

# Expressão Génica de RNA em doentes obesos e com Síndrome de Prader-Willi

Pinto MC<sup>1,2</sup>, Moya R<sup>3</sup>, Magalhães-Faria R<sup>4</sup>, Castro C<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Especialista em Genética Médica; PhD Genética Molecular. Genética Humana. Faculdade de Medicina de Lisboa;

<sup>2</sup> Research Fellow. Departamento de Endocrinologia e Metabolismo. Divisão de Biologia Molecular. Universidade de Miami. EUA (USA)

<sup>3</sup> Doutorando. Departamento de Biologia Celular e Molecular. Universidade de Coimbra;

<sup>4</sup> Chefe de Serviço. Serviço de Endocrinologia. Hospital Curry Cabral, Lisboa;

<sup>5</sup> Nutricionista Graduada. Instituto Superior de Ciências do Sul. Caparica.

## Correspondência:

Professora Doutora Maria Cristina Rosamond Pinto › Centro de Genética Humana Rua Amílcar Cabral, N.º.21 – R/C “H” › 1750-018 Lisboa  
E-mail: [genetica\\_medica@hotmail.com](mailto:genetica_medica@hotmail.com) › Telefone: + 351967328084

## RESUMO

A Síndrome de Prader-Willi, caracterizada por hipotonia infantil, hipogonadismo, atraso mental, e obesidade infantil na sequência da hiperfagia, e a obesidade não síndrómica estão associadas a doenças cardiovasculares. A cardiomiopatia hipertrófica e outras alterações cardíacas são causadas por mutações em genes com expressão preferencial no tecido cardíaco. O objectivo do estudo foi o recurso a técnicas moleculares para uma triagem rápida e precoce da patologia cardíaca. A partir do RNA do sangue e do ADN extraído dos leucócitos os autores recorreram a sondas correspondentes às mutações génicas para a amplificação e sequenciação directa do RNA. Foram detetadas mutações genotípicas na proteína ligante da miosina cardíaca. Conclui-se pela aplicação da tecnologia RNA visando o futuro equacionamento genético e clínico da patologia cardiovascular.

## PALAVRAS-CHAVE

Marcadores moleculares; Testes genéticos; Doença cardiovascular; Obesidade; Síndrome de Prader-Willi.

## SUMMARY

*Prader-Willi Syndrome is characterized by hypotonia, hypogonadism, mental retardation and infantile obesity as a consequence of hyperphagia. The PWS and non syndromic obesity are associated to cardiovascular disease. Hypertrophic cardiomyopathy and other cardiac disorders are caused by genetic mutations of genes with a preferential expression in the cardiac tissue. The purpose of the research was to apply molecular techniques viewing a rapid screening of cardiac implications. With blood extracted RNA and lymphocytic DNA, cDNA probes linked to the genetic mutations for amplification and direct RNA sequencing were tested. Genotypic mutations of the cardiac myosin binding protein were detected. The Authors believe that the resource to RNA technology will facilitate the genetic and clinic handling of cardiovascular diseases.*

## KEY-WORDS

*Molecular markers; Genetic tests; Cardiovascular disease; Obesity; Prader-Willi Syndrome.*

## INTRODUÇÃO

A Síndrome de Prader-Willi (PWS) é caracterizada por hipotonia infantil, problemas alimentares, hipogonadismo, mãos e pés de dimensões inferiores às normais, atraso mental, problemas de comportamento e a hiperfagia que é responsável pela obesidade, que se manifesta precocemente na infância<sup>1</sup>. Citogeneticamente traduz-se por uma deleção no braço longo do cromossoma 15 (15q11-q13), e caracteriza-se, em geral, por uma isodisomia paterna. Esta entidade sindrómica foi reconhecida como o primeiro exemplo de impressão genómica no ser humano, ou seja, exemplo da diferenciação experimental de informação genética dependente da origem parental<sup>2,3</sup>. O PWS constitui a causa mais conhecida da obesidade mórbida. A obesidade associada ao PWS parece contribuir para um elevado risco de diabetes e doenças cardiovasculares. Actualmente os indivíduos com PWS são diagnosticados mais precocemente do que se passava há alguns anos. A vida média destes doentes é mais prolongada, aumentando, desta forma, o risco de desenvolverem doenças cardiovasculares e outras alterações relacionadas com a obesidade, à medida que envelhecem. Existem casos bem documentados de doenças cardiovasculares em doentes com PWS<sup>4,5</sup>.

A doença vascular isquémica está normalmente associada à obesidade na população em geral<sup>6,7,8</sup>.

Diversos tipos de doenças cardiovasculares têm uma base genética. A triagem destas alterações revela-se de uma grande importância, visando uma abordagem pré-sintomática e aconselhamento genético precoce<sup>9,10,11</sup>. No entanto a disponibilidade de testes genéticos para as doenças cardiovasculares é limitada. A maior parte destas doenças é reconhecida na idade adulta, limitando as oportunidades para a identificação génica através da análise ou polimorfismos de restrição, por falta de membros familiares disponíveis para os testes genéticos. As razões da execução técnica dos testes são igualmente prevaletentes. Muitas doenças cardiovasculares são produzidas por várias mutações em genes extensos.

Por exemplo, a cardiomiopatia hipertrófica é provocada por cerca de 200 mutações em cerca de 10 genes codificantes, de proteínas do sarcómero. A dilatação cardiomiopática associa-se

a mutações em 17 genes distintos<sup>12,13</sup>. Os testes génicos usados têm implicado a sequenciação generalizada dos exões a partir da amplificação genómica do ADN linfocitário ou a desnaturação por cromatografia líquida de alta pressão (DHPLC) à qual se segue a sequenciação generalizada dos exões anormais<sup>14,15</sup>.

A sequenciação do ARNm mensageiro (mRNA) codificado pelos genes inerentes às doenças cardiovasculares revela-se uma alternativa válida<sup>16</sup>. Dado que o RNAm é processado com a eliminação da maioria das sequências não codificantes, a quantidade do material genético disponível para os testes permite uma análise eficaz por sequência directa.

Os autores descrevem a incorporação da tecnologia do RNA purificado num método de triagem génica que permite a amplificação de RNA e a sequência directa de alguns dos genes associados a patologia cardiovascular presente nos obesos em geral e nos obesos PWS.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudaram-se doentes obesos e com PWS, conforme as normas éticas vigentes para estudos experimentais congéneres, tendo sido obtido o consentimento para a doação de sangue visando os testes genéticos. Os proposita que aderiram ao estudo foram seleccionados segundo correlação genótipo/fenótipo, entre doentes PWS e obesos seguidos nas consultas de Endocrinologia. Estudaram-se 8 doentes com PWS (6 homens e 2 mulheres); idades médias (DP)=23,5±10,5 anos, limites etários=10 a 48 anos; Índice Médio da Massa Corporal (IMC)=35,2±10,5 e 10 indivíduos obesos não sindrómicos (2 homens e 8 mulheres) com obesidade de etiologia não determinada; idade média (DP)=32,0±12,0 anos; limites etários 12-53 anos; IMC=34,6±5,7 (termo comparativo). Todos os proposita tinham o diagnóstico ecográfico de hipertrofia cardíaca, tendo sido submetidos a par do perfil químico analítico a estudos endocrinológicos exaustivos incluindo insulina plasmática, glicemias pós-prandiais, peptídeo C, cortisol, doseamento das hormonas sexuais, tiroideias e níveis de leptina. O diagnóstico clínico de PWS foi geneticamente confirmado por estudos cromossómicos com FISH, estudos de metilação do ADN e análise microsatelitizada cromossómica 15q11-q13; os

indivíduos obesos não sindrômicos tinham os testes citogenéticos normais. Os doentes PWS não tinham sido submetidos à terapia com hormona de crescimento.

O ADN genómico foi preparado a partir de linfócitos periféricos<sup>17</sup> com o kit de isolamento da *Genra Systems*, aplicando-se os respectivos protocolos. Obteve-se ARN a partir de 3 ml do sangue periférico total colectado em tubos Paxgene (Quiagen Inc). As amostras de sangue foram armazenadas a 4° C e processadas nas 96 h seguintes, de acordo com as especificações do fabricante. Efectuou-se a transcrição reversa com o aparelho de Transcrição Rtase da *Roche Applied Science*, recorrendo-se a hexâmeros aleatórios como “primers” para cada uma das reacções enzimáticas. Seguiram-se as reacções PCR com templató Rtase, “primers” específicos, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, betaína e tampão q.b., para 1 unidade de Taq polimerase. O dimensionamento dos “primers” foi efectuado com *software* da *Invitrogene Corp*.

Após a purificação dos produtos PCR (protocolos da Quiagen Inc), processou-se a respectiva quantificação por geles electroforéticos e recurso a reagentes da Applied Biosystems (ABI) em reacções cíclicas de sequenciação. Os produtos foram subsequentemente analisados mediante o Analisador Génico da ABI e respectivo *software*. Recorreu-se, igualmente, à análise de concordância da expressão alélica para a definição dos genótipos RNA/ADN e detecção de SNP's (single

nucleotide polymorphism) comuns. A fim de se detectar mutações do gene da proteína C ligante da miosina cardíaca (MYBPC3), recorreu-se a um SNP bialélico no exão 31<sup>18</sup>.

## RESULTADOS

O princípio geral da leitura das sequências génicas neste estudo está delineado na Fig. 1, com a representação dos SNP's e combinações haplotípicas possíveis.

As mutações MYBPC3, subjacentes a cerca de 50% das mutações associadas à Cardiomiopatia Hipertrófica, encontravam-se presentes em todos os doente PWS estudados. Com a amplificação MYBPC3 a partir do RNA com recurso a “primers” específicos para a análise SNP foi possível detectar 3 mutações genotípicas no exão 31 (Fig. 2).

O varrimento (*scanning*) das sequências da proteína ligante da miosina cardíaca (sequência nucleotídica MYBPC3=1-3825 pb (Database: <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fagi?>), recorrendo a três “primers” oligonucleotídicos de 23pb, 21pb e 20 pb, comprovou o estado de heterozigotia nos indivíduos obesos não sindrômicos (Fig. 3). No entanto em quatro destes obesos estudados (resultados não apresentados) o padrão não era conclusivo, indicando, eventualmente a existência de outra variante de cardiopatia a par da CMH a ser detectada por sequências génicas distintas e correspondentes SNP's.

O estudo da concordância genótipo RNA/ADN visando a detecção da mutação alélica bem como dos alelos selvagens demonstrou que a mutação detectada na análise inicial do RNA também se encontrava presente na correspondente sequência ADN. A Fig. 4 apresenta a concordância genotípica em dois indivíduos PWS estudados. Idêntica concordância (resultados não apresentados) foi observada nos indivíduos obesos não sindrômicos, à excepção dos já referidos quatro obesos com padrão de sequenciação RNA não conclusivo.

FIGURA 1. Representação diagramática geral dos SNP's, haplotipos e SNP's marcadores



a. Sequências oligonucleotídicas curtas correspondentes à mesma região cromossômica em indivíduos diferentes. A maior parte das sequências ADN é idêntica, mas evidenciam-se três bases onde ocorre a mutação. Cada SNP tem dois alelos possíveis; o 1° SNP no painel a tem os alelos C e T.

b. Um haplótipo é feito de uma combinação alélica específica de SNP's adjacentes. O diagrama apresenta os genótipos possíveis para os SNP's ao longo de uma extensão de centenas de pares de bases de ADN. Só estão representadas as bases com mutações, incluindo os 3 SNP's apresentados no painel a.

c. A genotipagem de 3 SNP's marcadores é suficiente para a identificação dos 4 referidos haplótipos.

Adaptado do International HapMap Project – sendo o 1°. Autor deste estudo participante no projecto

FIGURA 2. Sequenciação RNA em 8 doentes PWS, (exão 31 gene MYBPC3) com detecção de mutações genotípicas indicadas pela substituição das respectivas bases nucleotídicas: T/T (timidina/timidina); T/C (timidina/citosina); C/C (citosina/citosina). Código de cores: T: Cor encarnada ; G: Azul escuro , C; Azul claro; A : Verde.

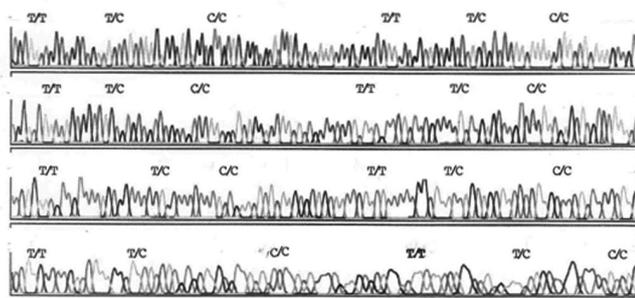


FIGURA 3. Sequenciação RNA em 6 doentes obesos. Os traçados não reproduzem a extensão da sequência génica e foram agregados para evidenciarem as mutações da substituição das bases. Encontram-se realçadas as 3 mutações genotípicas (exão 31 – MYBPC3) Código de cores: T: Cor encarnada; G: Azul escuro, C; Azul claro; A : Verde.

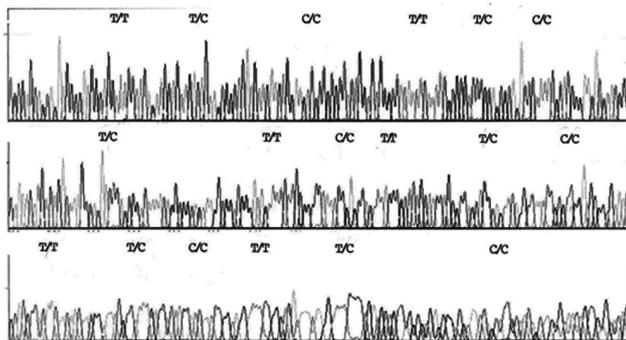
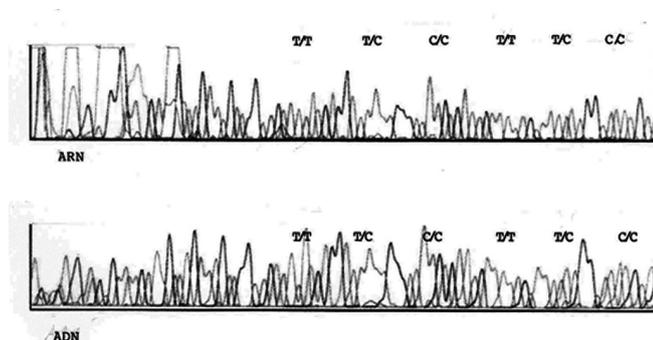


FIGURA 4. Sequenciação ARN e ADN apresentando a concordância genotípica ARN/ADN observada em dois indivíduos PWS estudados. Código de cores: T: Cor encarnada; G: Azul escuro, C; Azul claro; A: Verde.



## DISCUSSÃO

As doenças mais prevalentes como as doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e outras são causadas pela combinação alélica de múltiplos factores genéticos e ambientais<sup>19</sup>. A descoberta destes factores genéticos tem vindo a modificar a percepção da patogénese, diagnóstico e tratamento das doenças humanas. Os estudos de ligação (polimorfismos de restrição génica) nem sempre localizam as variantes genéticas que afectam as doenças ditas complexas, dado que cada variante individual mais prevalente contribui de uma forma relativa para o risco patológico<sup>20,21</sup>.

Um elevado número de estudos de associação entre uma variante genética específica e a doença, permite comparar grupos de indivíduos afectados com grupos de controlos não afectados<sup>22</sup>. Uma das abordagens para efectuar estudos de associação implica testar cada variante causal putativo para a correlação com a doença, e, designa-se de abordagem directa<sup>20</sup>. O escrutínio do genoma completo de inúmeros doentes para as associações patológicas incorreria em custos elevados para a identificação de genes variantes candidatos. Actualmente, este tipo de método directo limita-se à sequenciação de partes de genes candidatos ou seleccionados com base numa hipótese funcional ou genética pré-existente. Uma tecnologia alternativa, designada de metodologia indirecta, recorre a um conjunto de sequências variantes no genoma como marcadores genéticos para detectar a associação entre uma determinada região genómica e a doença, quer os marcadores tenham ou não efeitos funcionais. Desta for-

ma, a definição das variantes causativas seria limitada para regiões génicas demonstrando associação com a doença ou doenças afins. A segunda metodologia permite definir a maior parte das sequências humanas variantes, não só porque 90% da variação das sequências génicas incluídas deve-se a variantes comuns<sup>23</sup>, como pelo facto de essas mesmas variantes resultarem de eventos mutacionais únicos associados a variantes génicas adjacentes presentes no cromossoma ancestral em que a dita mutação terá ocorrido. Deste modo, a metodologia indirecta permite estudar variantes em genes candidatos, regiões cromossomáticas ou até regiões presentes em todo o genoma humano. Esta abordagem indirecta utiliza informação de um pequeno número de variantes que englobam a maioria dos padrões comuns de alteração génica, de forma a que cada região ou gene possa ser testado para a associação com uma ou mais doenças com uma elevada probabilidade de que essa associação será detectada caso exista efectivamente.

Duas cópias do genoma humano diferem uma da outra por cerca de 0,1% de locais nucleotídicos. O tipo de polimorfismo mais comum – o SNP – é a diferença entre cromossomas na respectiva base nucleotídica presente num determinado local de uma sequência de ADN. A presença dos alelos de um dado SNP é determinada pela genotipagem de uma amostra de ADN genómico. De acordo com as modernas tecnologias, como a usada no presente trabalho os ARNs podem ser rapidamente detectados no sangue periférico sem passar por estádios de purificação genética ou culturas celulares, podendo ser usado como material primário para uma triagem rápida e de alta definição de sequências codificantes e mutações “splicing” em genes associados com doenças cardiovasculares como é o caso do gene MYBPC3. A sequenciação do RNA tem a vantagem de revelar significativas mutações funcionais que poderiam passar despercebidas com a análise funcional do ADN genómico. As sequências de “splicing” ou material excisado, são sequências degenerativas e como tal não identificáveis de uma forma clara nos dados genómicos. O recurso ao RNA do sangue identifica mutações com menos ónus financeiro relativamente à sequenciação do ADN, sendo, igualmente, de execução mais rápida. O RNA

permite obter resultados de uma ou várias amostras de sangue enquanto que os ensaios com ADN requerem o uso de amostras múltiplas e o processamento simultâneo de controlos. A transcrição ectópica tem sido detectada para um grande número de genes<sup>16</sup> com expressão intercalar do gene da cadeia pesada da miosina beta (MyH7); da troponina cardíaca T (TNNT2) e da proteína – C ligante da miosina específica do miocárdio (MYBPC3)<sup>17</sup>.

O número de doentes ora apresentado não permite uma determinação quantitativa específica. A detecção de mutação com frequências semelhantes na PWS e na síndrome metabólica da obesidade advoga o uso de testes de ARN que poderão obter sensibilidades comparativas aos métodos clássicos DHPLC e outros. Recentemente, outros investigadores<sup>10</sup> obtiveram resultados com valor prognóstico e resposta terapêutica na cardiopatia LQTS (Long QT Syndrome), baseada na mutação de um *locus* génico. Na HCM o risco de arritmias e morte súbita pode ser influenciado pelo genótipo<sup>24</sup>. Em todas estas situações o aporte genético poderá ser fundamental para o diagnóstico clínico essencialmente no estado pré-sintomático ou em doentes com heredogramas familiares negativos<sup>25,26</sup>.

Em Portugal existem Laboratórios de Investigação com equipamento altamente sofisticado e técnicos superiores especializados na metodologia do RNA. A extrapolação desta tecnologia para os Laboratórios Clínicos permite antecipar um método de diagnóstico preciso, sem custos altamente empolados. Tornam-se necessários estudos mais amplos contemplando a triagem de doenças cardiovasculares na síndrome metabólica da obesidade, com a sua expressão extrema na PWS, não só para aprofundar a informação dos repositórios genotípicos destas patologias, como para uma melhor compreensão do binómio genótipo-fenótipo.

#### AGRADECIMENTOS:

Os Autores agradecem À Dra. Helena Cabelleira dos quadros superiores administrativos da Faculdade de Medicina de Lisboa, a ajuda na preparação deste manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bittel DC, Buttler MG. Prader-Willi syndrome. Clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Exper Rev Mol Med* 2005; 7: 1-20.
2. Nicholls RD, Knoll JL, Buttler MG et al. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi Syndrome. *Nature* 1989; 342: 281-285.
3. Cassidy SB, Oykens E, Williams CA. Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet* 2000; 97: 136-146.
4. Lamb AS, Jhonson WM. Premature coronary artery atherosclerosis in a patient with Prader-Willi Syndrome. *Am J Med Genet* 1987; 28: 873-880.
5. Page SR, Nussey SS, Haywood GA et al. Premature coronary artery disease and the Prader-Willi Syndrome. *Post Grad Med J* 1990; 66: 232-234.
7. Kuromaru T, Kohno H, Ueyama N, Hassan HM et al. Long term perspective study of body composition and lipid profiles during and after growth hormone treatment in children with GH deficiency; Gender specific metabolic effects. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3890-3896.
8. l'Allemand D, Schlumpf M, Torresani T et al. Insulin secretion before and under 3 years of growth hormone therapy in Prader-Willi Syndrome (abstract). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: 171.
9. Arking DE, Chugh SS, Chakravarti A et al. Genomics in sudden cardiac death. *Cir Res* 2004; 94: 712-723.
10. Napolitano C, Priori S, Schwartz PJ et al. Genetic testing in the long QT Syndrome. *JAMA* 2005; 294: 2975-2980.
11. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001; 104: 569-580.
12. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 969-981.
13. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy; from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001; 104: 557-567.
14. Van Driest SL, Ellsworth EG, Omman SR et al. Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an out patient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 108: 445-451.
15. Halliday DJ, Hutchinson S, Lorie L et al. Twelve novel FBN1 mutations in Marfan Syndrome and related phenotypes test the feasibility of FBN1 mutation testing in clinical practice. *J Med Genet* 2002; 39: 589-593.
16. Sarkar G, Sommer SS. Access to a messenger RNA sequence or its protein products is not limited by time or species specificity. *Science* 1989; 244: 331-334.
17. Rosenzweig A, Weatkins H, Hwang DS et al. Preclinical diagnosis of familiar hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *N Engl J Med* 1991; 325: 1753-1760.
18. Richard P, Chanon P, Carier L et al. Hypertrophic cardiomyopathy : distribution of disease genes, spectrum of mutations and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003; 107: 227-223.
19. King RA, Rotter JL, Motulsky AC. The Genetic Basis of Common Diseases. Vol 20 (eds. Motulsky et al). Oxford Univ Press. Oxford, 1992.
20. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; 405: 847-856.
21. Botstein D, Rish N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past success for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genet* 2003; 33(suppl): 228-237.
23. Rish N, Muikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 223: 1516-1517.
24. Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2499-2506.
25. Anderson ME, Al-Khatib SM et al. Cardiac repolarization: current knowledge, critical gaps and new approaches to drug development and patient management. *Am Heart J* 2002; 144: 769-78.
26. Watkin H, Thierfelder L, Hwang DS et al. Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations. *J Clin Invest* 1992; 90: 1666-1671.