



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**Aplicação do sequenciamento de nova geração no diagnóstico
molecular da síndrome de Prader-Willi**

Igor Ribeiro Ferreira

Rio de Janeiro
2019



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**Aplicação do sequenciamento de nova geração no diagnóstico
molecular da síndrome de Prader-Willi**

Igor Ribeiro Ferreira

Dissertação apresentada à Pós-
graduação em Pesquisa Aplicada à
Saúde da Criança e da Mulher,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Orientadora: Dra. Letícia da Cunha Guida
Co-orientador: Dr. Leonardo Henrique Ferreira Gomes

Rio de Janeiro
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Ferreira, Igor Ribeiro.

Aplicação do sequenciamento de nova geração no diagnóstico molecular da síndrome de Prader-Willi / Igor Ribeiro Ferreira. - Rio de Janeiro, 2019.
113 f.; il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2019.

Orientadora: Letícia da Cunha Guida.

Co-orientador: Leonardo Henrique Ferreira Gomes.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Prader-Willi. 2. Sequenciamento de Nova Geração. 3. Diagnóstico. 4. Genética. I. Título.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Regina e Sergio, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigado pelo amor incondicional que sempre recebi, pela educação e valores a mim ensinados. Essa conquista não é minha, é nossa!

Agradeço à minha namorada, Caroline, pelo seu amor e momentos maravilhosos juntos. Obrigado por dividir comigo teu caráter, bondade e disponibilidade, que me auxiliam a repensar minhas atitudes e convicções de mundo.

Agradeço à minha orientadora, Letícia Guida, pela sua generosidade em compartilhar sua experiência e conhecimento. Obrigado pela paciência e disponibilidade em sempre me ajudar em momentos de dúvida e desespero, por me proporcionar um crescimento profissional e intelectual imensurável.

Agradeço ao meu co-orientador Leonardo Gomes, pelo ombro amigo e pelo conhecimento ensinado. Obrigado por todos os conselhos, puxões de orelha e ensinamentos passados, obrigado por todas as oportunidades a mim oferecidas. Sou muito grato por tudo!!!

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Alta Complexidade que sempre me apoiou no desenvolvimento da dissertação. Obrigado por todas as risadas juntos, por cada almoço e lanche compartilhado, por cada piada sem graça contada, pelo café fresco de todas as manhãs, obrigado por todos estes momentos divididos!!!

Agradeço a todos meus amigos e família pelo apoio constante e incansável. Obrigado por serem tão compreensivos nas minhas ausências, e por compartilharem minhas angústias e alegrias.

Resumo

Introdução: A síndrome de Prader- Willi (SPW) é uma desordem genética complexa, caracterizada por deleções, dissomia uniparental materna ou defeito no centro de *imprinting* no alelo paterno do cromossomo 15. As perdas de funções de genes específicos da região 15q11 afetam múltiplos sistemas corporais. O diagnóstico da SPW envolve a realização de diversas técnicas de biologia molecular e citogenética para a completa elucidação do mecanismo genético relacionado ao desenvolvimento da síndrome, tornando todo o processo laborioso, demorado e custoso. **Objetivo:** Aplicação da tecnologia sequenciamento de nova geração (NGS), plataforma Ion Torrent PGM, para diagnóstico molecular da SPW. **Materiais e Métodos:** Foram incluídos 17 pacientes suspeitos para SPW onde foram submetidos a análise de metilação (MS-HRM), citogenética (GTG e FISH) e sequenciamento de genes alvos na plataforma Ion Torrent PGM, e subsequente confirmação de variantes através da técnica de sequenciamento de Sanger. **Resultados:** A análise de metilação detectou 6 indivíduos portadores da SPW, 1 portador da Síndrome de Angelman (SA) e 10 indivíduos normais. A técnica de GTG identificou 1 indivíduo com uma grande perda cromossômica, já a metodologia de FISH identificou 3 indivíduos com deleções, totalizando 4. O bom desempenho da tecnologia de sequenciamento NGS, através da metodologia Ion Torrent PGM, permitiu a realização de análises de frequência alélica, variação do número de cópias (CNV) e de mutações específicas do genoma. As análises por bioinformática realizadas nos dados do NGS permitiram detectar 4 pacientes portadores de deleção, classificando-as como Tipo 1 ou Tipo 2. Além disso, foi possível identificar um evento raro de dissomia uniparental segmentar, com complicações prognósticas severas. Identificou-se variantes do tipo INDEL no gene *PWRN1* em 2 pacientes, onde, o impacto funcional desta mutação ainda não foi estudado. Contudo o gene possui forte correlação com o desenvolvimento da SPW. A metodologia também identificou uma mutação INDEL no gene *MAGEL2* em um paciente com padrão de metilação normal no MS-HRM, sugerindo a identificação de uma síndrome análoga a SPW. Todas as variantes detectadas foram validadas através do sequenciamento de Sanger. **Conclusão:** A plataforma Ion Torrent identificou todas as alterações relacionadas ao desenvolvimento da SPW. O *pipeline* desenvolvido mostrou-se aplicável a uma rotina diagnóstica.

Palavras-Chave: Síndrome de Prader-Willi; Sequenciamento de Nova Geração; Biologia Computacional; Deleção; Diagnóstico Molecular; Dissomia Uniparental; Defeito no centro de imprinting.

Abstract

Introduction: Prader-Willi syndrome (PWS) is a complex genetic disorder characterized by deletions, maternal uniparental disomy or defect at the imprinting center in the paternal allele of chromosome 15. Loss of 15q11 region-specific gene functions affects multiple body systems. The diagnosis of SPW involves the accomplishment of several techniques of molecular biology and cytogenetics for the complete elucidation of the genetic mechanism related to the development of the syndrome, making the whole process laborious, time-consuming and costly. **Objective:** Application of the Next-Generation sequencing technology (NGS), platform Ion Torrent PGM, for molecular diagnosis of PWS. **Materials and Methods:** Seventeen suspected patients for SPW were submitted to methylation (MS-HRM), cytogenetic analysis (GTG and FISH) and sequencing of target genes in the Ion Torrent PGM platform, and subsequent confirmation of variants by the technique of sequencing of Sanger. **Results:** Methylation analysis detected 6 individuals with SPW, 1 with Angelman Syndrome (AS) and 10 normal individuals. The GTG technique identified 1 individual with a large chromosomal loss, and the FISH methodology identified 3 individuals with deletions, totaling 4. The good performance of the NGS sequencing technology, through the Ion Torrent PGM methodology, allowed the performance of frequency analyzes allelic, copy number variation (CNV), and genome-specific mutations. The bioinformatics analyses performed on the NGS data allowed the detection of 4 patients with deletion, classifying them as Type 1 or Type 2. In addition, it was possible to identify a rare segmental uniparental disomy with severe prognostic complications. Variables of the INDEL type were identified in the PWRN1 gene in 2 patients, where the functional impact of this mutation has not been studied. However, the gene has a strong correlation with the development of PWS. The methodology also identified an INDEL mutation in the MAGEL2 gene in a patient with normal methylation pattern in MS-HRM, suggesting the identification of a syndrome similar to PWS. All detected variants were validated through Sanger sequencing. **Conclusion:** The Ion Torrent platform has identified all the changes related to the development of PWS. The pipeline developed proved to be applicable to a diagnostic routine.

Key words: Prader-Willi syndrome; Next Generation Sequencing; Computational Biology; Deletion; Molecular diagnosis; Uniparental Dissymia; Defect in imprinting center.

Lista de abreviações e Siglas

IFF – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira

SPW – Síndrome de Prader-Willi

SA – Síndrome de Angelman

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

UPD – Dissomia uniparental materna

GH – Hormônio do Crescimento

MS-HRM – *Methylation-sensitive High Resolution Melting*

MLPA - Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação

FISH - Hibridização *in situ* com fluorescência

STR - Análise de Microsatélite

PGH – Projeto Genoma Humano

QI – Quociente de inteligência

DNA - ácido desoxirribonucléico

RPM – Rotação por minuto

CEP – Comitê de ética em Pesquisa

min - Minuto

μL - Microlitro

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polymerase)

pH - Potencial Hidrogeniônico

RNA - Ácido ribonucleico

°C - Grau Celsius

GTG - Técnica de bandeamento G

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina

TS - Síndrome de Turner

Primers - Oligonucleotídeos iniciadores

dNTPs - Desoxirribonucleosídeos trifosfatados

ddNTPs - Didesoxirribonucleosídeos trifosfatados

G - aceleração da gravidade

bp - Pares de base

Kb - 100.000 pares de base

Mb - 1.000.000 pares de base

Gb - 1.000.000.000 pares de base

WES - Sequenciamento de todos os éxons

WGS - Sequenciamento de todo o genoma

AF - Frequência Alélica

CNV - *Copy number variations* (Variações do número de cópia)

n - Haploidia

2n - Diploidia

3n - Triploidia

INDEL - Inserção ou Deleção

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de base única)

MNV - *Multiple Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismos de múltiplas bases)

SY - Síndrome de Schaaf-Yang

MAF - Minor allele frequency (Menor frequência alélica)

HTML - Hypertext Markup Language (Linguagem de Marcação de Hipertexto)

- VUS – Variante de significado incerto
- pLI – valor de haploinsuficiencia
- HMM – Modelo oculto de Markov
- VPP – Valor Preditivo Positivo
- VPN – Valor Preditivo Negativo
- Ct – Cycle threshold (limiar do ciclo)
- BP – *Break Point* (ponto de quebra)
- U\$ - Dólares americanos
- IC – Centro de imprinting
- TVC – *Torrent Variant Caller* (Chamador de variante do Ion Torrent)

Sumário

1.	Introdução.....	1
2.	Objetivos.....	4
2.1	Objetivo Geral.....	4
2.2	Objetivos Específicos:.....	4
3.	Referencial Teórico.....	5
3.1	A síndrome de Prader-Willi.....	5
3.1.1	Descrição clínica.....	5
3.1.2	Alteração genética.....	7
3.1.3	Estrutura genômica.....	8
3.1.4	Diagnóstico molecular.....	12
3.2	Sequenciamento de DNA.....	17
3.2.1	Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	17
3.2.2	Sequenciamento de Nova Geração e o diagnóstico molecular.....	21
4	Material & Métodos.....	23
4.1	Aspecto Ético.....	23
4.2	Critérios de inclusão de casos.....	23
4.3	Critérios de exclusão de casos.....	25
4.4	Extração de DNA.....	25
4.5	Análise da curva de dissociação em alta resolução (HRM).....	26
4.5.1	Conversão com bissulfito.....	26
4.5.2	PCR em tempo real HRM.....	28
4.6	Ion Torrent PGM.....	29
4.6.1	Construção da biblioteca.....	29
4.6.2	Enriquecimento da biblioteca.....	32
4.6.3	Sequenciamento.....	34
4.7	Bandeamento GTG.....	36
4.8	FISH.....	37
4.9	Sequenciamento de Sanger.....	38
4.10	Análise da biblioteca NGS por bioinformática.....	40
4.11	Análise de ganho diagnóstico.....	45
5	Resultados.....	46
5.1	Análise de metilação MS-HRM.....	46
5.2	Citogenética.....	48
5.3	Ion Torrent PGM.....	50
5.3.1	Desempenho geral do sequenciamento Ion Torrent PGM.....	50
5.3.2	Cobertura das regiões-alvo.....	52
5.3.3	Análise de frequência alélica e <i>Copy Number Variations</i>	53
5.3.4	Deteção de variantes.....	64
5.4	Análise haploinsuficiência e intolerância gênica a perda de função (pLI).....	65
5.6	Análise de ganho diagnóstico.....	67
6	Discussão.....	69
7	Conclusão.....	90
8	Referência bibliográfica.....	91

Lista de Figuras

Figura 1 - Genes localizados na região 15q11-q13.....	9
Figura 2 - Processo diagnóstico da SPW.....	16
Figura 3 - Evolução do custo de sequenciamento por megabase.....	18
Figura 4 - Etapas relacionadas ao Ion Torrent PGM.....	20
Figura 5 - Diagramação detalhada do processo de chamada variante.....	42
Figura 6 - Fluxograma do sequenciamento por Ion Torrent.....	44
Figura 7 - Metodologia para cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.....	45
Figura 8 - Interpretação do coeficiente de Kappa (44).....	45
Figura 9 - Discriminação alélica a partir da curva de dissociação.....	47
Figura 10 - Ct relativo à amplificação de cada triplicata.....	48
Figura 11 - Análise cromossômica através do bandeamento G de alta resolução.....	49
Figura 12 - Técnica de bandeamento G.....	49
Figura 13 - Imagem da técnica de FISH.....	50
Figura 14 - Gráfico de exclusão de base por qualidade.....	52
Figura 15 - Distribuição dos valores de cobertura.....	52
Figura 16 - Análise primária relativa aos fragmentos sequenciados.....	53
Figura 17 - Frequência alélica LACIFF-1.....	54
Figura 18 - Frequência alélica LACIFF-2.....	55
Figura 19 - Frequência alélica LACIFF-3.....	56
Figura 20 - Frequência alélica LACIFF-4.....	57
Figura 21 - Frequência alélica LACIFF-5.....	58
Figura 22 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-1.....	59
Figura 23 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-2.....	60
Figura 24 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-3.....	61
Figura 25 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-4.....	62
Figura 26 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-5.....	63
Figura 27 - Árvore de interações gênicas no desenvolvimento da SPW.....	66
Figura 28 - Ganho diagnóstico.....	68
Figura 29 - Tabela com valor Kappa por categoria (Normal, SPW e AS).....	68
Figura 30 - Provável mecanismo de formação da dissomia uniparental intersticial.....	82
Figura 31 - Características fenotípicas relativas as síndromes SPW e SY (134).....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1: Ficha clínica para avaliação primária de SPW. (36)	24
Tabela 2: Componentes para extração.	25
Tabela 3: Componentes para conversão.....	27
Tabela 4: Parâmetros do termociclador.....	27
Tabela 5: Tabela oligonucleotídeos HRM.....	28
Tabela 6: Componentes para preparo do mix.	30
Tabela 7: Parâmetros de ciclagem para amplificação de fragmentos.	30
Tabela 8: Parâmetros de ciclagem digestão parcial dos amplicons.....	30
Tabela 9: Componentes para adição de barcodes e adaptadores.....	31
Tabela 10: Parâmetros para adição de barcodes e adaptadores.....	31
Tabela 11: Parâmetros de ciclagem para quantificação da biblioteca.	32
Tabela 12: Componentes para enriquecimento da biblioteca.....	33
Tabela 13: Adição de componentes ao strip.....	34
Tabela 14: Parâmetros de ciclagem para sequenciamento.	35
Tabela 15 - Iniciadores utilizados no Sequenciamento de Sanger.	38
Tabela 16: Condições de ciclagem Sanger.	39
Tabela 17 - Análise básica de sequenciamento.	51
Tabela 18 - Resultados das técnicas MS-HRM, GTG, FISH, AF e CNV dos pacientes LACIFF-1 ao LACIFF-17.....	64
Tabela 19 - Tabela de variantes encontradas nos pacientes LACIFF-1, LACIFF-2 e LACIFF-3.....	65
Tabela 20 - Resultados obtidos através do software Phenolyzer e ordenados baseados no <i>score</i> apresentado. Valores ExAC pLI próximos a 1 indicam alta intolerância a perda de função.....	67

1. Introdução

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) é uma doença congênita de origem genética caracterizada pela não expressão do alelo paterno do cromossomo 15 (15q11-13). Aproximadamente 70% dos indivíduos portadores da doença apresentam deleções na região 15q11-13, 25% dos casos são oriundos de dissomia uniparental materna (UPD), enquanto que 5% dos casos relacionados a doença são devido a defeitos relacionados ao mecanismo de *imprinting*. A SPW acomete ambos os sexos e é considerada rara por conta de sua incidência ser de 1 a cada 15 mil nascidos vivos (1,2). Além disso, não segue um padrão de herança mendeliano.

A enfermidade é caracterizada por apresentar hipotonia ao nascer, baixa estatura, mãos e pés pequenos, hipogonadismo, retardo psicomotor e obesidade. Algumas características metabólicas lembram as deficiências de hormônio de crescimento (GH), como redução de massa magra, redução da concentração de fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) e crescimento estrutural reduzido (3,4).

O diagnóstico preciso de SPW é realizado analisando os padrões de metilação na região 15q11-q13, através da utilização de técnicas moleculares. A detecção do perfil de metilação apenas no *locus SNRPN-SNURF* através da técnica de conversão por bissulfito, permite o diagnóstico da doença, sem especificar a sua etiologia. Para maiores informações, deve haver a utilização de técnicas complementares como Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação (MLPA), técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e Análise de Microssatélite (STR) (5).

Avaliação do perfil de metilação associado ao FISH irá confirmar o diagnóstico e identificar a presença de uma possível deleção, a análise genômica de vários locais da região 15q11-q13 pelo uso da MS-MLPA detecta alterações deletérias e dissomia uniparental (UDP). No entanto, na ausência de uma deleção, a análise dos microssatélites torna-se necessária para distinguir entre UPD e um defeito de *imprinting*. Portanto, são necessárias várias metodologias moleculares complexas para o diagnóstico preciso de todas as alterações genéticas que ocorrem na SPW (6,7).

Na década de setenta do século passado, Frederick Sanger e colaboradores publicaram o método de sequenciamento por terminação de cadeia. Esse método passou a ser conhecido como “método de Sanger” e foi sofrendo aprimoramentos nos trinta anos seguintes. Na década de 1980, com o desenvolvimento dos primeiros protótipos de sequenciadores semiautomáticos de DNA, este método se tornaria o método mais comum de sequenciamento, utilizado em rotina até os dias de hoje (8,9). O concomitante desenvolvimento de algoritmos de montagem de genomas a partir de fragmentos sequenciados tornou o método Sanger a principal ferramenta do projeto de sequenciamento do Projeto Genoma Humano (PGH) e de outros organismos nos anos seguintes (10). Essa metodologia apresenta limitações em projetos de alta demanda. A partir de 2005 foram apresentadas novas tecnologias que não eram mais baseadas no princípio da eletroforese. Esse conjunto de diferentes plataformas foi denominada de Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*). Embora apresentem diferenças técnicas, todas as plataformas NGS apresentam em comum a capacidade de sequenciamento em

larga escala, rapidez e com um custo total por base identificada mais acessível (11).

O aumento na capacidade de geração de dados, acrescido do desenvolvimento de algoritmos possibilitou que a tecnologia NGS fosse utilizada em um amplo espectro na pesquisa científica, não apenas no estudo de genomas completos como também a análise de grupos de genes específicos, regiões promotoras, RNA-seq entre outras (6). Relacionado a saúde humana, a tecnologia NGS também é utilizada no sequenciamento do exoma completo (referente as regiões codantes do genoma) e o sequenciamento de genes alvos, o qual é focado em um grupo de genes (painéis genéticos) envolvidos com a doença em estudo. Essas estratégias são válidas na busca de alterações em regiões codantes, porém quando se trata de aplicações clínicas mais diretas, a literatura disponível favorece a utilização de painéis, por alguns motivos: maior objetividade e rapidez na interpretação dos resultados e melhor desempenho em relação aos genes de interesse (11–13).

Dessa forma o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA permitiu uma revolução no diagnóstico molecular, permitindo a identificação de múltiplas alterações genéticas de forma mais eficiente e, conseqüentemente, contribuindo para o diagnóstico de indivíduos portadores de SPW.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a metodologia de sequenciamento de Nova Geração e a sua aplicação no diagnóstico molecular de SPW frente as técnicas atuais.

2.2 Objetivos Específicos:

- Identificar alterações compatíveis com a síndrome de Prader-Willi através do sequenciamento de nova geração;
- Análise de concordância diagnóstica entre o sequenciamento de nova geração, com a utilização de um painel ampliado, frente as técnicas MS-HRM, FISH e sequenciamento de Sanger.
- Avaliar a aplicabilidade da tecnologia NGS e do painel desenhado, validando os resultados obtidos frente a amostras de pacientes com diagnóstico molecular prévio, obtido por análise de metilação (MS-HRM) e técnicas de citogenética (GTG, FISH) realizadas no departamento de Genética do IFF;

3. Referencial Teórico

3.1 A síndrome de Prader-Willi

3.1.1 Descrição clínica

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) foi descrita pela primeira vez no ano de 1956 por Andrea Prader, Heinrich Willi e Alexis Labhart sendo documentada como uma doença de origem genética, caracterizada por alterações na região proximal do cromossomo 15 (15q11-13) (1). Considerada rara, a doença tem incidência aproximada de 1 caso a cada 15.000 nascidos vivos, afetando ambos os sexos, independente de etnia e raça. A taxa de reincidência do distúrbio possui um risco relativamente alto, variando de 1% a 50% (2).

Durante a fase neonatal a enfermidade é caracterizada por diferentes graus de hipotonia sendo associada à baixa movimentação, letargia, choro fraco e dificuldade de sugar e conseqüentemente de alimentação, sendo constante o uso de sondas que auxiliam na correta nutrição (1).

Um atraso no desenvolvimento mental também é relacionado a doença e se torna evidente na fase pré-escolar através de testes de quociente de inteligência (QI) indicando uma capacidade intelectual reduzida (QI: 60-70) prejudicando o desempenho acadêmico devido às múltiplas dificuldades de aprendizado (14). Um retardo no desenvolvimento motor é invariavelmente relacionado à SPW visto que acomete 90 a 100% de seus portadores, fazendo-se necessário quase que o dobro do tempo, quando comparado a uma criança normal, para aprender atividades normais desta faixa etária como sentar e andar. Durante a infância, 70% a 90% dos indivíduos com SPW possuem um perfil comportamental característico como: birras, teimosias, dificuldade com mudança de rotina e comportamento compulsivo manipulativo (15).

O hipogonadismo atinge ambos os sexos dos portadores de SPW levando a uma hipoplasia genital devido à problemas relacionados à produção de hormônios sexuais, como a testosterona para os homens e o estrogênio para as mulheres. Como consequência dessa deficiência hormonal os testículos podem não produzir espermatozoides adequadamente, assim como os ovários podem não produzir ou liberar os óvulos levando a infertilidade de seus portadores na maioria dos casos. Aparente na infância, a baixa estatura é devido à baixa concentração do hormônio do crescimento (GH), resultando em uma altura média para homens de 155 cm e para mulheres, 148 cm (16). Além disso características faciais típicas, mãos e pés pequenos, estrabismo e escoliose estão sempre presentes em pacientes com SPW (1).

Anomalias do sono são documentadas para a Síndrome de Prader-Willi devido disfunção hipotalâmica primária incluindo redução da fase de latência REM (movimento rápido dos olhos), dessaturação de oxigênio causado por distúrbios de ventilação e oxigenação, apneia central e obstrutiva (17).

A obesidade apresentada pela grande maioria dos portadores é devido ao consumo excessivo de calorias, pelo comportamento compulsivo relacionado a alimentação, fatores metabólicos e pouca atividade física que resultarão em uma diminuição do consumo de energia contribuindo para o acúmulo de massa gorda. Esse quadro acarreta na alta incidência de morte dos portadores de SPW através de doenças cardiopulmonares, diabetes mellitus tipo II, hipertensão, tromboflebite e edema crônico na perna (3). A hiperfagia é em decorrência de um mau funcionamento do hipotálamo que eleva os níveis de grelina indicando o organismo a necessidade de alimentar-se. Nos indivíduos com SPW, os níveis permanecem altos mesmo após a alimentação, não havendo sensação de

saciedade. A grelina apresenta duas formas a n-octanoil e a des-acil, no jejum ocorre o aumento de ambas. Na hiperfagia e obesidade ocorre a redução apenas da des-acil grelina. É possível que na SPW ocorra a disfunção nessa relação entre os dois tipos de grelina, resultando na concentração aumentada, opondo-se ao que ocorre no obeso não portador da síndrome (18).

3.1.2 Alteração genética

A enfermidade é causada pela não expressão de alelos paternos (*imprinting*), acarretando em anormalidades endócrinas como: baixa concentração do hormônio de crescimento (GH), deficiência na secreção de gonadotrofina, fator de crescimento insulina-like baixo, e proteína-3 de ligação ao fator de crescimento IGF (4).

Em 75% dos casos, os portadores de SPW apresentam uma deleção de 4 MB à 4,5 MB na região 15q11-q13 no cromossomo herdado de origem paterna (19). Outro fator frequente na SPW é a dissomia uniparental (UPD) materna que acomete 20% a 30% de casos confirmados da síndrome. A UPD ocorre quando o indivíduo recebe dois cromossomos maternos e nenhum paterno, erro gerado durante a primeira divisão meiótica, resultando em regiões cromossômicas heterodissômicas ou isodissômicas (1).

Aproximadamente 5% dos casos são gerados a partir de uma translocação ou outra anormalidade estrutural envolvendo o centro de *imprinting*. Defeitos no centro de *imprinting* são referentes a microdeleções no gene *SNURF-SNPRN* no éxon 1. O *imprinting* genômico é um processo de marcação bioquímica natural geralmente realizada na região promotora do gene. São adicionados grupamentos metil nas citosinas presentes nas ilhas CpG do qual irão impedir a

ligação de fatores de transcrição, resultando na expressão ou inativação de certo gene. Apresenta um padrão de herança que não segue o perfil Mendeliano e por não alterar a sequência de bases do DNA, é considerado um processo epigenético (19).

3.1.3 Estrutura genômica

A região 15q11-q13 pode ser subdividida em 4 regiões (Figura 1);

1º) Região proximal que não sofre *imprinting*, havendo a expressão de genes biparentais;

2º) Região de expressão somente paterna que contém genes bem caracterizados que codificam proteínas (*MKRN3*, *MAGEL 2*, *NDN* e *SNURF-SNRPN*), o gene *C15orf2* (que não apresenta introns e é expresso no alelo paterno); um cluster gênico que codifica pequenos RNA nucleares (snoRNA) (*HBII-413*, *HBII-13*, *HBII-438*, *HBII- 85*, *HBII-52*) dos quais exercem importante função regulatória sobre os outros tipos de moléculas de RNA;

3º) Região que contém genes de expressão preferencialmente materna (região da síndrome de Angelman (SA) *UBE3A* e *ATP10A*);

4º) Região denominada distal a qual não sofre *imprinting* e contém um cluster com três genes receptores GABA (3,20).

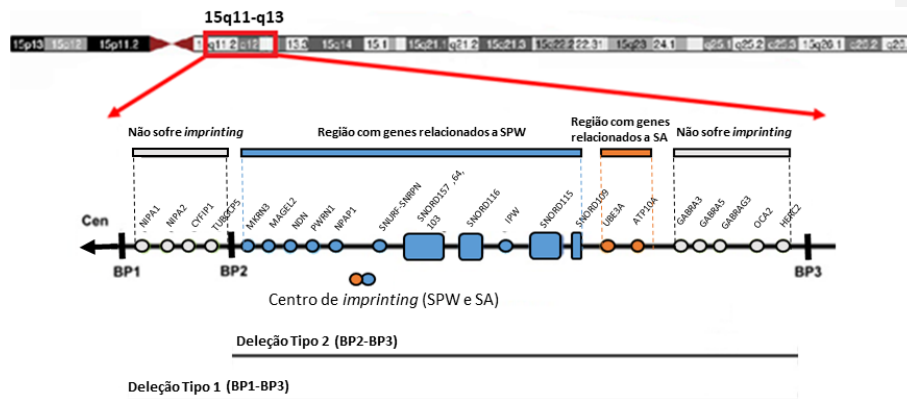


Figura 1 - Genes localizados na região 15q11-q13. Os pontos brancos representam genes que não sofrem *imprinting*, havendo expressão bialélica; Os pontos azuis representam a região crítica relacionada à SPW, com expressão monoalélica dos genes localizados no alelo; Quadrados azuis na região SPW representam os snoRNAs; Os pontos laranjas mostram genes com expressão monoalélica materna, estes genes são relacionados a outra síndrome genética, a síndrome de Angelman (SA); BP1: ponto de quebra 1; BP2: ponto de quebra 2; BP3: ponto de quebra 3; Tipo 1: deleção BP1-BP3 com aproximadamente 5,69 Mb; Tipo 2: deleção BP2-BP3 com aproximadamente 4,82 Mb; Cen: Centrômero. (21)

Apesar dos avanços obtidos com a utilização de modelos animais, a exata função de cada um dos genes na determinação fenotípica da SPW continua a ser elucidada; ao contrário da Síndrome de Angelman (SA), doença genética decorrente de alterações na mesma região da SPW na região 15q11-q13 (5), onde se sabe que uma mutação no gene *UBE3A* causa as características clínicas.

Considera-se a ausência do gene *MAGEL2* um dos candidatos para o desenvolvimento de uma desordem alimentar por conta do seu local de expressão ser no hipotálamo e outras regiões do cérebro (21). Estudos em camundongos com deleção no gene *MAGEL2* identificaram características biológicas semelhantes a seres humanos portadores da SPW, retardo do crescimento neonatal, ganho de peso excessivo após o desmame, regulação hipotalâmica prejudicada e redução de fertilidade. Havendo indícios da relação

entre a perda de função do gene *MAGEL2* e o desenvolvimento de fenótipos relacionados a SPW (22).

O gene *NDN* está localizado adjacente ao gene *MAGEL2*, onde tem como função codificar a proteína NECDIN que atua como supressor do crescimento neuronal e proteína antiapoptótica em pós-mitóticos, além de possuir um nível de expressão elevado no hipotálamo. Um modelo de camundongo com deleção no gene *NDN* demonstrou defeitos similares a indivíduos com SPW (23).

O gene *MKRN3* (*Makorin Ring Finger Protein 3*) não apresenta íntrons e a expressão do alelo diferencial ocorre através do silenciamento do alelo materno do gene, o qual está associado à metilação da ilha 5 'CpG47. A proteína codificada por este gene, está diretamente relacionada com as fases iniciais de maturação sexual que ocorrem na adolescência. A puberdade inicia-se a partir da ação do hipotálamo através da liberação do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH). O GnRH é um hormônio dipeptídico e atua na liberação de outros hormônios que atuam estimulando as gônadas dos animais mamíferos. Pesquisas sugerem que a proteína codificada pelo gene *MKRN3* inibe a liberação de GnRH pelo hipotálamo, impedindo o início da puberdade. Defeitos de *imprinting* neste locus são característicos de pacientes portadores da síndrome de Prader-Willi, sugerindo que a não expressão do gene *MKRN3* está diretamente relacionada com a puberdade precoce (24).

O gene *SNURF-SNRPN* encontra-se localizado na região central dos genes envolvidos com a SPW, codifica duas proteínas diferentes e faz a regulação de 6 snoRNA presentes na região distal. É um gene bicistrônico que codifica duas proteínas. Os exons 4-10 estão relacionados com a síntese da proteína SmN, a qual desempenha um papel no mecanismo de processamento

(splicing) de RNAm (25). A proteína SNURF é codificada pelos exons 1-3 do qual produzem polipeptídios de função desconhecida. Na extremidade 5' do gene *SNURF-SNRPN* existe uma ilha CpG onde não ocorre a metilação do gene herdado paterno (havendo sua expressão), enquanto que o gene materno sofre metilação, não havendo a expressão materna desse gene. Os genes *snoRNA* estão presentes em cópia única para cada gene exceto para os genes *SNORD116 (HBII-85)* e *SNORD 115 (HBII-52)* que possuem 29 e 42 cópias, respectivamente (26).

Muitos RNAs não codificantes (lncRNAs) interagem com proteínas modificadoras da cromatina devido à sua estrutura secundária podendo recrutar complexos modificadores de cromatina para regiões genômicas específicas. O gene *IPW* localizado dentro da região crítica associada à SPW no cromossomo 15 é um de vários lncRNAs associados a um locus que sofre *imprinting*, o qual é considerado apenas um transcrito de RNA, visto que não codifica nenhuma proteína (27).

Os genes *SNORD 116 (HBII-85)*, *SNORD 115 (HBII-52)*, *SNORD 107 (HBII-436)*, *SNORD 64 (HBII-13)* não são expressos em pacientes com SPW, em indivíduos normais a expressão no cérebro é normal. Experimentos em modelos animais portadores de SPW com deleção no gene demonstraram sintomas similares aos humanos (hiperfagia e deficiência no hormônio de crescimento), confirmando que a síndrome está diretamente ligada a deleção do *SNORD116* (28). Recentemente foram relatados 3 casos de indivíduos com microdeleções relacionadas ao cluster gênico do gene *SNORD116* e que apresentavam características clínicas típicas da SPW como hipotonia neonatal, problemas de alimentação, ganho acentuado de peso, hiperfagia,

hipogonadismo, atraso no desenvolvimento intelectual/motor e problemas comportamentais. No entanto esses mesmos 3 indivíduos possuem características atípicas de SPW, alta estatura comparada a portadores da síndrome, características faciais e corporais normais. Rigorosos estudos neurocomportamentais não foram realizados a fim de determinar se esses 3 portadores da síndrome possuem fenótipo comportamental típico da SPW (26).

3.1.4 Diagnóstico molecular

Os procedimentos de diagnóstico molecular para SPW variam de laboratório para laboratório, dependendo de alguns fatores como; disponibilidade de amostras; disponibilidade de equipamentos laboratoriais e padronização de técnicas. A abordagem mais sensível para diagnosticar a síndrome é realizando uma análise dos padrões de metilação na região 15q11-q13, através da utilização de técnicas moleculares específica como a Reação em Cadeia da Polimerase seguida de uma análise da curva de Dissociação em Alta resolução (High Resolution Melting - HRM) e Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação (MLPA) (7,29).

O HRM é um método pós-PCR rápido, simples, robusto, homogêneo e desenvolvido em sistema fechado. É uma técnica que consiste na caracterização da amostra de DNA de acordo com a composição de pares de base (pb) refletida no comportamento da curva de dissociação durante a transição de DNA fita dupla para DNA fita simples com o aumento da temperatura, recorrendo a corantes fluorescentes intercalantes saturantes que se ligam ao DNA de dupla cadeia, sendo o fenômeno monitorado através do equipamento de PCR em

tempo real. Estes corantes apresentam baixa toxicidade para a reação, podendo ser utilizado em concentrações elevadas a fim de saturar toda a dupla cadeia de DNA das amostras. Isso significa, que os sinais de fluorescência medidos têm maior fidelidade (sensibilidade e resolução), aparentemente devido à menor proporção de redistribuição de corante das regiões desnaturadas para aquelas ainda em dupla cadeia (29).

A avaliação do estado de metilação do exon 1 na ilha CpG do gene *SNURP-SRNP* pode ser feita através da técnica HRM. Após a extração do DNA, o material é submetido ao tratamento com bissulfito onde ocorre uma reação de desaminação seguida da conversão de todas as citosinas não metiladas em uracila. A sequência de DNA modificada pelo tratamento com bissulfito é distinta da sequência correspondente ao alelo metilado, portanto utilizando-se de dois pares de *primers* para cada alelo (metilado e não metilado) para que ocorra amplificação específica de cada região. (5,6,29)

O resultado da análise do estado de metilação por HRM apenas confirma o diagnóstico da Síndrome de Prader-Willi, não havendo diferenciação entre UPD, deleção e defeitos no *imprinting* (5,29). Técnicas adicionais como a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) para detecção de deleções, e GTG de alta resolução para identificação de translocações, inversões e outros rearranjos cromossômicos devem ser realizadas em paralelo ao HRM. O método FISH utiliza um microscópio de fluorescência para visualizar sinais luminosos emitidos por sondas que hibridizam ou não, em regiões homólogas do cromossomo espalhados em uma lâmina. Após a realização da técnica, a não hibridização de sondas a região crítica da SPW indica uma deleção da região, um resultado negativo torna necessária a realização de outro método para

distinguir se o desenvolvimento da doença foi causado por UPD ou defeitos no *imprinting* (7).

As regiões de microssatélites são *loci* polimórficos presentes no DNA nuclear que consistem em unidades repetitivas 1 a 6 pares de bases de comprimento e apresentam altas taxas de mutação genética no número de cópias. Quando um diagnóstico de SPW é confirmado pelas técnicas anteriormente descritas, a análise de microssatélites se faz necessária para identificar UPD ou defeitos no centro de *imprinting*. O resultado da análise demonstrando uma herança uniparental na região crítica da doença é causada por regiões heterodissômicas e isodissômicas caracterizando uma UPD. Uma herança biparental na região crítica do cromossomo 15 pode ser representativa de microdeleções no centro de *imprinting*.(5)

Outra triagem diagnóstica utilizada para detecção de SPW inicia-se a partir da avaliação do perfil de metilação através da análise genômica de vários locais da região 15q11-q13 (MS-MLPA). A utilização da técnica de MS-MLPA não necessita de um tratamento com bissulfito e dispensa a realização da técnica de FISH para identificação de deleções na região da SPW. Cada reação da técnica de MS-MLPA gera duas amostras para serem analisadas, sendo uma para verificar alteração no número de cópias do cromossomo e outra para análise de metilação. A amostra utilizada para avaliar o estado de metilação utiliza sondas específicas oligonucleotídicas que irão hibridizar-se com o DNA genômico e enzimas de restrição (*HhaI*) sensíveis a metilação nas ilhas CpG. Após a reação de hibridização uma amplificação por PCR é realizada para verificar se houve ou não amplificação. A ação da *HhaI* é bloqueada caso a região a ser amplificada esteja metilada, gerando produtos da reação de PCR, no entanto, se não houve

adição do grupamento metil, a enzima irá digerir o DNA e não haverá amplificação. A genotipagem utilizando MS-MLPA pode detectar alterações no número de cópias bem como determinar o estado de metilação da região 15q11-13, porém não possui capacidade de distinguir se a doença é originária de UPD ou alterações no centro de *imprinting*, por conta disso uma análise de microssatélite se faz necessária (5,7).

A completa investigação a respeito dos mecanismos genéticos referentes a origem da doença, está diretamente relacionada com um aconselhamento genético eficaz. A partir de um diagnóstico capaz de identificar a alteração responsável pelo desenvolvimento da síndrome, o médico responsável poderá indicar o risco de recorrência, que pode atingir 50% quando oriunda de um defeito no centro de *imprinting* (2).

O processo diagnóstico da SPW pode seguir duas vertentes distintas. A primeira linha diagnóstica inicia-se a partir de uma análise de metilação (MS-HRM/MS-PCR) seguida pela técnica de FISH e análise de microssatélite (Figura 2A). A segunda perspectiva diagnóstica por outro lado, inicia-se através da técnica de MS-MLPA que analisa simultaneamente o padrão de metilação e diferença no número de cópias cromossômicas, e por fim, a análise de microssatélite (Figura 2B).

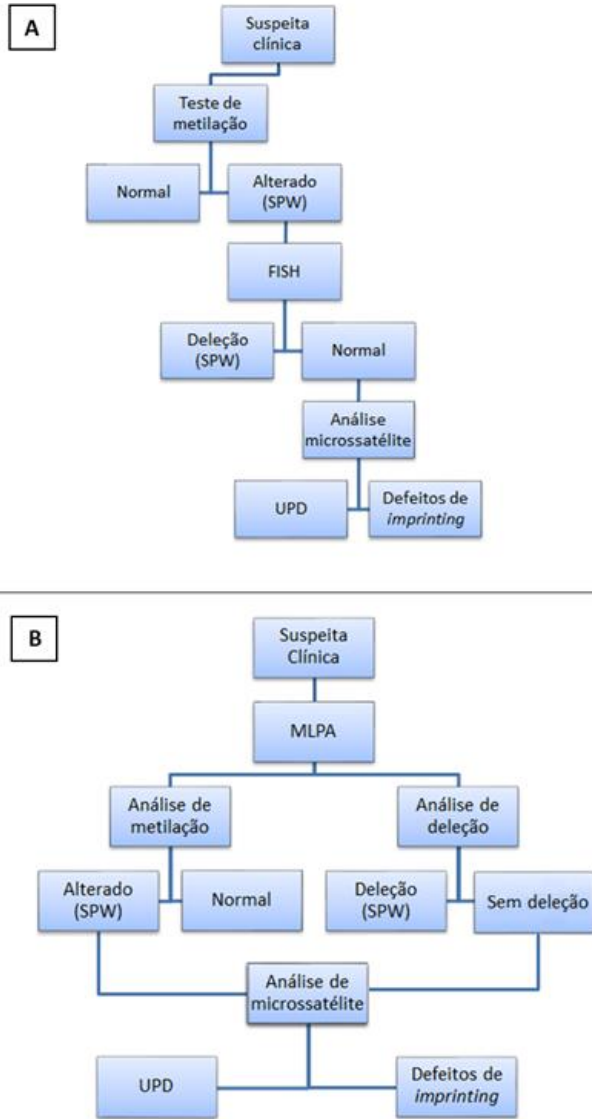


Figura 2 - A: Processo diagnóstico iniciando-se a partir da suspeita clínica e posterior realização das técnicas de análise de metilação, FISH e Análise de microsatélite; B: A partir de uma suspeita clínica realiza-se o teste diagnóstico MLPA, avaliando a integridade cromossômica e o perfil de metilação do cromossomo 15. Subsequente ao MLPA a análise de microsatélite se faz necessária.

3.2 Sequenciamento de DNA

3.2.1 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O primeiro método amplamente utilizado e popularizado de sequenciamento de DNA foi através da técnica de terminação de cadeia de Sanger. Com a contínua automatização e progressão do processo de sequenciamento os princípios da técnica de Sanger foram aprimorados permitindo o desenvolvimento de projetos mais complexos como o sequenciamento do Projeto Genoma Humano (PGH) (10). Apesar de todo o avanço no sequenciamento através da técnica de Sanger e sua introdução como método diagnóstico para diversas patologias, algumas limitações justificam a dificuldade de implantação da técnica na rotina de exames laboratoriais.

As contínuas evoluções das tecnologias de sequenciamento e do poder computacional necessário para análise de dados, levaram ao surgimento de novas plataformas de sequenciamento conhecidas como Sequenciadores de Nova Geração (NGS). A tecnologia NGS utiliza abordagens metodológicas diferentes do sequenciamento de Sanger permitindo uma maior robustez no sequenciamento de genomas completos, metagenomas, RNA-seq, exomas, RNAs não codificantes, pequenos RNAs (snoRNAs), *amplicons*, bibliotecas enriquecidas com fragmentos alvos dentre outras aplicações.

Enquanto que um sequenciador de eletroforese processa, no máximo fragmentos de 96 bp por vez, os sequenciadores de nova geração podem ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo (13).

A figura 3 demonstra o início de um decréscimo de custo por megabase sequenciada a partir de 2004 com custo aproximado de mil dólares (\$1000) a partir do lançamento da plataforma 454 (Roche). Os anos seguintes demonstram

uma queda acentuada com o lançamento dos sequenciadores subsequentes da Illumina e da Life Technologies. O gráfico ratifica que a redução de valor não acompanha a lei de Moore indicando que a redução de custo foi acelerada quando comparada a evolução dos processadores de computadores, apontando que a evolução metodológica foi muito mais avançada que a capacidade de análise dos dados. A lei de Moore relaciona o tempo para que cada processador atinja o dobro de sua potência pelo mesmo preço e tamanho, permitindo que a tecnologia continue avançando e evoluindo cada vez mais rápido. (30,31)

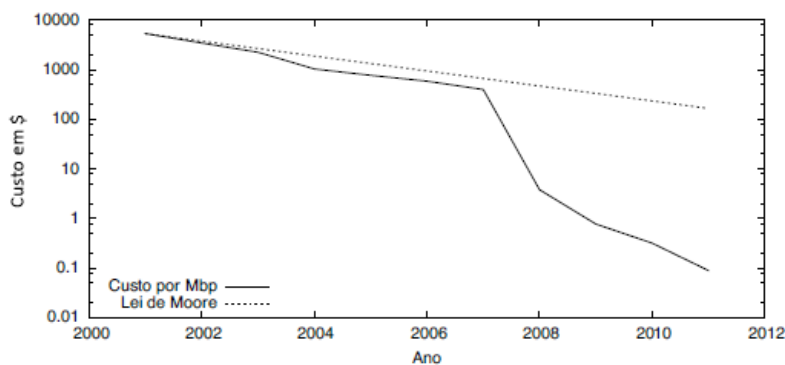


Figura 3 - Evolução do custo de sequenciamento por megabase (31).

Cada plataforma utiliza um método específico de sequenciamento, sendo comum as etapas de extração do material genético, a construção da biblioteca e a aquisição dos dados de sequenciamento para interpretação dos resultados.

O processo de sequenciamento executa uma série de reação químicas que resultam em liberações de sinal que serão detectados e interpretados pelos softwares de cada plataforma, permitindo identificar a sequência de base que foram adicionadas.

A plataforma Ion Torrent PGM™ (Life Technologie, Thermo Scientific) é um sequenciador de bancada (*benchtop*), direcionado para o sequenciamento de genes alvos ou pequenos genomas. Essa tecnologia não utiliza moléculas modificadas, nucleotídeos fluorescentes dispensando a utilização de aparelhos ópticos de detecção, como em outras plataformas, possibilitando um baixo custo de manutenção e de reagentes.

O protocolo inclui basicamente três passos: 1) Construção das bibliotecas: Com a amplificação de sequências específicas (200-400 pares de bases/pb). Em seguida os fragmentos recebem dois adaptadores em suas extremidades de sequência conhecida (denominados de A e P1). No caso de mais de uma amostra por corrida são utilizadas junto com esses adaptadores, sequências denominadas de *barcodes* (específicos para cada amostra), permitindo a correta separação de cada amostra no momento da análise; 2) Preparo do molde: realizada a construção das bibliotecas, os fragmentos são utilizados para a etapa de preparo dos molde, onde ocorre a PCR de emulsão; 3) Sequenciamento: Nessa etapa, a amostra no interior do chip, o qual apresenta milhares de poços de diâmetro micrométrico. Cada *bead* individualmente é depositada por poço para a etapa do sequenciamento. A detecção acontece na incorporação de um nucleotídeo, a ligação fosfodiéster gerada libera íons de hidrogênio, sendo estes detectados pelos semicondutores. Assim toda vez que ocorre o fornecimento de um nucleotídeo acompanhados de variação de pH, isso indica que a base foi incorporada (Figura 4). O processo total pode levar até 5 horas e ao final do processo são lidas mais de 1 bilhão de pares de base (Gb) (11,12),13).

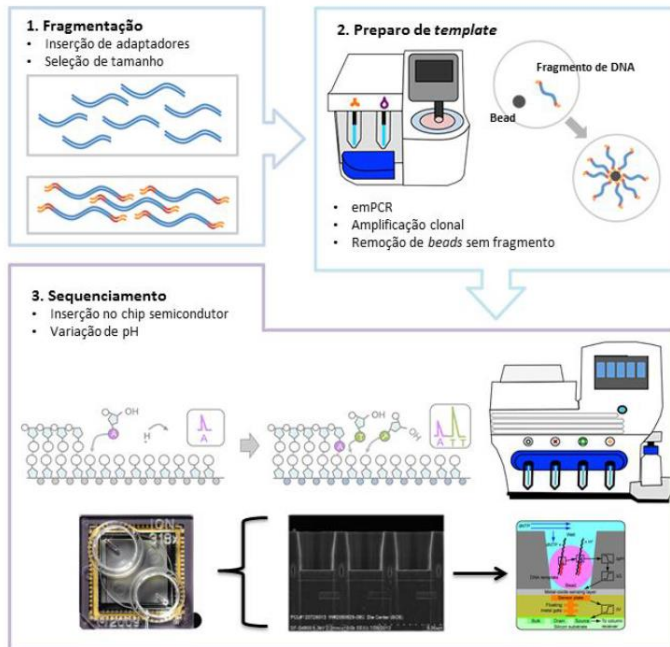


Figura 4 - Etapas relacionadas ao sequenciamento de nova geração na plataforma Ion Torrent PGM.

A plataforma Ion Torrent utiliza fluxos contínuos de dNTPs analisando a mudança de pH por um sensor ISFET e convertendo essa informação para sinais elétricos. Uma questão relevante para os sequenciadores que operam com fluxos contínuo de bases nitrogenadas são os homopolímeros, que por definição são sequências de bases iguais que se repete de forma ininterrupta (AAAA, CCCC, etc), onde o Ion Torrent possui uma boa acurácia devido ao sensor ISFET ter uma detecção linear; portanto se houver uma adição de dNTP de forma repetida o equipamento interpretará quantas vezes o sinal foi maior, ofertando um bom paralelismo da reação e detecção (32).

3.2.2 Sequenciamento de Nova Geração e o diagnóstico molecular

Nos últimos anos diversos estudos têm sido publicados utilizando a tecnologia NGS na área de oncologia, relacionando síndromes genéticas com fatores de predisposição ao câncer. Em um estudo recente realizado por Pinto *et al.* (2016), buscou-se a validação do uso das técnicas NGS para identificação de mutações pontuais nos genes *BRCA1/BRCA2* dos quais estão relacionados com o desenvolvimento de câncer de mama e ovário hereditário (HBOC), e relacionou o papel de outros genes associados a patologia (33).

Uma coorte em 94 pacientes com histórico familiar de câncer de ovário ou mama com predisposição à HBOC foi utilizada como modelo de estudo. Através de técnicas de rastreio padrões para detecção de mutações associadas aos genes, identificou-se 14 pacientes positivos e 80 negativos. As amostras também foram submetidas a uma análise por sequenciamento de Sanger de toda a região codante e regiões de íntrons adjacentes dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Os dados NGS obtidos através da plataforma Illumina MiSeq foram comparados aos resultados do sequenciamento de Sanger, onde obtiveram uma concordância de 100% de ambas as técnicas devido a detecção simultânea de 506 mutações relacionadas aos genes anteriormente descritos. A estratégia de rastreio através da metodologia NGS permitiu a identificação de 10 deleções no gene *BRCA1*, 21 em *BRCA2*, 4 em *PALB2*, 2 em *ATM*, 1 em *CHEK2* e 1 em *TP53* totalizando 39 mutações. Esses resultados demonstram a eficiência da NGS para a detecção de mutações pontuais nos genes *BRCA1/BRCA2* e destacam a heterogeneidade genética da HBO, oferecendo um diagnóstico rápido e completo a respeito da patologia (33).

Em outro estudo realizado recentemente, David e colaboradores (2017) procuraram determinar se o sequenciamento de todos os éxons (WES) tem potencial para rastreio em recém-nascidos portadores da Síndrome de Turner (TS). A síndrome ocorre devido à perda completa ou parcial do cromossomo X em pacientes do sexo feminino. O estudo teve como metodologia a realização de cariótipo, uma análise de larga escala do genoma através de microarranjos e o sequenciamento do exoma através do procedimento NGS em amostras sanguíneas de mulheres com diagnóstico confirmado de TS (n=27). O WES realizado na plataforma Illumina MiSeq detectou monossomia para o cromossomo X em todas as 27 amostras confirmadas com TS através das técnicas de microarranjo e cariótipo, além de identificar mosaicismos 45X/46XX e a presença de isocromossoma Xq. A sensibilidade e especificidade da técnica NGS para o diagnóstico de TS foram de 100% sem a presença de falsos positivos e negativos. Os resultados expressos pelo estudo demonstrando que a realização da técnica de NGS é um método preciso para diagnosticar TS, incluindo casos com mosaicismos e isocromossomos (34). Além disso, diversos estudos corroboram para a aplicabilidade da plataforma Ion Torrent no diagnóstico de síndromes genéticas, oferecendo um diagnóstico preciso e rápido(33,35,35-38).

4 Material & Métodos

4.1 Aspecto Ético

Este estudo é um subprojeto inserido em um projeto guarda-chuva em desenvolvimento na instituição denominado “O papel do hormônio do crescimento na Síndrome de Prader-Willi: estudo da regulação da expressão de GH através da estratégia CRISPR/Cas9, rastreamento neonatal e diagnóstico molecular”, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IFF/Fiocruz (CAAE: 45767015.0.0000.5269).

Este projeto tem apoio financeiro do Edital de Doenças Raras do CNPq.

4.2 Critérios de inclusão de casos

Os 17 pacientes selecionados para a realização do estudo foram submetidos a uma avaliação por uma ficha clínica pré-estabelecida por Holm *et al.*, 1993 (39), afim de identificar indivíduos com suspeita de possuírem a Síndrome de Prader-Willi. A ficha clínica utilizou como método para identificação os critérios fenotípicos relacionados a doença, categorizados de acordo com a relevância de cada característica da síndrome, conforme demonstrado na tabela 1. A seleção dos indivíduos suspeitos para SPW foi realizada no ambulatório de genética do Instituto Fernandes Figueira e pela equipe médica do IEDE (Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia).

Os principais critérios são ponderados em um ponto cada. Os critérios menores são ponderados em meio ponto. Crianças com 3 anos de idade ou menos necessitam cinco pontos para o diagnóstico, dos quais quatro devem ser do grupo principal. Crianças de 3 anos de idade até a idade adulta necessitam uma pontuação total de oito para o diagnóstico. Os principais critérios devem incluir cinco ou mais pontos da pontuação total.

Tabela 1: Ficha clínica para avaliação primária de SPW. (39)

Principais critérios	
1.	Hipotonia neonatal e infantil com má sucção, melhorando gradualmente com a idade.
2.	Problemas de alimentação na infância com necessidade de técnicas especiais de alimentação e perda de peso.
3.	Ganho de peso excessivo ou rápido no gráfico de peso relacionado a altura e faixa etária
4.	Características faciais características com dolicocefalia na infância, diâmetro da face estreita ou bifrontal, olhos em forma de amêndoa, boca de aparência pequena com lábio superior fino, cantos da boca virados para baixo.
5.	Hipogonadismo - com qualquer um dos seguintes, dependendo da idade: <ol style="list-style-type: none"> Hipoplasia genital (macho: hipoplasia escrotal, criptorquidismo, pênis pequeno e/ou testículos para idade [$<5^{\circ}$ percentil]; Feminino: ausência ou hipoplasia grave de lábios e/ou clitóris Maturação gonadal retardada ou incompleta com sinais tardios de puberdade na ausência de intervenção após 16 anos de idade (masculino: gônadas pequenas, diminuição facial e corporal, ausência na alteração de voz; Feminino: amenorréia / oligomenorréia após os 16 anos de idade).
6.	Hiperfagia.
7.	Deleção 15q11-q13 em alta resolução (> 650 bandas), anormalidade da região cromossômica de Prader-Willi, incluindo UDP.
8.	Leve a moderado retardo mental, atraso ou problemas de aprendizagem em crianças mais velhas.
Critérios menores	
1.	Diminuição do movimento fetal, letargia infantil ou choro fraco na infância, melhorando com a idade.
2.	Problemas de comportamento característicos - crises de raiva, surtos violentos e obsessivos/ comportamento compulsivo; tendência a ser argumentativa, oposicionista, rígida, manipuladora, possessivo e teimoso; perseverando, roubando e mentindo (5 ou mais desses sintomas requeridos)
3.	Perturbação do sono ou apnéia do sono.
4.	Baixa estatura.
5.	Hipopigmentação.
6.	Mãos pequenas ($<$ percentil 25) e / ou pés ($<$ percentil 10) para idade de estatura.
7.	Anormalidades oculares (esotropia, miopia).
8.	Saliva espessa e viscosa com crostas nos cantos da boca.

4.3 Critérios de exclusão de casos

Os critérios de exclusão dos casos foram relacionados a doenças sindrômicas com características fenotípicas que diferem da SPW (hipotonia neonatal, hipogonadismo, hiperfagia, comprometimento cognitivo, transtornos comportamentais e obesidade), evitando assim fatores de confundimento ligados a seleção amostral.

4.4 Extração de DNA

O sangue dos 17 pacientes incluídos no estudo foram coletados e armazenados em tubo EDTA. O kit utilizado para extração de DNA foi “QIAamp® DNA”. Após a coleta sanguínea, um tubo *ependorf* de 1.5 ml devidamente identificado com o nome do paciente foi utilizado para adicionar os componentes indicados na tabela 2.

Tabela 2: Componentes para extração.

Componentes	Volume
Proteinase K	20 µl
Sangue total	200 µl
Buffer AL	200 µl

Após a adição destes componentes, o tubo de 1.5 ml foi agitado através do equipamento vórtex por 15 segundos e incubado em banho-maria por 10 min à 56°C.

Com o término da incubação, os tubos foram centrifugados e então adicionou-se 200 µl de etanol 96%-100%, com posterior agitação utilizando o vórtex. O volume total do tubo foi transferido para uma coluna “QIAamp Mini column” acoplada a um tubo e alocado para centrifugação à 6.000 g por 3 minutos. O líquido foi descartado e a coluna inserida em um novo tubo de coleta onde adicionou-se 750 µl de Tampão AW1 na coluna alocada no tubo coletor. Uma nova centrifugação foi realizada na mesma velocidade e tempo anteriores.

Essa etapa repete-se mais uma vez modificando apenas o Tampão AW1 pelo Tampão AW2.

Descartou-se o líquido e centrifugou-se a coluna em um novo tubo coletor à 14.000 g por 1 min para que o filtro esteja completamente seco.

Novos tubos *eppendorf* de 1.5 ml foram identificados onde inseriu-se as colunas correspondentes. Adicionou-se 200 µl de Tampão de eluição AE e centrifugou-se à 6.000 g por 1 minuto. O material genético extraído suspenso no tampão de eluição foi submetido a uma dosagem de concentração (ng/µl) no equipamento de espectrofotometria NanoDrop, utilizando 2 µl de cada amostra. Além disso, o equipamento avaliou a presença de contaminantes de acordo com o comprimento de onda de 260/280.

4.5 Análise da curva da curva de dissociação em alta resolução (HRM)

4.5.1 Conversão com bissulfito

O protocolo inicia-se a partir do DNA extraído através do processo descrito na etapa 4.4, com o objetivo de converter as citosinas não metiladas em uracilas. O tratamento com bissulfito foi realizado através da utilização do kit EZ DNA Methylation-Lightning Kits (Zymo Research, USA)

Foi utilizado um tubo de PCR (reação em cadeia polimerase) de 0,2 ml e adicionaram-se os componentes descritos na tabela 3 para posterior alocação no termociclador com as condições de ciclagem descritas na tabela 4.

Tabela 3: Componentes para conversão.

Componentes	Volume
Lightning Conversion Reagent	130 µl
DNA	20 µl

Tabela 4: Parâmetros do termociclador.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
98°C	8 min	1
54°C	60 min	1

Após a ciclagem das amostras adicionou-se 600 µl de M-Binding Buffer a Zymo-Spin™ IC Column devidamente acoplada a um tubo de coleta, o volume de 150 µl referente aos componentes da tabela 3 foram transferidos para a mesma coluna onde foram submetidos a uma centrifugação de 14.000 g por 30 segundos. Descartou-se o líquido depositado no tubo de coleta e adicionou-se 100 µl de M-Wash Buffer a coluna para a centrifugação à 14.000 g por 30 segundos. O líquido é novamente descartado e adicionou-se 200 µl de L-Desulphonation Buffer e incubou-se à (20-30°C) por 20 minutos, a coluna Zymo-Spin™ IC Column é centrifugada à 14.000 g por 30 segundos, após o término da incubação o líquido sofre novo descarte e adicionou-se 200 µl de M-Wash Buffer para centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores. Esta etapa foi realizada duas vezes.

A coluna submetida as etapas anteriormente descritas foram depositadas em um tubo *ependorf* de 1.5 ml devidamente identificados. Pipetou-se 10 µl de M-Elution Buffer e uma nova centrifugação foi realizada à 14.000 g por 30 segundos.

4.5.2 PCR em tempo real HRM

Utilizando as condições e amostras de DNA obtidas acima, realizamos experimentos de PCR em tempo real associado com a análise da curva de dissociação (*melting*) com o objetivo de confirmar suspeitas relacionadas a Síndrome de Prader-Willi, sendo todas as amostras analisadas em triplicatas. A sequência dos *primers* utilizados estão apresentados na tabela 5. As reações foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA), pertencente a plataforma RPT09I - PCR em Tempo Real - IFF – RJ, do programa de rede plataformas Tecnológicas FIOCRUZ (PDTIS/FIOCRUZ).

Tabela 5: Tabela oligonucleotídeos HRM.

Primers PCR	Sequência
Iniciador Foward (Primer F)	5'-AGGGAGTTGGGATTTTGTATT-3'
Iniciador Reverse (Primer R)	5'-CCCCAACTATCTCTTAAAAAAC-3'

Os parâmetros (concentração e volume) dos componentes para o preparo de cada reação estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Componentes para HRM.

Componentes	Concentração
Iniciador Foward (200nM)	0,5 µl
Iniciador Reverse (200nM)	0,5 µl
HRM Melt-Doctor (2X)	5 µl
DNA (10-25 nh/ul)	1 µl
H2O	3 µl

As condições de ciclagem bem como os parâmetros para a realização da análise da curva de Melting estão apresentados na tabela 5

Tabela 5: Condições de ciclagem do equipamento 7500 Fast.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
95°C	10 min	1
95°C	30 seg	40
60°C	1 min	
60°C	7 min	1
95°C	5 seg	1
73°C	1 seg	
85°C	1 seg	
60°C	15 seg	

4.6 Ion Torrent PGM

4.6.1 Construção da biblioteca

O painel de sequenciamento elaborado possibilita o sequenciamento de genes completos na região 15q11-q13 e regiões polimórficas (SNP) com alta frequência (acima de 0,7). O desenho do conjunto de iniciadores para a amplificação dos genes (*SNRPN*, *NPAP1*, *IPW*, *GABRB3*, *PWRN1*, *UBE3A*, *HERC2*, *SNORD116*, *NDN*, *SNORD115*, *PWAR1*, *MAGEL2*, *MKRN3*) e demais regiões do cromossomo 15 foi realizada na plataforma virtual Ion Ampliseq Designer (<https://ampliseq.com>), na qual foram indicados os genes e *SNP* de interesse (versão do genoma utilizada: hg19) (Anexo 1).

Todas as etapas foram realizadas na plataforma RPT01M- Sequenciamento de Nova Geração - IFF - RJ.

O protocolo de sequenciamento NGS para a plataforma Ion Torrent inicia-se a partir do DNA extraído na etapa 4.2 para a construção de uma biblioteca de fragmentos a serem sequenciados.

A partir de um painel com oligonucleotídeos (*primers*) específicos para região relativa ao cromossomo 15q11q-13 que será sequenciado, pipetou-se os seguintes componentes da tabela 6 para o preparo de um mix.

Tabela 6: Componentes para preparo do mix.

Componentes	Concentração
5x Ion AmpliSeq Hifi Mix	5 µl
DNA	5 µl
Nuclease-free Water	2,5 µl

Após a homogeneização transferiu-se 5 µl do mix anteriormente preparado para 2 tubos *ependorfs* de 0.2 ml e adicionou-se 5 µl do *pool* de *primers* 1 e 2 em cada tubo correspondente. Os 2 novos tubos devidamente homogeneizados prosseguiram para a etapa de amplificação do número de fragmentos do DNA por PCR através dos parâmetros de ciclagem descritos na tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros de ciclagem para amplificação de fragmentos.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
99°C	2 min	1
99°C	15 seg	13
60°C	8 min	1
10°C	∞	1

Após a amplificação, os produtos dos tubos relativos aos *pools* 1 e 2 foram combinados em um tubo único, coletando 10 µl de cada totalizando ao final, um volume de 20 µl. A digestão parcial dos *amplicons* produzidos inicia-se com a adição de 2 µl de FuPa Reagent ao tubo preparado anteriormente, totalizando um volume de 22 µl que foram alocados em um termociclador com as condições de tempo e temperatura descritos na tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros de ciclagem digestão parcial dos amplicons.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
50°C	30 min	1
55°C	30 min	1
60°C	20 min	1
10°C	1 hora	1

Com o intuito de sequenciar diversas bibliotecas de diversos fragmentos de DNA, utilizam-se *barcodes* que funcionam identificando cada tipo de amplicon. Além dos *barcodes* os adaptadores também foram adicionados nesta etapa que iniciou-se com a adição dos componentes descritos na tabela 9 ao tubo anteriormente preparado com 22 μ l.

Tabela 9: Componentes para adição de barcodes e adaptadores.

Componentes	Concentração
Switch Solution	4 μ l
IonCode Adapters	2 μ l
DNA Ligase	2 μ l

Após a adição dos componentes o volume final apresentado no tubo *ependorf* foi de 30 μ l, onde foi alocado em um termociclador com as condições especificadas na tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros para adição de barcodes e adaptadores.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
22°C	30 min	1
68°C	5 min	1
72°C	5 min	1
10°C	24 horas	1

Após a ligação dos adaptadores aos fragmentos de DNA, a biblioteca passou por um processo de purificação com finalidade de descartar os fragmentos que não se ligaram aos adaptadores e *barcodes* adicionados.

Adicionou-se 45 μ l de Agencourt AMPure XP Reagent ao tubo anteriormente preparado homogeneizando-o através de fluxo-refluxo com a pipeta. O tubo que contém 75 μ l foi então alocado em uma placa magnética que separou as *beads* do líquido, o líquido sofreu descarte. Foi preparado etanol 70% e pipetou-se 150 μ l ao tubo que contém somente as *beads*, após a

homogeneização dos componentes, as *beads* separaram-se do etanol através do campo magnético exercido pela placa, o líquido sofre novo descarte.

As *beads* depositadas no tubo foram ressuspensas com a adição de 50 μ l de TE para a realização de uma diluição 1:100. Em um novo tubo *ependorf* de 1.5 ml, adicionou-se 2 μ l das *beads* em TE e 198 μ l de Nuclease-free Water.

A quantificação da biblioteca por qPCR confirma que as amplificações dos fragmentos nas etapas anteriores foram realizadas com sucesso. O protocolo inicia-se a partir do preparo de um mix com 20 μ l de 2X TaqMan MasterMix e 2 μ l de 20X Ion TaqMan Assay.

Em uma placa de qPCR adicionou-se 11 μ l do mix preparado e 9 μ l das amostras diluídas 1:100, totalizando um volume de 20 μ l. A placa foi inserida no equipamento 7500 Standard para a realização da quantificação. As condições de ciclagem do equipamento estão descritas na tabela 11.

Tabela 11: Parâmetros de ciclagem para quantificação da biblioteca.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
50°C	2 min	1
95°C	2 min	1
95°C	15 seg	40
60°C	1 min	

4.6.2 Enriquecimento da biblioteca

O protocolo de enriquecimento da biblioteca inicia-se após a quantificação da mesma. As configurações do equipamento Ion OneTouch 2 Instrument foram realizadas de acordo com kit que foi utilizado nesta etapa, PGM: Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit-400. A partir de uma concentração da biblioteca de 100 pM, pipetou-se 2 μ l do tubo correspondente a biblioteca amplificada em um novo *ependorf*, adicionando a ele 23 μ l de Nuclease-free Water, totalizando 25 μ l.

Em um tubo de 2 ml que contem 800 μl de Ion PGM Hi-Q View Reagent Mix, adicionou-se os componentes descritos na tabela 12.

Tabela 12: Componentes para enriquecimento da biblioteca.

Componentes	Concentração
Nuclease-free Water	25 μl
Ion PGM Hi-Q View Enzyme Mix	50 μl
Diluted library	25 μl
Ion PGM Hi-Q View ISPs	100 μl

Após a adição dos componentes descritos na tabela 13, o volume obtido foi de 1.000 μl do qual foram pipetados para o equipamento através do Ion OneTouch Reaction Filter, através do mesmo local, foram adicionados 1.700 μl de Ion OneTouch Reaction Oil. Em 2 tubos denominados Ion OneTouch Recovery, adicionou-se 150 μl de Tubes Ion OneTouch Breaking Solution e alocou-o na região correspondente da máquina. Após a adição de todos os componentes citados nesta etapa, configurou-se o equipamento conforme as instruções dadas pelo mesmo.

Para a recuperação das *beads* enriquecidas, ao final das etapas realizadas pelo equipamento Ion OneTouch 2 Instrument, transferiu-se 100 μl de Recovery Solution para um novo tubo onde também se adicionou 500 μl de Ion OneTouch Wash Solution. O novo tubo foi alocado em uma centrífuga para centrifugação por 3 minutos à 15.000 g. Com o término da centrifugação houve um descarte de 500 μl , permanecendo apenas 100 μl da mistura (ISP) anteriormente realizada.

O processo de enriquecimento prossegue com o preparo de uma nova solução que foi utilizada posteriormente. A solução denominada Melt-Off Solution foi produzida a partir da adição de 280 μl de Tween Solution e 40 μl de 1 M NaOH, totalizando um volume de 320 μl .

Em uma nova etapa do processo de enriquecimento, realizou-se a homogeneização de Dynabeads MyOne Streptavidin C1 por 30 segundos, e pipetou-se 13 μ l para um novo tubo *ependorf* de 1.5ml denominado LoBind Tube, adicionou-se a este tubo 130 μ l de MyOne Beads Wash Solution.

Todas as soluções previamente preparadas serão depositadas individualmente em um *strip* com 8 poços, seguindo as recomendações do protocolo descritos na tabela 13.

Tabela 13: Adição de componentes ao strip.

Nº poço	Reagente
1	100 μ l ISP
2	130 μ l Dynabeads
3	300 μ l Ion One Touch Wash Solution
4	300 μ l Ion One Touch Wash Solution
5	300 μ l Ion One Touch Wash Solution
6	Vazio
7	300 μ l Melt-Off Solution
8	Vazio

Antes de dar início ao processo de enriquecimento no instrumento, pipetou-se 10 μ l de Neutralization Solution no local demarcado pelo equipamento. Ao final de todo o processo, a biblioteca estará composta apenas por fragmentos ligados aos adaptadores, *beads* e barcodes.

4.6.3 Sequenciamento

O processo de sequenciamento tem como princípio a mudança de pH ocasionada pela adição de bases nitrogenadas complementares. O protocolo iniciou-se a partir do preparo de 500 μ l de NaOH à 100 mM, diluiu-se 50 μ l de 1 M NaOH em 450 μ l de nuclease-free water resultando em um volume de 500 μ l. A garrafa correspondente a W2 do equipamento Ion PGM foi enchida com a

solução de Ion PGM Hi-Q View Sequencing onde também pipetou-se 70 μ l da solução 100 mM NaOH anteriormente preparada.

A garrafa identificada como W1 foi preenchida com 350 μ l da solução 100 mM NaOH enquanto que a garrafa W3 foi preenchida com 50 ml de Ion PGM Hi-Q View Sequencing W3 Solution

O preparo dos dNTPs a serem adicionados iniciou-se a partir da identificação de cada tubo correspondente aos dNTPs (A, T, G, C) e a adição de 20 μ l.

As *beads* enriquecidas na etapa 4.4.2 foram adicionadas a um tubo *ependorf* de 0.2 ml que continha 5 μ l de Control ISPs, este tubo foi centrifugado à 15.500 g por 2 minutos. Um descarte do líquido presente no tubo foi realizado, evitando desfazer o *pellet* formado pela centrifugação, o volume de líquido que permaneceu no tubo foi de 15 μ l.

Adicionou-se 12 μ l de Sequencing Primer ao *ependorf* com 15 μ l de ISPs, totalizando um volume de 27 μ l, onde foi alocado em um termociclador com as condições de ciclagem descritas na tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros de ciclagem para sequenciamento.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
95°C	2 min	1
27°C	2 min	1

Ao fim da ciclagem no termociclador adicionou-se ao *ependorf* da solução de ISPs preparada, 3 μ l de Ion PGM Hi-Q View Sequencing Polymerase, totalizando um volume final de 30 μ l.

O carregamento do chip que foi inserido no sequenciador Ion PGM teve seu início a partir da adição dos 30 μ l da solução anteriormente preparada ao chip 318, após seu completo preenchimento o chip foi centrifugado a máxima

velocidade em uma centrífuga por 30 segundos para garantir a total distribuição das ISPs por toda a área do chip. Após o carregamento uniforme de todas as ISPs pelo chip, ele foi inserido no sequenciador para que ocorra o sequenciamento da região associada a Síndrome de Prader-Willi. O processo foi realizado 2 vezes, totalizando 2 corridas de sequenciamento (Anexo 2 e Anexo 3)

4.7 Bandeamento GTG

Diretamente do sangue do paciente coletado, 1 ml do material foi depositado sobre uma lâmina de vidro e alocadas em temperatura ambiente para que envelhecessem durante 5 dias. Ao final dos 5 dias, uma solução de tripsina (100mg de tripsina (100 mL de tampão Dulbecco – 0,8g de NaCl; 0,2g de KCl; 0,2g de KH_2PO_4 ; 1,44g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 1000mL de água destilada) foi preparada na qual as lâminas permaneceram inseridas na solução por 14 segundos à temperatura ambiente.

Após o tempo descrito, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato (6,808 g de KH_2PO_4 ; 0,882g de NaOH em 1000 mL de água destilada, pH 6,8). A etapa de coloração das lâminas iniciou-se depositando-as em solução Giemsa 4% durante 4 minutos, e por fim lavadas em água destilada. As lâminas coradas foram secas em temperatura ambiente e analisadas sob microscópio ótico (Seabright, 1971). Etapa realizada no Departamento de Genética do Instituto Fernandes Figueira.

4.8 FISH

A análise da citogenética foi realizado a partir de amostras de sangue periférico estimuladas por fitohemaglutinina de acordo com o protocolo padrão. A análise da amostra foi realizada por bandas GTG em alta resolução (450/550 bandas) e a classificação foi feita de acordo com a ISCN 2016. A técnica de FISH foi processada nos cromossomos de acordo com protocolo padrão. A sonda utilizada para visualização de deleções foi a SNRPN e15qter (Cytocell Inc). A visualização da ausência/presença de fluorescência só foi possível através de um microscópio de fluorescência.

A técnica de FISH foi processada a partir da utilização de 1 ml do sangue extraído do paciente depositado em uma lâmina de vidro. A lâmina foi alocada em temperatura ambiente durante um dia para o envelhecimento do material. Após o tempo descrito, a lâmina foi colocada em uma solução 2x SSC (pH 7,0) a temperatura ambiente por 30 minutos.

A lâmina foi desidratada em etano 70%, 85% e 100% respectivamente durante 2 minutos cada e alocadas para secar ao final da última desidratação em etanol 100%. A codesnaturação foi iniciada a partir da adição de 8 µl das sondas (SNRPN e15qter; Cytocell Inc) em uma lamínula, onde foi posta no centro da lamina desidratada. A lâmina foi selada com a cola Rubber Cement e foi alocada sobre uma placa aquecida à 72°C por 10 minutos.

Posteriormente realizou-se a fase de hibridação, do qual a lâmina foi guardada em uma estufa à 37°C durante 16 horas. Após o período de incubação a lâmina foi lavada em duas soluções: solução I (SSC 0,4x + tween 0,3% com pH 7,0) a 72°C por um minuto e solução II (SSC 2x + tween 0,1% com pH 7,0) à temperatura ambiente por 2 minutos e colocada para secar. Pipetou-se 10 µl de

DAPI do kit de sondas na lâmina e coberta com outra lamínula, selada com esmalte e depositada à 4°C por 10 minutos. Por fim, a lâmina com o material foi analisado em microscópio de fluorescência (Olympus BX50). Etapa realizada no Departamento de Genética do Instituto Fernandes Figueira.

4.9 Sequenciamento de Sanger

Para sequenciamento de DNA foram empregados: os produtos de PCR obtidos como molde, os iniciadores *Forward* e *Reverse* de cada variante (tabela 15), na concentração de 3.2 pmol e o kit de sequenciamento BigDye 3.1 (Applied Biosystems®). As reações foram analisadas no sequenciador de 96 capilares modelo ABI3730XL na Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT01) do programa PDTIS/FIOCRUZ.

Tabela 15 - Iniciadores utilizados no Sequenciamento de Sanger.

Primer	<i>Forward (5' > 3')</i>	<i>Reverse (5' > 3')</i>
INDEL <i>Magel2</i>	TTCATCCTCCAGGTGCGAGA	GCGGAGGAGCCCTTATAACT
INDEL <i>PWRN1</i>	TCAGCAGCGACTGCTTACAG	GAGTGAGCTCTCAAGAC

Cada produto purificado de DNA foi lido nos dois sentidos, com cada iniciador senso (em uma mistura) e iniciador antisenso (em outra mistura). O volume de reação foi de 10 µL. Para o volume de 10 µL de reação, foi adicionado 1 µL de BigDye e 1,5 µL de tampão de sequenciamento 5x.

Após o preparo da mistura, as amostras foram colocadas em um termociclador, na seguinte ciclagem descrita na tabela 16.

Tabela 16: Condições de ciclagem Sanger.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	5 min	1
94°C	10 seg	40
50°C	5 seg	
60°C	4 min	

Após a reação de sequenciamento foi realizada uma precipitação das amostras para retirada de ddNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA e formar um precipitado do material a ser analisado. A placa foi centrifugada brevemente (spin); seguido da adição de 35 µl de isopropanol 75% em cada poço. A placa é então agitada (vortex) por 10 segundos e mantida em temperatura ambiente, por 15 minutos, sob abrigo da luz. Em seguida a etapa de incubação realizou-se uma etapa de centrifugação por 45 minutos, à 4.000 rpm; o sobrenadante foi descartado. O pellet é lavado com a adição de 50 µl de etanol 75% em cada poço da placa; e foi centrifugada por 15 minutos, à 4.000 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado. A placa foi centrifugada invertida ("spin down") deixando chegar até 600 rpm e interrompeu-se a centrifugação. Por fim a placa foi aquecida à 60°C, permanecendo por 10 minutos, sob abrigo da luz.

Após o processo de precipitação, os produtos de sequenciamentos foram preparados para serem submetidos à eletroforese no sequenciador. Para tal procedimento, a desnaturação, utilizou-se a formamida, fator este altamente desnaturador que permitiu a separação da dupla-fita de DNA que foi analisada no sequenciador automático capilar.

Este processo consistiu em: Adicionar 10 µl de formamida em cada poço da placa seca; Centrifugar brevemente para permitir o preenchimento correto de cada poço; Colocar a placa em um bloco aquecido a 95°C, permanecendo por 3

minutos, sob abrigo da luz; Logo após o término do aquecimento, colocou-se a placa num recipiente com gelo com temperatura próxima a 4°C, onde permaneceu por 10 minutos; Centrifugou-se brevemente para permitir que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços concentrem-se ao fundo. Após estes processos a placa foi direcionada para o equipamento de eletroforese.

4.10 Análise da biblioteca NGS por bioinformática

Os dados gerados em formato <.FASTQ> pelo sequenciador Ion Torrent foram submetidos a um processo de limpeza e filtragem através da ferramenta Ion Torrent Suit. Os resultados básicos relativos ao número e o tamanho dos *reads* gerados, índice de qualidade das sequências e a distribuição do tamanho das sequências foram analisados no formato HTML.

Após as análises iniciais do desempenho do sequenciamento, os *reads* que não atingiram o valor de qualidade de 20 Phred foram excluídos da análise por serem considerados dados de baixa qualidade (12). O teste estatístico “teste t de student” avaliou se a diferença entre bases sequenciadas excluídas e bases sequenciadas iniciais é significativa, evitando a criação de vieses de análise provenientes da exclusão de dados.

A identificação de regiões com baixos índices de cobertura ($\geq 10x$) foi realizada a partir dos valores médios de cobertura de cada uma das 1618 regiões alvo mapeados em cada paciente.

O alinhamento das sequências foi realizado através do programa *TMAP* no software Ion Torrent Suit a partir da utilização diversos algoritmos de forma

simultânea, BWA-short (40), BWA-long (41), SSAHA (42) e Super-maximal Exact Matching (43). O processo iniciou-se a partir criação de um grupo de arquivos índices do genoma humano GRCh37/hg19. Os arquivos índice gerados foram utilizados como base para o alinhamento da sequência de cada biblioteca produzida no sequenciamento. O programa *TMAP* teve como produto final a criação de um arquivo formato <.BAM> contendo todas as informações das sequências que se alinharam ao genoma referência utilizado.

Após a formação do arquivo <.BAM.> alinhado a sequência referência hg19, um processo de chamada de variantes iniciou-se de acordo com um conjunto de pré-requisitos definidos no *FreeBayes* do software *Torrent Variant Caller* (TVC) (44). As variantes filtradas que atingiram os parâmetros de qualidade (qphred ≥ 20), profundidade e cobertura ($\geq 10x$) estipulados, foram avaliadas por um modelo estatístico do *FreeBayes* afim de estimar a confiabilidade de cada variante encontrada frente ao genoma referência. Em paralelo ao arquivo <.BAM>, utilizou-se o arquivo contendo o painel das regiões alvo para aumentar a confiabilidade das variantes detectadas. Além disso, um arquivo adicional *hotspot* foi introduzido visando analisar genes específicos do genoma sequenciado que possuem alguma relação com a SPW (*GABRB3*, *UBE3A*, *MAGEL2*, *SNRPN*, *NDN*, *PWRN1*, *NPAP1*, *HERC2*, *SNORD115*-, *SNORD116-1*, *MKRN3*, *IPW*, *MKRN3-AS1*, *PWAR1*). O arquivo *hotspots* permite a visualização da base independentemente dos parâmetros de sequenciamento e filtros da chamada de variantes.

A chamada de variantes ocorreu em 3 etapas: 1. O módulo de chamada de variantes TVC (*de novo*) utiliza o *FreeBayes* para descobrir uma variante candidata onde são subsequentemente pontuadas a partir do modelo de sinal

adaptativo e filtrado; 2. O segundo módulo realiza a montagem de leituras para detectar INDELS longos; 3. A partir da utilização de um arquivo *hotspots*, uma chamada de TVC separada pontua as variantes localizadas nos locais de interesse. As variantes do tipo INDEL foram realinhadas através da metodologia “*left indel align*” objetivando reduzir as detecções de variantes falso-positivas relacionadas à tecnologia Ion Torrent. Os arquivos gerados por cada etapa são sobrepostos para produção de um arquivo único final <VARIANTES.VCF> (Figura 5).

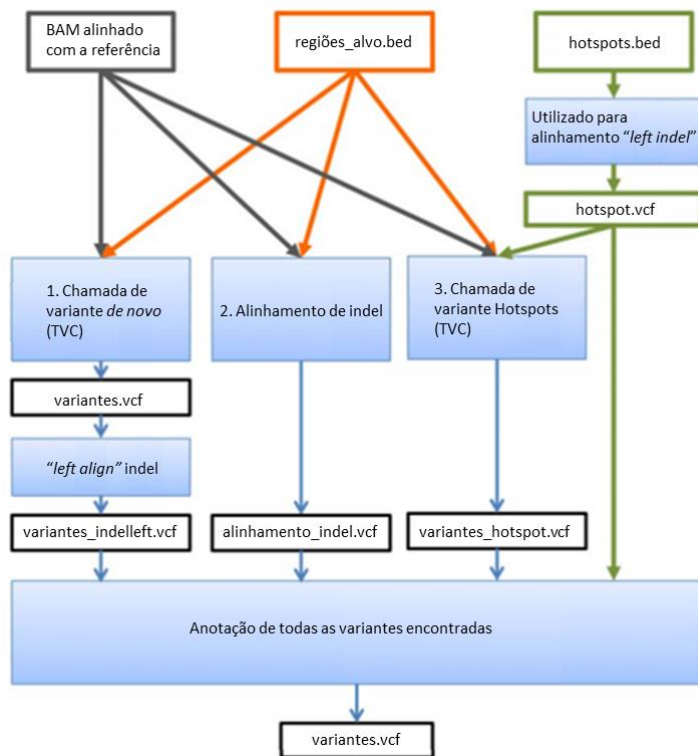


Figura 5 - Diagramação detalhada do processo de chamada variante.

O arquivo <VARIANTES.VCF> gerado, permitiu análises específicas de SNP, INDEL e MNV em toda região mapeada do cromossomo 15. As alterações SNP, INDEL e MNV de interesse foram classificadas como patogênica, provavelmente patogênica, variante de significado incerto (VUS) e benigna de acordo com as anotações genômicas (ClinVar), consequências preditas como causadoras de modificação na sequência das proteínas (perda de função, *missense*, *frameshift*, *nonsense*) (*Scale Invariant Feature Transform* – SIFT) e frequência alélica em que são encontradas na população (patogênica: *Minor Allele Frequency* < 1%; benigna *Minor Allele Frequency* > 1%). As frequências populacionais das alterações foram estimadas através consultas nos bancos de dados do *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP) e *Exome Aggregation Consortium* (ExAC). As alterações pontuais identificadas foram submetidas a uma análise comparativa através do *software* Phenolyzer (45) buscando um paralelismo entre o desenvolvimento da patologia e a mutação encontrada. Associado aos genes detectados pelo Phenolyzer, uma análise de haploinsuficiência e intolerância gênica a perda de função (pLI) foi realizada (ExAC pLI Score). O *score* pLI é a probabilidade de um determinado ser Haploinsuficiente, portanto, é extremamente intolerante à variação da perda de função. Genes com altos *score* de pLI ($pLI \geq 0,9$) são extremamente intolerantes a perda de função, genes com baixos *score* de pLI ($pLI \leq 0,1$) são tolerantes a perda de função de uma das cópias cromossômicas (46).

A integridade cromossômica foi avaliada a partir da frequência alélica (AF) de cada SNP de acordo com a sua posição, identificando regiões de homoziguidade e heteroziguidade. Os polimorfismos mapeados assim como a localização em que foram identificados, foram inseridos no *software* GraphPrism

para melhor visualização dos dados. A partir de alterações de zigosidade cromossômica uma análise de *Copy Number Variations* (CNV) foi realizada afim de identificar UPD e deleções através do software Ion Reporter™. A CNV constitui-se por uma análise comparativa de um grupo referência frente ao indivíduo a ser analisado. O grupo controle compôs-se com 10 indivíduos normais para SPW e SA. Variações dos números de cópias cromossômicas foram relacionadas a ploidia (0,1 ,2 ,3, etc) e visualizadas através do software IGV. A comparação entre o grupo controle e as amostras analisadas para detecção de variações de ploidia teve como metodologia a probabilidade estatística conhecida como Modelo Oculto de Markov (HMM).

O fluxograma de preparo dos dados sequenciados até a análise de variantes está descrito na figura 6.

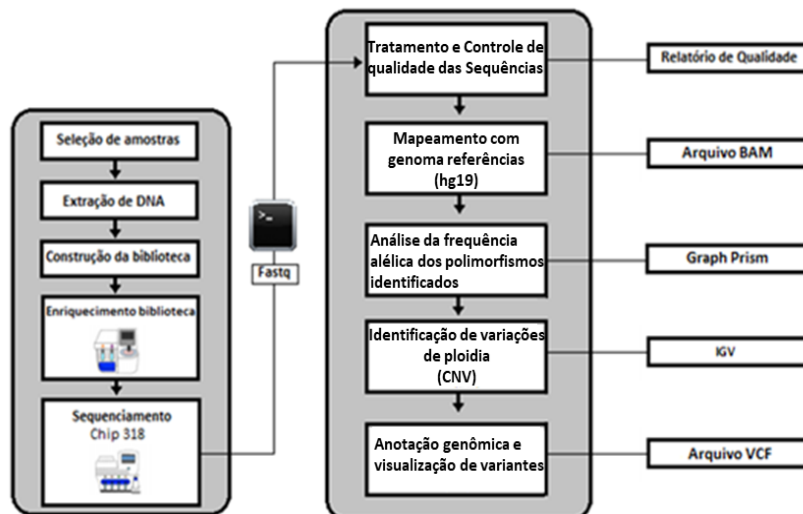


Figura 6 - Fluxograma resumido do preparo e análise das etapas relacionadas ao sequenciamento por Ion Torrent.

4.11 Análise de ganho diagnóstico

A técnica de MS-HRM foi considerada como padrão ouro para o diagnóstico da SPW e SA. Os casos identificados através da análise de metilação foram comparados aos resultados da metodologia Ion Torrent PGM visando identificar os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo (Figura 7).

SPW e SA		MS-HRM	
		Presente	Ausente
Ion	Presente	verdadeiro positivo (a)	falso positivo (b)
Torrent	Ausente	falso negativo (c)	verdadeiro negativo (d)

Sensibilidade: $a/(a+c)$ **Valor preditivo positivo: $a/(a+b)$**
Especificidade: $d/(b+d)$ **Valor preditivo negativo: $d/(c+d)$**

Figura 7 - Metodologia para cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Além disso, as metodologias de MS-HRM e NGS foram submetidas a uma análise do coeficiente de Kappa visando classificar a concordância entre ambas técnicas (Figura 8). O coeficiente de Kappa obtido foi avaliado através de um teste estatístico para estimar a significância do valor. Neste caso a hipótese testada foi que o Kappa é igual a 0; o que indicaria concordância nula; ou se ele é maior do que zero, concordância maior do que o acaso (teste monocaudal: $H_0: K = 0; H_1: K > 0$)

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Sem concordância
0-0.19	Concordância baixa
0.20-0.39	Concordância razoável
0.40-0.59	Concordância moderada
0.60-0.79	Concordância forte
0.80-1.00	Concordância quase perfeita

Figura 8 - Interpretação do coeficiente de Kappa (47).

As amostras consideradas negativas para a técnica de MS-HRM foram submetidas a uma análise de ganho diagnóstico visando identificar variações genômicas (variantes *nonsense*, *frameshift* e *missense*) que justificassem a suspeita clínica para SPW. As alterações com impacto funcional considerado deletério ou danoso (sessão 4 .10 Análise de bioinformática, Materiais & Métodos) para a proteína foram associadas a características clínicas da SPW previamente descritas na literatura. Os pacientes com padrão de metilação normal pelo MS-HRM portadores destas alterações foram realocados de negativos para inconclusivos.

5 Resultados

5.1 Análise de metilação MS-HRM

Conforme os objetivos propostos pelo estudo, a análise comparativa entre as técnicas padrão ouro para diagnóstico da síndrome de Prader-Willi e as técnicas de sequenciamento de DNA, tiveram seu início a partir da seleção amostral de pacientes com suspeita de SPW e posterior coleta de sangue, atravessando as demais etapas descritas do item 2 (Material & Métodos).

A técnica de conversão bissulfídica converteu as citosinas não metiladas presentes no alelo paterno em uracila, enquanto que as citosinas metiladas presentes no alelo materno foram protegidas contra o tratamento com bissulfito, mantendo-se como citosina. O DNA convertido foi submetido a técnica de MS-HRM para uma análise dos padrões de metilação dos alelos paterno e materno do gene *SNRPN-SNURF*. O HRM foi realizado em 17 suspeitos para as síndromes genéticas SPW e AS. Do total de 17 indivíduos suspeitos, 6 (LACIFF-3 LACIFF-4, LACIFF-5, LACIFF-15, LACIFF-16, LACIFF-17) casos foram

confirmados para síndrome de Prader-Willi devido à alteração do padrão de metilação, representado pela presença de pico único relativo à temperatura de dissociação alélica materna, e ausência do pico relacionado ao alelo paterno (Figura 9 C). Além dos 6 casos confirmados de SPW, o HRM detectou 1 (LACIFF-2) caso de SA devido a presença de pico único relativo ao alelo paterno, indicando que o alelo materno está ausente (Figura 9 B). Dos 17 indivíduos suspeitos, 10 (LACIFF-1, LACIFF-6, LACIFF-7, LACIFF-8, LACIFF-9, LACIFF-10, LACIFF-11, LACIFF-12, LACIFF-13 e LACIFF-14) foram considerados normais para a SPW e AS devido ao padrão de metilação representado pela presença de dois picos relativos à temperatura de dissociação, sendo o primeiro pico correspondente ao alelo materno (metilado) e o segundo ao alelo paterno (não metilado) (Figura 9 A).

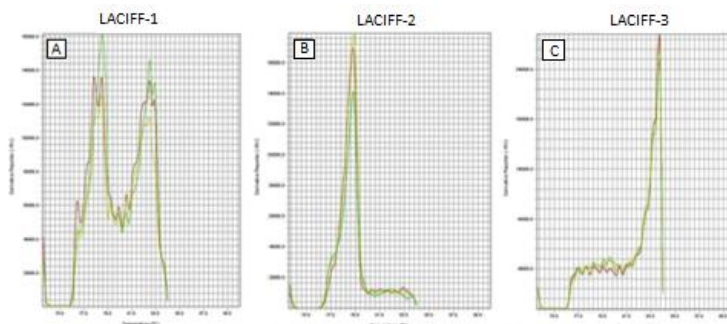


Figura 9 - Discriminação alélica a partir da curva de dissociação do DNA amplificado. A: Paciente LACIFF-1 apresenta padrão de metilação normal devido a presença dos picos referentes ao alelo paterno (78°C) e materno (83°C); B: Paciente LACIFF-2 com alteração no perfil de metilação devido à ausência do pico referente ao alelo materno e presença do alelo paterno, caracterizando-se AS; C: Paciente LACIFF-3 possui alteração no perfil de metilação, indicando ausência do alelo paterno e presença apenas do alelo materno, caracterizando-se SPW.

As reações de MS-HRM dos 17 indivíduos foram realizadas em triplicatas e demonstraram pouca variação no *ct* de amplificação, mantendo-se constante

em 32. Representativamente, a figura 12 indica pouca variação de *ct* entre 3 indivíduos (LACIFF-1, LACIFF-2 e LACIFF-3) (Figura 10).

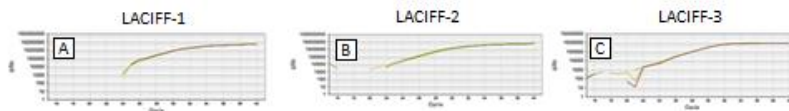


Figura 10 - *Ct* relativo à amplificação de cada triplicata. Todas triplicatas dos indivíduos LACIFF-1(A), LACIFF-2 (B), LACIFF-3 (C) apresentaram *ct* de amplificação próximo à 32.

5.2 Citogenética

O estudo das alterações cromossômicas iniciou-se a partir da análise de células em metáfase extraídas de sangue periférico. O cariótipo por bandeamento G (GTG) de alta resolução foi realizado nos 17 indivíduos suspeitos submetidos a análise por HRM. A técnica permitiu identificar uma deleção na região 15q11.2, do paciente LACIFF-17 (Figura 11), os demais pacientes confirmados com Prader-Willi (LACIFF-3, LACIFF-4, LACIFF-5, LACIFF-15 e LACIFF-16) não obtiveram alterações cromossômicas detectadas pela técnica de GTG. A figura 12 (LACIFF-1) trata-se de um resultado representativo dos pacientes considerados normais para o GTG. A citogenética através do bandeamento GTG com alta resolução somente avalia as alterações estruturais como translocações, inversões, grandes deleções, duplicações e outros rearranjos cromossômicos. Portanto, não é possível afirmar que um padrão cromossômico normal analisado através da técnica de GTG seja indicativo de que o mecanismo genético relacionado a doença foi necessariamente dissomia ou defeito no centro de *imprinting*. Esta limitação ocorre devido a técnica possuir capacidade de detecção de deleções >5 Mb (48).

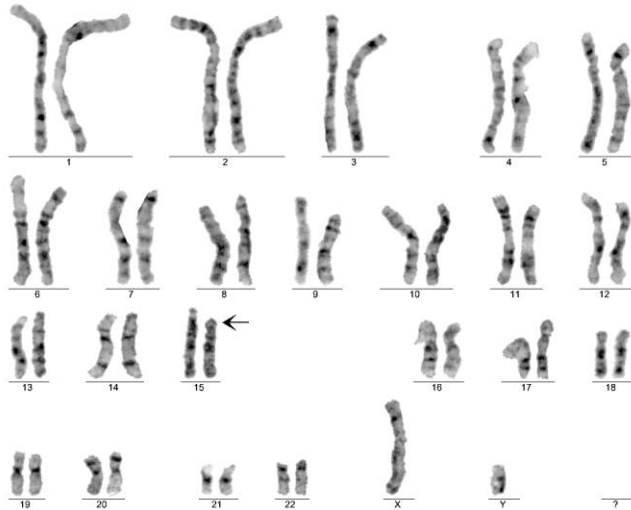


Figura 11 - Análise cromossômica através do bandamento G de alta resolução revelando ausência de parte do cromossomo 15 no paciente LACIFF-17. Imagem cedida pelo Departamento de Genética.

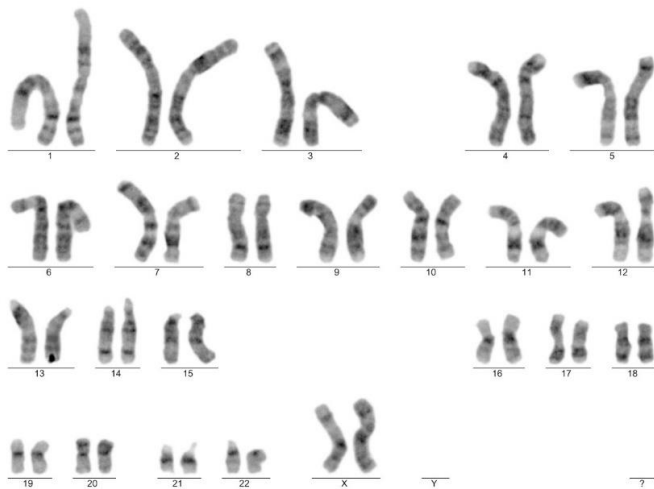


Figura 12 - Técnica de bandamento G para identificação de anormalidades cromossômicas. O paciente LACIFF-1 não apresentou qualquer alteração cromossômica estrutural através da técnica de GTG. Imagem cedida pelo Departamento de Genética.

A técnica de FISH avaliou a integridade cromossômica dos 17 pacientes suspeitos, utilizando sondas que hibridizaram-se homologamente a região específica do genoma. A sonda 15qter indica a presença dos alelos paterno e

materno na lâmina, enquanto que a sonda SNRPN é específica para a região da síndrome de Prader-Willi. Os pacientes LACIFF-1, LACIFF-2, LACIFF-4, LACIFF-5, LACIFF-6, LACIFF-7, LACIFF-8, LACIFF-9, LACIFF-10, LACIFF-11, LACIFF-12, LACIFF-13 e LACIFF-14 apresentaram hibridização de ambos pares de sonda 15qter e SNRPN nos alelos materno e paterno, indicando um padrão regular do cromossomo 15 (Figuras 13 A e B são representativos de um resultado de FISH normal para os demais pacientes sem alterações cromossômicas). Nos pacientes LACIFF-3, LACIFF-15, LACIFF-16, LACIFF-17 foi possível observar a hibridização de ambas sondas controle 15qter nos alelos paterno e materno, contudo, a sonda específica SNRPN hibridizou-se em apenas um alelo indicando ausência de um cromossomo (Figura 13 C e D, são representativos de um resultado de FISH com deleção).

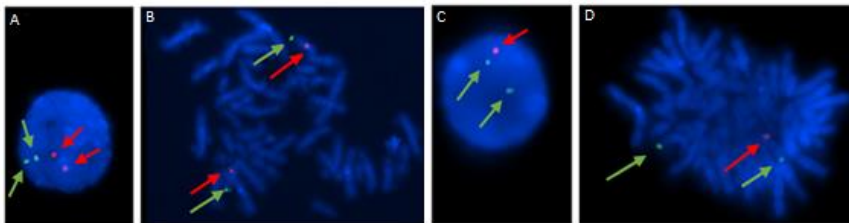


Figura 13 – Imagem da técnica de FISH realizada em células de sangue periférico e visualizada através de microscópio de fluorescência. A e B: Indivíduo LACIFF-1 com integridade cromossômica regular devido a hibridização das sondas SNRPN (vermelha) e 15qter (verde). C e D: Indivíduo LACIFF-3 com anormalidade cromossômica devido à ausência de hibridização da sonda específica SNRPN vermelha.

5.3 Ion Torrent PGM

5.3.1 Desempenho geral do sequenciamento Ion Torrent PGM

O sequenciamento através da plataforma Ion Torrent gerou arquivos <FASTQ> com sequências aproximadas de 179.000 à 727.000 *reads*, sendo cada sequência variando de 152 a 257 pares de base (pb) de comprimento. A análise básica das bibliotecas excluiu através da plataforma Ion Torrent Suit,

bases de baixa qualidade que não atenderam valor mínimo de qualidade de 20 Phred. A porcentagem de exclusão das bases sequenciadas de baixa qualidade não ultrapassou 15.1% do total sequenciado (Tabela 17).

Tabela 17 - Análise básica de sequenciamento.

Amostra	Bases totais	Bases (QPhred>=20)	Número de reads	% de exclusão de bases	Comprimento médio dos reads (bp)
LACIFF-1	85.019.615	78.278.856	334.507	7,9	256
LACIFF-2	90.938.744	83.926.768	354.013	7,7	251
LACIFF-3	64.172.675	54.983.844	328.859	14,3	257
LACIFF-4	124.714.257	106.190.761	637.745	14,9	250
LACIFF-5	114.765.885	97.387.669	577.458	15,1	259
LACIFF-6	93.445.233	79.470.732	539.193	15,0	219
LACIFF-7	139.327.819	118.430.068	621.706	15,0	262
LACIFF-8	87.002.395	77.471.075	379.873	11,0	257
LACIFF-9	90.524.073	80.210.468	605.363	11,4	251
LACIFF-10	94.172.675	86.116.618	179.546	8,6	254
LACIFF-11	99.502.086	91.360.839	395.890	8,2	254
LACIFF-12	117.954.050	108.580.396	465.137	7,9	254
LACIFF-13	134.954.990	123.691.141	537.427	8,3	171
LACIFF-14	82.452.679	76.049.281	320.353	7,8	221
LACIFF-15	66.165.971	60.281.066	298.649	8,9	160
LACIFF-16	104.027.647	95.643.684	396.377	8,1	257
LACIFF-17	106.148.966	94.951.224	726.909	10,5	152

O teste t de student foi utilizado para comparar a relação entre bases excluídas pelo valor de qualidade e a quantidade de bases iniciais. O p valor = 0,063949 (p valor>0,05) indica que a diferença entre o número inicial de bases e a quantidade final de bases após a limpeza não apresentaram significância estatística, ou seja, as análises posteriores não sofreram influência por conta da exclusão de bases com qualidade inferior a 20 Phred (Figura 14).

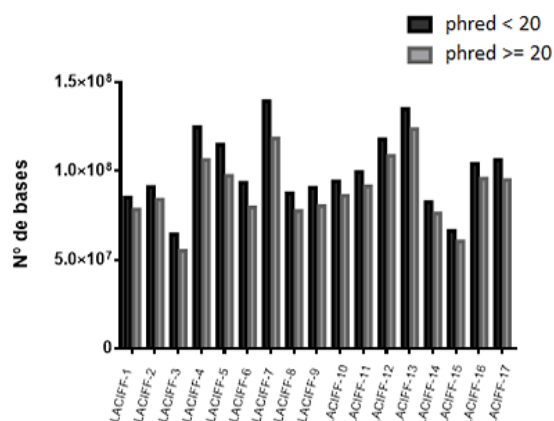


Figura 14 - Gráfico de exclusão de base por qualidade. As bases sequenciadas que não atingiram o valor mínimo de qualidade de 20 QPhred foram retiradas da análise. Não houve diferença significativa (p valor $> 0,05$) entre o número inicial de bases sequenciadas e o número de bases com valor de qualidade maior ou igual a 20.

5.3.2 Cobertura das regiões-alvo

O total de 1618 regiões foram mapeadas ao longo do cromossomo 15 em cada paciente. Uma análise da distribuição dos valores de cobertura em cada SNP mapeado foi realizada relacionando os valores de cobertura médio e o número de regiões que atingiram este valor. Apenas 42 (2.6% do total) regiões não atingiram uma cobertura mínima de 10x (Figura 15).

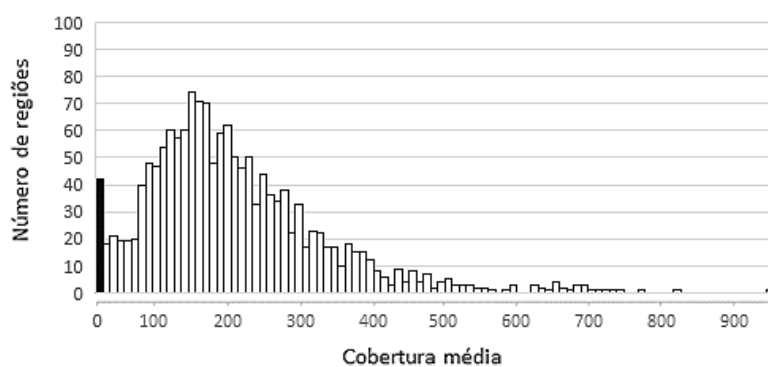


Figura 15 - Distribuição dos valores de cobertura média ao longo de 1618 regiões mapeadas ao longo do cromossomo 15. Região na cor preta representa as 42 regiões do painel que obtiveram uma cobertura igual ou inferior que 10x.

Os 17 pacientes sequenciados na plataforma Ion Torrent foram avaliados de acordo com as *reads* relativas a corrida, apresentando média de 251 bp, 287 bp de mediana e 327 bp de moda (Figura 16).

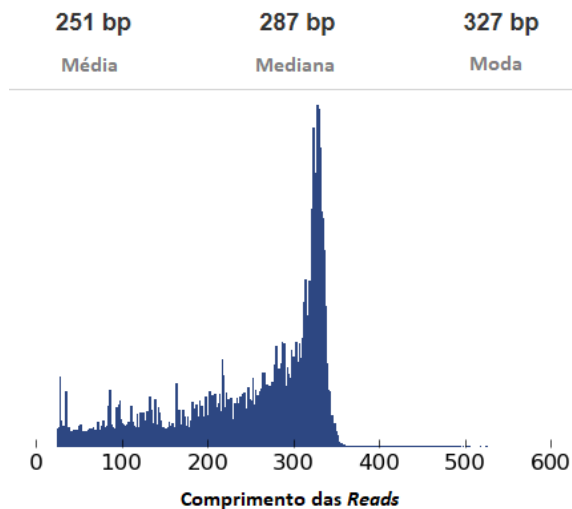


Figura 16 – Análise primária relativa ao comprimento do conjunto de *reads* da corrida sequenciada.

5.3.3 Análise de frequência alélica e *Copy Number Variations*

O *output* em formato <.FASTQ> das sequências tratadas de acordo com a qualidade, serviu como *input* dos demais processos derivados da análise dos dados NGS descritos na etapa 4.9, culminando na produção do arquivo <.VCF>.

O painel desenhado para diagnóstico de SPW permitiu realizar uma análise de estabilidade do cromossomo 15 através da frequência alélica em que os SNPs identificados se dispõem ao longo de cada posição genômica. As posições genômicas correlacionadas com os SNPs foram obtidas através do arquivo <.VCF> produzido. A análise de frequência alélica do paciente LACIFF-1 demonstrou um padrão de normalidade de acordo com a disposição dos polimorfismos mapeados, apresentando um padrão regular de heteroziguidade dos SNPs devido a maior concentração na região de 0,5. Os SNPs dispostos

nas extremidades 1.0 e 0.0 indicaram polimorfismos em estado de homozigose, havendo leitura apenas de um dos alelos (Figura 17).

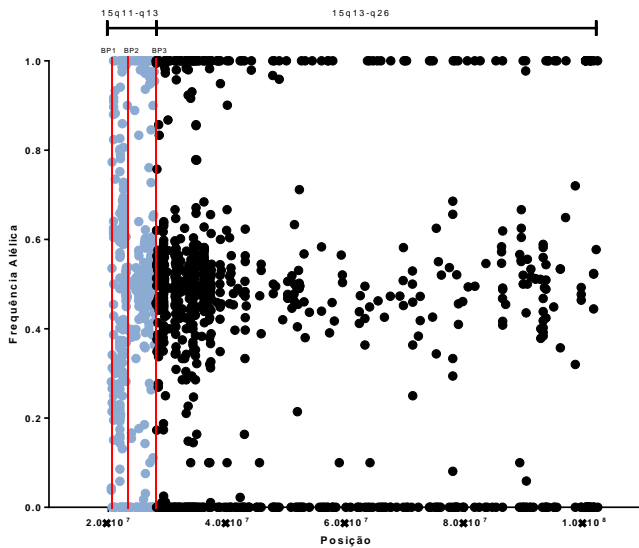


Figura 17 - Frequência alélica LACIFF-1 . A região em azul 15q11-q13 é relativa a posição genômica das síndromes de Prader-Willi e Angelman. Os SNPs localizados na região 15q13-q26 avaliaram a integridade cromossômica. BP1: Ponto de quebra 1; BP2: Ponto de quebra 2; BP3: Ponto de quebra 3.

A análise de frequência alélica foi realizada no paciente LACIFF-2 e o gráfico apresentou uma perda de heterozigosidade na região 15q11-q13 entre os pontos BP2 e BP3. Os SNPs presentes na região aproximaram-se das extremidades 1.0 e 0.0 indicando leitura dos polimorfismos em apenas um dos alelos. A região 15q13-q26 apresentou regularidade quanto a genotipagem dos SNPs (Figura 18)

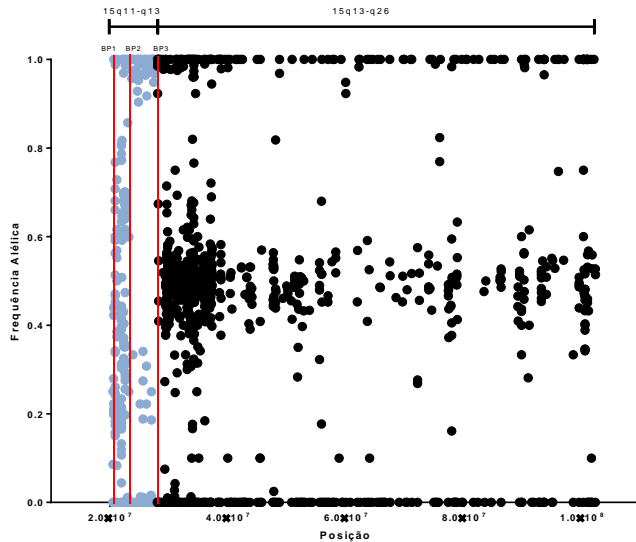


Figura 18 - Frequência alélica LACIFF-2. A região em azul 15q11-q13 é relativa a posição genômica das síndromes de Prader-Willi e Angelman. A análise de AF identificou uma perda de heteroziguidade dos polimorfismos dentro da região 15q11-q13. Os SNPs localizados na região 15q13-q26 demonstraram regularidade cromossômica. BP1: Ponto de quebra 1; BP2: Ponto de quebra 2; BP3: Ponto de quebra 3.

O gráfico de frequência alélica do paciente LACIFF-3 indica uma perda de heteroziguidade na região 15q11-q13 entre os pontos de quebra BP2 e BP3 devido a maior concentração de SNPs próximos as extremidades 1.0 e 0.0. A anormalidade cromossômica observada pode ser devido a deleções ou dissomia uniparental. A presença dos polimorfismos próximos a 0.5 na região 15q13-q26 indicam um padrão heterozigótico com leitura de ambos os alelos (Figura 19).

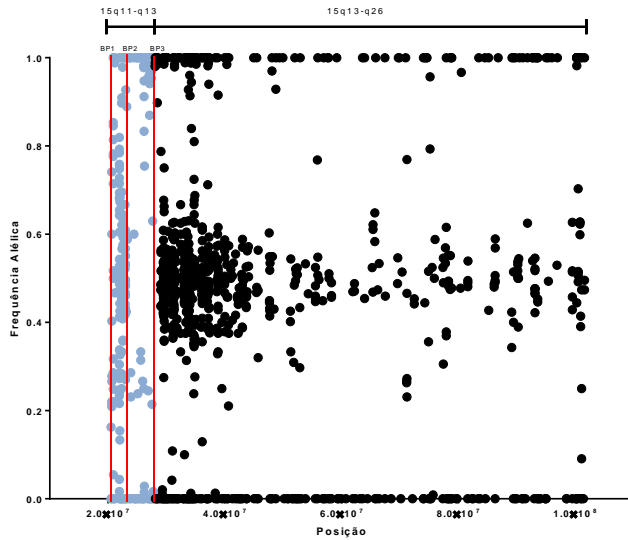


Figura 19 - Frequência alélica LACIFF-3. A região em azul 15q11-q13 é relativa a posição genômica das síndromes de Prader-Willi e Angelman. A análise de AF identificou uma perda de heteroziguidade dos polimorfismos dentro da região 15q11-q13. Os SNPs localizados na região 15q13-q26 identificaram um padrão regular de genótipo dos polimorfismos. BP1: Ponto de quebra 1; BP2: Ponto de quebra 2; BP3: Ponto de quebra 3.

A análise de AF presente na figura 20 indicam que o indivíduo LACIFF-4 apresentou heterozigose de SNPs por todo o cromossomo 15 devido à disposição dos polimorfismos estarem próximos a 0.5. O padrão regular do gráfico indica ausência de deleções ou dissomia uniparental.

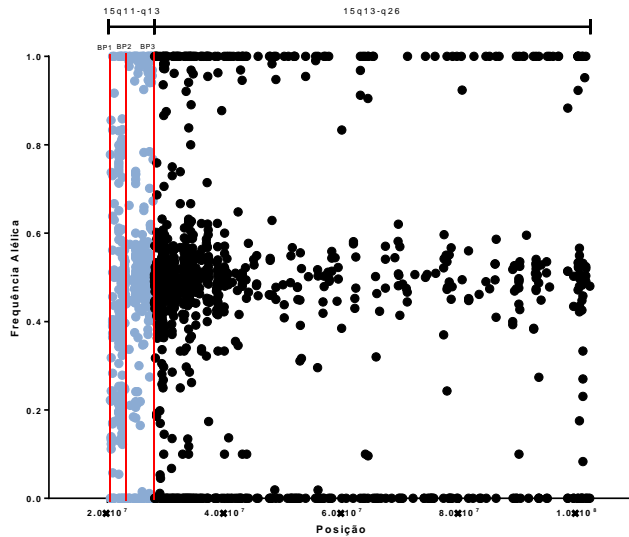


Figura 20 - Frequência alélica LACIFF-4. A região em azul 15q11-q13 demonstra a posição genômica das síndromes de Prader-Willi e Angelman. A análise de AF apresentou um padrão heterozigótico normal dos SNPs dispostos ao longo de todo o cromossomo 15. BP1: Ponto de quebra 1; BP2: Ponto de quebra 2; BP3: Ponto de quebra 3.

O gráfico de frequência alélica referente ao paciente LACIFF-5 apresentou que os polimorfismos sequenciados possuem um perfil de heterozigose dentro da região da síndrome de Prader-Willi 15q11-q13. A extensão heterozigótica é interrompida na posição genômica entre 15q21.3-q26.1 por uma região homozigótica. Este resultado é devido à proximidade dos polimorfismos as extremidades 1.0 e 0.0 do gráfico AF. A característica demonstrada indica leitura de apenas um dos alelos (materno ou paterno) atestando uma anormalidade genética ocorrida (Figura 21).

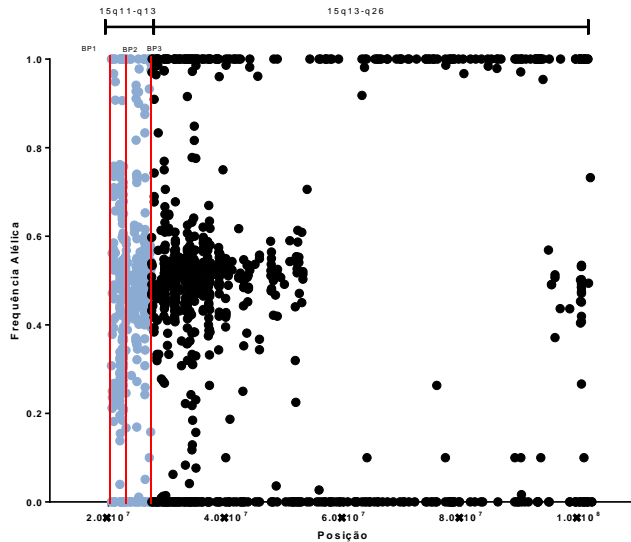


Figura 21 - Frequência alélica LACIFF-5. A região em azul 15q11-q13 relativa às síndromes de Prader-Willi e Angelman manteve-se normal com os SNPs apresentando caráter heterozigótico devido à proximidade a região 0.5. A extensão cromossômica 15q21.3-q26.1 apresentou uma perda de heterozigótica devido à disposição polimórfica próxima às extremidades 1.0 e 0.0. BP1: Ponto de quebra 1; BP2: Ponto de quebra 2; BP3: Ponto de quebra 3.

As amostras provenientes dos pacientes LACIFF-6 até o paciente LACIFF-14 não apresentaram alterações no perfil heterozigótico dos polimorfismos. Contudo a análise de frequência alélica detectou alteração no perfil de zigossidade dos polimorfismos nos pacientes LACIFF-15, LACIFF-16 e LACIFF-17. Os SNPs se depuseram nos extremos 1.0 e 0.0 na região 15q11-q13 entre os pontos de quebra BP2 e BP3.

A análise de *Copy Number Variations* avaliou a ploidia dos pacientes sequenciados de acordo com um padrão de CNV estabelecido a partir de 10 indivíduos normais utilizados como referência. Esta metodologia permitiu identificar variações estruturais como deleções e duplicações ao longo de todo cromossomo 15. O indivíduo LACIFF-1 apresentou um padrão de normalidade na análise de CNV em grande parte do cromossomo 15, contudo, na região 15q11.2 (chr15: 22.503.731- 22.562.048) a metodologia identificou a ploidia de

apenas 1 dos pares do cromossomo no núcleo celular. Além disso, foi possível avaliar o genótipo do genoma sequenciado, demonstrando ter um padrão heterozigótico contínuo (Figura 22). O resultado geral de CNV indica uma ausência de alterações cromossômicas

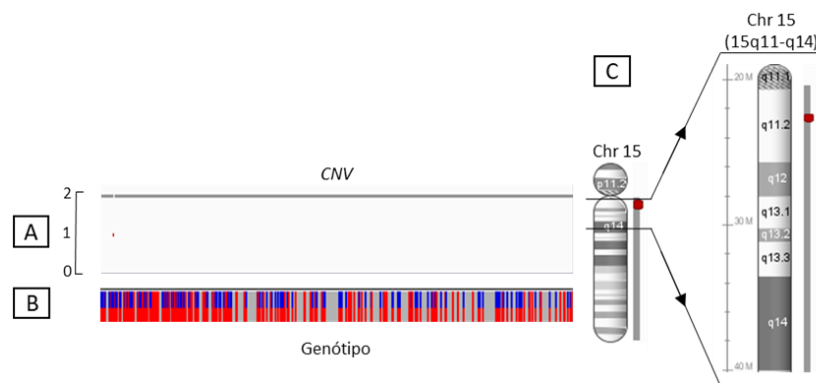


Figura 22 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-1. A: Padrão normal de CNV indica uma ploidia compatível com a referência utilizada devido a presença de 2 cromossomos; B: O genótipo do paciente indica uma estabilidade heterozigótica ao longo do cromossomo 15; C: Ampliação da região genômica relacionada ao desenvolvimento da síndrome de Prader-Willi a Angelman.

A figura 23 demonstra a análise de CNV do paciente LACIFF-2. O paciente apresentou alterações do número de cópias cromossômicas na região 15q11-q14 com ganhos e perdas genômicas. As posições 15q11.2 (chr15:20.959.431- 21.046.400; chr15:22.987.173- 23.165.687-27) e 15q14 (chr15:34.434.985- 34.480.758; chr15:39.735.492- 42.042.448) apresentaram ganhos cromossômicos. Enquanto que as regiões 15q11.1 (chr15:20.398.627- 20.435.245), 15q11.2-q13.1 (chr15:22.604.882- 22.870.365, chr15:23.373.867- 28.811.693) e 15q13.3 (chr15:31.440.813- 31.441.099) demonstraram perdas cromossômicas. A deleção de 15q11.2-q13.1 (chr15:23.373.867- 28.811.693) abrange os genes relacionados ao desenvolvimento das síndromes de Prader-Willi e Angelman. O genótipo foi alterado na região chr15:23.373.867- 28.811.693, demonstrando leitura de apenas um dos alelos (Figura 23).

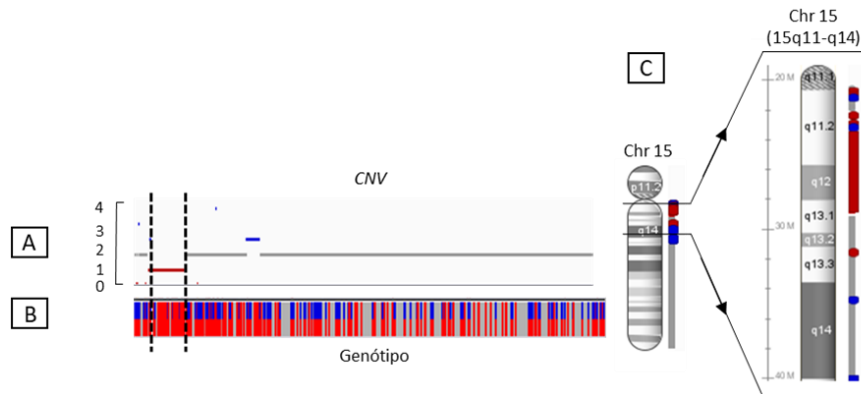


Figura 23 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-2. A: Padrão com alterações de diploidia variando de 4 a 0 com perdas e ganhos cromossômicos; B: O genótipo do paciente indica uma perda de heterozigidade na região chr15:23.373.867- 28.811.693; C: Ampliação da região genômica relacionada ao desenvolvimento da síndrome de Prader-Willi a Angelman.

A análise de CNV do paciente LACIFF-3 indicou perda de homocigosidade extensa em regiões relacionadas ao desenvolvimento da síndrome de Prader-Willi. A perda de diploidia e consequente leitura de apenas um dos alelos foi detectada nas regiões 15q11.2-q13.1 (chr15:20.876.470-20.878.759; chr15:21.908.650- 22.311.452; chr15:23.382.539- 28.298.553), 15q13.3 (chr15:31.200.558- 31.440.221) e 15q14 (chr15:33.767.104-33.767.533). Houve a detecção de polimorfismos em apenas um dos alelos na região 15q11.2 até 15q13.1 (chr15:23.382.539- 28.298.553) abrangendo genes relacionados ao desenvolvimento da SPW e AS. O genótipo do cromossomo 15 apresentou regiões homocigóticas e heterocigóticas (Figura 24).

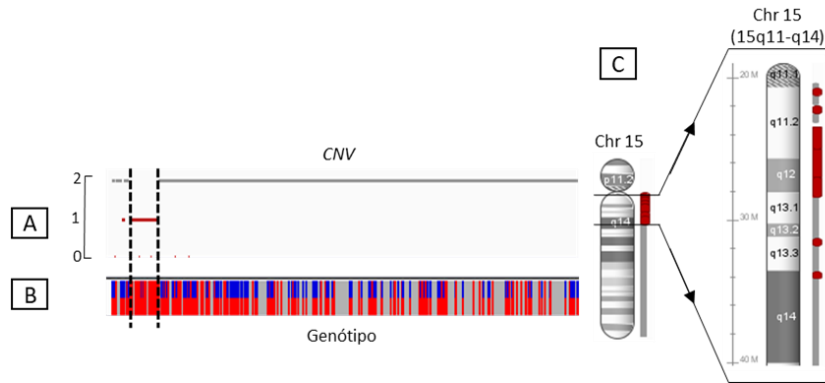


Figura 24 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-3. A: Padrão com alterações de diploidia variando de 2 a 0 com perdas cromossômicas 15q11.2-q13.1; B: O genótipo do paciente indica uma perda de heterozigosidade na região chr15:23.382.539- 28.298.553; C: Ampliação da região genômica relacionada ao desenvolvimento da síndrome de Prader-Willi a Angelman.

O paciente LACIFF-4 demonstrou através da figura 25 que a análise por CNV possui alterações de diploidia com ganhos e perdas cromossômicas. O gráfico de *copy number variations* demonstrou que a região 15q11.2 (chr15:21.040.68- 21.119.638) apresentou uma ploidia de 3. Enquanto que as regiões 15q11.2 (chr15:20.605.837- 20.862.165; chr15:25.125.486- 25.125.665), 15q13.3 (chr15:31.439.900- 31.440.186; chr15:33.770.736- 33.771.058) demonstraram o perfil de perda cromossômica. O genótipo do paciente manteve-se regular com um padrão de normalidade heterozigótico.

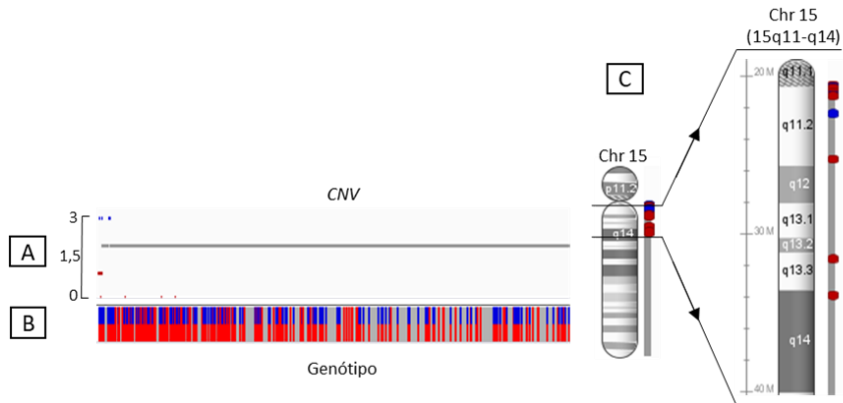


Figura 25 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-4. A: Padrão com alterações de diploidia variando de 3 a 0 com perdas e ganhos cromossômicos na extensão 15q11.1-q14; B: O genótipo do paciente demonstrou um perfil normal de heterozigidade dos polimorfismos; C: Ampliação da região genômica relacionada ao desenvolvimento da síndrome de Prader-Willi a Angelman.

A análise de CNV buscando variações de ploidia no paciente LACIFF-5 identificou alterações genômicas com perdas cromossômicas na região 15q11.2 (chr15:20.414.734- 20.652.753; chr15:22.297.878- 22.299.487). A análise de genótipo detectou uma região em homozigose 15q21.3-q26.1 (chr15:54.154.648- 93.839.110) que interrompe o padrão de normalidade heterozigótico relacionado aos polimorfismos sequenciados no cromossomo 15 (Figura 26).

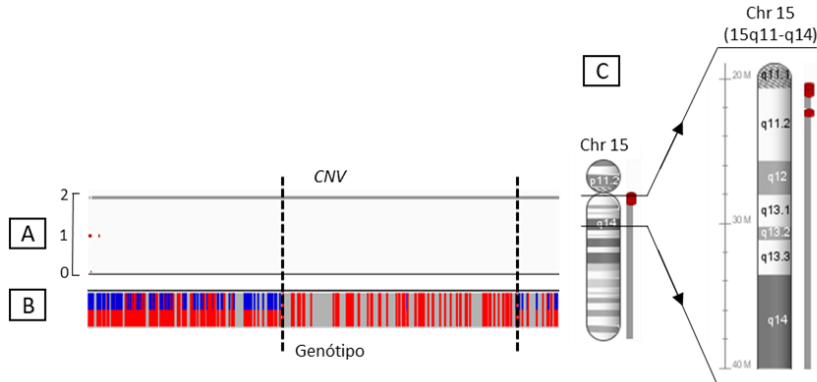


Figura 26 - Análise de CNV e Genótipo LACIFF-5. A: Padrão com alterações de diploidia variando de 2 a 0 com perdas cromossômicas nas regiões 15q11.1-q11.2; B: O genótipo do paciente demonstrou uma grande extensão em homocigose da região 15q21.3 até 15q26.1; C: Ampliação da região genômica relacionada ao desenvolvimento da síndrome de Prader-Willi a Angelman.

A análise de *copy number variations* realizada nos pacientes LACIFF-6 até o paciente LACIFF-14 não apresentou alterações de ploidia, permanecendo $2n$. Além disso, o genótipo apresentou padrão heterocigótico para toda extensão do cromossomo 15. A amostra proveniente do paciente LACIFF-15 apresentou ploidia = n na extensão chr15:24.570.916-28.333.452, assim como genótipo homocigótico na mesma localização cromossômica. O paciente LACIFF-16 apresentou perda de diploidia na região chr15:23.191.533-27.940.689 assim como perda de heterocigosidade. A análise de CNV no paciente LACIFF-17 identificou ploidia = n na região chr15:22.088.212-28.855.977, a análise de genótipo identificou que a região apresenta homocigosidade. A relação entre as análises de MS-HRM, GTG, FISH, AF e CNV estão demonstradas na tabela 18.

Tabela 18 - Resultados das técnicas MS-HRM, GTG, FISH, AF e CNV dos pacientes LACIFF-1 ao LACIFF-17.

Amostra	MS-HRM	GTG	FISH	NGS	
				AF	CNV
LACIFF-1	Normal	46, XX	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-2	AS	46, XY	Sem deleção	Perda de heterozigosidade (15q11-q13)	n (chr15:23.373.867-28.811.693)
LACIFF-3	SPW	46, XX	Deleção	Perda de heterozigosidade (15q11-q13)	n (chr15:23.382.539-28.298.553)
LACIFF-4	SPW	46, XX	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-5	SPW	46, XY	Sem deleção	Perda de heterozigosidade (15q13-q26)	2n
LACIFF-6	Normal	46, XX	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-7	Normal	46, XX	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-8	Normal	46, XY	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-9	Normal	46, XX	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-10	Normal	46, XX	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-11	Normal	46, XY	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-12	Normal	46, XY	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-13	Normal	46, XX	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-14	Normal	46, XY	Sem deleção	Heterozigótico	2n
LACIFF-15	SPW	46, XX	Deleção	Perda de heterozigosidade (15q11-q13)	n (chr15:24.570.916-28.333.452)
LACIFF-16	SPW	46, XX	Deleção (Tipo I)	Perda de heterozigosidade (15q11-q13)	n (chr15:23.191.533-27.940.689)
LACIFF-17	SPW	del 15q11.2	Deleção (Tipo II)	Perda de heterozigosidade (15q11-q13)	n (chr15:22.088.212-28.855.977)

5.3.4 Detecção de variantes

As variantes pontuais identificadas através do sequenciamento de Nova Geração foram analisadas e classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas de acordo com os critérios estabelecidos na etapa 4.10 da sessão Materiais & Métodos. Os pacientes LACIFF-2, LACIFF-3, LACIFF-6, LACIFF-7, LACIFF-8, LACIFF-9, LACIFF-10, LACIFF-11, LACIFF-12, LACIFF-13, LACIFF-14, LACIFF-15, LACIFF-16 e LACIFF-17 não apresentaram qualquer alteração do tipo SNV, INDEL ou MNV que fossem consideradas patogênicas. O indivíduo LACIFF-1 apresentou uma mutação do tipo INDEL no exon 1 do gene *MAGEL2* (chr15:23.891.909) com valor qphred de qualidade de 681 e com profundidade de sequenciamento de 145x, além disso sua frequência na população (MAF) é de 0.001. A alteração engloba 21 bases “AGCCATCGGCTGTGCAGGTGG” que tem como consequência a interrupção na produção de aminoácidos, sendo classificada como provavelmente patogênica pelos preditores SIFT (0.02) e

PolyPhen (0.79) O indivíduo LACIFF-4 apresentou uma INDEL no exon 3 do gene *PWRN1* (chr15:24.813.231) em 3 bases (AGA), o valor de qualidade phred atingiu 355 com profundidade de sequenciamento de 161x. O paciente LACIFF-5 apresentou uma INDEL no exon 3 do gene *PWRN1* (chr15:24.813.231) em 3 bases (AGA), o valor de qualidade phred relacionado a esta alteração no paciente foi de 358, apresentando uma profundidade de sequenciamento de 176x. A consequência das alterações INDEL no gene *PWRN1* nos pacientes LACIFF-4 e LACIFF-5 são variantes de significado incerto (VUS). A tabela 19 exhibe as variantes com significado incerto/provavelmente patogênicas SNV, INDEL e MNV identificadas de acordo com os padrões estabelecidos.

Tabela 19 - Tabela de variantes encontradas nos pacientes LACIFF-1, LACIFF-2 e LACIFF-3.

Amostra	Posição	Gene	Variante	Consequência	Alteração	Predição	MAF	Profundidade	Phred
LACIFF-1	23.891.931	MAGEL2	INDEL	Frameshift Indels	c.962delC	Prov. Patogênica	0.001	145x	681
LACIFF-4	24.813.231	PWRN1	INDEL	-	n.499_500delGA	VUS	-	161x	355
LACIFF-5	24.813.231	PWRN1	INDEL	-	n.499_500delGA	VUS	-	176x	358

As variantes identificadas através do workflow gerado para as análises dos dados NGS foram submetidas ao sequenciamento de Sanger para a validação das mesmas. A metodologia de Sanger confirmou a variante INDEL no gene *MAGEL2* no paciente LACIFF-1, assim como detectou a mutação INDEL no gene *PWRN1* nos indivíduos LACIFF-4 e LACIFF-5.

5.4 Análise haploinsuficiência e intolerância gênica a perda de função (pLI)

O software Phenolyzer foi utilizado para identificar a árvore de interações gênicas dos genes que possuem relação direta ou indireta ao desenvolvimento da SPW. O algoritmo do Phenolyzer utiliza-se de dados já descritos em bancos de dados do OMIM, CLINVAR, GENECARDS e DISGENET. Além disso, leva em consideração a posição no genoma que se encontra o gene identificado. As

interações consideradas para cálculo de *score* incluem: interação proteica; mesmo biosistema de interação e interação de transcritos, além da correlação com os bancos de dados mencionados. A análise identificou 50 genes que interagem entre si e tem relação direta ou indireta com o desenvolvimento da SPW. Este fato demonstra a complexidade na descrição da doença, assim como estabelecer uma casuística entre genótipo-fenótipo (Figura 27).

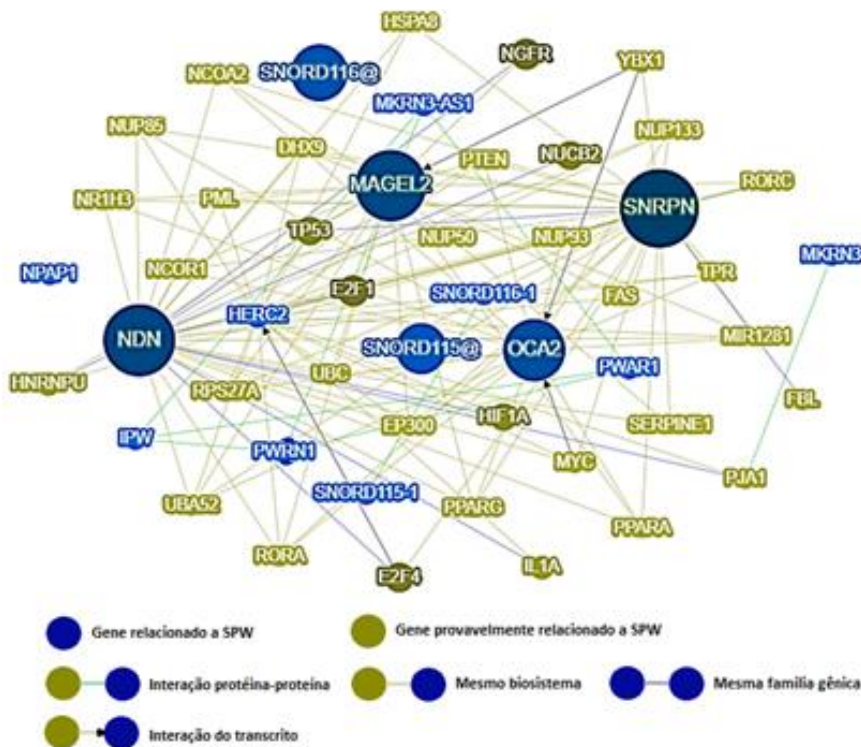


Figura 27 - Árvore de interações gênicas no desenvolvimento da SPW.

O programa *Phenolyzer* ordenou os 10 genes candidatos com a maior probabilidade de estarem relacionados ao desenvolvimento da SPW (*score*). De acordo com os parâmetros estabelecidos pelo software, também foi possível atribuir os valores de pLI a cada um dos 10 genes identificados. Os genes

SNORD116-1, *SNORD115-1*, *PWRN1* e *PWAR1* não dispõe de dados suficientes na literatura, para uma predição de pLI (Tabela 20).

Tabela 20 - Resultados obtidos através do software Phenolyzer e ordenados baseados no *score* apresentado. Valores ExAC pLI próximos a 1 indicam alta intolerância a perda de função.

Rank	Gene	Score (Phenolyzer)	ExAC pLI
1	SNRPN	1	0.967185657
2	MAGEL2	0.8839	0.922
3	NDN	0.8108	0.3187072423
4	OCA2	0.5633	0.3724935126
5	SNORD116-1	0.4506	-
6	SNORD115-1	0.338	-
7	MKRN3	0.03286	0.33518518519
8	PWRN1	0.03286	-
9	HERC2	0.03286	0.29952819061
10	PWAR1	0.03286	-

5.6 Análise de ganho diagnóstico

As técnicas de NGS e MS-HRM + FISH identificaram 6 pacientes (LACIFF-3, LACIFF-4, LACIFF-5, LACIFF-15, LACIFF-16, LACIFF-17) portadores da SPW e 1 paciente (LACIFF-2) portador da SA. O cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo obedeceu a metodologia descrita na etapa 4.11. Devido a concordância de 100% entre as técnicas os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram iguais a 1, demonstrando ser uma metodologia eficiente para a identificação das alterações genômicas relacionadas ao desenvolvimento da SPW.

Além disso, a técnica de NGS identificou uma mutação provavelmente patogênica do tipo INDEL no paciente LACIFF-1, do qual foi considerado posteriormente pelas técnicas MS-HRM + FISH como normal. Devido à alta correlação entre as características clínicas da SPW e mutações no gene

MAGEL2 relatadas na literatura, o paciente LACIFF-1 foi realocado como inconclusivo (Figura 28).

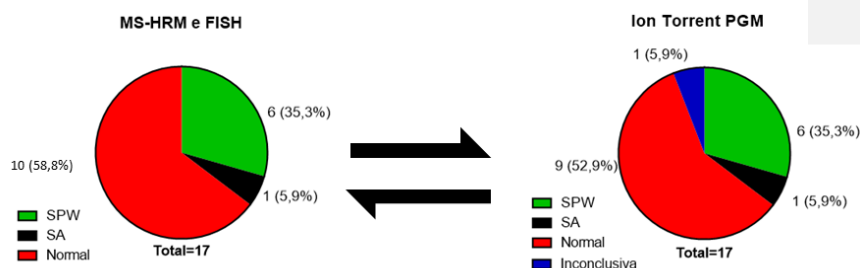


Figura 28 - Ganho diagnóstico através da plataforma Ion Torrent para reclassificação de amostras previamente negativas.

O coeficiente de concordância de Kappa avaliou a concordância entre as técnicas de MS-HRM e Ion Torrent PGM na identificação e confirmação dos casos Normais, SPW e SA. Ambas metodologias possuíram resultados congruentes, detectando 10 pacientes Normais, 6 pacientes SPW e 1 paciente SA. Portanto, o coeficiente Kappa calculado atingiu o valor de 1, atingindo uma concordância perfeita (Figura 29).

	Normal	SPW	SA
Kappa da categoria	1.0	1.0	1.0
P-valor do Kappa da categoria	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Intervalo de 95% de confiança do Kappa da categoria	sup: 1.0 inf: 0.525	sup: 1.0 inf: 0.525	sup: 1.0 inf: 0.525

Figura 29 - Tabela com valor Kappa por categoria (Normal, SPW e SA); P-valor do coeficiente Kappa; Intervalo de 95% de confiança do coeficiente Kappa calculado para cada categoria (Normal, SPW e SA).

6 Discussão

A síndrome de Prader-Willi é uma doença genética complexa desenvolvida a partir de anormalidades na região 15q11-q13 do alelo paterno do cromossomo 15. O diagnóstico da SPW apenas através das características clínicas é de difícil identificação devido a sobreposição de fenótipos com outras doenças genéticas, como a Síndrome de Schaaf-Yang (SYS). Algumas sobreposições fenotípicas entre SYS e SPW incluem hipotonia neonatal, dificuldades na alimentação, ganho de peso, atraso no desenvolvimento intelectual e obesidade (49). Alterações genéticas fora do cromossomo 15 também podem resultar em características clínicas semelhantes a SPW como: dissomia uniparental materna na região 14q32.2 (50); deleções no cromossomo 1 (1p36) (51); 6 (6q16.2) (52) e 10 (10q26) (53) além de outras anormalidades cromossômicas impossibilitarem um diagnóstico clínico preciso e exigem estudo molecular (54–57). A caracterização laboratorial da SPW através de técnicas moleculares (MS-HRM, *Multiplex Ligation Probe dependent Amplification* e Análise de microssatélite) e de citogenética molecular (FISH) a distingue das demais síndromes genéticas além de elucidar o mecanismo genético causador da síndrome (5). Apesar das análises moleculares comumente utilizadas oferecerem um diagnóstico preciso, a necessidade de realização de diversas técnicas torna todo o processo diagnóstico demasiadamente laborioso, demorado e caro.

A análise do padrão de metilação do éxon 1 do gene *SNURF-SNRPN* confirma a suspeita clínica para SPW. No nosso estudo, a técnica de MS-HRM identificou 6 (35,3%) indivíduos portadores da SPW, 1 (5,8%) indivíduos portadores de SA e 10 (58,8%) indivíduos normais. Apesar da confirmação diagnóstica através do MS-HRM, a principal desvantagem da metodologia é a falta de informação a respeito do mecanismo genético causador da síndrome, impactando negativamente na eficiência do aconselhamento genético (7). A técnica de MS-HRM demanda a realização de outras técnicas moleculares e de citogenética para um diagnóstico completo.

A citogenética é realizada com finalidade de um aconselhamento genético eficaz devido a capacidade de detecção de translocações, duplicações,

inversões e outros rearranjos cromossômicos que poderiam alterar o fenótipo clínico da doença. Esta abordagem foi realizada nos 17 pacientes submetidos ao estudo afim de detectar rearranjos cromossômicos. Apenas 1 amostra (5,8% de 17 pacientes) proveniente do paciente LACIFF-17 constatou-se anormalidade genômica no cromossomo 15. A integridade cromossômica com objetivo diagnóstico foi investigada através da hibridização em situ por fluorescência (FISH), identificando deleções no cromossomo 15 de 4 pacientes (LACIFF-3, LACIFF-15 e LACIFF-16 e LACIFF-17). As sondas SNRPN e 15qter utilizadas na técnica de FISH identificaram a presença/ausência de ambos alelos do cromossomo 15 sem discriminação alélica, a identificação de qual alelo está deletado só é possível a partir de uma análise conjunta com os dados obtidos através da técnica de MS-HRM. A partir da combinação de dados de ambas as técnicas foi possível definir que a ausência cromossômica detectada nos pacientes LACIFF-3, LACIFF-15, LACIFF-16 e LACIFF-17 é relativa ao alelo paterno, caracterizando SPW. Os pacientes LACIFF-2, LACIFF-4 e LACIFF-5 obtiveram resultados normais de citogenética, porém, os resultados de MS-HRM indicam alteração no perfil de metilação. Portanto, o provável mecanismo genético responsável pelo desenvolvimento de SPW foi UPD ou microdeleções no centro de *imprinting*.

No nosso estudo, o poder de detecção de deleções utilizando as técnicas de GTG de alta resolução e FISH foram distintas. De acordo com a literatura, a técnica de bandeamento G só possui capacidade de detecção de deleções maiores que 5 Mb, já a técnica de FISH é capaz de detectar deleções a partir de 80 Kb(58). Ambas as técnicas comparadas a metodologia NGS possuem menor resolução. O sequenciamento Ion Torrent PGM identifica microdeleções de até

uma base oligonucleotídica, além disso, a técnica de FISH não identifica deleções fora da região da sonda utilizada para hibridização (58).

Um diagnóstico rápido e preciso está diretamente relacionado com um aconselhamento genético eficaz e uma intervenção medicamentosa eficiente. Ângulo MA et al., 2007, Takeda A et al., 2010 e Wolfgram et al., 2013 (59–61) demonstraram que administração de Hormônio de Crescimento (GH) em pacientes com SPW oferece diversos benefícios. O tratamento com GH está relacionado a composição corpórea devido a regulação de massa gorda e massa magra, normalização de tônus muscular, correção das disfunções metabólicas e correção do desenvolvimento irregular cognitivo relacionado à SPW. Contudo, efeitos preeminentes do tratamento com GH são comumente observados com uma intervenção medicamentosa nos primeiros anos de vida (idade recomendada para iniciar a administração de GH: 4-6 meses de idade). O processo de análise laboratorial utilizado atualmente demanda maior tempo para um diagnóstico completo e acurado, além de uma equipe técnica especializada para elaboração e interpretação dos resultados, podendo comprometer os benefícios com o tratamento com GH (62).

Desde o desenvolvimento da metodologia de sequenciamento de Sanger diversos avanços nos processos de análise genéticas ocorreram, sendo por exemplo, a principal ferramenta utilizada no sequenciamento completo do genoma humano através do Projeto Genoma Humano em 2001. Apesar de ser considerado o método padrão ouro para sequenciamento, algumas limitações inviabilizaram sua introdução como ferramenta no diagnóstico genético laboratorial. O alto custo dos reagentes para sequenciamento (~\$500/Mb,) (63), uma baixa capacidade de sequenciamento e uma metodologia demasiadamente

demorada impossibilitaram sua introdução na rotina diagnóstica (64). Os aperfeiçoamentos dos dispositivos de sequenciamento através do surgimento das plataformas de Sequenciamento de Nova Geração, propiciaram um avanço exponencial na compreensão das doenças genéticas e a sua relação com os fenótipos de cada doença. Como por exemplo, as tecnologias NGS permitiram identificar padrões de herança, ofertaram um aconselhamento genético eficaz além de possibilitar a melhor correlação genótipo-fenótipo (65,66).

As plataformas NGS oferecem um bom custo benefício com uma redução de gasto em reagentes de até x1000 (~\$0,5/Mb) comparado ao sequenciamento de Sanger (63). Além disso, os novos sequenciadores possuem uma capacidade de sequenciamento com maior robustez, permitindo o sequenciamento de diversas amostras em paralelo e em menor tempo (67). Dentre as plataformas de sequenciamento, o sequenciador Ion Torrent PGM possui um custo médio de \$0.63/Mb, enquanto que, a plataforma Illumina MiSeq oferece um gasto de \$0.5/Mb. Apesar do aparente custo mais acessível da plataforma Illumina MiSeq por base sequenciada, a necessidade de um sequenciamento com maior profundidade/cobertura encarece a metodologia. Além disso, o tempo necessário para o sequenciamento Illumina é cerca de 27 horas, já a plataforma Ion Torrent PGM oferece um sequenciamento 9x mais rápido (3h), tornando-o ideal para a rotina de diagnóstico laboratorial (68).

As técnicas atualmente utilizadas para identificação de deleções, dissomia uniparental e defeitos no centro de *imprinting* na SPW interferem não só no tempo necessário para uma investigação etiológica, como também aumentam o gasto para um diagnóstico preciso. A metodologia de análise de metilação (MS-HRM), citogenética (FISH) e STR representam um gasto somado de U\$ 640 por

paciente para a identificação dos mecanismos genéticos associados ao desenvolvimento da SPW (7,69). O sequenciamento através da plataforma Ion Torrent apresenta um custo de U\$ 625 (68) para investigação de todas as anormalidades associadas a SPW, resultando em uma economia de até U\$ 15. A segunda triagem diagnóstica inicia-se a partir da análise de metilação e deleção através do MLPA e uma análise das regiões microssatélite com a técnica de STR (69,70). O segundo grupo metodológico utilizado para o diagnóstico da SPW detém um gasto médio de U\$ 600 dólares por paciente, U\$ 25 mais barato que o sequenciamento utilizando a plataforma Ion Torrent.

O custo relativo a realização das técnicas MS-HRM, FISH, MLPA e Ion Torrent foram estimadas. A discrepância dos valores cobrados para cada exame em diferentes laboratórios dificulta uma análise comparativa precisa entre as diversas metodologias utilizadas para o diagnóstico da SPW (7,68–71).

A aparente economia proveniente da utilização do MLPA e STR são recompensados pelo ganho diagnóstico oferecidos pelo sequenciamento NGS. A técnica de MLPA oferece um poder de resolução de 50 sequências de ácidos nucleicos (72) já a tecnologia NGS sequencia massivamente milhões de segmentos de DNA analisando polimorfismos base a base (73). Além disso, o MLPA só é possível ser realizado em mutações previamente descritas, não detectando alterações em regiões não cobertas pelas sondas. A técnica de MLPA também é extremamente sensível a contaminantes e a qualidade do DNA extraído (74,75). O sequenciamento de Nova Geração permite identificar novas mutações SNPs, INDELS, MNV e correlaciona-las com patologias, possibilitando um paralelismo genótipo-fenótipo oferecendo não só um diagnóstico acurado, como também um aprofundamento científico sobre síndromes genéticas. A

tarefa analítica utilizada para análise de dados do NGS possui ferramentas de exclusão de qualquer organismo contaminante, demonstrando ser uma metodologia com baixa sensibilidade a moléculas contaminadoras (76). O tempo necessário para realização da técnica de MLPA é aproximadamente 72 horas (3 dias), e devido à necessidade de uma metodologia adicional por STR acrescenta-se 24 horas (1 dia) para um diagnóstico preciso, totalizando 96 horas (4 dias) (72,77). A metodologia Ion Torrent demanda de apenas 48 horas (2 dias) para a construção da biblioteca e sequenciamento, diminuindo as etapas do fluxo diagnóstico, resultando em um menor tempo para identificação de deleções, UPD e defeitos no IC. Além do diagnóstico rápido, o Ion Torrent diminui as chances de contaminações provenientes da manipulação de amostras devido à sua metodologia discernir todas as alterações genéticas relacionadas a SPW em plataforma única.

Devido ao amplo espectro de potenciais benefícios econômicos e diagnósticos ofertados pelas plataformas NGS, as novas tecnologias de sequenciamento vêm sendo utilizadas como método preferido para identificação de diversas síndromes genéticas como Alström, Waardenburg, Silver-Russell, Kleefstra, Cardio-Facio-Cutaneous e Alagille (78–84). Os sequenciadores de Nova Geração atuam como metodologia de rastreio e diagnóstico de recém-nascidos com doenças raras em unidades de tratamento intensivo, exercendo um grande impacto na identificação precoce de síndromes genéticas devido à rapidez do exame (85–87). O diagnóstico precoce de distúrbios genéticos em recém-nascidos permite a administração de medicamentos que evitem o desenvolvimento de adversidades relacionadas a doenças, propiciando uma melhor qualidade de vida (88–91). Além dos benefícios mencionados, o

diagnóstico preciso de síndromes genéticas também altera a rotina de Serviços de Saúde públicos e privados. Diversas síndromes necessitam de uma vigilância clínica periódica, e a distinção das mais graves para as mais brandas minimizam os gastos públicos com desordens genéticas raras. Essa diferenciação entre síndromes também permite a inclusão de indivíduos em programas governamentais específicos para cada doença.

Além da função diagnóstica, o NGS enriquece a literatura científica estabelecendo novas relações casuísticas entre desordens genéticas e novas alterações gênicas. Mingjia MA et al., 2016 utilizou a tecnologia Ion Torrent para identificar uma nova mutação no gene *FBN1* relacionada ao desenvolvimento da síndrome de Marfan. Contribuindo para uma maior compreensão dos mecanismos de mutação genética da síndrome, além de facilitar o diagnóstico molecular (92). A plataforma Ion Torrent também foi inserida em diversas áreas na oncologia, atuando como método de identificação de mutações de câncer de cólon de reto por exemplo (93).

Neste estudo, foram explorados quatro principais aspectos da aplicabilidade da tecnologia NGS associada a painéis gênicos no diagnóstico molecular da SPW: a performance de enriquecimento e análises de regiões-alvo, análise de integridade cromossômica; avaliação de desempenho analítico na detecção de variantes, e por fim, o ganho diagnóstico obtido através da utilização de um painel para a plataforma Ion Torrent. A análise básica do sequenciamento através da plataforma Ion Reporter™ iniciou-se a partir da limpeza dos dados brutos obtidos pelo sequenciador. O valor de qualidade Phred é um valor arbitrário de qualidade de leitura de bases sequenciadas onde excluem-se as seqüências que não atingirem este valor limítrofe. Este processo de eliminação

de bases com baixo valor de Phred é essencialmente importante pois aumenta o grau de confiabilidade do sequenciamento, eliminando bases de má qualidade que levariam a erros críticos de análise (94). O valor de qualidade escolhido foi de Phred = 20, indicando 99% de acurácia das bases sequenciadas. A razão de exclusão das bases com Phred = 20 não ultrapassou 15% do total sequenciado. Um valor excessivamente alto de Phred implicaria em um maior percentual eliminatório das bases, gerando um viés que impossibilitaria análises do genoma devido a exclusão excessiva de dados (95–97).

Através da distribuição dos valores médios de cobertura por região sequenciada foi possível identificar regiões de baixa cobertura dentro do painel desenhado. Apenas 42 (2,6% do total) de 1618 regiões mapeadas apresentaram uma cobertura menor que 10x (Figura 15). Sequências com cobertura abaixo de 10x aumentam a porcentagem de falsos positivos e falsos negativos, portando, essas regiões não foram submetidas a análises de variantes (98). Possivelmente, estas regiões com cobertura menor que 10x podem ser difíceis de amplificar e consequentemente de sequenciar. A representatividade da extensão com baixa cobertura não interfere de forma significativa na análise dos resultados, contudo, o desenho de novos *primers* para esta região poderia solucionar a questão.

Os *reads* obtidos através da plataforma Ion Torrent PGM apresentaram uma extensão média adequada para um alinhamento eficaz (cerca de 251 bp) (Figura 16). Fragmentos longos possibilitam uma montagem fidedigna a sequência genômica original utilizada como referência. Contraditoriamente, fragmentos menores podem gerar erros de alinhamento frente a sequência

referência devido a ambiguidade apresentada por regiões repetitivas do DNA, por exemplo (99–101).

O bom desempenho inicial do painel de SPW na plataforma Ion Torrent permitiu avaliar a disposição heterozigótica ou homozigótica dos SNPs em um determinado locus genômico, este processo é fundamental para o mapeamento e associações a síndromes genéticas. Alterações de grande extensão do genótipo dos polimorfismos informam através da perda de heterozigosidade, que a região sofreu alterações cromossômicas que levaram a detecção de apenas um alelo (102).

A análise de frequência alélica de 10 pacientes (LACIFF-1, LACIFF-6, LACIFF-7, LACIFF-8, LACIFF-9, LACIFF-10, LACIFF-11, LACIFF-12, LACIFF-13 e LACIFF-14) demonstraram a disposição predominante dos SNPs na faixa heterozigótica, indicando uma integridade cromossômica (Figura 17 representativa de um resultado de AF normal). Paradoxalmente, as amostras provenientes dos pacientes LACIFF-2, LACIFF-3, LACIFF-15, LACIFF-16 e LACIFF-17 demonstraram uma perda de heterozigosidade dos polimorfismos na região 15q11-q13, sabidamente relacionada ao desenvolvimento da SPW (1) (Figura 18 e 19). Os resultados alcançados através da análise de AF vão de encontro aos resultados prévios obtidos através das técnicas de MS-HRM e FISH. O paciente LACIFF-5, confirmado com SPW através da metodologia de MS-HRM, possui uma extensa região em homozigose 15q21.3-q26.1 (chr15:54.154.648- 93.839.110) detectada através da análise de AF dos polimorfismos. Devido à grande extensão (~40 Mb) homozigótica a hipótese de deleção da região foi descartada visto que a técnica de GTG teria identificado anormalidades cromossômicas desta proporção (Figura 21). A metodologia de

FISH por sua vez, também não seria capaz de detectar alterações fora da região de hibridização da sonda. De acordo com esses resultados, o provável pressuposto para região homocigótica é a identificação de SNPs de apenas um dos alelos proveniente de uma possível UPD.

A genotipagem dos polimorfismos mapeados possibilitou através da perda de heterocigosidade, a classificação dos subtipos (Tipo 1: BP1-BP3; Tipo 2: BP2-BP3) de deleção descritos para SPW. Os pacientes LACIFF-2, LACIFF-3, LACIFF-15 e LACIFF-16 (Figura 18 e 19) apresentaram perda de heterocigosidade entre os BP2-BP3 dentro da região 15q11-13, sendo classificada como Tipo 2 (~5.3 Mb). A análise de frequência alélica do paciente LACIFF-17 demonstrou a perda de heterocigosidade em toda extensão dos pontos BP1 até BP3, caracterizando-se como Tipo 1 (~6 Mb). A caracterização dos subtipos de deleção na síndrome através da plataforma Ion Torrent PGM, permite estudos futuros de correlação desses achados com o seguimento clínico desses pacientes. Indivíduos portadores da SPW com deleção Tipo 1 (BP1-BP3) possuem um comportamento altamente compulsivo e mal adaptativo, elevada dificuldade de aprendizado e menor percepção visual quando comparados aos pacientes portadores de deleção Tipo 2 (BP2-BP3) (103,104).

As detecções de deleções e alterações de genótipo também foram analisadas mediante a metodologia de *copy number variations*. A detecção de variações de CNV é realizada através do modelo probabilístico conhecido como Modelo Oculto de Markov (HMM) no *software* Ion Reporter. Este algoritmo estabiliza as variações de cobertura ao longo dos fragmentos para prever o estado de ploidia (0, 1, 2, 3, etc.) de determinada região cromossômica (105,106). A partir da criação de um grupo controle com ploidia igual a $2n$

(LACIFF-1, LACIFF-4, LACIFF-5, LACIFF-6, LACIFF-7, LACIFF-8, LACIFF-9, LACIFF-10, LACIFF-11, LACIFF-12, LACIFF-13 e LACIFF-14) e com os valores de cobertura previamente corrigidos através do modelo HMM, os demais pacientes foram comparados ao linha de base estabelecido (Figura 22 representativa CNV normal). A análise de CNV realizada identificou regiões com haploidia na região 15q11-q13 em 5 pacientes (LACIFF-2, LACIFF-3, LACIFF-15, LACIFF-16 e LACIFF-17). A detecção de apenas 1 alelo nos pacientes citados, demonstram a concordância entre as técnicas de FISH, GTG e as análises de AF e CNV. O paciente LACIFF-2 apresentou perda de heteroziguidade e haploidia, características de deleção (Figura 23). Contudo, a técnica de análise de metilação indicou o paciente como portador da síndrome de Angelman devido à presença apenas do alelo paterno. O fato do painel gênico utilizado para sequenciamento ter capacidade de identificar alterações deletérias compatíveis com outras síndromes, demonstra o ganho diagnóstico associado a esta metodologia.

As variações de pequena extensão encontradas ao longo das análises de *copy number variations*, podem ser devido a discrepância de cobertura entre as amostras utilizadas como grupo controle e os casos analisados. Li et al., 2012 observou que variações na construção da biblioteca do grupo controle e dos indivíduos a serem analisados provocam redução da uniformidade de cobertura dos *reads* sequenciados, prejudicando análises de *copy number variations* (105). Renjie Tan et al., 2014 demonstrou que análises de CNV baseadas na profundidade de cobertura dos *reads* sequenciados estão suscetíveis a variabilidade amostral (107). Além das variações de cobertura entre as bases sequenciadas, outros desequilíbrios como proporção de conteúdo GC, total de

reads e comprimento das *reads* também exercem um impacto na precisão de detecção de variações de ploidia (108).

Diversas ferramentas combinam diversos parâmetros de análise objetivando mitigar os vieses amostrais gerados por análises de CNV que utilizam a cobertura como parâmetro. O *software* CONTRA utiliza um método de normalização de variações que inclui a utilização do log de cobertura de cada base visando corrigir as diferenças entre as bibliotecas sequenciadas (105). Os programas CONIFER e XHMM combinam a cobertura de cada *read* com abordagens matemáticas, decomposição em valores singulares através de matrizes (SVD) e análise dos componentes principais (PCA), visando remover ruídos experimentais (109,110). O *software* EXCAVATOR adota uma metodologia de normalização da mediana do conteúdo GC além da cobertura por *read* sequenciado (111). Embora os programas listados contribuam para a redução dos vieses sistemáticos do CNV, todos demandam um grande número de amostras para criação de um grupo controle robusto. Portanto, as pequenas alterações de ploidia na análise de *copy number variations* apresentadas por todos os pacientes sequenciados neste estudo são sabidamente falso-positivas, podendo ser corrigidas através do aumento do grupo controle (112).

A metodologia de análise de ploidia através do CNV também informa a respeito do genótipo dos polimorfismos mapeados frente ao grupo controle. Os pacientes LACIFF-2, LACIFF-3, LACIFF-15, LACIFF-16 e LACIFF-17 obtiveram alteração de genótipo correspondente a área indicada como deletada pela análise de CNV (Figura 23, 24 e 26). Além disso, as informações coincidem com a análise de AF e as técnicas de citogenética. Os pacientes LACIFF-1, LACIFF-4, LACIFF-6, LACIFF-7, LACIFF-8, LACIFF-9, LACIFF-10, LACIFF-11, LACIFF-

12, LACIFF-13 e LACIFF-14 sequenciados não apresentaram qualquer alteração no genótipo dos SNPs (Figura 22 representativa de normalidade).

Interessantemente, o paciente LACIFF-5, apresentou uma alteração de zigosidade de aproximadamente ~40 Mb na extensão 15q21.3-q26.1 nas análises de AF e genotipagem do CNV (Figura 26). As análises de citogenética não detectaram deleção, contudo, a técnica de MS-HRM confirmou o paciente como portador da SPW. A ploidia analisada por *copy number variations* manteve-se estável em 2n, indicando a presença de dois alelos. Esses fatos corroboram para o descarte da hipótese de deleção e reforçam a ideia de dissomia uniparental da região.

A dissomia uniparental materna possui prevalência de ocorrência de aproximadamente 25% dos casos de SPW (26). Os mecanismos genéticos relacionados ao desenvolvimento da UPD total do cromossomo podem ser, resgate trissômico (trissomia do 15 não é compatível com a vida), complementação de gametas (espermatozóide nulissômico fecunda um óvulo dissômico), resgate monossômico (espermatozóide nulissômico fecunda óvulo monossômico, havendo uma compensação cromossômica a partir da duplicação do cromossomo materno), e pós-fertilização. Além dos fenômenos descritos, eventos somáticos adicionais como recombinações mitóticas podem gerar dissomias parciais do cromossomo (113).

A dissomia parcial é classificada como dissomia uniparental segmentar intersticial ou telomérica (114). A dissomia segmentar é frequentemente associada a síndrome de Beckwith-Wiedemann (~20% dos casos) (115), contudo, o evento é extremamente raro na SPW onde poucos casos foram descritos na literatura (116). Os resultados obtidos através das análises de AF e

CNV do paciente LACIFF-5 condizem com as características da dissomia uniparental materna segmentar intersticial, aumentando a suspeita para o evento. O possível mecanismo genético responsável por esse tipo de UPD inicia-se a partir de uma não disjunção meiótica do gameta feminino. Como consequência dessa não disjunção, a fecundação com o gameta masculino gera um zigoto trissômico. Após a formação do zigoto trissômico, durante as fases da mitose ocorre uma recombinação mitótica gerando regiões heterodissômicas/isodissômicas. Devido a trissomia do 15 não ser compatível com a vida, um evento conhecido como resgate trissômico ocorre, descartando um dos cromossomos (117,118) (Figura 30).

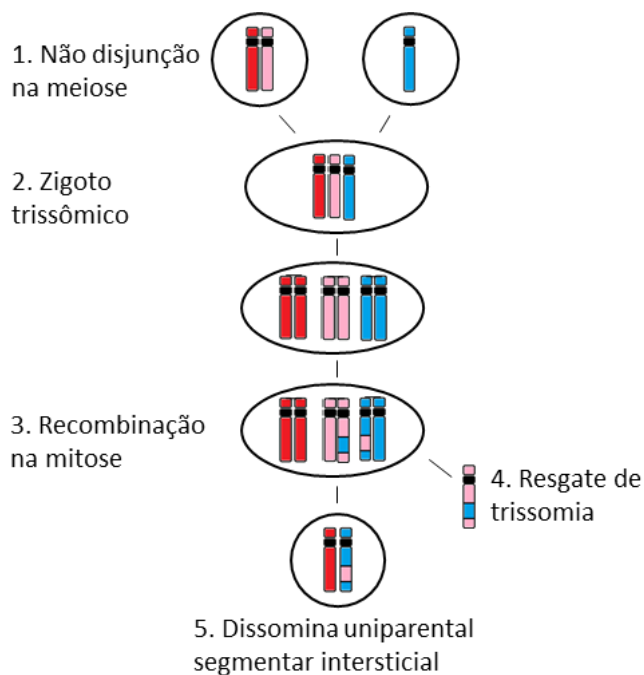


Figura 30 – Provável mecanismo de formação da dissomia uniparental intersticial.

O mecanismo de resgate trissômico no desenvolvimento da UPD, pode resultar em um mosaico de células trissômicas do cromossomo 15. Apesar de

ser um fenômeno raro, alguns casos de mosaicismos relacionados a SPW já foram descritos na literatura (119–122). A capacidade do painel desenhado para SPW em discernir os subtipos de UPD possui implicações prognósticas significativas. Olander et al., 2010 e Izumi et al., 2013, descreveram que casos de mosaicismos trissômicos do 15 devido a uma dissomia uniparental segmentar tendem a possuir um fenótipo sistêmico mais grave da SPW, incluindo anormalidades cardiovasculares como defeito do septo ventricular, por exemplo (119,120).

Apesar da constatação de dissomia uniparental segmentar intersticial no paciente LACIFF-5, sua presença não justifica o desenvolvimento da SPW, visto que esta anomalia ocorreu fora da região associada a doença. Por conta disso, uma análise criteriosa nas variantes sequenciadas foi realizada afim de encontrar alguma mutação que seja possível realizar uma associação causal com o desenvolvimento da síndrome.

As bases sequenciadas foram submetidas a filtros para aumentar a sensibilidade na chamada de variantes consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas. Após o refinamento das sequências, foi possível detectar uma variante do tipo INDEL no exon 3 do gene *PWRN1* do paciente LACIFF-5. Interessantemente, a mesma variante foi identificada no paciente LACIFF-4 onde ambas apresentaram uma boa profundidade de sequenciamento e um valor de qualidade alto. De forma contraditória, a mesma variante do tipo INDEL no gene *PWRN1* não está presente em nenhum paciente considerado normal para SPW ou SA. Apesar disso, essa variante não apresenta consequências descritas na literatura. Concomitantemente, a análise de haploinsuficiência e intolerância gênica do gene *PWRN1* não identificou qualquer

dado na literatura científica a respeito de mutações neste gene. A predição *in silico* gerada pelo *software* Phenolyzer sugere que uma possível alteração deletéria no gene possui consequências no desenvolvimento da SPW devido ao *score* apresentado (0.03286).

A hipótese de erro de sequenciamento na detecção da INDEL no gene *PWRN1* foi especulada. Song et al., 2017 demonstrou que a plataforma Ion Torrent possui alta susceptibilidade a detecção de INDEL falso-positivas (1,5%) devido a forma de identificação da complementariedade das bases sequenciadas ser de acordo com a mudança de Ph. Contudo, a taxa de erros apresentada pela plataforma pode variar de acordo com o *pipeline* e *workflow* utilizados. Esse grupo realizou uma combinação de diversos programas (Coral, Karect, Blue, Pollux, Fiona) visando reduzir os erros de detecção de INDEL (123). Com exceção do *software* Fiona, todos os programas possuem maior taxa de sucesso na correção de erros INDEL em dados provindos da plataforma Illumina (124–127). Sugerindo que, o *workflow* de análise pode estar enviesado devido a fatores intrínsecos ligados a metodologia de detecção de complementariedade de bases relativa as plataformas Illumina e Ion Torrent

A metodologia aplicada para realinhamento e redução de INDEL falso-positiva engloba algoritmos avançados do *software* *FreeBayes*, e a moderna abordagem de “*left-indel align*” utilizada pelo TVC. Este processo foi exclusivamente sistematizado para os erros gerados pela plataforma Ion Torrent. A especificidade da análise considera as informações obtidas através do fluxo de sinais gerados pela mudança de pH, onde, modelos estatísticos avaliam variantes falso-positivas e falso-negativas geradas pela plataforma (44). Autores como Roux et al., 2015 e Cherukuri et al., 2015 recomendam que a cobertura

mínima para identificação de variantes com alta confiabilidade seja de 30x (128,129). Em nosso estudo, as variantes filtradas e identificadas (*PWRN1* e *MAGEL2*) apresentaram cobertura de sequenciamento variando de 146x a 175x. Este conjunto de fatores demonstram a eficiência no *workflow* de análises elaborado, detectando variantes verdadeiro-positivas.

Recentemente, Baudhuin LM et al., 2015 demonstrou que variantes com valor de qualidade phred ≥ 20 e cobertura $\geq 100x$ não demandam a realização de confirmação através do sequenciamento de Sanger devido ao caráter redundante e desnecessário (130). Contudo, devido a necessidade da validação das variantes detectadas a técnica de sequenciamento de Sanger foi realizada. Como resultado, a metodologia confirmou as alterações INDEL nos genes *MAGEL2* e *PWRN1* em seus respectivos pacientes portadores. Este fato reforça o poder diagnóstico do Ion Torrent na detecção de variantes específicas utilizando um painel de genes alvo para sequenciamento, nas nossas condições.

O *Prader-Willi region non-protein coding RNA 1 (PWRN1)* é um gene poliadenilado que sofre *splicing* alternativo e é localizado na região crítica associada a SPW (15q11-q13). O gene é bialelicamente expresso no testículo e no rim, porém mono alelicamente expresso no cérebro (alelo paterno). O fato do gene estar ativamente relacionado a árvore de interação gênica reforça a hipótese de sua relação com a SPW. Chen et al., 2018 demonstraram que a hiperexpressão do *PWRN1* poderia reduzir a proliferação e estimular apoptose em células do câncer de intestino. Antagonicamente, sua falta de expressão pode estar relacionada com o desenvolvimento da patologia. O fato dos pacientes LACIFF-4 e LACIFF-5 possuírem uma mutação INDEL pode gerar

complicações relacionadas ao desenvolvimento de tumores, e sua relação pode significar um possível preditor para identificação precoce do câncer.

Comentado [ZFMdV1]: Existe alguma relação de PWS com câncer? É aumentado nessa população?

Apesar de ser um gene que não possui seus transcritos codificados (*lncRNAs*), o *PWRN1* pode exercer uma função regulatória no complexo mecanismo de metilação localizado no centro de *imprinting* no gene *SNURF-SNRPN*. A contribuição do *PWRN1* para o desenvolvimento do fenótipo da SPW é desconhecida. Porém, Wawrzik et al., 2009 demonstraram que o gene atua no processo de abertura de cromatina para o acesso de mecanismos de epigenética no alelo paterno. Embora correlação nem sempre significar um vínculo causal, as mutações INDEL no gene *PWRN1* nos pacientes LACIFF-4 e LACIFF-5 tornam-se guias úteis para investigações funcionais do gene e seu papel no desenvolvimento da SPW (131–134).

Devido ao grupo amostral utilizado neste estudo ser constituído de indivíduos suspeitos para SPW, os pacientes considerados normais para análise de MS-HRM foram submetidos a um processo de investigação de microdeleções na população clinicamente suspeita de SPW visando identificar mutações patogênicas/provavelmente patogênicas que estivessem relacionadas com o fenótipo clínico da SPW. O paciente LACIFF-1 apresentou uma variante do tipo INDEL de 21 bp no gene *MAGEL2*. O impacto funcional desta mutação acarreta na interrupção da produção de aminoácidos. O alto valor de cobertura associada a variante, a confirmação pelo sequenciamento de Sanger, e a estrutura do *pipeline* desenvolvido demonstram a confiabilidade na detecção e chamada de variantes pela abordagem *in silico* adotada. A análise de pLI do gene demonstra baixa tolerância a alterações nucleotídicas, reforçando a patogenicidade da mutação.

Recentemente, uma série de indivíduos com mutações pontuais no gene *MAGEL2* foram identificados através do sequenciamento de DNA. Esses pacientes manifestavam um espectro fenotípico condizente com a SPW, hipotonia neonatal, ganho de peso, atraso no desenvolvimento intelectual e psicomotor além de hipogonadismo. Considerados suspeitos para SPW, o teste diagnóstico baseado em padrões anormais de metilação do DNA genômico na região 15q11-q13 foi realizado. Como resultado, as análises indicaram normalidade no padrão de metilação da região com ambos alelos materno e paterno. Apesar do ganho de peso, nenhum dos pacientes estudados apresentaram obesidade mórbida comumente associada a SPW. Além disso, alguns dos indivíduos desenvolveram outras características que não são relacionadas a SPW. Nesse contexto, mutações pontuais no gene *MAGEL2* porém sem alteração de metilação no gene *SNURF-SNRPN*, levam ao desenvolvimento de uma doença síndrômica similar a SPW, subseqüentemente denominada síndrome Schaaf-Yang. A sobreposição de diversas características fenotípicas relativas a cada síndrome dificulta um diagnóstico preciso, especialmente em recém nascidos onde os sintomas são difíceis de se identificar e distinguir (Figura 31) (135,136).

Comentado [ZFMdV2]: Pronto! Use esse argumento para fundamentar o seu chamado ganho diagnóstico, que eu chamaria de investigação de microdeleções na população clinicamente suspeita de PWS

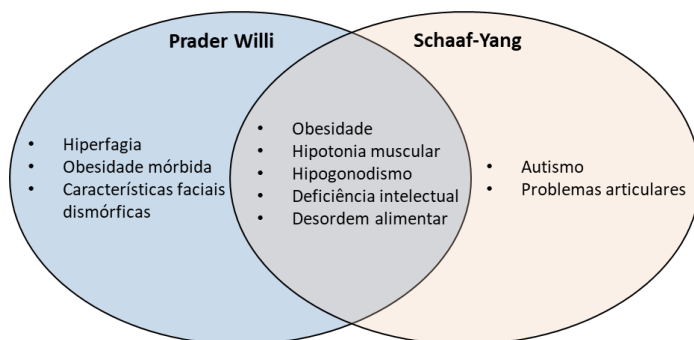


Figura 31 - Características fenotípicas relativas as síndromes SPW e SY (136).

A reanálise através da plataforma Ion Torrent dos casos negativados por meio de testes de metilação, possibilitaram a identificação de uma síndrome análoga a SPW. A capacidade do painel de genes e do *workflow* elaborado permite detectar diferentes doenças sindrômicas, oferecendo não só uma economia financeira e de tempo como uma redução na taxa de portadores subdiagnosticados destas síndromes. Além disso, possibilita estudar do ponto de vista funcional e molecular o papel do produto gênico desses alvos detectados na patogênese da síndrome de Prader-Willi. Portanto, a metodologia adotada neste estudo se mostrou eficaz na reclassificação de indivíduos conforme a suspeita da doença, impactando diretamente no manejo de famílias através de aconselhamento genético devido a diferentes prognósticos relativos a cada síndrome.

Os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados uma vez que metodologias diferentes analisaram o mesmo grupo de pacientes. Considerando a técnica MS-HRM como padrão e assumindo que as variações de metilação no gene *SNURF-SNRPN* estão relacionadas com o desenvolvimento da SPW e SA (137), os resultados obtidos para ambos parâmetros analisados foram de 100%. Desta forma, foi possível constatar que a utilização de um painel para sequenciamento é sensível e específico, de modo a detectar corretamente os portadores ou não de Prader-Willi e Angelman. O ganho diagnóstico relacionado a diferenciação de UPDs e detecção da síndrome de Schaaf-Yang obtidos através do Ion Torrent, não podem ser considerados como aumento de sensibilidade e especificidade visto que a análise de metilação avaliou apenas a detecção da SPW e SA. Além disso, o teste de coeficiente de kappa demonstrou que a concordância entre as técnicas de MS-HRM e Ion

Torrent não foi aleatória, corroborando com os resultados de sensibilidade e especificidade apresentados.

A tecnologia NGS oferece perspectivas positivas no campo diagnóstico laboratorial. Estudos recentes avaliaram a realização da metodologia de sequenciamento de nova geração utilizando DNA extraído do teste do pezinho. Amostras provenientes do teste do pezinho oferecem uma série de benefícios frente a realização do sequenciamento com sangue total. As vantagens incluem fácil armazenamento, transporte simples, técnica minimamente invasiva e requer baixa quantidade de sangue. O fato do teste de pezinho utilizar uma baixa quantidade de amostra e ser minimamente invasivo o torna ideal para rastreamento de doenças em recém-nascidos. Esta fonte de recurso de DNA aliada a eficiência e a robustez do sequenciamento de nova geração, permite identificar e distinguir diversas síndromes genéticas impactando diretamente em intervenções médicas precisas devido ao diagnóstico precoce (85,138–140).

7 Conclusão

- Os resultados obtidos através da utilização de um painel com genes-alvo associado a tecnologia Ion Torrent foram concordantes as técnicas de metilação (MS-HRM) e citogenética (GTG e FISH);
- O bom desempenho das estratégias adotadas no pipeline para as análises de dados do NGS, corroboram com a aplicabilidade e eficiência do sequenciamento de nova geração para o diagnóstico da SPW;
- A metodologia Ion Torrent PGM™ associada ao pipeline computacional foi capaz de detectar as alterações cromossômicas compatíveis ao desenvolvimento da SPW;
- A plataforma Ion Torrent PGM™ demonstrou ser um método rápido e eficiente na detecção de deleções, UPD e mutações genicas específicas;
- A abordagem diagnostica utilizando a metodologia NGS oferece a possibilidade de explorar microdeleções que eventualmente poderão ser associadas ao desenvolvimento da SPW
- A metodologia Ion Torrent PGM™ associada ao *pipeline* de bioinformática possui a capacidade de distinção das diferentes classes de dissomia uniparental e deleções existentes;
- A categorização das diversas anomalias genéticas referentes a SPW utilizando a plataforma Ion Torrent PGM™, permite a compreensão das alterações genéticas de cada indivíduo impactando diretamente na eficiência e precisão do aconselhamento genético

8 Referência bibliográfica

1. Cassidy SB, Driscoll DJ. Prader–Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009 Jan;17(1):3–13.
2. Saitoh S, Buiting K, Cassidy SB, Conroy JM, Driscoll DJ, Gabriel JM, et al. Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet.* 1997 Jan 20;68(2):195–206.
3. Relkovic D, Isles AR. Behavioural and cognitive profiles of mouse models for Prader-Willi syndrome. *Brain Res Bull.* 2013 Mar;92:41–8.
4. Burman P, Ritzén EM, Lindgren AC. Endocrine dysfunction in Prader-Willi syndrome: a review with special reference to GH. *Endocr Rev.* 2001 Dec;22(6):787–99.
5. 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.
6. Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinniss WJ, Jones KL. Prader-Willi and Angelman Syndromes: Diagnosis. *Am J Med Genet.* 1997;73:308–313.
7. Smith A, Hung D. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome. *Transl Pediatr.* 2017 Jan;5(1):46–56.
8. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74(12):5463–5467.
9. Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ, Hood LE. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(7):2399–2412.
10. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304–51.
11. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 2008 Mar;24(3):133–41.
12. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012 Jul 24;13:341.
13. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics.* 2008 Nov;92(5):255–64.
14. Dykens EM, Hodapp RM, Walsh K, Nash LJ. Profiles, correlates, and trajectories of intelligence in Prader-Willi syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1992 Nov;31(6):1125–30.
15. Bakker NE, Siemensma EPC, Koopman C, Hokken-Koelega ACS. Dietary Energy Intake, Body Composition and Resting Energy Expenditure in Prepubertal Children with Prader-Willi Syndrome before and during Growth Hormone Treatment: A Randomized Controlled Trial. *Horm Res Paediatr.* 2015;83(5):321–31.

16. Emerick JE, Vogt KS. Endocrine manifestations and management of Prader-Willi syndrome. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2013;2013(1):14.
17. Festen D a. M, Weerd D, W A, Bossche VD, S RA, Joosten K, et al. Sleep-Related Breathing Disorders in Prepubertal Children with Prader-Willi Syndrome and Effects of Growth Hormone Treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Dec 1;91(12):4911–5.
18. Correa-Silva SR, Sá LBPC de, Lengyel A-MJ. Ghrelina e secretagogos do hormônio de crescimento (GHS): modulação da secreção do hormônio de crescimento e perspectivas terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol*. 2008 Jul;52(5):726–33.
19. Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2:153–75.
20. Chamberlain SJ, Chen P-F, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, et al. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 12;107(41):17668–73.
21. Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, et al. Expression and imprinting of *MAGEL2* suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet*. 2000 Jul 22;9(12):1813–9.
22. Bischof JM, Stewart CL, Wevrick R. Inactivation of the mouse *Magel2* gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet*. 2007 Nov 15;16(22):2713–9.
23. Pagliardini S, Ren J, Wevrick R, Greer JJ. Developmental abnormalities of neuronal structure and function in prenatal mice lacking the prader-willi syndrome gene *necdin*. *Am J Pathol*. 2005 Jul;167(1):175–91.
24. Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the *MKRN3* gene. *J Mol Endocrinol*. 2015 Jun;54(3):R131–9.
25. Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD. An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5616–21.
26. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2012 Jan;14(1):10–26.
27. Murrell A. Cross-talk between imprinted loci in Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*. 2014 Jun;46(6):528–30.
28. Cavallé J, Buiting K, Kiefmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, et al. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14311–6.
29. Ferreira IRFIR, Wilton Darleães dos Santos Cunha, Leonardo Henrique Ferreira Gomes, Hiago Azevedo Cintra, Letícia Lopes Cabral Guimarães da Fonseca, Elenice Ferreira Bastos, et al. A rapid and accurate Methylation-Sensitive High-Resolution Melting Analysis assay for the diagnostic of Prader Willi and Angelman patients. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(4).

30. The Cost of Sequencing a Human Genome [Internet]. National Human Genome Research Institute (NHGRI). [cited 2017 Jun 1]. Available from: <https://www.genome.gov/27565109/The-Cost-of-Sequencing-a-Human-Genome>
31. Moore GE, others. Cramming more components onto integrated circuits. *Proc IEEE*. 1998;86(1):82–85.
32. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 20;475(7356):348–52.
33. Pinto P, Paulo P, Santos C, Rocha P, Pinto C, Veiga I, et al. Implementation of next-generation sequencing for molecular diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer highlights its genetic heterogeneity. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Sep;159(2):245–56.
34. Murdock DR, Donovan FX, Chandrasekharappa SC, Banks N, Bondy C, Muenke M, et al. Whole-Exome Sequencing for Diagnosis of Turner Syndrome: Toward Next-Generation Sequencing and Newborn Screening. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 May 1;102(5):1529–37.
35. Fujita S, Masago K, Takeshita J, Okuda C, Otsuka K, Hata A, et al. Validation of an Ion Torrent Sequencing Platform for the Detection of Gene Mutations in Biopsy Specimens from Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Jun 15 [cited 2019 Jun 24];10(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4467975/>
36. Hsiao Y-P, Lu C-T, Chang-Chien J, Chao W-R, Yang J-J. Advances and Applications of Ion Torrent Personal Genome Machine in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Reveal Novel Gene Mutations. *Materials* [Internet]. 2016 Jun 14 [cited 2019 Jun 24];9(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456775/>
37. Hao Y, Chen D, Zhang Z, Zhou P, Cao Y, Wei Z, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis by targeted next-generation sequencing on an ion torrent personal genome machine platform. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):4296–302.
38. Tarabeux J, Zeitouni B, Moncoutier V, Tenreiro H, Abidallah K, Lair S, et al. Streamlined ion torrent PGM-based diagnostics: BRCA1 and BRCA2 genes as a model. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2014 Apr;22(4):535–41.
39. Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, et al. Prader-Willi Syndrome: Consensus Diagnostic Criteria. *Pediatrics*. 1993 Feb 1;91(2):398–402.
40. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009 Jul 15;25(14):1754–60.
41. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010 Mar 1;26(5):589–95.
42. Ning Z, Cox AJ, Mullikin JC. SSAHA: A Fast Search Method for Large DNA Databases. *Genome Res*. 2001 Oct;11(10):1725–9.

43. Li H. Exploring single-sample SNP and INDEL calling with whole-genome de novo assembly. *Bioinformatics*. 2012 Jul 15;28(14):1838–44.
44. Torrent Suite User Documentation : Torrent Variant Caller Parameters [Internet]. [cited 2019 Jan 28]. Available from: https://ts-pgm.epigenetic.ru/ion-docs/Torrent-Variant-Caller-Parameters_71210217.html
45. Yang H, Robinson PN, Wang K. Phenolyzer: phenotype-based prioritization of candidate genes for human diseases. *Nat Methods*. 2015 Sep;12(9):841–3.
46. Exome Aggregation Consortium, Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug;536(7616):285–91.
47. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
48. Cytogenetic diagnosis of patients with idiopathic mental retardation [Internet]. [cited 2019 Mar 14]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442012000100007
49. McCarthy JM, McCann-Crosby BM, Rech ME, Yin J, Chen C-A, Ali MA, et al. Hormonal, metabolic and skeletal phenotype of Schaaf-Yang syndrome: a comparison to Prader-Willi syndrome. *J Med Genet*. 2018 May 1;55(5):307–15.
50. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, et al. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates prader-willi syndrome-like phenotype. *J Pediatr*. 2009 Dec;155(6):900-903.e1.
51. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Osaka H, Yamamoto K, et al. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int Off J Jpn Pediatr Soc*. 2010 Aug;52(4):547–50.
52. Bonaglia MC, Ciccone R, Gimelli G, Gimelli S, Marelli S, Verheij J, et al. Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2008 Dec;16(12):1443–9.
53. Lukusa T, Fryns JP. Pure distal monosomy 10q26 in a patient displaying clinical features of Prader-Willi syndrome during infancy and distinct behavioural phenotype in adolescence. *Genet Couns Geneva Switz*. 2000;11(2):119–26.
54. Monaghan KG, Van Dyke DL, Feldman GL. Prader-Willi-like syndrome in a patient with an Xq23q25 duplication. *Am J Med Genet*. 1998 Nov 16;80(3):227–31.
55. Pramyothin P, Pithukpakorn M, Arakaki RF. A 47, XXY patient and Xq21.31 duplication with features of Prader-Willi syndrome: results of array-based comparative genomic hybridization. *Endocrine*. 2010 Jun;37(3):379–82.
56. Florez L, Anderson M, Lacassie Y. De novo paracentric inversion (X)(q26q28) with features mimicking Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*. 2003 Aug 15;121A(1):60–4.

57. Nowicki ST, Tassone F, Ono MY, Ferranti J, Croquette MF, Goodlin-Jones B, et al. The Prader-Willi phenotype of fragile X syndrome. *J Dev Behav Pediatr JDBP*. 2007 Apr;28(2):133–8.
58. Linhares ND, Svartman M, Valadares ER. Diagnóstico citogenético de pacientes com retardo mental idiopático. *J Bras Patol E Med Lab*. 2012 Feb;48(1):33–9.
59. Wolfgram PM, Carrel AL, Allen DB. Long-term effects of recombinant human growth hormone therapy in children with Prader–Willi syndrome. *Curr Opin Pediatr*. 2013 Aug;25(4):509–14.
60. Angulo MA, Castro-Magana M, Lamerson M, Arguello R, Accacha S, Khan A. Final adult height in children with Prader-Willi syndrome with and without human growth hormone treatment. *Am J Med Genet A*. 2007 Jul 1;143A(13):1456–61.
61. Takeda A, Cooper K, Bird A, Baxter L, Frampton GK, Gospodarevskaya E, et al. Recombinant human growth hormone for the treatment of growth disorders in children: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess Winch Engl*. 2010 Sep;14(42):1–209, iii–iv.
62. Grugni G, Sartorio A, Crinò A. Growth hormone therapy for Prader–willi syndrome: challenges and solutions. *Ther Clin Risk Manag*. 2016 Jun 2;12:873–81.
63. Moorthie S, Mattocks CJ, Wright CF. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *HUGO J*. 2011 Dec;5(1–4):1–12.
64. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology | Science [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/300/5617/286>
65. Next-generation sequencing identifies unexpected genotype-phenotype correlations in patients with retinitis pigmentosa [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6292620/>
66. A genetic counselor’s guide to using next-generation sequencing in clinical practice. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151055>
67. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms | Nature Biotechnology [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt.2198>
68. Comparing Price and Tech. Specs. of Illumina MiSeq, Ion Torrent PGM, 454 GS Junior, and PacBio RS [Internet]. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <http://nextgenseek.com/2012/08/comparing-price-and-tech-specs-of-illumina-miseq-ion-torrent-pgm-454-gs-junior-and-pacbio-rs/>
69. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Jul 3;98(14):8012–7.
70. Boormans EMA, Birnie E, Hoffer MJV, Macville MVE, Galjaard R-J, Schuring-Blom GH, et al. Economic evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification and

- karyotyping in prenatal diagnosis: a cost-minimization analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Jan;285(1):67.
71. Monaghan KG, Van Dyke DL. Laboratory Testing for Prader-Willi Syndrome. In: Butler MG, Lee PDK, Whitman BY, editors. *Management of Prader-Willi Syndrome* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2006 [cited 2019 Jan 16]. p. 74–93. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-33536-0_4
 72. Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AOH. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal Chem*. 2008 Dec 1;80(23):9363–8.
 73. Grotta S, D’Elia G, Scavelli R, Genovese S, Surace C, Sirleto P, et al. Advantages of a next generation sequencing targeted approach for the molecular diagnosis of retinoblastoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Dec [cited 2019 Jan 11];15(1). Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1854-0>
 74. Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *ELECTROPHORESIS*. 2008;29(23):4627–36.
 75. De Lellis L, Mammarella S, Curia MC, Veschi S, Mokini Z, Bassi C, et al. Analysis of gene copy number variations using a method based on lab-on-a-chip technology. *Tumori*. 2012 Feb;98(1):126–36.
 76. Lu J, Salzberg SL. Removing contaminants from databases of draft genomes. *PLoS Comput Biol*. 2018;14(6):e1006277.
 77. Jann J-C, Nowak D, Nolte F, Fey S, Nowak V, Obländer J, et al. Accurate quantification of chromosomal lesions via short tandem repeat analysis using minimal amounts of DNA. *J Med Genet*. 2017 Sep;54(9):640–50.
 78. Mucciolo M, Dello Russo C, D’Emidio L, Mesoraca A, Giorlandino C. Next Generation Sequencing Approach in a Prenatal Case of Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jun 16 [cited 2019 Jan 9];17(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926485/>
 79. Gao ML, Zhong XM, Ma X, Ning HJ, Zhu D, Zou JZ. [Target gene sequence capture and next generation sequencing technology to diagnose four children with Alagille syndrome]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi Chin J Pediatr*. 2016 Jun 2;54(6):441–5.
 80. Maltese PE, Iarossi G, Ziccardi L, Colombo L, Buzzonetti L, Crinò A, et al. A Next Generation Sequencing custom gene panel as first line diagnostic tool for atypical cases of syndromic obesity: Application in a case of Alström syndrome. *Eur J Med Genet*. 2018 Feb;61(2):79–83.
 81. Li H, Jin P, Hao Q, Zhu W, Chen X, Wang P. Identification of a Novel De Novo Heterozygous Deletion in the SOX10 Gene in Waardenburg Syndrome Type II Using Next-Generation Sequencing. *Genet Test Mol Biomark*. 2017 Nov;21(11):681–5.
 82. Meyer R, Soellner L, Begemann M, Dicks S, Fekete G, Rahner N, et al. Targeted Next Generation Sequencing Approach in Patients Referred for Silver-Russell Syndrome

Testing Increases the Mutation Detection Rate and Provides Decisive Information for Clinical Management. *J Pediatr*. 2017;187:206-212.e1.

83. Bock I, Németh K, Pentelényi K, Balicza P, Balázs A, Molnár MJ, et al. Targeted next generation sequencing of a panel of autism-related genes identifies an EHMT1 mutation in a Kleefstra syndrome patient with autism and normal intellectual performance. *Gene*. 2016 Dec 31;595(2):131–41.
84. Weerakkody RA, Vandrovцова J, Kanonidou C, Mueller M, Gampawar P, Ibrahim Y, et al. Targeted next-generation sequencing makes new molecular diagnoses and expands genotype-phenotype relationship in Ehlers-Danlos syndrome. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2016;18(11):1119–27.
85. Boemer F, Fasquelle C, d’Otreppe S, Josse C, Dideberg V, Segers K, et al. A next-generation newborn screening pilot study: NGS on dried blood spots detects causal mutations in patients with inherited metabolic diseases. *Sci Rep [Internet]*. 2017 Dec [cited 2019 Feb 5];7(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-18038-x>
86. Petrikin JE, Cakici JA, Clark MM, Willig LK, Sweeney NM, Farrow EG, et al. The NSIGHT1-randomized controlled trial: rapid whole-genome sequencing for accelerated etiologic diagnosis in critically ill infants. *NPJ Genomic Med [Internet]*. 2018 Feb 9 [cited 2019 Mar 29];3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5807510/>
87. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med*. 2016 Jul;18(7):696–704.
88. Tridello G, Castellani C, Meneghelli I, Tamanini A, Assael BM. Early diagnosis from newborn screening maximises survival in severe cystic fibrosis. *ERJ Open Res [Internet]*. 2018 Apr 20 [cited 2019 Mar 29];4(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5909061/>
89. Dodge JA. Neonatal screening for cystic fibrosis. *BMJ*. 1998 Aug 8;317(7155):411.
90. Myers KA, Reeves M, Wei X-C, Khan A. Cerebral Edema in Maple Syrup Urine Disease Despite Newborn Screening Diagnosis and Early Initiation of Treatment. *JIMD Rep*. 2011 Sep 22;3:103–6.
91. Almawazini AM, Hanafi HK, Madkhali HA, Majrashi NB. Effectiveness of the critical congenital heart disease screening program for early diagnosis of cardiac abnormalities in newborn infants. *Saudi Med J*. 2017 Oct;38(10):1019–24.
92. Ma M, Li Z, Wang DW, Wei X. Next-generation sequencing identifies novel mutations in the FBN1 gene for two Chinese families with Marfan syndrome. *Mol Med Rep*. 2016 Jul;14(1):151–8.
93. Malapelle U, Vigliar E, Sgariglia R, Bellevicine C, Colarossi L, Vitale D, et al. Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients. *J Clin Pathol*. 2015 Jan;68(1):64–8.

94. Bragg LM, Stone G, Butler MK, Hugenholtz P, Tyson GW. Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. Beerenwinkel N, editor. *PLoS Comput Biol*. 2013 Apr 11;9(4):e1003031.
95. Pereira FL, Soares SC, Dorella FA, Leal CAG, Figueiredo HCP. Evaluating the efficacy of the new Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit applied to bacterial genomes. *Genomics*. 2016 May;107(5):189–98.
96. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 12];2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398667/>
97. Churchill JD, Chang J, Ge J, Rajagopalan N, Wootton SC, Chang C-W, et al. Blind study evaluation illustrates utility of the Ion PGM™ system for use in human identity DNA typing. *Croat Med J*. 2015 Jun;56(3):218–29.
98. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2013 Sep;15(9):733–47.
99. Pollard MO, Gurdasani D, Mentzer AJ, Porter T, Sandhu MS. Long reads: their purpose and place. *Hum Mol Genet*. 2018 Aug 1;27(R2):R234–41.
100. Chhangawala S, Rudy G, Mason CE, Rosenfeld JA. The impact of read length on quantification of differentially expressed genes and splice junction detection. *Genome Biol* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jan 13];16(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531809/>
101. Rizzetto S, Eltahla AA, Lin P, Bull R, Lloyd AR, Ho JWK, et al. Impact of sequencing depth and read length on single cell RNA sequencing data of T cells. *Sci Rep*. 2017 Oct 6;7(1):12781.
102. Germer S, Holland MJ, Higuchi R. High-Throughput SNP Allele-Frequency Determination in Pooled DNA Samples by Kinetic PCR. *Genome Res*. 2000 Feb;10(2):258–66.
103. Kim S-J, Miller JL, Kuipers PJ, German JR, Beaudet AL, Sahoo T, et al. Unique and atypical deletions in Prader–Willi syndrome reveal distinct phenotypes. *Eur J Hum Genet*. 2012 Mar;20(3):283–90.
104. Butler MG, Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Thompson T. Behavioral Differences Among Subjects With Prader-Willi Syndrome and Type I or Type II Deletion and Maternal Disomy. *PEDIATRICS*. 2004 Mar 1;113(3):565–73.
105. Li J, Lupat R, Amarasinghe KC, Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, et al. CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics*. 2012 May 15;28(10):1307–13.
106. CNV Detection by Ion Reporter.pdf [Internet]. [cited 2019 Jan 21]. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/CNV-Detection-by-Ion.pdf>
107. Tan R, Wang Y, Kleinstein SE, Liu Y, Zhu X, Guo H, et al. An evaluation of copy number variation detection tools from whole-exome sequencing data. *Hum Mutat*. 2014 Jul;35(7):899–907.

108. Create a Copy Number baseline [Internet]. [cited 2019 Jan 21]. Available from: <https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-8C6C88F7-2A84-4331-9A36-352D9D8B8562.html>
109. Krumm N, Sudmant PH, Ko A, O'Roak BJ, Malig M, Coe BP, et al. Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome Res.* 2012 Aug;22(8):1525–32.
110. Fromer M, Moran JL, Chambert K, Banks E, Bergen SE, Ruderfer DM, et al. Discovery and Statistical Genotyping of Copy-Number Variation from Whole-Exome Sequencing Depth. *Am J Hum Genet.* 2012 Oct 5;91(4):597–607.
111. Magi A, Tattini L, Cifola I, D'Aurizio R, Benelli M, Mangano E, et al. EXCAVATOR: detecting copy number variants from whole-exome sequencing data. *Genome Biol.* 2013;14(10):R120.
112. Kong J, Shin J, Won J, Lee K, Lee U, Yoon J. ExCNVSS: A Noise-Robust Method for Copy Number Variation Detection in Whole Exome Sequencing Data [Internet]. *BioMed Research International.* 2017 [cited 2019 Jan 22]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/9631282/>
113. Eggermann T, Soellner L, Buiting K, Kotzot D. Mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis. *Trends Mol Med.* 2015 Feb 1;21(2):77–87.
114. Bruce S, Leinonen R, Lindgren C, Kivinen K, Dahlman-Wright K, Lipsanen-Nyman M, et al. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet.* 2005 Nov;42(11):847–51.
115. Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). *Mol Cytogenet.* 2010 Mar 29;3:8.
116. Liu S, Zhang K, Song F, Yang Y, Lv Y, Gao M, et al. Uniparental Disomy of Chromosome 15 in Two Cases by Chromosome Microarray: A Lesson Worth Thinking. *Cytogenet Genome Res.* 2017;152(1):1–8.
117. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet.* 2001 Aug 1;38(8):497–507.
118. *Complex Genetic Traits.* :42.
119. Izumi K, Santani AB, Deardorff MA, Feret HA, Tischler T, Thiel BD, et al. Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 15 in Prader-Willi syndrome: utility of genome-wide SNP array. *Am J Med Genet A.* 2013 Jan;161A(1):166–71.
120. Olander E, Stamberg J, Steinberg L, Wulfsberg EA. Third Prader-Willi syndrome phenotype due to maternal uniparental disomy 15 with mosaic trisomy 15. *Am J Med Genet.* 2000;93(3):215–8.
121. Devriendt K, Matthijs G, Claes S, Legius E, Proesmans W, Cassiman JJ, et al. Prader-Willi syndrome in a child with mosaic trisomy 15 and mosaic triplo-X: a molecular analysis. *J Med Genet.* 1997 Apr;34(4):318–22.

122. Horsthemke B, Nazlican H, Hüsing J, Klein-Hitpass L, Claussen U, Michel S, et al. Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes. *Hum Mol Genet.* 2003 Oct 15;12(20):2723–32.
123. Song L, Huang W, Kang J, Huang Y, Ren H, Ding K. Comparison of error correction algorithms for Ion Torrent PGM data: application to hepatitis B virus. *Sci Rep [Internet].* 2017 Dec [cited 2019 Jan 28];7(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-08139-y>
124. Allam A, Kalnis P, Solovyev V. Karect: accurate correction of substitution, insertion and deletion errors for next-generation sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl.* 2015 Nov 1;31(21):3421–8.
125. Marinier E, Brown DG, McConkey BJ. Pollux: platform independent error correction of single and mixed genomes. *BMC Bioinformatics [Internet].* 2015 Dec [cited 2019 Jan 28];16(1). Available from: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-014-0435-6>
126. Schulz MH, Weese D, Holtgrewe M, Dimitrova V, Niu S, Reinert K, et al. Fiona: a parallel and automatic strategy for read error correction. *Bioinformatics.* 2014 Sep 1;30(17):i356–63.
127. Filippova D, Gadani A, Kingsford C. Coral: an integrated suite of visualizations for comparing clusterings. *BMC Bioinformatics.* 2012 Oct 29;13(1):276.
128. Cherukuri PF, Maduro V, Fuentes-Fajardo KV, Lam K, Adams DR, Tiftt CJ, et al. Replicate exome-sequencing in a multiple-generation family: improved interpretation of next-generation sequencing data. *BMC Genomics [Internet].* 2015 Nov 25 [cited 2019 Jan 29];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659195/>
129. Roux PF, Marthey S, Djari A, Moroldo M, Esquerré D, Estellé J, et al. Comparison of whole-genome (13X) and capture (87X) resequencing methods for SNP and genotype callings. *Anim Genet.* 2015;46(1):82–6.
130. Baudhuin LM, Lagerstedt SA, Klee EW, Fadra N, Oglesbee D, Ferber MJ. Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing. *J Mol Diagn.* 2015 Jul 1;17(4):456–61.
131. Chen Z, Ju H, Yu S, Zhao T, Jing X, Li P, et al. Prader–Willi region non-protein coding RNA 1 suppressed gastric cancer growth as a competing endogenous RNA of *mir-425-5p*. *Clin Sci.* 2018 May 23;132(9):1003–19.
132. Wawrzik M, Spiess A-N, Herrmann R, Buiting K, Horsthemke B. Expression of SNURF–SNRPN upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. *Eur J Hum Genet.* 2009 Nov;17(11):1463–70.
133. PWRN1 Gene - GeneCards | PWRN1 RNA Gene [Internet]. [cited 2019 Jan 29]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PWRN1>
134. Shao X-Y, Zhang R, Hu C, Wang C-R, Lu J-Y, Qin W, et al. Precise Microdeletion Detection of Prader-Willi Syndrome with Array Comparative Genome Hybridization. *Biomed Environ Sci.* 2010 Jun;23(3):194–8.

135. Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Gripp KW, Zhang B, et al. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet.* 2013 Nov;45(11):1405–8.
136. Fountain MD, Schaaf CP. Prader-Willi Syndrome and Schaaf-Yang Syndrome: Neurodevelopmental Diseases Intersecting at the MAGEL2 Gene. *Diseases* [Internet]. 2016 Jan 13 [cited 2019 Jan 29];4(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456300/>
137. Buiting K, Groß S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, El-Maarri O, Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman Syndromes: A Molecular Study of 136 Patients with an Imprinting Defect. *Am J Hum Genet.* 2003 Mar 1;72(3):571–7.
138. Poulsen JB, Lescai F, Grove J, Bækvad-Hansen M, Christiansen M, Hagen CM, et al. High-Quality Exome Sequencing of Whole-Genome Amplified Neonatal Dried Blood Spot DNA. Brusgaard K, editor. *PLOS ONE.* 2016 Apr 18;11(4):e0153253.
139. Qian J, Wang X, Liu J, Zhong J, Le Y, Melchior Tellier LCA, et al. Applying targeted next generation sequencing to dried blood spot specimens from suspicious cases identified by tandem mass spectrometry-based newborn screening. *J Pediatr Endocrinol Metab* [Internet]. 2017 Jan 28 [cited 2019 Feb 5];30(9). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/jpem.2017.30.issue-9/jpem-2017-0003/jpem-2017-0003.xml>
140. Bassaganyas L, Freedman G, Vaka D, Wan E, Lao R, Chen F, et al. Whole exome and whole genome sequencing with dried blood spot DNA without whole genome amplification. *Hum Mutat.* 2018 Jan;39(1):167–71.

Anexo 1 - Tabela de genes cobertos pelos iniciadores desenhados; Início e final dos iniciadores; Tamanho dos amplicons esperados

#Id	Região	## referência=hg19		Tamanho dos <i>amplicons</i>
		Início	Final	
CHEK2P2	chr15	20487995	20496811	8816
HERC2P3	chr15	20613648	20711433	97785
NBEAP1	chr15	20874795	20961480	86685
POTEB3	chr15	21040699	21071981	31282
POTEB2	chr15	21040699	21071643	30944
POTEB	chr15	21040699	21071643	30944
LINC01193	chr15	21145765	21198633	52868
LOC646214	chr15	21932512	21940739	8227
CXADRP2	chr15	22014418	22016878	2460
NF1P2	chr15	22133179	22145802	12623
LOC101927079	chr15	22278029	22383564	105535
LINC02203	chr15	22278030	22371088	93058
OR4M2	chr15	22368476	22369561	1085
OR4N3P	chr15	22413460	22414395	935
REREP3	chr15	22546563	22570831	24268
TUBGCP5	chr15	22833393	22873891	40498
CYFIP1	chr15	22892168	23006015	113847
NIPA2	chr15	23004682	23034427	29745
NIPA1	chr15	23043277	23086843	43566
LOC283683	chr15	23094329	23115254	20925
WHAMMP3	chr15	23187727	23208357	20630
GOLGA8IP	chr15	23255240	23262743	7503
HERC2P2	chr15	23282263	23378259	95996
GOLGA8S	chr15	23599893	23613471	13578
GOLGA6L2	chr15	23684531	23692390	7859
MKRN3	chr15	23810452	23813166	2714
MAGEL2	chr15	23888694	23892993	4299
NDN	chr15	23930552	23932450	1898
PWRN2	chr15	24409924	24415053	5129
PWRN3	chr15	24686272	24693114	6842
PWRN1	chr15	24803302	24832926	29624
NPAP1	chr15	24920539	24928593	8054
SNRPN	chr15	25068753	25223870	155117
SNHG14	chr15	25068753	25664608	595855
SNURF	chr15	25200038	25223870	23832
SNORD116-1	chr15	25296621	25296719	98
IPW	chr15	25361690	25367623	5933
PWAR1	chr15	25380787	25383200	2413
SNORD115-1	chr15	25415868	25415951	83
UBE3A	chr15	25582394	25684175	101781
ATP10A	chr15	25923858	26108349	184491
LINC02346	chr15	26147505	26298267	150762
GABRB3	chr15	26788692	27018935	230243

GABRA5	chr15	27111864	27194357	82493
GABRG3	chr15	27216427	27778373	561946
OCA2	chr15	28000019	28344458	344439
HERC2	chr15	28356181	28567298	211117
HERC2P9	chr15	28899586	28930410	30824
WHAMMP2	chr15	28982727	29003508	20781
PDCD6IPP2	chr15	29034978	29101720	66742
APBA2	chr15	29131118	29410516	279398
FAM189A1	chr15	29412453	29862927	450474
LOC100130111	chr15	29967137	29971367	4230
TJP1	chr15	29991569	30261002	269433
ULK4P3	chr15	30395933	30423948	28015
CHRFAM7A	chr15	30653441	30685864	32423
ARHGAP11B	chr15	30918349	30941385	23036
LOC100288637	chr15	30938316	31065209	126893
HERC2P10	chr15	31110237	31119986	9749
FAN1	chr15	31196053	31235310	39257
MTMR10	chr15	31231142	31283807	52665
TRPM1	chr15	31293262	31453476	160214
KLF13	chr15	31619056	31727868	108812
OTUD7A	chr15	31767599	32162875	395276
CHRNA7	chr15	32322684	32462384	139700
WHAMMP1	chr15	32812047	32825942	13895
LINC02256	chr15	32828958	32872810	43852
ARHGAP11A	chr15	32907343	32932138	24795
SCG5	chr15	32933812	32989299	55487
GREM1	chr15	33010203	33026870	16667
FMN1	chr15	33057743	33486934	429191
TMCO5B	chr15	33528675	33539756	11081
LOC101928134	chr15	33595856	33602860	7004
RYR3	chr15	33603161	34158304	555143
AVEN	chr15	34158426	34331303	172877
CHRM5	chr15	34260513	34357295	96782
KATNBL1	chr15	34432873	34502297	69424
EMC4	chr15	34517196	34522366	5170
SLC12A6	chr15	34522195	34630265	108070
NOP10	chr15	34633915	34635362	1447
GOLGA8A	chr15	34671268	34729667	58399
GOLGA8B	chr15	34817482	34875771	58289
GJD2	chr15	35044640	35046782	2142
LOC101928174	chr15	35047283	35105124	57841
ACTC1	chr15	35080295	35087927	7632
AQR	chr15	35148550	35261995	113445
ZNF770	chr15	35270540	35280497	9957
DPH6	chr15	35663168	35838404	175236
DPH6-AS1	chr15	35838394	36151202	312808

C15orf41	chr15	36871802	37102461	230659
CSNK1A1P1	chr15	37091299	37110707	19408
LOC145845	chr15	37156642	37178734	22092
MEIS2	chr15	37183220	37393500	210280
TMCO5A	chr15	38226806	38259925	33119
LINC02345	chr15	38332592	38354541	21949
SPRED1	chr15	38545050	38649450	104400
FAM98B	chr15	38746326	38779911	33585
RASGRP1	chr15	38780297	38857007	76710
C15orf53	chr15	38988797	38992239	3442
THBS1	chr15	39873278	39891121	17843
FSIP1	chr15	39892230	40075039	182809
SRP14	chr15	40327889	40331403	3514
BMF	chr15	40380089	40401085	20996
BUB1B	chr15	40453208	40513337	60129
INAFM2	chr15	40616255	40618916	2661
DISP2	chr15	40650434	40663257	12823
RAD51	chr15	40987325	41024356	37031
INO80	chr15	41271077	41408444	137367
EXD1	chr15	41474929	41522955	48026
RTF1	chr15	41709300	41775761	66461
RPAP1	chr15	41809373	41836475	27102
SPTBN5	chr15	42140342	42186275	45933
EHD4	chr15	42191637	42264755	73118
PLA2G4E-AS1	chr15	42264959	42291292	26333
PLA2G4E	chr15	42273778	42342901	69123
PLA2G4F	chr15	42433330	42448839	15509
VPS39	chr15	42450897	42500524	49627
GANC	chr15	42566364	42645864	79500
ZNF106	chr15	42704633	42783395	78762
HAUS2	chr15	42841009	42862190	21181
STARD9	chr15	42867855	43013196	145341
CDAN1	chr15	43015740	43029326	13586
TTBK2	chr15	43036540	43213007	176467
TGM5	chr15	43524791	43559055	34264
TGM7	chr15	43568477	43594453	25976
ADAL	chr15	43622547	43646753	24206
TP53BP1	chr15	43699410	43802707	103297
MAP1A	chr15	43809804	43823818	14014
PPIP5K1	chr15	43825658	43882451	56793
PDIA3	chr15	44038588	44064804	26216
SPG11	chr15	44854892	44955876	100984
B2M	chr15	45003683	45010357	6674
DUOX2	chr15	45384850	45406359	21509
DUOX1	chr15	45422190	45457776	35586
GATM	chr15	45653320	45694515	41195

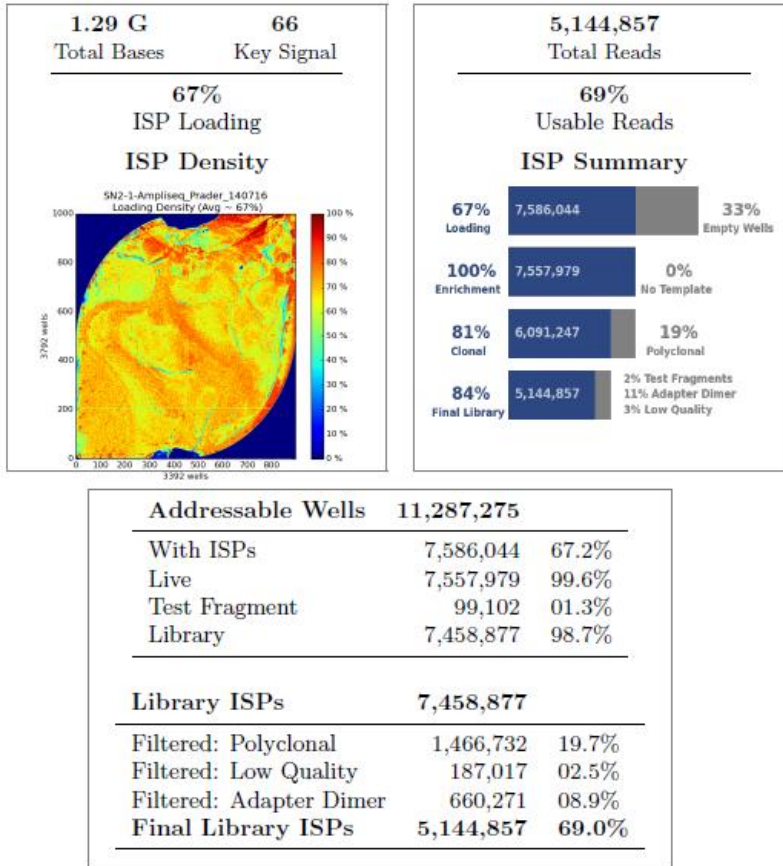
SPATA5L1	chr15	45694517	45713616	19099
SEMA6D	chr15	47476401	48066420	590019
LINC01491	chr15	48095579	48138433	42854
SLC24A5	chr15	48413167	48434589	21422
SLC12A1	chr15	48498496	48596275	97779
FBN1	chr15	48700501	48937985	237484
SECISBP2L	chr15	49280833	49338760	57927
DTWD1	chr15	49913224	49937333	24109
ATP8B4	chr15	50150433	50411419	260986
USP8	chr15	50716572	50793280	76708
TRPM7	chr15	50849354	50979012	129658
AP4E1	chr15	51200867	51298097	97230
MIR4713HG	chr15	51329683	51586109	256426
CYP19A1	chr15	51500252	51630795	130543
GLDN	chr15	51633699	51700197	66498
DMXL2	chr15	51739919	51914967	175048
SCG3	chr15	51973548	52013223	39675
TMOD2	chr15	52043756	52108558	64802
TMOD3	chr15	52121823	52204331	82508
LOC100422556	chr15	52211158	52216317	5159
LEO1	chr15	52230220	52263998	33778
BCL2L10	chr15	52401464	52404972	3508
GNB5	chr15	52413121	52483565	70444
CERNA1	chr15	52472221	52498076	25855
MYO5A	chr15	52599478	52821247	221769
ARPP19	chr15	52839240	52861643	22403
FAM214A	chr15	52873516	52970831	97315
WDR72	chr15	53805936	54055075	249139
UNC13C	chr15	54270375	54920806	650431
RSL24D1	chr15	55473510	55489231	15721
RAB27A	chr15	55495162	55582013	86851
PYGO1	chr15	55831077	55881050	49973
PRTG	chr15	55903737	56035317	131580
NEDD4	chr15	56119115	56285944	166829
RFX7	chr15	56382729	56535483	152754
MNS1	chr15	56720927	56757335	36408
ZNF280D	chr15	56922372	57026284	103912
LOC145783	chr15	57178366	57210697	32331
LINC01413	chr15	57611334	57617237	5903
CGNL1	chr15	57668701	57842925	174224
GCOM1	chr15	57884100	58009755	125655
POLR2M	chr15	57998717	58009755	11038
ALDH1A2	chr15	58245620	58358121	112501
LIPC	chr15	58724173	58861073	136900
MINDY2	chr15	59063389	59154098	90709
RNF111	chr15	59279785	59389618	109833

GTF2A2	chr15	59930259	59949740	19481
BNIP2	chr15	59951343	59981733	30390
ICE2	chr15	60711806	60771359	59553
VPS13C	chr15	62144588	62352664	208076
C2CD4A	chr15	62359174	62363116	3942
TLN2	chr15	62939508	63136829	197321
RAB8B	chr15	63481726	63559973	78247
APH1B	chr15	63569747	63601325	31578
CA12	chr15	63613575	63674365	60790
HERC1	chr15	63900815	64126147	225332
SNX1	chr15	64388081	64436433	48352
SNX22	chr15	64443914	64449680	5766
PPIB	chr15	64448012	64455354	7342
CSNK1G1	chr15	64457714	64648458	190744
ANKDD1A	chr15	65204099	65251041	46942
SLC51B	chr15	65337706	65345734	8028
KBTBD13	chr15	65369152	65372276	3124
IGDCC4	chr15	65673823	65715410	41587
DPP8	chr15	65734799	65810051	75252
HACD3	chr15	65822825	65870693	47868
SLC24A1	chr15	65903741	65953256	49515
RAB11A	chr15	66161795	66184329	22534
MEGF11	chr15	66187632	66546075	358443
TIPIN	chr15	66629006	66649054	20048
SMAD3	chr15	67358193	67487533	129340
CALML4	chr15	68483041	68498448	15407
CORO2B	chr15	68810710	69020144	209434
GLCE	chr15	69452934	69564544	111610
PAQR5	chr15	69591292	69699976	108684
LOC145694	chr15	69689241	69707368	18127
DRAIC	chr15	69854057	69863779	9722
LINC00593	chr15	70127571	70135306	7735
TLE3	chr15	70340128	70390256	50128
UACA	chr15	70946891	71055932	109041
LARP6	chr15	71123861	71146604	22743
LRRC49	chr15	71145576	71342436	196860
THAP10	chr15	71173679	71184772	11093
MYO9A	chr15	72118359	72410440	292081
SENP8	chr15	72406597	72433311	26714
CD276	chr15	73976620	74006859	30239
C15orf59	chr15	74027770	74044711	16941
LOXL1	chr15	74218797	74244482	25685
CCDC33	chr15	74528628	74628482	99854
ARID3B	chr15	74833516	74890472	56956
EDC3	chr15	74922897	74988394	65497
ULK3	chr15	75128455	75135552	7097

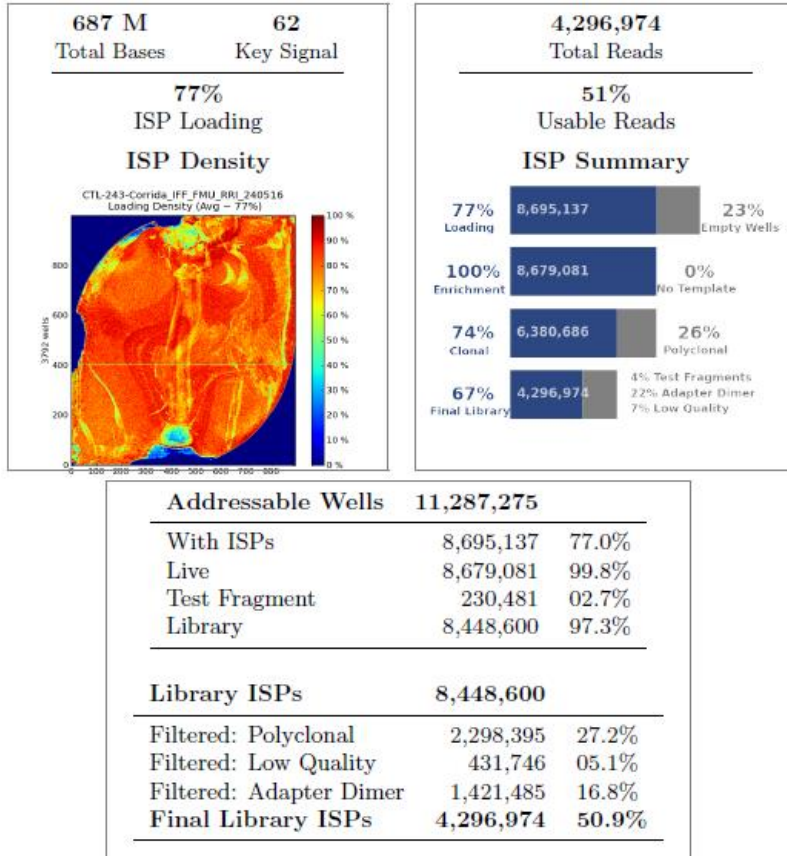
MPI	chr15	75182344	75191798	9454
RPP25	chr15	75247441	75249775	2334
SCAMP5	chr15	75287874	75313836	25962
C15orf39	chr15	75494219	75504510	10291
SIN3A	chr15	75661718	75748124	86406
PTPN9	chr15	75759460	75871632	112172
CSPG4	chr15	75966661	76005189	38528
PSTPIP1	chr15	77287019	77329816	42797
TSPAN3	chr15	77336358	77363570	27212
PEAK1	chr15	77400496	77712446	311950
HMG20A	chr15	77712991	77777946	64955
LINGO1	chr15	77905364	78113242	207878
LOC645752	chr15	78206557	78219188	12631
TBC1D2B	chr15	78287325	78369994	82669
IDH3A	chr15	78441717	78462884	21167
DNAJA4	chr15	78556485	78574538	18053
CRABP1	chr15	78632664	78640572	7908
IREB2	chr15	78730516	78793798	63282
PSMA4	chr15	78832745	78841604	8859
CHRNA5	chr15	78857860	78887611	29751
ANKRD34C	chr15	79575144	79590581	15437
KIAA1024	chr15	79724856	79764642	39786
ZFAND6	chr15	80351908	80430735	78827
CTXND1	chr15	80487819	80544603	56784
IL16	chr15	81489217	81605104	115887
TMC3-AS1	chr15	81616672	81735417	118745
TMC3	chr15	81623444	81666497	43053
MEX3B	chr15	82334117	82338484	4367
EFL1	chr15	82422559	82555104	132545
LOC338963	chr15	83379221	83382745	3524
WHAMM	chr15	83478378	83503613	25235
BTBD1	chr15	83685179	83736106	50927
ADAMTSL3	chr15	84322836	84708593	385757
ZSCAN2	chr15	85144247	85166947	22700
WDR73	chr15	85184724	85197574	12850
AKAP13	chr15	85923845	86292589	368744
KLHL25	chr15	86302557	86338189	35632
AGBL1	chr15	86623037	87572283	949246
LINC01586	chr15	89128800	89148341	19541
AEN	chr15	89164525	89175512	10987
ACAN	chr15	89346672	89418585	71913
MFGE8	chr15	89441912	89456700	14788
ABHD2	chr15	89631379	89745591	114212
FANCI	chr15	89787192	89860362	73170
POLG	chr15	89859534	89878026	18492
MIR9-3HG	chr15	89904808	89941718	36910

KIF7	chr15	90171199	90198682	27483
PEX11A	chr15	90224760	90234015	9255
WDR93	chr15	90234026	90286869	52843
MESP1	chr15	90293096	90294540	1444
ANPEP	chr15	90328124	90358072	29948
C15orf38-AP3S2	chr15	90373829	90456222	82393
ARPIN	chr15	90439762	90456222	16460
GABARAPL3	chr15	90889761	90892679	2918
IQGAP1	chr15	90931471	91045475	114004
MAN2A2	chr15	91445446	91465815	20369
SV2B	chr15	91642816	91845795	202979
SLCO3A1	chr15	92396936	92715665	318729
ST8SIA2	chr15	92937115	93011958	74843
LINC00930	chr15	93111046	93115493	4447
CHD2	chr15	93443549	93571237	127688
RGMA	chr15	93586634	93632443	45809
MCTP2	chr15	94841428	95027181	185753
LOC440311	chr15	95398590	95400293	1703
LINC00924	chr15	95976320	96051076	74756
NR2F2	chr15	96869155	96883492	14337
ARRDC4	chr15	98503931	98517068	13137
IGF1R	chr15	99191766	99507759	315993
PGPEP1L	chr15	99511457	99551024	39567
MEF2A	chr15	1E+08	1E+08	150889
LYSMD4	chr15	1E+08	1E+08	6045
DNM1P46	chr15	1E+08	1E+08	16773
ADAMTS17	chr15	1,01E+08	1,01E+08	370569
CERS3-AS1	chr15	1,01E+08	1,01E+08	64977
CERS3	chr15	1,01E+08	1,01E+08	144327
PRKXP1	chr15	1,01E+08	1,01E+08	11533
LRRK1	chr15	1,01E+08	1,02E+08	153676
CHSY1	chr15	1,02E+08	1,02E+08	76211
PCSK6	chr15	1,02E+08	1,02E+08	186056
TARSL2	chr15	1,02E+08	1,02E+08	70692
LOC100128108	chr15	1,02E+08	1,02E+08	9778

Anexo 1 - Figura primeira corrida sequenciamento Ion Torrent.



Anexo 2 - Figura segunda corrida secuenciamento Ion Torrent .





Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisador Responsável
 Dra. Leticia da Cunha Guida
 Doutor em Ciências
 Centro de Genética Médica
 Laboratório de Alta Complexidade
 Contatos: (21) 2554-1919
 Email: leticia@iff.fiocruz.br

Médico Responsável
 Dr. Juan Clinton Llerena Jr
 Chefe do Centro de Genética Médica
 Telefone: 21 2554-1751
 Email: llerena@iff.fiocruz.br

Comitê de Ética em Pesquisa CEP-IFF
 Telefone: 21 2552-1730
 Email: cepiff@iff.fiocruz.br

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulado: "O papel do hormônio do crescimento na síndrome de Prader-Willi: estudo da regulação da expressão de GH através da estratégia CRISPR/Cas9, rastreamento neonatal e diagnóstico molecular"

Esta pesquisa pretende desenvolver um exame de laboratório para ajudar no diagnóstico da síndrome de Prader-Willi. Além disso, será desenvolvido um novo exame do teste do pezinho para tentar achar crianças com essa síndrome cada vez mais cedo. Os exames são baseados em testes do DNA do paciente e dos seus pais nas células de sangue.

Para a participação nesta pesquisa você precisa somente permitir o uso do sangue coletado para outros exames diagnósticos, os quais já seriam realizados no seu filho, para essa pesquisa. Desta forma, participar deste estudo não causará nenhum prejuízo ou risco adicional para a saúde dele. Além disso, serão necessárias coletas de sangue seu e do seu cônjuge para comparação do DNA de toda a família. Todos os cuidados para impedir que problemas ocorram durante essas coletas serão tomados, pois a mesma será realizada por profissional treinado e utilizando procedimentos padrões de coleta. É importante também dizer que as amostras enviadas para este estudo não serão utilizadas para nenhuma outra pesquisa. As análises serão realizadas no Laboratório de Alta Complexidade do Instituto Nacional da Criança, da Mulher e do Adolescente Fernandes Figueira/FIOCRUZ (LACIFF).

Os benefícios esperados com esse estudo serão tanto o auxílio no diagnóstico dessa doença com maiores detalhes como a capacidade de identificar cada vez mais cedo, crianças com essa síndrome.

Nesse último ponto, acreditamos que o tratamento correto poderá ser adotado rapidamente, garantindo a qualidade de vida.

Todas as informações referentes a esta pesquisa são confidenciais, estarão guardadas em segurança e só serão utilizadas pela equipe de pesquisa. Estas informações estão submetidas às normas de privacidade e confidencialidade do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ que é o setor responsável por assegurar as normas de pesquisa em seres humanos neste

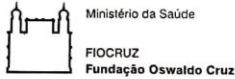
ml
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - FIOCRUZ

APROVAÇÃO PROCECADA
 Visto em 01/01/2021
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - FIOCRUZ
 Telefone: 2552-3451 / 2554-1700 R. 1730

1

TCLE versão 4

Rubrica paciente_____
Rubrica pesquisador



hospital, segundo a Resolução 466/2012. As informações só serão divulgadas em eventos e publicações científicas, assim como, para compor relatórios técnicos, sem revelar a sua identidade e/ou da sua família, sendo assegurado, portanto, o sigilo sobre sua participação.

Os resultados dos exames realizados com as amostras poderão ser requisitados, por escrito, por você (ou por algum responsável legal) a qualquer momento, e uma via fará parte do seu prontuário médico no IFF. Esclarecimentos serão fornecidos sempre que solicitados bastando para isso entrar em contato, com o pesquisador responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/IFF-FIOCRUZ). O conteúdo dessas informações não poderá ser usado em nenhum outro estudo ou para qualquer outro propósito sem a autorização por escrito das partes interessadas. Se alguma alteração for detectada você será imediatamente avisado para que a intervenção possa ser instituído junto ao médico responsável pelos cuidados clínicos prestados ao seu filho.

Sua participação nessa pesquisa é voluntária, caso você decida, a qualquer momento, desligar-se deste estudo não haverá nenhum prejuízo a assistência médica dispensada ao seu filho. Não há nenhum custo, a você, relacionado aos procedimentos previstos neste estudo assim como não há pagamento por sua participação. É garantido o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa das quais não foram previamente antecipados ou relatados a vocês.

Se você (ou seu parente) tiver alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contactar o Pesquisador Responsável pelo Projeto ou sua equipe. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional da Criança, da Mulher e do Adolescente Fernandes Figueira/FIOCRUZ.

Sendo assim, após a leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com profissional capacitado, para esclarecer detalhadamente todas as minhas dúvidas, estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades, expresse minha concordância de espontânea vontade em participar do projeto de pesquisa intitulado: "O papel do hormônio do crescimento na síndrome de Prader-Willi: estudo da regulação da expressão de GH através da estratégia CRISPR/Cas9, rastreamento neonatal e diagnóstico molecular". Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

Declaro que recebi uma cópia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. E permito, os pesquisadores deste projeto, me contatarem por telefone ou através de mensagem de correio

TCLE versão 4


2


Rubrica paciente

Rubrica pesquisador

APROVAÇÃO PROROGADA
Válida até 01/07/2021
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ
Telefone: 2532-8011 / 2534-1700 R.1720

me
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ


 Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz


IFF
 INSTITUTO NACIONAL FERNANDES FIGUEIRA
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

se informações adicionais forem necessárias, conforme informações que constam em meu prontuário no IFF-FIOCRUZ.

Nome do Paciente: _____

Prontuário: _____ Código: _____

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Assinatura do Voluntário (ou responsável legal): _____

Nome Completo (em letra legível): _____

Documento de Identidade: _____ Telefone para contato: _____

Assinatura de uma testemunha: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Instituições envolvidas:
 Instituto Nacional da Criança, da mulher e do Adolescente Fernandes Figueira
 Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
 Centro de Genética Médica
 Laboratório de Alta Complexidade
 Av. Rui Barbosa, 716 - Flamengo - Rio de Janeiro – Brasil
 Telefone/FAX: (21) 2554-1918

Comitê de Ética em Pesquisa CEP-IFF
 Instituto Nacional da Criança, da mulher e do Adolescente Fernandes Figueira
 Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
 Telefone: 21 2552-1730
 Fax: 2552-8491
 Email: cepiff@iff.fiocruz.br

Aprovação PROBOCADA
 Número de Registro: 011012021
 Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 Instituto Fernandes Figueira - FIOCRUZ
 Telefone: 2552-8491 - 7554-1700 R.1730

Quilombola, e do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 Instituto Fernandes Figueira - IFF/FIOCRUZ

3

TCLE versão 4

 Rubrica paciente

 Rubrica pesquisador