2 were diagnosed with AS (1 of paternal UPD15 and 1 deletion at 15q11-13). Comparing both methodologies, it was possible to observe concordant results between MSP and SB and discordant results between MSP and FISH (n = 4). We standardized two MSP methods in order to confirm the results and for internal quality control.

**Conclusion:** The resulting profile of each technique varies according to the existing etiological mechanism. The methylation analysis by MSP technique detects changes on methylation pattern caused by deletion, UPD and imprinting defects, but it does not identify the responsible etiologic mechanism. Nevertheless, it is effective to confirm the suggestive clinical diagnosis of PWS/AS and to be used as a screening protocol. If positive results are observed, it is important to identify the underlying molecular mechanism to determine genotype-phenotype correlations and the risk of familial recurrence, which is essential for genetic counseling.

**Keywords:** *Methylation; imprinting; Prader-Willi; Angelman*

A síndrome de Prader-Willi (SPW) e a síndrome de Angelman (SA) são distúrbios genéticos clinicamente distintos causados pela ausência de expressão de genes de origem paterna e materna, respectivamente, mapeados na região cromossômica 15q11-13<sup>1</sup>. Nessa região ocorre o silenciamento diferencial de alguns genes através da metilação do DNA durante a gametogênese devido ao *imprinting* genômico<sup>2</sup>. Deleções, dissomia uniparental do cromossomo 15 (UPD15), defeitos de *imprinting* e mutações no gene UBE3A (no caso de SA) são os mecanismos mais citados como causa de SPW e SA<sup>3,4</sup>. No entanto, ambas as síndromes possuem fenótipo neurológico, comportamental e de desenvolvimento característico, além de anormalidades estruturais e funcionais típicas de cada distúrbio<sup>5</sup>.

A SPW é a causa mais frequente de obesidade infantil relacionada à herança genética, com incidência estimada em 1 caso para cada 25.000 nascidos vivos, totalizando cerca de 350.000 a 400.000 indivíduos afetados em todo o mundo<sup>1,6,7</sup>. As principais características clínicas incluem hipotonia muscular, baixa estatura,

distúrbios do sono, atraso no desenvolvimento, hipogonadismo, hiperfagia e ganho de peso no início da infância, que resultam em obesidade mórbida na maioria dos casos<sup>8</sup>.

A incidência relatada de SA é de 1 caso a cada 12.000 a 20.000 indivíduos, dado este que pode estar subestimado em função de ausência ou erro no diagnóstico, devido principalmente às dificuldades de diagnóstico clínico nos primeiros anos de vida. Os recém-nascidos e as crianças com idade inferior a três anos podem expressar fenótipos semelhantes a outras síndromes genéticas<sup>9</sup>. Os pacientes com SA apresentam deficiência mental grave, microcefalia, ataxia de marcha, crises epiléticas, distúrbios do sono, déficit de fala, humor eufórico e comportamento hiperativo<sup>4,9,10</sup>.

O diagnóstico preciso da SPW e da SA é baseado na combinação entre características clínicas, moleculares e citogenéticas. Tendo em vista a presença de características clínicas inespecíficas, principalmente no início do desenvolvimento, o diagnóstico genético confirmatório é essencial para

indicar a intervenção clínica adequada, auxiliar no aconselhamento genético e determinar o risco de recorrência familiar, que pode variar entre 0 e 50% conforme a etiologia molecular<sup>1,4</sup>. A existência de diferentes mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento das duas síndromes implica na aplicação de diferentes técnicas para identificá-las<sup>11</sup>.

A SPW e a SA compartilham as mesmas metodologias de diagnóstico, aplicadas para a detecção de alterações moleculares e cromossômicas presentes na região 15q11-13. O diagnóstico por técnicas moleculares detecta as alterações genéticas e determina o padrão de metilação de herança paterna ou materna<sup>9,12,13</sup>. A análise de metilação da região SPW/SA do gene SNRPN por *methylation-specific polymerase chain reaction* (MSP) é a técnica que apresenta maior sensibilidade e a mais utilizada para a determinação do perfil de metilação. Ela detecta mais de 99% dos pacientes com SPW e aproximadamente 80% dos pacientes com SA<sup>14</sup>. Porém, para a identificação específica da alteração genética é necessária análise suplementar por meio de outras técnicas, como hibridação *in situ* fluorescente (FISH), *Southern blot* (SB) e/ou análise de microssatélites<sup>4</sup>.

Estudos previamente publicados já evidenciam as diferenças entre as técnicas e determinam protocolos adequados para diagnóstico laboratorial com a aplicação de mais de um método para a detecção das diferentes alterações genéticas que possam estar presentes. Todavia, em nossa população, ainda não foi desenvolvido um estudo de avaliação comparativa entre as técnicas mais utilizadas no diagnóstico de SPW e SA.

Tendo em vista a variedade de metodologias utilizadas no diagnóstico das síndromes de Prader-Willi e Angelman, foi realizada uma análise comparativa dos resultados obtidos pelas técnicas de MSP, FISH e SB, aplicadas para essa finalidade. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a análise molecular de um grupo de 123 pacientes com suspeita clínica de SPW (n = 71) ou SA (n = 52) através da técnica de MSP.

## MÉTODOS

### **Pacientes e Amostras**

A amostra foi composta por 123 pacientes atendidos no ambulatório de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Desses, 52 pacientes apresentavam suspeita clínica de SA e 71 apresentavam sinais clínicos compatíveis com SPW. Além disso, 79 tinham diagnóstico laboratorial prévio através das técnicas de FISH e/ou SB e foram utilizados para a padronização da metodologia de MSP. A análise de MSP foi realizada por profissional

cego em relação aos dados de análise prévios. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), de acordo com o método de precipitação por sais descrito por Miller et al.<sup>15</sup>. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, registrado sob o nº 13-0029.

### **Conversão do DNA**

As amostras de DNA genômico foram tratadas com bissulfato de sódio para converter as citosinas não metiladas em uracilas, pois as citosinas metiladas são resistentes a esse tratamento, permanecendo inalteradas. Na região cromossômica 15q11-13, o gene SNRPN contém uma ilha CpG com padrão de metilação variável de acordo com a origem do alelo, e a maioria dos dinucleotídeos CpG nessa região são metilados no cromossomo materno e não metilados no cromossomo paterno<sup>16</sup>. Através da modificação com bissulfato de sódio, é possível a análise do padrão de metilação com base na presença de citosinas inalteradas (metiladas) na molécula de DNA após o tratamento das amostras. Para a conversão das amostras de DNA, foram utilizados os *kits* EpiTect Bisulfite (Qiagen, Hilden, Alemanha) e Cells-to-CpG (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) seguindo as instruções dos fabricantes, e foram obtidos resultados igualmente eficazes com ambos os *kits*.

### **Análise de Metilação**

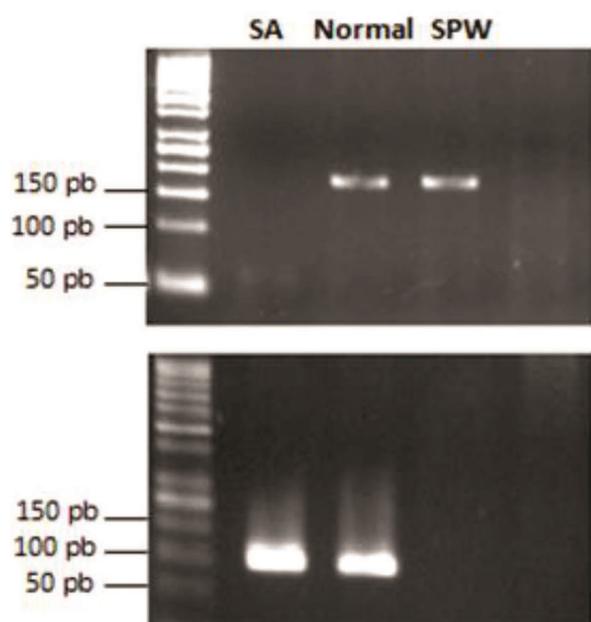
Após o tratamento do DNA com bissulfato de sódio, as amostras foram submetidas a reação de amplificação com *primers* específicos para as sequências maternas (metiladas) e paternas (não metiladas) da ilha CpG na região 5' do gene SNRPN. A análise de metilação foi realizada através da técnica MSP. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3%, corado com GelRed, e visualizados em transiluminador. Para a padronização da análise de metilação, foram selecionadas três amostras com diagnóstico laboratorial prévio: uma amostra de paciente com SPW, uma de paciente com SA e uma de paciente com padrão de metilação normal. Duas técnicas de MSP foram utilizadas neste estudo. A técnica descrita por Kubota et al.<sup>17</sup>, e o método baseado no estudo de Kosaki et al.<sup>18</sup>, ambas utilizando *primers* específicos para os alelos paterno e materno da ilha CpG do gene SNRPN (tabela 1).

## RESULTADOS

Na análise de metilação pela técnica de MSP utilizando a sequência de *primers* descrita por Kubota et al.<sup>17</sup>, indivíduos com padrão de metilação normal apresentaram dois fragmentos de amplificação, um com 174 pb, proveniente da cópia metilada do gene SNRPN presente no cromossomo materno, e

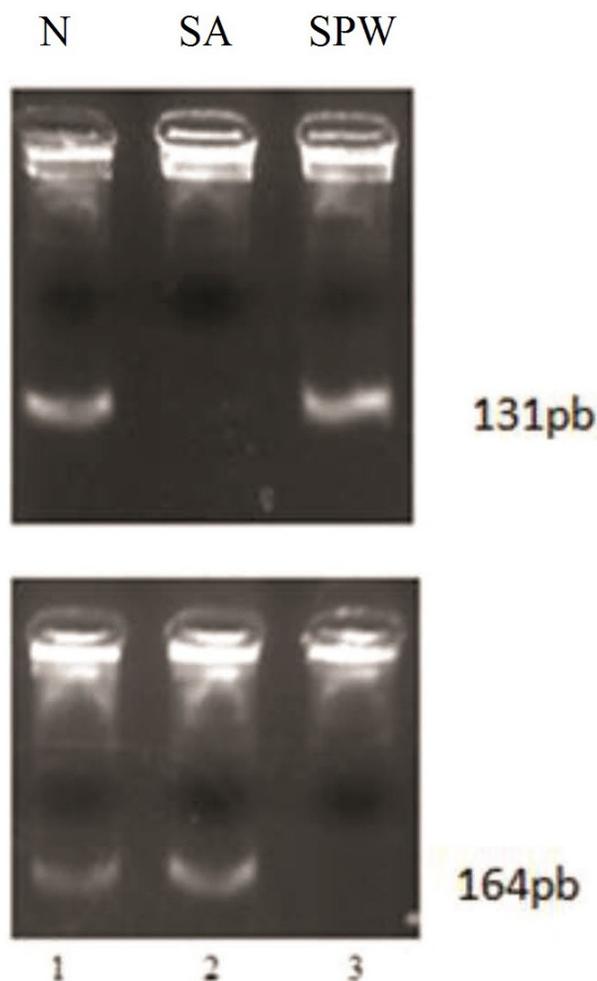
outro com 100 pb, proveniente da cópia não metilada presente no cromossomo paterno. Pelo padrão dos fragmentos em gel de agarose (figura 1), é possível identificar os pacientes com SPW, os quais apresentam apenas a banda de 174 pb, proveniente do cromossomo materno metilado. Já os pacientes com SA apresentam apenas a banda de 100 pb, proveniente do cromossomo paterno não metilado.

De forma semelhante, para os resultados obtidos pelo MSP com a sequência de *primers* descrita por Kosaki et al.<sup>18</sup>, observamos duas bandas resultantes da amplificação dos alelos materno e paterno em pacientes com padrão de metilação normal. A presença de apenas uma banda de 131 pb, referente ao alelo materno do gene SNRPN, caracteriza um resultado positivo para SPW, enquanto a presença de apenas uma banda de 164 pb, referente ao alelo paterno, caracteriza um resultado positivo para SA (figura 2).



**Figura 1:** Diagnóstico molecular das Síndromes de Prader-Willi e Angelman por MSP de acordo com Kubota et al.<sup>17</sup>. Produtos de MSP visualizados em gel de agarose 3% corado com GelRed. Linha 1: paciente com SA, apresenta apenas uma banda com 100 pb; Linha 2: paciente com padrão de metilação normal, apresenta uma banda com 174 pb e outra com 100 pb; Linha 3: paciente com SPW, apresenta somente uma banda de 174 pb.

Na primeira etapa de validação da metodologia de MSP, realizamos uma análise comparativa entre as técnicas a partir dos resultados de 79 pacientes com diagnóstico laboratorial prévio através de FISH



**Figura 2:** Diagnóstico molecular das Síndromes de Prader-Willi e Angelman por MSP de acordo com Kosaki et al.<sup>18</sup>. Os produtos das reações de MSP foram visualizados em gel de agarose 3% corado com GelRed. Na parte de cima a reação com o par de *primers* MET e na parte de baixo, PCR com o par UNMET. Linha 1: paciente normal, apresenta amplificação com ambos pares de *primers*; Linha 2: paciente SA, reação de MSP amplifica apenas com o par de primers UNMET, apresenta banda de 164pb; Linha 3: paciente com SPW, reação de MSP amplifica apenas com o par de *primers* MET, apresenta banda de 131pb.

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados para a análise de MSP.

	<b>Forward (senso) 5'-3'</b>	<b>Reverse (antisenso) 5'-3'</b>	<b>Referência</b>
Materno	TAAATAAGTACGTTTGC GCGGTC	AACCTTACCCGCTCCATCGCG	Kubota et al. <sup>17</sup>
Paterno	GTAGGTTGGTGTGTATGTTAGGT	ACATCAAACATCTCCAACAACCA	Kubota et al. <sup>17</sup>
Met	CGGTCGTAGAGGTAGGTTGGCGC	CTCCTCAAACAAATACGTCAAACATCTCCGA	Kosaki et al. <sup>18</sup>
Unmet	GTGTGGTTGTAGAGGTAGGTTGGTGT	CAACTAACCTTACCCACTCCATCACA	Kosaki et al. <sup>18</sup>

(n = 59) e/ou SB (n = 22). Dos 39 pacientes com suspeita clínica de SPW (tabela 2), dois apresentaram discordância entre os resultados, com resultado normal para a técnica de FISH, sem deleção na região 15q11-13, mas resultado positivo para SPW na análise de metilação por MSP, sugerindo UPD ou defeito de *imprinting*. No grupo de pacientes com suspeita de SA (tabela 3), obtivemos dois resultados discordantes com MSP positivo e FISH normal,

sugerindo UPD ou defeito de *imprinting*. Entretanto, nos dois grupos de pacientes não houve discordância entre os resultados das técnicas de SB e MSP.

Para os 44 pacientes que não apresentavam diagnóstico laboratorial prévio, foi realizada apenas a análise por MSP, previamente validada na primeira etapa deste trabalho, obtendo-se sete resultados positivos adicionais: dois de SA e cinco de SPW (tabela 4).

**Tabela 2:** Análise citogenética e molecular de pacientes com suspeita clínica de síndrome de Prader-Willi.

Paciente	Sexo	FISH	Southern blot	MPCR
1	M	NR <sup>a</sup>	Normal, biparental	Normal <sup>b</sup>
2	M	NR	UPD15 materna <sup>c</sup>	SPW
3	M	NR	UPD15 materna	SPW
4	F	del (15) (q11-q13)	NR	SPW
5	M	NR	Normal, biparental	Normal
6	F	NR	UPD15 materna	SPW
7	M	NR	Normal, biparental	Normal
8	F	NR	UPD15 materna	SPW
9	M	NR	Normal, biparental	Normal
10	M	NR	Normal, biparental	Normal
11	M	NR	Normal, biparental	Normal
12	F	del (15) (q11-q13)	NR	SPW
13	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
14	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
15	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
16	M	Normal, sem deleção	NR	SPW
17	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
18	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
19	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
20	M	Normal, sem deleção	NR	SPW
21	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
22	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
23	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
24	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
25	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
26	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
27	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
28	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
29	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
30	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
31	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
32	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
33	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
34	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
35	F	del (15) (q11-13q)	NR	SPW
36	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
37	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
38	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
39	F	NR	SPW	SPW

<sup>a</sup>NR: Não realizado; <sup>b</sup>Normal: Padrão de metilação normal na região promotora do gene SNRPN; <sup>c</sup>UPD15 materna: Dissomia uniparental materna do cromossomo 15.

Tabela 3: Análise citogenética e molecular de pacientes com suspeita clínica de síndrome de Angelman.

Paciente	Sexo	FISH	Southern blot	-PCR
1	F	NR <sup>a</sup>	Normal, biparental	Normal <sup>b</sup>
2	M	NR	Normal, biparental	Normal
3	M	NR	UPD15 paterna <sup>c</sup>	SA
4	F	NR	Normal, biparental	Normal
5	F	NR	Normal, biparental	Normal
6	F	NR	Normal, biparental	Normal
7	F	NR	Normal, biparental	Normal
8	F	Normal, sem deleção	Normal, biparental	Normal
9	F	NR	Normal, biparental	Normal
10	F	Normal, sem deleção	Normal, biparental	Normal
11	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
12	F	NR	Normal, biparental	Normal
13	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
14	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
15	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
16	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
17	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
18	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
19	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
20	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
21	M	del (15) (q11-q13)	NR	SA
22	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
23	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
24	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
25	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
26	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
27	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
28	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
29	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
30	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
31	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
32	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
33	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
34	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
35	F	Normal, sem deleção	NR	Normal
36	M	Normal, sem deleção	NR	SA
37	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
38	M	Normal, sem deleção	NR	Normal
39	F	Normal, sem deleção	NR	SA
40	M	Normal, sem deleção	NR	Normal

<sup>a</sup>NR: Não realizado; <sup>b</sup>Normal: Padrão de metilação normal na região promotora do gene SNRPN; <sup>c</sup>UPD15 materna: Dissomia uniparental paterna do cromossomo 15.

Tabela 4: Análise por MSP de pacientes com suspeita clínica de SPW ou SA sem diagnóstico prévio.

Suspeita clínica	Sexo	Resultado	MSP
SPW	<b>Masculino = 13</b>	<b>2 SPW</b>	11 Normal
	<b>Feminino = 19</b>	<b>3 SPW</b>	16 Normal
	<b>Total = 32</b>	<b>5 SPW</b>	27 Normal
SA	<b>Masculino = 6</b>	<b>0 SA</b>	6 Normal
	<b>Feminino = 6</b>	<b>2 SA</b>	4 Normal
	<b>Total = 12</b>	<b>2 SA</b>	10 Normal

Do total de pacientes com resultados positivos para SPW ou SA (n = 21), apenas em nove foi determinada a etiologia molecular, sendo sete com diagnóstico de SPW (dos quais quatro tinham UPD15 materna e três tinham deleção na região 15q11-13) e dois com diagnóstico de SA (um com UPD15 paterna e um com deleção na região 15q11-13).

Do total de 123 pacientes analisados, a distribuição por sexo no grupo de pacientes com suspeita clínica de SPW foi de 38 (30,89%) indivíduos do sexo

masculino e 33 (26,83%) do sexo feminino. No grupo de pacientes com suspeita de SA, 24 (19,5%) eram do sexo masculino e 28 (22,76%) eram do sexo feminino.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As síndromes de Angelman e Prader-Willi são causadas pela perda funcional de genes na região cromossômica 15q11-13. Na SA, a maioria dos casos (70-75%) estão relacionados à presença de uma deleção **de novo** na região 15q11-13 do cromossomo materno; o segundo mecanismo mais frequente são as mutações no gene UBE3A, responsáveis por aproximadamente 10% dos casos; 3-7% dos casos derivam de dissomia uniparental paterna do cromossomo 15; e 2-3% dos defeitos estão no centro de *imprinting*. Na SPW, observa-se que 75-85% dos casos são relacionados com deleções **de novo** na região 15q11-13 do cromossomo paterno; 20-25% apresentam dissomia uniparental materna do cromossomo 15; e aproximadamente 1% dos casos possuem defeitos no centro de *imprinting*<sup>14</sup>. Entretanto, cerca de 10% dos indivíduos com fenótipo característico de SA têm o distúrbio como resultado de um mecanismo genético ainda não identificado, não sendo passíveis de diagnóstico pelos métodos convencionais utilizados. Da mesma forma, em cerca de 1% dos pacientes com SPW o diagnóstico clínico não é confirmado por meio de testes genéticos moleculares<sup>11,19,20</sup>.

O diagnóstico laboratorial tem como desafio a complexa base genética dessas síndromes, envolvendo mecanismos diferentes que, para serem identificados, muitas vezes, precisam da aplicação de mais de um método para a obtenção de um resultado mais preciso. A análise de metilação do DNA, através de SB ou MSP, é geralmente o primeiro método realizado no processo de diagnóstico molecular da SA e da SPW, por ter maior perfil de detecção de pacientes afetados quando comparada a outras metodologias<sup>21</sup>. A presença de um padrão de metilação normal descarta, na grande maioria dos casos, a presença da SPW, pois 99% dos pacientes com essa síndrome apresentam alteração no padrão de metilação<sup>22,23</sup>. Já na SA, somente cerca de 70-75% dos casos apresentam alteração na metilação e, assim, são passíveis de detecção pelas técnicas de análise de metilação.

Para os pacientes com quadro clínico sugestivo de SA que apresentam padrão de metilação normal, recomenda-se a realização da pesquisa de mutações no gene UBE3A<sup>4</sup>. Em estudos prévios, Molfetta et al.<sup>24</sup> e Abaied et al.<sup>2</sup> relatam casos de pacientes com SA com mutações novas no gene UBE3A que não apresentam

alterações nos resultados de estudos citogenéticos e de metilação. O gene UBE3A é composto por 16 éxons e codifica uma proteína ubiquitina-ligase envolvida no processo de ubiquitinação de proteínas, marcando as proteínas destinadas à degradação<sup>19,25</sup>. Esse gene sofre *imprinting* em tecido específico, e sua expressão no cérebro é dependente do alelo de origem materna, sendo transcricionalmente inativo no alelo paterno<sup>26</sup>. Nos demais tecidos, o gene UBE3A tem transcrição bialélica<sup>27</sup>.

Neste estudo, de amostra composta por pacientes com suspeita clínica sugestiva de SPW ou SA, o MSP identificou 21 pacientes com padrão de metilação alterado. Entre eles, 15 casos apresentaram padrão de metilação compatível com SPW, representando 21,13% dos pacientes com suspeita desta síndrome (n = 71). No grupo de pacientes com clínica sugestiva de SA (n = 52), apenas 6 (11,54%) foram identificados com metilação alterada no MSP. Resultado semelhante foi evidenciado por estudo realizado por Teng et al.<sup>16</sup>, em que de 108 pacientes com suspeita de SPW, 26 (24%) apresentaram padrão de metilação alterado; e de 20 pacientes com suspeita de SA, apenas 2 (10%) mostraram metilação alterada para SA. A análise de metilação através do MSP fornece informação diferencial entre as heranças paterna, materna e biparental (normal) de *loci* específicos da região cromossômica 15q11-13, os quais possuem padrão de metilação dependente da origem parental do alelo. Essa informação é suficiente para a confirmação do diagnóstico clínico, mas não para a correlação genótipo-fenótipo, a determinação do risco de recorrência e o aconselhamento genético, pois essa técnica detecta casos de deleção, UPD e defeitos de *imprinting*, mas não faz distinção entre estes diferentes mecanismos moleculares<sup>11,28</sup>.

A partir de resultados positivos para SPW ou SA por MSP, faz-se necessária a identificação do mecanismo molecular subjacente através de estudos genéticos adicionais, uma vez que o perfil de detecção de cada técnica varia de acordo com o mecanismo etiológico presente. Sendo assim, para identificação de deleções na região cromossômica 15q11-13, pode ser realizado FISH ou análise de microssatélites. A análise de microssatélites é capaz de identificar a presença de deleções e UPD materna (SPW) ou paterna (SA), diferentemente do FISH, que detecta apenas deleções<sup>28</sup>. No presente estudo, entre os 21 casos em que a suspeita clínica foi confirmada pelos métodos avaliados, nove tiveram a identificação do mecanismo molecular, sendo dois casos de SA e sete de SPW. No primeiro caso de SA, foi detectada por FISH uma deleção na região cromossômica 15q11-13; já no segundo caso, a determinação da etiologia molecular foi através do

SB, que identificou a presença de UPD15 paterna. Dos sete pacientes com diagnóstico confirmado de SPW e com identificação do mecanismo molecular, três possuem uma deleção que foi detectada por FISH e quatro apresentam UPD15 materna diagnosticada através de SB. Em situações em que os resultados das metodologias anteriores não identificam o mecanismo responsável, é indicada a análise do centro de *imprinting* para a pesquisa de deleções e mutações nessa região. Em cerca de 10-15% dos casos, o defeito de *imprinting* é causado por uma microdeleção no centro de *imprinting*, e este tipo de alteração é associado a um risco de recorrência de 50%<sup>14</sup>.

Na comparação entre as metodologias analisadas neste estudo, foi possível observar resultados equivalentes entre MSP e SB, e resultados discrepantes entre MSP e FISH. A FISH é aplicada no diagnóstico de SPW e SA causada por deleção da região 15q11-q13. Isso justifica a discrepância entre resultados positivos para SPW (n = 2) e para SA (n = 2) identificados por meio de MSP, porém com resultado de FISH normal, ou seja, sem a presença de deleção. A análise de metilação realizada por meio da técnica de SB, assim como o MSP, detecta alterações no padrão de metilação geradas por deleção, UPD e defeitos de *imprinting*, mas sem identificar o mecanismo etiológico responsável. Entretanto, dependendo da sonda utilizada, o SB pode identificar casos de UPD. Porém, essa técnica possui algumas desvantagens quando comparada com o MSP: além do custo elevado, ela exige maior tempo para sua execução e requer uma concentração muito maior de DNA<sup>16</sup>.

Este estudo demonstra diferenças entre os métodos usados no diagnóstico genético molecular

da SPW e da SA, comprovando a eficiência do MSP como método de *screening* para confirmação do diagnóstico clínico. Além disso, elucida a importância de maiores investigações para a identificação dos mecanismos etiológicos presentes em pacientes portadores desses distúrbios. A maioria dos pacientes avaliados ainda não possui essa identificação, então o risco de recorrência familiar não é conhecido e o aconselhamento genético é prejudicado. Além disso, em casos de suspeita clínica forte de uma das síndromes, faz-se necessária maior investigação por meio de outros métodos, para que assim seja descartada a presença de alterações que não modificam o perfil de metilação, tais como mutações no gene UBE3A.

A confirmação diagnóstica precoce e definitiva de pacientes com SPW ou SA através de métodos moleculares possibilita a intervenção no desenvolvimento de alterações clínicas, permitindo retardar as principais consequências desses distúrbios. A aplicação de medidas preventivas de tratamento acarreta em melhor qualidade de vida para os pacientes, além de evitar exames desnecessários, contribuindo para a melhora do prognóstico em ambos os quadros e auxiliando no aconselhamento genético para os familiares.

### Agradecimentos

Este trabalho recebeu auxílio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA). Sandra Leistner-Segal recebeu uma bolsa de Pesquisador ID do CNPq, e Bruna de Oliveira recebeu uma bolsa IC-HCPA-CNPq.

Estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Genética Médica (SGM), Laboratório de Genética Molecular (LGM).

### REFERÊNCIAS

- Boyle J, Hawkins M, Barton DE, Meaney K, Guitart M, O'Grady A, et al. Establishment of the first WHO international genetic reference panel for Prader Willi and Angelman syndromes. *Eur J Hum Genet*. 2011;19:857-64.
- Abaied L, Trabelsi M, Chaabouni M, Kharrat M, Kraoua L, M'Rad R, et al. A novel UBE3A truncating mutation in large Tunisian Angelman syndrome pedigree. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:141-6.
- Wang W, Law HY, Chong SS. Detection and discrimination between deletional and non-deletional Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific PCR and quantitative melting curve analysis. *J Mol Diagn*. 2009;11:446-9.
- Buiting K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C:365-76.
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA. Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet*. 2000;97:136-46.
- Wattendorf DJ, Muenke M. Prader-Willi syndrome. *Am Fam Physician*. 2005;72:827-30.
- Butler MG. Prader-Willi Syndrome: obesity due to genomic imprinting. *Curr Genomics*. 2011;12:204-15.
- Brambilla P, Crinò A, Bedogni G, Bosio L, Cappa M, Corrias A, et al. Metabolic syndrome in children with Prader-Willi syndrome: the effect of obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011;21:269-76.
- Williams CA, Driscoll DJ, Dagli AI. Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genet Med*. 2010;12:385-95.
- Van Buggenhout G, Fryns JP. Angelman syndrome (AS, MIM 105830). *Eur J Hum Genet*. 2009;17:1367-73.
- Camprubí C, Guitart M, Gabau E, Coll MD, Villatoro S, Oltra S, et al. Novel UBE3A mutations causing Angelman

- syndrome: different parental origin for single nucleotide changes and multiple nucleotide deletions or insertions. *Am J Med Genet A*. 2009;149A:343-8.
12. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem*. 2006;52:1276-83.
  13. Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, Glaze DG, German JR, Bird LM, et al. Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet*. 2006;43:512-6.
  14. Ramsden SC, Clayton-Smith J, Birch R, Buiting K. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet*. 2010;11:70.
  15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
  16. Teng YN, Tsai WH, Wu CJ, Lin SJ, Chen YJ, Kuo PL. Referral diagnosis of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome based on methylation-specific polymerase chain reaction. *J Formos Med Assoc*. 2002;101:488-94.
  17. Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet*. 1997;16:16-7.
  18. Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinniss WJ, Jones KL. Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am J Med Genet*. 1997;73:308-13.
  19. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet*. 2003;40:87-95.
  20. Pérez DR, Galindo LM, Pisón JL, Delgado RP, Hidalgo ML, Segura JL, et al. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman: experiencia de 21 años. *Ann Pediatr (Paris)*. 2012;77:151-7.
  21. Cortés F, Alliende MA, Barrios A, Curotto B, María LS, Barraza X, et al. Caracterización clínico-genético-molecular de 45 pacientes chilenos con Síndrome de Prader Willi. *Rev Med Chil*. 2005;133:33-41.
  22. Gillissen-Kaesbach G, Robinson W, Lohmann D, Kaya-Westerloh S, Passarge E, Horsthemke B. Genotype-phenotype correlation in a series of 167 deletion and non-deletion patients with Prader-Willi syndrome. *Hum Genet*. 1995;96:638-43.
  23. Monaghan KG, Wiktor A, Van Dyke DL. Diagnostic testing for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: a cost comparison. *Genet Med*. 2002;4:448-50.
  24. Molfetta GA, Ferreira CA, Vidal DO, Giuliani Lde R, Maldonado MJ, Silva WA JR. 1031-1034delTAAC (Leu125Stop): a novel familial UBE3A mutation causing Angelman syndrome in two siblings showing distinct phenotypes. *BMC Med Genet*. 2012;13:124.
  25. Malzac P, Webber H, Moncla A, Graham JM, Kukulich M, Williams C, et al. Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet*. 1998;62:1353-60.
  26. Maris AF, Trott A. A patogênese genética e molecular da síndrome de Angelman. *J Bras Psiquiatr*. 2011;60:321-30.
  27. Dagli A, Buiting K, Williams CA. Molecular and clinical aspects of Angelman Syndrome. *Mol Syndromol*. 2012;2:100-12.
  28. Aráoz HV, Torrado M, Barreiro C, Chertkoff L. A combination of five short tandem repeats of chromosome 15 significantly improves the identification of Prader-Willi syndrome etiology in the Argentinean population. *Genet Mol Res*. 2006;5:390-8.

Recebido Maio 25, 2016  
Aceito: Jun 17, 2016