

SINDROMUL PRADER WILLI IDENTIFICAT PRIN TEHNICA MS-MLPA (METHYLATION SPECIFIC MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)**Dr. Simona Loredana Vasilache^{1,2}, Dr. Adelina Micheu², Dr. Claudia Bănescu³,
Dr. Valeriu Moldovan³, Dr. Carmen Duicu¹, Dr. Ionela Maria Pașcanu^{2,4},
Prof. Dr. Oana Mărginean¹**¹*Departamentul de Pediatrie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Târgu Mureș*²*Departamentul de Endocrinologie, Spitalul Clinic Județean Mureș, Târgu Mureș*³*Departamentul de Genetică, Universitatea de Medicină și Farmacie, Târgu Mureș*⁴*Departamentul de Endocrinologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Târgu Mureș***REZUMAT**

Sindromul Prader-Willi (SPW) reprezintă o afecțiune genetică complexă, multisistemică, cauzată de lipsa expresiei genelor din regiunea q11.2-q13 a cromozomului 15 patern. Există trei subtipuri genetice majore în SPW: deleția paternă din regiunea 15q11-q13 (70% dintre cazuri), disomia uniparentală maternă (25-30%) și defecte de amprentare (1-3%). Clinicienii se confruntă cu provocarea de a discerne mai clar între PWS clasic și diferitele sindroame PW-like (SPWL). Este necesar un diagnostic molecular, pentru a explica aceste asemănări genetice și pentru a oferi consiliere genetică și tratament adecvat. Prezentăm cazul unui pacient în vârstă de 6 ani, cu hipotonie severă, dificultăți de hrănire în perioada neonatală, cu întârzierea dezvoltării neuromotorii, hiperfagie și obezitate (IMC: +4.66 DS). Analiza genetică cu tehnica MS-MLPA (methylation specific multiplex ligation dependent probe amplification) relevă o metilare aberantă a insulei CpG. Este important de menționat faptul că un diagnostic precis al SPW și o abordare multidisciplinară timpurie sunt esențiale pentru gestionarea eficientă pe termen lung, pentru prevenirea complicațiilor și îmbunătățirea calității vieții acestor pacienți.

Cuvinte cheie: sindrom Prader-Willi, centru de amprentare, obezitate**Abrevieri****PWS** – sindrom Prader-Willi**PWLS** – fenotip asemănător sindromului PWS**BMI** – indice de masă corporală**DS** – deviație standard**MS-MLPA** – methylation specific multiplex ligation dependent probe amplification**SNRPN** – ribonucleoproteine nucleare mici**IGF1** – somatomedina C**TSH** – tireotropina**FT4** – tiroxina liberă**NDN gena** – gena codificatoare a necdinei**DNA** – acid dezoxiribonucleic**IC** – centru de amprentare**INTRODUCERE**

Sindromul Prader-Willi (SPW) este caracterizat prin alterări neurogenetice, neurometabolice și neurocomportamentale. Are o prevalență estimată la nivel mondial cuprinsă între 1 la 10.000-30.000 de persoane (1). SPW este o afecțiune genetică cauzată de pierderea paternă a genelor amprentate de pe cromozomul 15 și caracterizată printr-o serie de implicații mentale și fizice, inclusiv obezitatea, care poate pune viața în pericol (2). Aproximativ

70% dintre cazurile de PWS sunt cauzate de o deleție netransmisibilă în regiunea q11.2-q13 a cromozomului 15 patern; în jur de 25% sunt rezultatul disomiei uniparentale de origine maternă și în mai puțin de 3% dintre cazuri sunt indivizii cu defecte ale centrului de amprentare (2,3,4).

Copiii afectați prezintă în mod constant hipotonie semnificativă, dificultăți de hrănire și retard în dezvoltarea staturoponderală, urmat în mica copilărie de apetit excesiv, cu dezvoltarea treptată a obe-

Adresa de corespondență:

Prof. Dr. Oana Mărginean, Universitatea de Medicină și Farmacie, str. Gheorghe Marinescu nr. 38, Târgu Mureș

E-mail: marginean.oana@gmail.com

zității, statură mică, dizabilități intelectuale și probleme de comportament (5).

În SPW, o abordare multidisciplinară precoce este fundamentală pentru prevenirea complicațiilor, pentru a îmbunătăți calitatea vieții și a prelungi speranța de viață a acestor pacienți.

PREZENTARE DE CAZ

În cadrul departamentului nostru, am examinat un pacient de sex masculin, în vârstă de 6 ani, provenit dintr-o familie cu părinți non-consangvini, cu sarcină patologică –oligoamnios. A prezentat acti-

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio ^H	Stdev
154	TUBGCP5-8	15q11.2	15-020.398303	8222	49296	0.92	0.03
434	NIPA1-4	15q11.2	15-020.612289	396	6929	0.05	0
172	MKRN3-1	15q11.2	15-021.362818	8488	54621	0.96	0.03
409	MAGEL2-1	15q11.2	15-021.440355	7605	57910	1	0.03
445	NDN-1	15q11.2	15-021.482381	7083	52730	0.99	0.03
419	NDN-1 [HHA1]	15q11.2	15-021.483412	648	5436	0.08	0
287	SNRPN-u1b	15q11.2	15-022.619902	8058	51562	1.01	0.03
238	SNRPN-u1b*	15q11.2	15-022.626072	12545	78880	0.99	0.03
278	SNRPN-Intr.u2	15q11.2	15-022.690980	8852	57458	0.99	0.03
270	SNRPN-Intr.u2	15q11.2	15-022.703328	10268	64664	0.98	0.03
256	SNRPN-u5	15q11.2	15-022.716714	10000	61727	0.92	0.03
391	SNRPN-u5	15q11.2	15-022.717321	8033	57382	0.94	0.03
250	SNRPN-CpG isl	15q11.2	15-022.751105	819	4598	0.06	0
178	SNRPN-CpG isl	15q11.2	15-022.751214	0	0	0	0
190	SNRPN-CpG isl	15q11.2	15-022.751480	1057	6430	0.13	0
142	SNRPN-CpG isl	15q11.2	15-022.751773	1143	9727	0.15	0
294	SNRPN-3	15q11.2	15-022.764248	8954	57251	1.04	0.03
400	SNRPN-7	15q11.2	15-022.772555	8958	65303	0.93	0.03
214	SNRPN-HB2-85-	15q11.2	15-022.848250	17955	109877	1.04	0.03
472	SNRPN-HB2-85-	15q11.2	15-022.872658	8189	68867	0.94	0.03
328	SNRPN-HB2-85-	15q11.2	15-022.888662	1321	8642	0.11	0
355	UBE3A-13	15q11.2	15-023.136395	8545	57903	0.94	0.03
301	UBE3A-8	15q11.2	15-023.156677	10698	70858	1.02	0.03
160	UBE3A-7	15q11.2	15-023.167740	10364	65202	0.9	0.03
197	UBE3A-6	15q11.2	15-023.171919	11132	64995	1.03	0.03
373	UBE3A-5	15q11.2	15-023.201674	8878	62548	1	0.03
184	UBE3A-1 [HHA1]	15q11.2	15-023.235184	0	0	0	0
366	ATP10A-5	15q12	15-023.522207	10569	71690	1.01	0.03
226	ATP10A-1	15q12	15-023.659906	9988	60469	1	0.03
220	GABRB3-12	15q12	15-024.344242	8575	56340	1.03	0.03
382	GABRB3-10	15q12	15-024.363881	429	3511	0.04	0
202	APBA2-14 [HHA]	15q13.1	15-027.196749	404	2421	0.04	0
463	MLH1-1 [HHA1]	03p22.2	03-037.009621	0	0	0	0
346	BLM-1 [HHA1]	15q26.1	15-089.061432	0	0	0	0
427	Reference C/M*	01p21.3	01-097.754015	8213	65517	1.01	0.03
244	Reference C/M*	05p15.2	05-013.819132	12259	74491	0.96	0.03
264	Reference C/M*	07q22.1	07-099.111656	9537	61511	1.01	0.03
136	Reference C/M*	10q26.3	10-133.865537	10862	69602	1.01	0.03
454	Reference C/M*	11p15.1	11-020.632867	7197	57249	1.03	0.03
130	Reference C/M*	11q13.3	11-069.956854	10054	60929	0.95	0.03
319	Reference C/M*	11q24.2	11-125.001668	9730	64907	0.99	0.03
166	Reference C/M*	11q24.2	11-125.002858	13590	85431	1	0.03
208	Reference C/M*	12q13.11	12-046.657475	12938	78148	0.93	0.03
337	Reference C/M*	13q14.3	13-049.873373	8638	58908	0.95	0.03
148	Reference C/M*	17q12	17-032.463021	12462	73258	0.92	0.03
232	Reference C/M*	17q21.31	17-038.421624	11523	70440	1.02	0.03
480	Reference C/M*	17q23.2	17-057.116062	8434	74524	1.05	0.03
309	Reference C/M*	22q12.2	22-028.400833	11243	72672	1	0.03
Median value all probe values:				8865	61220	0.99	0.03

FIGURA 1. Raport al datelor obținute prin electroforeză capilară dintr-o probă de ADN analizată cu SALSA MS-MLPA probemix ME028 Prader Willi / Angelman probemix. Cu roșu sunt marcate SNRP-CpG care sunt hipometilate.

vită fetală diminuată, s-a născut la 42 de săptămâni, prin operație cezariană, cu o greutate la naștere de 2.100 g (-2.18 DS), o lungime la naștere de 47 cm (-1.63 DS) și scor APGAR 6/1 minut. Pe parcursul perioadei neonatale, s-au constatat hipotonie severă, dificultăți de alimentație (până la vârsta de 3 săptămâni, copilul a fost alimentat prin sondă nazogastrică) și întârziere în dezvoltarea neuromotorie. În evoluție, pacientul a prezentat hiperfagie cu creștere semnificativă în greutate și probleme de comportament – accese de furie, încăpățănare. Cariotipul din sânge proaspăt a fost 46, XY. Ulterior, utilizarea unui kit SALSA MS-MLPA ME028 (MS-MLPA = methylation specific multiplex ligation dependent probe amplification) a evidențiat o metilare aberantă a insulei CpG, care aparține promoterului SNRPN (Fig. 1).

Pacientul este internat în clinica noastră; examenul clinic efectuat relevă trăsături dismorfice (frunte îngustată, ochi migdalați, buză superioară mai subțire), întârziere în dezvoltarea motorie și cognitivă, statură redusă (înălțime: -1.05 DS), creștere excesivă în greutate (IMC: +4.66 DS) și organe sexuale subdezvoltate.

Comorbidități asociate: microcefalie congenitală, infecția sistemului nervos central cu citomegalovirus, retard psihomotor și cognitiv sever, criptorhidie corectată chirurgical.

Investigațiile de laborator relevă IGF1: 62,89 ng/ml, TSH: 1,376 μ UI/ml, FT4: 0,94 ng/dl și creșterea enzimelor hepatice. Ecografia abdominală evidențiază hidronefroză unilaterală, steatoză hepatică și hepatomegalie. Pacientul este diagnosticat cu apnee obstructivă de somn severă; examenul polisomnografic relevând un scor apnee-hipopnee > 40. Se efectuează adenoidectomie pentru vegetațiile adenoide, cu scor apnee-hipopnee post-procedural 9,4. După adenoidectomie se inițiază terapie cu hormon de creștere. Dozele se cresc progresiv, iar după 6 luni de tratament se constată o îmbunătățire a înălțimii cu 0,46 DS, IMC: +3,82 DS, cu o viteză de 9 cm/an.

DISCUȚII

Este cunoscut faptul că SPW prezintă aspecte clinice comune cu alte boli, ceea ce face ca diagnosticul precis să fie dificil. De aceea, clinicienii se confruntă cu provocarea de a discerne mai clar între clasicul SPW și diferitele sindroame PW-like (SPWL). Este necesar ca aceste aspecte să fie studiate la nivel molecular pentru a explica asemănările genetice și pentru a oferi consiliere genetică și tratament adecvat. SPWL conține elemente ale fenoti-

pului SPW, iar funcțiile perturbate ale unor gene din PWLS sunt susceptibile de a fi implicate în căi genetice care sunt semnificative pentru expresia fenotipului PWS (6).

Având în vedere aceste aspecte, este important să alegem testul genetic corect pentru a identifica pacienții cu SPW clasic, deoarece Rocha și colaboratorii (7) raportează într-o metaanaliză alte mutații asociate cu fenotip SPW-like, cum ar fi: deleția 6q, inversiune paracentrică, sindrom X fragil.

Metilarea ADN este considerată un instrument solid pentru a determina moștenirea exclusiv paternă, exclusiv maternă sau biparentală, dar nu poate diferenția disomia uniparentală maternă sau defectele de amprentare (5). Comparativ cu metilarea ADN convențională, o nouă metodă semicantitativă, și anume „methylation-specific multiplex-ligation probe amplification“ (MS-MLPA) este recomandată pentru detectarea metilării în defecte de amprentare (cum ar fi sindromul Beckwith Wiedemann, sindromul Silver Russel) și disomia uniparentală. MS-MLPA va determina starea de metilare folosind 5 sonde specifice metilării (4 pentru gena SNRPN și una pentru gena NDN), dar, de asemenea, detectează modificările numărului de copii (deleții pe cromozomul 15q11), fiind astfel indicat în stabilirea diagnosticului de SPW (8,9).

Din acest motiv, analiza MS-MLPA ar putea fi considerată ca fiind prima testare atunci când un posibil diagnostic de SPW este suspectat. În urma testului MS-MLPA, pacientul nostru a fost diagnosticat cu SPW din cauza metilării aberante a insulelor CpG, aparținând promotorului SNRPN, și astfel delețiile 15q au fost excluse. Din nefericire, deoarece tehnica nu poate distinge între defectele de amprentare și disomia uniparentală maternă a cromozomului 15, teste suplimentare, cum este analiza polimorfismului AND, pot fi efectuate pentru a determina cauza exactă a bolii, dar, cu toate acestea, diagnosticul de SPW este deja stabilit.

Înțelegerea etiologiei genetice particulare a pacienților cu SPW este esențială pentru consilierea genetică adecvată a familiilor afectate. Defectul genetic care produce SPW este corelat cu evaluarea riscului de recurență (11).

Defectele de amprentare sunt cauze rare, dar semnificative, de SPW. Pacienții cu defect de amprentare au aparent cromozom 15 normal, de origine maternă și paternă, dar prezintă metilare ADN aberantă a promotorului SNRPN. În consilierea pacienților cu acest defect, riscul de recurență este de până la 50%, deoarece mutația este probabil dominantă și a avut loc în linia germinală a bunicii paternă.

ne (12), iar cei fără deleție a centrului de amprentare ar fi de așteptat să aibă un risc mai mic.

Disomia uniparentală maternă a cromozomului 15 este a doua cauză de PWS și prezintă, de asemenea, metilare aberantă frecvent de novo. Această etiologie are o recurență < 1% (2).

CONCLUZII

Este important de menționat faptul că un diagnostic precis al PWS și o abordare multidiscipli-

nară timpurie sunt esențiale pentru gestionarea eficientă pe termen lung, pentru prevenirea complicațiilor și pentru îmbunătățirea calității vieții. Baza genetică a acestor tulburări rare diferă, dar MS-MLPA este o metodă simplă, rapidă și utilă pentru identificarea majorității cazurilor de PWS.