

ALINE GUIMARÃES DE FARIA BASTIANELLI

Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase digital em gotas e do sequenciamento paralelo em larga escala no diagnóstico genético da Síndrome de McCune-Albright

São Paulo

2023

ALINE GUIMARÃES DE FARIA BASTIANELLI

Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase digital em gotas e do sequenciamento paralelo em larga escala no diagnóstico genético da Síndrome de McCune-Albright

Versão Corrigida

(Versão original se encontra disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa de Pós-graduação quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Nahime Brito

Co-orientadora: Prof. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bastianelli, Aline Guimarães de Faria
Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase
digital em gotas e do sequenciamento paralelo em
larga escala no diagnóstico genético da Síndrome de
McCune-Albright / Aline Guimarães de Faria
Bastianelli. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientador: Vinicius Nahime de Brito.
Coorientadora: Nadja Cristhina de Souza Pinto.

Descritores: 1.Síndrome de McCune-Albright
2.Displasia fibrosa polioestótica 3.Diagnóstico
genético 4.Puberdade precoce. 5.Reação em cadeia da
polimerase digital em gotas 6.Sequenciamento
paralelo em larga escala

USP/FM/DBD-517/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A *Deus*, por ser luz no meu caminho e nunca me desamparar.

Aos meus pais, Roberto e Graça, por me mostrarem que o conhecimento é o bem mais valioso que pode se ter.

À minha irmã Andréa, fonte de amor e apoio incondicional.

Ao meu marido Lucas, por sempre acreditar no meu potencial, pelo amor e companheirismo nos últimos 9 anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a vida. A fé que eu tenho em Ti é tanta, que sei que por mais tortuoso ou íngreme seja meu caminho, tudo dará certo no final. Por mais que eu seja indigna, sou grata por sentir Seu amor e Sua ação em minha vida.

Ao meu pai, Roberto. Painho, você sempre confiou em mim mais do que eu mesma. O senhor sempre foi uma fortaleza para mim, e sei que para qualquer coisa que eu precisar você estará ao meu lado. Obrigada por se fazer presente em minha vida, por me mostrar o valor do estudo e da dedicação ao que nos propomos a fazer. Amo você.

À minha mãe, Graça. Obrigada pelo zelo, cuidado e amor dispensados. Eu sei que para você não foi fácil a minha ida para São Paulo, e mesmo assim, sempre me apoiou, torceu e vibrou com cada passo dado. Você nunca mediu esforços para nos proporcionar seu melhor. Eu te amo, mainha.

À minha irmã Andréa, minha melhor amiga. Com você posso falar qualquer coisa, seja um anseio ou qualquer bobagem. Você tem um pedaço do meu coração, e eu sei que tenho um pedaço do seu aqui comigo. Você é minha saudade diária.

Ao meu marido Lucas, companheiro de vida. Sorte a minha de ter você ao meu lado. Você é exemplo de dedicação, inteligência, retidão e altruísmo. Ao longo desses anos, conheci poucos médicos como você, sua doação ao próximo é bonita de se ver. Seu exemplo me faz querer ser melhor a cada dia. Te amo tanto que dói.

Ao meu orientador, Dr. Vinícius. Obrigada pelo incentivo, apoio, carinho, otimismo e compreensão. Todos que te conhecem são unânimes em dizer o quão especial você é. Para mim, você é um exemplo de pesquisador, médico e amigo. Sem dúvidas, uma fonte de inspiração. Obrigada ter me aceito e guiado com maestria nesse caminho da pesquisa. Minha evolução é graças ao senhor.

À Dra. Nadja Pinto por abrir as portas do Instituto de Química e disponibilizar as máquinas e insumos para uso da PCR digital. Sem sua ajuda este estudo não teria prosseguido.

Às Dras. Ana Claudia e Berenice. Fico maravilhada com o seu olhar clínico aguçado e sensibilidade, capazes de formular hipóteses geniais, e depois conduzir estudos relevantes em busca de respostas. “Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

À Lu Montenegro, por ser a pessoa que primeiro me ajudou a manipular as máquinas da PCR digital. Muito obrigada pela disponibilidade, amizade e conversas do dia-a-dia.

Aos amigos da endocrinologia e da pós-graduação: Carlos Seraphim, Flávia Tinano, Aline Bastos, Larissa Baracho, Ludmila Pedrosa e Thaís Castanheira. Obrigada pelas confidências, conversas, desabafos e apoio nessa caminhada. Foi gratificante dividir as dores e as delícias do mundo da pesquisa com vocês.

Ao Dr. Alex Jorge, pelos ensinamentos sobre sequenciamento paralelo em larga escala. Às Dras. Ana Canton, Regina Martin, Cândida Fragoso e Larissa Garcia. Vocês são inspiração e exemplo de dedicação ao paciente e conhecimento. Obrigada pelos ensinamentos.

Ao Dr. Jesús Argente pela contribuição com este estudo.

A toda minha família, que, mesmo distante fisicamente, torcem pelo meu sucesso. À minha avó Cristiana (*in memorian*), por ser modelo de mulher destemida e à frente do seu tempo, que sempre lutou por sua família e ideais.

À família do meu marido. Em nosso primeiro contato me senti acolhida, e logo depois, muito amada. Obrigada por me fazerem sentir que tenho o mesmo sangue que vocês.

Aos colegas e funcionários do LIM/42 por toda a ajuda e gentileza dispensadas, especialmente Miriam, Rosâgele, Cidinha, Nilda (*in memorian*), Mariana Funari e Val.

À Dra. Claudia Cozer, por ter sido a primeira pessoa que me incentivou a me inscrever no doutorado. Obrigada pelo apoio e compreensão sempre.

A toda a equipe do consultório. Silmara, Isa, Rosi, Evandra, Janaina, Rô, Fernanda, Lu e Ester. Obrigada pelo trabalho conjunto, incentivo, conversas e saber que posso sempre contar com vocês. E claro que vocês podem contar comigo!

A todos os pacientes e familiares que se disponibilizaram a colaborar com o estudo. Sem vocês nada seria possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

- João Guimarães Rosa. Grande Sertão: Veredas.
Rio de Janeiro: Nova Aguilar, 1994.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Síndrome de McCune-Albright.....	22
1.2. Receptores 7-transmembrana.....	22
1.3. Proteína G.....	23
1.4. Gene <i>GNAS</i> e a SMA.....	23
1.5. Mosaicismo	26
1.6. Manifestações Clínicas da SMA.....	27
1.6.1. Manchas <i>café-au-lait</i>	27
1.6.2. Displasia Fibrosa Óssea (DFO).....	27
1.6.3. Hiperfunções Hormonais	29
1.6.3.1. Puberdade Precoce Periférica (PPP)	29
1.6.3.2. Tireoidopatias.....	30
1.6.3.3. Perda renal de fosfato	31
1.6.3.4. Excesso de GH	31
1.6.3.5. Síndrome de Cushing (Hiper cortisolismo)	32
1.7. Aspectos Terapêuticos da SMA.....	33
1.7.1. Displasia fibrosa óssea (DFO).....	33
1.7.2. Puberdade precoce periférica	35
1.7.3. Outras hiperfunções endócrinas.....	36
1.8. Diagnóstico Clínico da SMA.....	38
1.9. Diagnóstico genético da SMA	38

1.10.	Princípios das metodologias mais sensíveis no diagnóstico de mutações somáticas.....	42
1.10.1.	Sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE)	42
1.10.2.	PCR digital em gotas.....	44
2.	JUSTIFICATIVA	46
3.	OBJETIVOS.....	47
3.1.	Objetivos Primários	47
3.2.	Objetivos secundários	47
4.	METODOLOGIA	Erro! Indicador não definido.
4.1.	Tipo de estudo	48
4.2.	Considerações éticas	48
4.3.	Pacientes estudados	48
4.3.1.	Critérios de inclusão	49
4.3.2.	Coleta de dados	49
4.4.	Avaliação Genética	50
4.4.1.	Extração de DNA.....	50
4.4.2.	Detecção da mutação p.R201H e p.R201C pela ddPCR	51
4.4.2.1.	Validação do método da ddPCR	52
4.4.2.1.1.	Cálculo da taxa de falso positivo (TFP).....	53
4.4.2.1.2.	Cálculo LoB e LoD.....	56
4.4.3.	Detecção da mutação p.R201H e p.R201C por SPLE	56
4.5.	Análise estatística	57
5.	RESULTADOS	59
5.1.	Caracterização clínica dos pacientes portadores SMA e portadores de uma característica clínica da SMA.....	59
5.2.	Características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de PPP	64
5.3.	Características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMA e hipertireoidismo	68

5.4. Características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMA e acromegalia	69
5.5. Características clínico-laboratoriais dos pacientes portadores de DFO	69
5.6. Análise genética por ddPCR	70
5.7. Análise genética por SPLE.....	79
5.7.1. Caracterização clínica dos pacientes estudados por SPLE	79
5.7.2. Análise genética por SPLE	81
5.8. Comparação entre os resultados obtidos por SPLE e ddPCR	83
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

μL	Microlitro
6-FAM	6- <i>carboxyfluorescein</i> ; fluoróforo que marca alelo mutado
7TM	Receptores 7 transmembrana
A	Adenosina
A/B	Transcrito alternativo do gene <i>GNAS</i> , também conhecido como 1A
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
Arg	Arginina
BAM	Binary Alignment/Map
C	Citosina
Ca^{2+}	Íon de cálcio
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
castPCR	PCR Taqman alelo-específico competitivo
CEMOs	Células do estroma da medula óssea
Cf-DNA	<i>Cellfree- DNA</i>
Cys	Cisteína
ddPCR	Reação em cadeia da polimerase digital em gotas
DFO	Displasia fibrosa óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
dPCR	Reação em cadeia da polimerase digital
EEA	Estatura alvo
ECLIA	ensaios de eletroquimioluminescência
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF-23	<i>Fibroblast growth fator 23</i>
FIA	Fluoroimunoensaios
FSH	Hormônio folículo-estimulante
G	Guanina
GDP	Difosfato de guanosina
GH	Hormônio do crescimento
Gly	Glicina
GMP-c	Monofosfato cíclico de guanosina

GNA-AS1	GNAS antisense RNA 1; transcrito <i>antisense</i> alternativo do gene <i>GNAS</i>
GNAS	<i>Guanine nucleotide binding protein alpha stimulatory</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GRCh37/hg19	<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Família de enzimas hidrolases que hidrolisam o GTP
G α_{12}	Subunidade alfa da proteína G Alfa 12
G α_i	Subunidade alfa da proteína G inibitória da adenilato-ciclase
G α_q	Subunidade alfa da proteína G estimulatória da fosfolipase C
G α_s	Subunidade alfa da proteína G estimulatória
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEX	<i>Hexachlorofluorescein</i> ; fluoróforo que marca alelo selvagem
His	Histidina
IC	Idade cronológica
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IGF-1	Fator de crescimento tipo insulina 1
IGV	<i>Integrative genome viewer</i>
IL-6	Interleucina-6
IO	Idade óssea
IQ	Intervalo interquartil
K ⁺	Íon de potássio
Leu	Leucina
LH	Hormônio luteinizante
LIM 42	Laboratório de investigação médica
LoB	<i>Limit of blanc</i>
LoD	<i>Limit of detection</i>
Lys	Lisina
M	Molar
m ²	Metro quadrado
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar

Na ⁺	Íon de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NESP-55	<i>Neuroendocrine secretory protein 55</i> ; transcrito alternativo do gene <i>GNAS</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NTC	<i>No template control</i>
°C	Grau Celsius
p	Valor-p ou probabilidade de significância
p.R201C	Mutação de ponto no códon 201 que leva a troca de uma arginina por cisteína
p.R201H	Mutação de ponto no códon 201 que leva a troca de uma arginina por histidina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg/ml	Picogramas por ml
pH	Escala numérica adimensional utilizada para especificar a acidez ou basicidade de uma solução aquosa
PNA	<i>Peptidic nucleic acids</i>
PP	Puberdade precoce
PPC	Puberdade precoce central
PPP	Puberdade precoce periférica
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
R201	Códon 201 do gene <i>GNAS</i> , composto pela Arginina
RANK-L	<i>Receptor activator of nuclear factor-kappa beta ligand</i>
RFP	Razão de falso positivo
SELA	Laboratório de sequenciamento em larga escala
Ser	Serina
SERM	Modulador seletivo do receptor de estrogênio
SMA	Síndrome de McCune-Albright
SPLE	Sequenciamento paralelo em larga escala
T	Timina
TFP	Taxa de falso positivo
Tris-HCl	Tris-hidrocloreto
UI/L	Unidades internacionais por litro

VCF	Arquivo “ <i>variant call format</i> ” contendo dados do sequenciamento paralelo em larga escala
WES	Sequenciamento exômico global, <i>whole-exome sequencing</i>
WT	<i>Wild-type</i>
XL α s	<i>Extra-large</i> Gas; transcrito alternativo do gene <i>GNAS</i>
α -MSH	Hormônio alfa-melanócito estimulante
Δ IO-IC	Avanço de idade óssea
Δ FP	Média de moléculas falso-positivas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Múltiplos transcritos do gene <i>GNAS</i>	24
Figura 2- Sinalização da Gas na SMA.....	26
Figura 3 - Princípios da PCR digital.....	45
Figura 4 - Cálculo de taxa de falso positivos para o ensaio p.R201C.	54
Figura 5 - Formação de gotas das 30 amostras WT para cálculo da taxa de falso-positivos do ensaio p.R201C.....	54
Figura 6 - Cálculo de taxa de falso positivos para o ensaio p.R201H.	55
Figura 7 - Formação de gotas das 30 amostras WT para cálculo da taxa de falso-positivos do ensaio p.R201H.....	55
Figura 8- Distribuição das características clínicas e procedência dos pacientes incluídos no estudo.	59
Figura 9 - Distribuição das hiperfunções hormonais nos pacientes portadores da tríade clássica da Síndrome de McCune-Albright	62
Figura 10 - Subgrupos de pacientes com 2 características clínicas Síndrome de McCune-Albright.....	63
Figura 11 - Grupo de pacientes portadores de 1 característica clínica da Síndrome de McCune-Albright.....	64
Figura 12 - Representação de gotas do ensaio ddPCR para a mutação p.R201H da paciente 4.....	71
Figura 13 - Análise dos resíduos padronizados ajustados da associação entre o resultado do teste genético positivo e o número de características clínicas dos pacientes.....	72
Figura 14 - Distribuição dos dados da abundância fracional entre os grupos com 1, 2 e 3 características clínicas da SMA obtidos na ddPCR.....	74
Figura 15 - Análise dos resíduos padronizados ajustados da associação entre o resultado do teste genético positivo e os subgrupos de associação de 2 características clínicas	75
Figura 16 – Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201C) da paciente 46, portadora de PPP isolada.....	76
Figura 17 - Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201H) da paciente 58, portadora de PPP isolada.....	77

Figura 18 - Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201H) da paciente 59, portadora de PPP isolada.....	78
Figura 19 - Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201H) da paciente 62, portadora de DFO.....	79
Figura 20- Representação de número de testes positivos ou negativos de acordo com a metodologia	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência das principais características clínicas na coorte do NIH de pacientes com displasia fibrosa/ Síndrome de McCune-Albright.....	33
Tabela 2 - Taxa de detecção da mutação no <i>GNAS</i> por diferentes metodologias para o diagnóstico genético da SMA.	42
Tabela 3 - Características clínicas individuais dos pacientes incluídos no estudo....	60
Tabela 4 - Características clínico-laboratoriais de pacientes com PPP associadas ou não a SMA no início do diagnóstico.	66
Tabela 5 - Características clínicas de pacientes com PPP associada ou não à SMA durante e após tratamento	68
Tabela 6 - Pacientes com teste genético positivo pela ddPCR e suas respectivas abundâncias fracionais.....	73
Tabela 7 - Características clínicas dos pacientes estudados por SPLE.	81
Tabela 8 - Mutações identificadas no gene <i>GNAS</i> pelo SPLE e suas respectivas abundâncias fracionais.....	83
Tabela 9 - Pacientes com mutação no <i>GNAS</i> identificadas por SLPE e/ou ddPCR e suas respectivas abundâncias fracionais.	85

LISTA DE ANEXOS

Anexo A- Parecer consubstanciado do comitê de ética	97
Anexo B- Termo de consentimento livre e esclarecido	100
Anexo C- Sondas marcadas utilizadas na ddPCR para detecção da mutação p.R201C/H.....	104
Anexo D- Cálculo do LoB e LoD a partir da contagem média de falsos-positivos..	104
Anexo E- Mutações analisadas no IGV	105

RESUMO

Bastianelli AGF. Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase digital em gotas e do sequenciamento paralelo em larga escala no diagnóstico genético da Síndrome de McCune-Albright [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Contexto: A síndrome de McCune-Albright (SMA) é uma doença rara caracterizada por displasia fibrosa óssea (DFO), manchas *café-au-lait* e hiperfunções endócrinas, causada por mutação ativadora pós-zigótica no códon 201 do gene *GNAS*, que codifica a subunidade alfa da proteína G estimulatória (G α). As mutações *missenses* mais comuns (95% dos casos) decorrem da substituição de uma arginina por cisteína ou histidina (p.R201C/H). As mutações pós-zigóticas no gene *GNAS* são adquiridas em estágios precoces da embriogênese, resultando em um estado de mosaicismosomático. Devido a essa particularidade, o número de células afetadas varia dependendo do momento em que a mutação ocorre. Portanto, a SMA apresenta um amplo espectro fenotípico, que pode acarretar subdiagnóstico em quadros clínicos mais brandos. Conseqüentemente, técnicas que permitam a identificação da mutação no DNA de sangue periférico são altamente desejáveis, pois evitariam procedimentos invasivos para obtenção de amostras de tecidos, além da confirmação do defeito genético representar um grande avanço no diagnóstico, acompanhamento e manejo terapêutico dos pacientes portadores da SMA. Neste contexto, as técnicas de *droplet digital PCR* (ddPCR) e de sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE), emergiram como metodologias mais sensíveis para a identificação de mutações em mosaico. **Objetivos:** Pesquisar a mutação p.R201C/H no gene *GNAS* em DNA de leucócitos periféricos pela técnica de ddPCR. Comparar a técnica da ddPCR com o SPLE nos pacientes que foram submetidos ao painel de genes relacionados às endocrinopatias (que inclui o *GNAS*) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP ou sequenciamento exômico global (WES). **Métodos:** A caracterização clínica e genética de 64 pacientes foi realizada, sendo 53 pacientes de uma coorte brasileira e 11 pacientes de uma coorte espanhola. Foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico da SMA (portadores de pelo menos duas características clínicas da SMA) e pacientes com 1 característica clínica da SMA (puberdade precoce periférica - PPP ou DFO). Todos os pacientes foram submetidos à análise genética por ddPCR e 35 dos 64 pacientes por SPLE. **Resultados:** A tríade clínica da SMA foi identificada em 34,4% (22/64) dos pacientes, enquanto 2 e 1 características clínicas estavam presentes em 34,4% (22/64) e 31,2% (20/64) dos pacientes, respectivamente. A PPP foi a endocrinopatia mais prevalente, presente em 59,4% dos pacientes. A ddPCR identificou a mutação p.R201C/H em 45,3% (29/64) dos pacientes, sendo 25 pacientes portadores de SMA e 4 pacientes com 1 característica clínica (3 pacientes portadores de PPP e 1 de DFO). Houve associação entre o número das características clínicas e o resultado genético positivo ($p=0,0154$). A mediana da abundância fracional detectada na ddPCR foi 0,58 (IQ 0,16; 1,7), variando de 0,1% a 14,8%. Não houve diferença entre as medianas das taxas de abundância fracional e o número de manifestações clínicas da SMA ($p=0,07$). O SPLE identificou a mutação p.R201C/H em 20% (7/35) dos pacientes, todos portadores da SMA (6 pacientes portadores da tríade clínica e 1 paciente portador de 2 características clínicas). A média da abundância fracional das mutações foi $8,7 \pm 6\%$ e variou entre 2,9% e 19%. Não houve associação entre o número de características clínicas e o resultado genético

positivo ($p=0,075$). Houve diferença significativa na proporção de resultados positivos e negativos comparando a ddPCR com o SPLE (45,3% vs 20%, $p=0,002$). Não houve diferença entre as médias das taxas de abundância fracional e o tipo de teste genético realizado ($p=0,34$). **Conclusões:** A ddPCR representou o método mais sensível na confirmação do diagnóstico genético da SMA em DNA de sangue periférico. Quanto maior o número de manifestações clínicas da SMA, maior foi a probabilidade de estabelecer o diagnóstico genético da SMA. Houve concordância entre os resultados das amostras testadas pelas duas metodologias. O diagnóstico genético da SMA foi estabelecido pela ddPCR em pacientes com apenas uma manifestação clínica da síndrome (SMA-like).

Palavras-chave: Síndrome de McCune-Albright. Displasia fibrosa polioestótica. Diagnóstico genético. Puberdade precoce. Reação em cadeia da polimerase digital em gotas. Sequenciamento paralelo em larga escala.

ABSTRACT

Bastianelli AGF. Applicability of droplet digital polymerase chain reaction and next-generation sequencing in the genetic diagnosis of McCune-Albright Syndrome [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Background: McCune-Albright Syndrome (MAS) is a rare disease characterized by bone fibrous dysplasia (FD), *café-au-lait* spots, and endocrine hyperfunctions. MAS is caused by a post-zygotic activating mutation in codon 201 of the *GNAS* gene, which encodes the alpha subunit of the stimulatory G protein (G α s). The most common missense mutations (95% of cases) result from the substitution of arginine with cysteine or histidine (p.R201C/H). Post-zygotic mutations in the *GNAS* gene are acquired in early stages of embryogenesis, resulting in a state of somatic mosaicism. Due to this particularity, the number of affected cells varies depending on when the mutation occurs. Therefore, MAS presents a broad phenotypic spectrum, which may result in underdiagnosis in milder clinical presentations. Consequently, techniques allowing the identification of the mutation in peripheral blood DNA are highly desirable, as they would avoid invasive procedures for obtaining tissue samples, and the confirmation of the genetic defect could represent a significant advance in the diagnosis, monitoring, and therapeutic management of MAS patients. In this context, droplet digital PCR (ddPCR) and next-generation sequencing (NGS) techniques have emerged as more sensitive methodologies for identifying mosaic mutations.

Objectives: To investigate the p.R201C/H mutation in the *GNAS* gene in peripheral leukocyte DNA using the ddPCR technique. Compare the ddPCR technique with NGS in patients who underwent a panel of genes related to endocrinopathies (including *GNAS*) from the Discipline of Endocrinology at the Faculty of Medicine, University of São Paulo, or whole exome sequencing (WES). **Methods:** Clinical and genetic characterization of 64 patients was performed, including 53 patients from a Brazilian cohort and 11 patients from a Spanish cohort. Patients with a clinical diagnosis of MAS (having at least two clinical features of MAS) and patients with one clinical feature of MAS (peripheral precocious puberty-PPP or FD) were included. All patients underwent genetic analysis by ddPCR, and 35 of the 64 patients by NGS.

Results: The clinical triad of MAS was identified in 34.4% (22/64) of patients, while 2 and 1 clinical features were present in 34.4% (22/64) and 31.2% (20/64) of patients, respectively. PPP was the most prevalent endocrinopathy, present in 59.4% of patients. DdPCR identified the p.R201C/H mutation in 45.3% (29/64) of patients, with 25 patients having MAS and 4 patients with one clinical feature (3 patients with PPP and 1 with FD). There was an association between the number of clinical features and positive genetic results ($p=0.0154$). The median fractional abundance detected in ddPCR was 0.58 (IQ 0.16; 1.7), ranging from 0.1% to 14.8%. There was no difference between the median fractional abundance rates and the number of MAS clinical manifestations ($p=0.07$). NGS identified the p.R201C/H mutation in 20% (7/35) of patients, all of whom had MAS (6 patients with the clinical triad and 1 patient with 2 clinical features). The mean fractional abundance of mutations was $8.7 \pm 6\%$, ranging from 2.9% to 19%. There was no association between the number of clinical features and positive molecular results ($p=0.075$). There was a significant difference in the proportion of positive and negative results comparing ddPCR with NGS ($p=0.002$). There was no difference between the means of fractional abundance rates and the type of genetic test performed ($p=0.34$). **Conclusions:** ddPCR proved

to be the most sensitive method in confirming the genetic diagnosis of MAS in peripheral blood DNA. The higher the number of clinical manifestations of MAS, the greater the likelihood of establishing the genetic diagnosis of MAS. There was concordance between the results of samples tested by both methodologies. The genetic diagnosis of MAS was established by ddPCR in patients with only one clinical manifestation of the syndrome (SMA-like).

Keywords: McCune-Albright Syndrome. Polyostotic fibrous dysplasia. Genetic diagnosis. Precocious puberty. Droplet digital polymerase chain reaction. Next-generation sequencing.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome de McCune-Albright

A síndrome de McCune-Albright (SMA) foi reportada primeiramente em 1936 por Donovan McCune no *Columbia University College of Physicians and Surgeons* e por Fuller Albright em 1937 no *Massachusetts General Hospital*, sendo inicialmente descrita como uma tríade clínica composta de precocidade sexual, hiperpigmentação da pele e áreas isoladas de rarefação óssea (1-3).

Em 1972, os Drs. Marco Danon e John Crawford publicaram a primeira evidência de que a puberdade precoce (PP) da SMA era independente de gonadotrofinas (4). Apenas em 1991, Lee Weinstein e colaboradores do National Institutes of Health (NIH) identificaram o defeito molecular relacionado à SMA: uma mutação no gene *GNAS* (*guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating*), resultando na melhor compreensão do mecanismo de ação da proteína G (5).

A SMA é uma doença rara com prevalência de 1:100.000 a 1: 1.000.000, causada por uma mutação ativadora pós-zigótica no gene *GNAS*, que codifica a subunidade alfa da proteína G estimulatória (*Gsq*) (6). Classicamente, a SMA é caracterizada clinicamente por displasia fibrosa óssea (DFO), manchas *café-au-lait* e hiperfunções endócrinas, tais como: puberdade precoce periférica (PPP), acromegalia, síndrome de Cushing, hipertireoidismo e perda renal de fosfato (6).

1.2. Receptores 7-transmembrana

Os receptores que transmitem sinais celulares por via das proteínas G possuem algumas características comuns em relação à sua estrutura: apresentam uma região amino-terminal extracelular e uma região transmembrana com sete domínios hidrofóbicos (α -hélices) ligados por três alças intracitoplasmáticas. Devido a esta conformação, são também conhecidos como receptores 7-transmembrana (7TM) (7).

Esses receptores formam a maior família de proteínas do organismo, somando mais de mil membros identificados, e participam juntamente com as proteínas G de um sofisticado sistema de transdução do sinal celular (8). Existem inúmeros ligantes extracelulares que podem causar uma mudança na conformação do receptor, expondo as α -hélices e ativando a proteína G, tais como: odorantes,

fótons de luz, hormônios, neurotransmissores, nucleotídeos, proteases e íons (7). Os principais efetores celulares regulados via proteína G são: adenilato-ciclase, as isoformas de fosfatidil-inositol, fosfolipase C, fosfodiesterases dependentes de GMPc e canais iônicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (7).

1.3. Proteína G

As proteínas G são compostos de alto peso molecular e ditos heterotriméricos, uma vez que são formados por três polipeptídios distintos: α , β e γ , compondo um complexo transdutor de sinais (8).

A ligação do hormônio ao receptor acoplado à proteína G produz uma mudança de conformação nesta estrutura, que induz a interação do receptor com a proteína G reguladora, com consequente liberação do difosfato de guanosina (GDP) em troca do trifosfato de guanosina (GTP), que resulta na ativação da proteína G. A proteína G ativada (ligada ao GTP) dissocia-se do receptor, seguido de dissociação da subunidade α de $\beta\gamma$ (9). As subunidades ativam alvos celulares, que podem ser tanto um canal iônico como uma enzima (8).

As duas principais enzimas que interagem com a proteína G são a adenilato-ciclase e fosfolipase C, sendo a seletividade de interação determinada pelo tipo de proteína G ao qual o receptor se associa. Com base na subunidade α , as proteínas G podem ser classificadas em quatro famílias associadas a diferentes proteínas efectoras. As vias de sinalização de três dessas famílias foram extensamente estudadas. A $G\alpha_s$ ativa a adenilato-ciclase, a $G\alpha_i$ inibe a adenilato-ciclase, e a $G\alpha_q$ ativa a fosfolipase C. As vias de segundos mensageiros utilizadas pela $G\alpha_{12}$ ainda não foram elucidadas por completo (8).

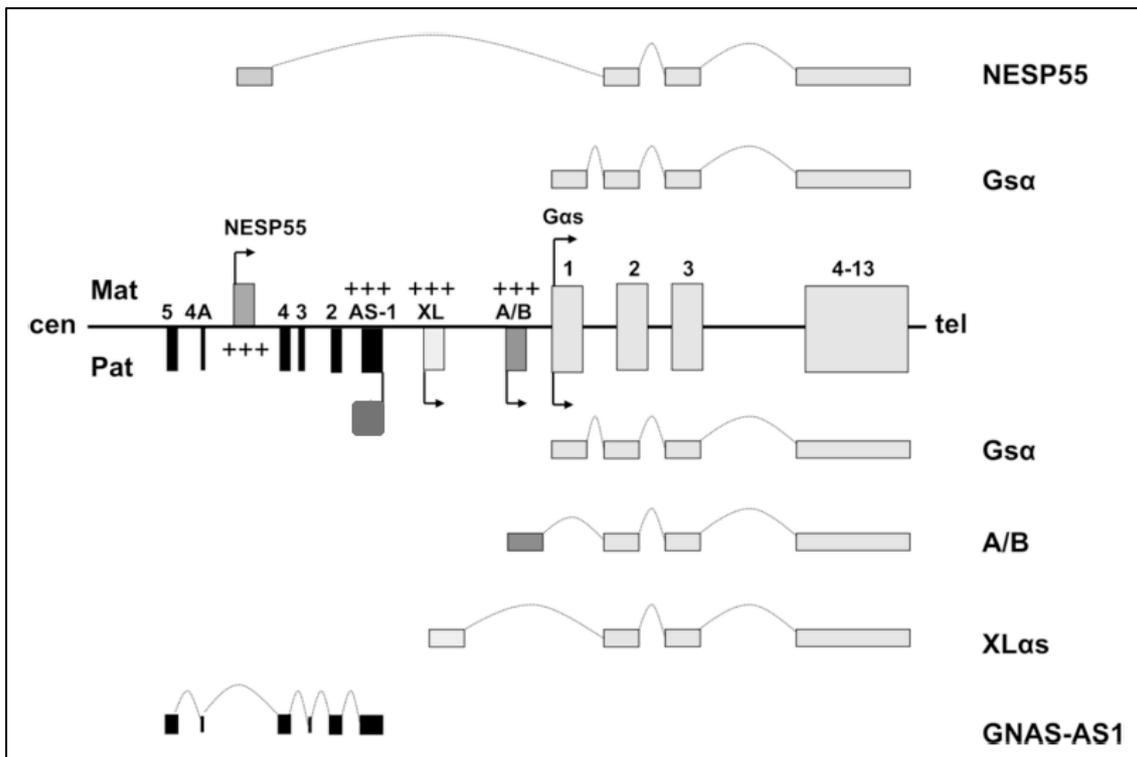
1.4. Gene *GNAS* e a SMA

A SMA é causada por uma mutação ativadora pós-zigótica no gene *GNAS*, localizado no braço longo do cromossomo 20 (20q13.3) (10, 11).

O *loci* do *GNAS* é extremamente complexo e codifica 4 transcritos primários, $G\alpha_s$, *extra-large* ($XL\alpha_s$), *neuroendocrine secretory protein 55* (NESP55) e A/B, bem como um transcrito *antisense* *GNAS-AS1* (9, 12). Os transcritos *sense* são gerados através de quatro promotores distintos e do *splicing* alternativo dos quatro primeiros

éxons únicos para os éxons comuns 2-13. A expressão alélica e tecido-dependente é regulada pela metilação diferencial dos promotores alternativos. $XL\alpha_s$, A/B e GNAS-AS1 são expressos a partir do alelo paterno, enquanto NESP55 é expresso a partir do alelo materno. Em contraste, o transcrito $G\alpha_s$ não é *imprintado* na maioria dos tecidos e apresenta expressão bialélica randômica (9, 12, 13). A Figura 1 demonstra o gene GNAS e seus transcritos.

Figura 1- Múltiplos transcritos do gene GNAS.



FONTE: Adaptado de Turan *et al.*, (2015) (9)

Os éxons 1-13 codificam o $G\alpha_s$, cuja expressão é bialélica na maioria dos tecidos. Os outros transcritos são originados a partir da metilação de diferentes promotores, incluindo o transcrito NESP55 (expresso pelo alelo materno), e os transcritos A/B e $XL\alpha_s$ (expressos pelo alelo paterno). Todos esses transcritos utilizam éxons individuais que fazem splicing com os éxons 2-13 do gene GNAS. Outro transcrito não-codificante também é derivado do alelo paterno do GNAS, mas este transcrito é gerado a partir da fita *antissense* (transcrito GNAS-AS1). Caixas e linhas conectivas representam éxons e íntrons, respectivamente. Os produtos GNAS maternos (mat) e paternos (pat) são ilustrados acima e abaixo da estrutura do gene, respectivamente, com os padrões de splicing indicados por linhas pontilhadas. O símbolo "+" indica promotores metilados, seja no alelo paterno (NESP55) ou no alelo materno ($XL\alpha_s$, A/B, GNAS-AS1). Setas indicam a direção da transcrição.

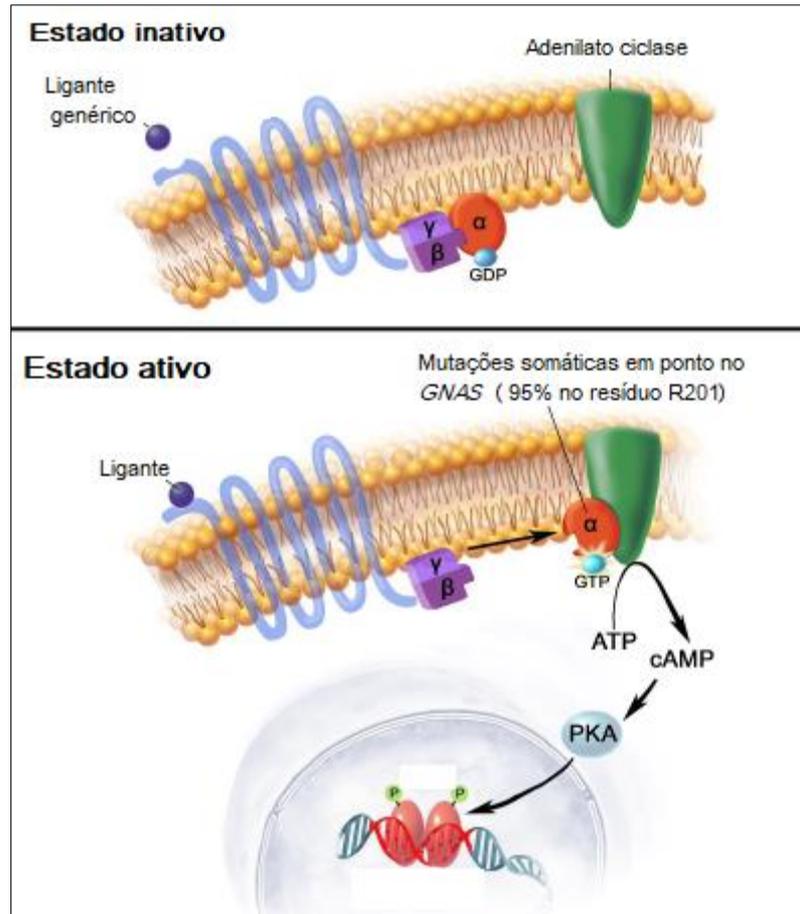
A interação da $G\alpha_s$ com a adenilato-ciclase e sua ativação resultam em aumento da conversão do trifosfato de adenosina em monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico (AMPc) (9). A elevação do AMPc intracelular ativa a proteína-quinase A, a qual, por sua vez, fosforila as proteínas efetoras produzindo respostas

celulares (8). O $G_s\alpha$ é composto em parte por um domínio intrínseco GTPase, que se liga ao nucleotídeo guanina que interage com receptores e efetores específicos. A atividade GTPase intrínseca da $G_s\alpha$ inativa a sinalização do receptor através da hidrolisação de GTP a GDP (10).

Na SMA, algumas mutações ativadoras *missenses* no códon 201 da $G_s\alpha$ foram identificadas: a substituição de uma arginina por histidina (p.R201H) ou cisteína (p.R201C), representando mais de 95% das mutações identificadas, e mais raramente mutações *missenses* no códon 227 (menos de 5% das mutações identificadas) (10, 11, 14).

O códon 201, composto por pela arginina (R201), representa um regulador essencial da GTPase. Mutações neste domínio acarretam em perda da atividade da GTPase, com consequente ativação constitutiva da $G_s\alpha$. No meio intracelular tal defeito resulta na hiperprodução de AMPc, levando à ativação de receptores hormonais e consequente produção hormonal excessiva, manifestada clinicamente por endocrinopatias hiperfuncionantes, hiperpigmentação da pele (manchas *café-au-lait*) e DFO (11). A Figura 2 demonstra o mecanismo molecular supracitado.

Figura 2- Sinalização da Gas na SMA.



FONTE: Adaptado de Boyce et al., Fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome: a rare, mosaic disease of Gαs activation, 2019. (15).

No estado inativo, o composto heterotrimérico está ligado ao GDP. Depois da interação com o ligante, a Gαs se dissocia do complexo-βγ e ativa a adenilato-ciclase, levando à produção intracelular de AMPc e ativação da Proteína quinase A. As mutações ativadoras no gene *GNAS* resultam na perda da atividade da GTPase, resultando na ativação constitutiva da Gαs.

GNAS: *guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating activity polypeptide*; GDP: guanosine difosfato; GTP: guanosine trifosfato; ATP: adenosina trifosfato; cAMP: monofosfato cíclico de adenosina; PKA: proteína quinase A; R201: códon 201 do gene *GNAS*, composto por uma arginina.

1.5. Mosaicismo

Mosaicismo é definido pela presença de duas ou mais populações de células com distintos genótipos dentro de um mesmo organismo, tipicamente oriundo de eventos mutacionais pós-zigóticos (16). O ritmo exponencial da multiplicação celular durante a embriogênese significa que as mutações que

ocorrem precocemente durante o desenvolvimento têm impacto mais significativo no fenótipo de um indivíduo (17).

As etiologias das mutações somáticas são complexas e podem estar relacionados com defeitos na replicação do DNA, insultos ambientais e outros fatores (18). Consistente com doenças em mosaicos, SMA não é herdada, e não há casos conhecidos de transmissão vertical (19).

Devido ao envolvimento variável das mutações nos tipos de tecidos, há um amplo espectro de fenótipos possíveis para uma mesma doença (16) e, portanto, se apresentam como casos desafiadores para confirmar diagnóstico e estabelecer tratamento adequado (16).

1.6. Manifestações Clínicas da SMA

1.6.1. Manchas *café-au-lait*

As manchas *café-au-lait* são tipicamente a manifestação clínica mais precoce da SMA, estando presentes já no nascimento ou logo após (6, 11).

O receptor do hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH) tem sua sinalização realizada através da proteína G, e, devido aos mecanismos supracitados que culminam na elevação dos níveis de AMPc intracelulares, há uma hiperprodução de melanina, resultando nas manchas *café-au-lait*.(6)

Classicamente, as manchas da SMA apresentam bordos irregulares (descritas como se assemelhando a costa de Maine), e tendência a respeitar a linha média corporal (presentes em apenas um dimídio) (6, 11).

1.6.2. Displasia Fibrosa Óssea (DFO)

A DFO é uma doença em mosaico incomum em que o osso sadio é substituído por tecido fibro-ósseo estruturalmente deficiente (12). No osso, a ativação constitutiva da $G_s\alpha$ dá origem a células do estroma da medula óssea (CEMOs) com capacidade reduzida de diferenciar-se em osteoblastos maduros, adipócitos e estroma de suporte da hematopoiese. O osso e medula óssea são assim substituídos por CEMOs em proliferação, resultando em tecido fibro-ósseo tipicamente desprovido de medula hematopoiética (11).

O osso resultante dessa alteração é frágil e propenso a fraturas, resultando muitas vezes em dor e perda da funcionalidade (12).

Geralmente, os sinais e sintomas decorrentes da DFO são os primeiros a serem notados na SMA: dor em membros, alteração em marcha, deformidades esqueléticas e ocasionalmente fraturas patológicas (6).

Na SMA, a displasia óssea pode afetar um (monostótica) ou vários (poliostótica) ossos (20). Os principais sítios acometidos são os ossos da base do crânio e a parte proximal do fêmur (6), no entanto não é incomum o acometimento maxilofacial (21). As manifestações clínicas iniciais ocorrem nos primeiros anos de vida da criança e tendem a se estabelecer completamente até os 15 anos de idade (90% das lesões craniofaciais se estabelecem antes dos 3,4 anos, enquanto 90% das lesões apendiculares e axiais se estabelecem até 13,7 anos e 15,5 anos, respectivamente) (6).

Nos ossos longos, as deformidades e fraturas são comuns, principalmente no fêmur proximal (deformidade "*Shepherd's crook*"). No esqueleto axial a escoliose é a manifestação mais comum, podendo raramente ser severa e progressiva, causando comprometimento respiratório e até mesmo morte (6, 11). Nos ossos do crânio, apesar de geralmente ser paucissintomática (comumente diagnosticado incidentalmente por exames de imagem), podem ocorrer deformidades morfológicas faciais e funcionais, com surdez e cegueira (por compressão de nervos cranianos) (6, 11, 19).

As lesões da DFO apresentam padrão histológico, clínico e radiográfico relacionados com a idade do paciente. Kuznetsov *et al.* (22) observaram o declínio no número CEMOs mutadas devido a uma alta taxa de apoptose em indivíduos mais velhos portadores de DFO, caracterizado como "normalização" da doença (22). Histologicamente, em alguns casos foi observada redução das características de DFO, com formação de osso e medula normais, apresentando inclusive restauração completa da hematopoiese (11).

A cintilografia óssea representa o exame de escolha para detecção das lesões ósseas, embora tais alterações também sejam evidenciadas radiologicamente. Em crianças abaixo de dois anos, as lesões da DFO são heterogêneas na radiografia e não apresentam o padrão clássico de vidro fosco. Na infância tardia, as lesões desenvolvem uma densidade radiográfica mais homogênea, com o padrão em vidro fosco, enquanto em indivíduos mais velhos as lesões são mais densas e escleróticas. Nas lesões craniofaciais em pacientes mais

velhos, a tomografia computadorizada evidencia um padrão menos homogêneo e a presença áreas císticas radiotransparentes (6).

Clinicamente, essas alterações são representadas pela frequência de fraturas, que ocorrem com mais intensidade entre 6 e 10 anos, com redução gradual após infância (23).

As lesões da DFO podem sofrer transformação maligna (degeneração sarcomatosa). Os fatores de riscos são dose alta de radiação externa e excesso de GH (acromegalia / gigantismo) (24, 25).

1.6.3. Hiperfunções Hormonais

1.6.3.1. Puberdade Precoce Periférica (PPP)

A puberdade precoce (PP) é uma das características clínicas mais marcantes da SMA (26). Devido o receptor de LH ser acoplado a proteína $G\alpha_s$, que está constitutivamente ativada, há produção dos hormônios sexuais independente de gonadotrofinas, caracterizando PPP (10, 20).

Apesar de o envolvimento gonadal ocorrer igualmente em meninas e meninos, a hiperprodução de esteroides sexuais ocorre mais frequentemente em meninas (19). Em uma coorte acompanhada pelo NIH, a ativação do *GNAS* resultou em cistos recorrentes produtores de estradiol em 85% das meninas (11, 27). A PPP ocorre predominantemente no sexo feminino provavelmente porque tanto a camada granulosa do ovário quanto a teca produzem esteroides sexuais nas meninas (10).

Normalmente, a PPP representa juntamente com a DFO a primeira manifestação a ser notada na criança(6).

No sexo feminino, a PPP é documentada como produção estrogênica por cistos volumosos ovarianos, frequentemente unilaterais, que é a manifestação morfológica da hiperativação autônoma de células foliculares (26). A pacientes desenvolvem rapidamente sinais puberais, como desenvolvimento mamário e aceleração do crescimento. Exames laboratoriais evidenciam níveis elevados de estradiol, com gonadotrofinas suprimidas (28) e cistos uni ou bilaterais no exame de ultrassom (19). Quando o cisto involui, há uma queda brusca nos níveis de estradiol, que culmina com sangramento vaginal indolor (27). Após os primeiros sinais, muitas meninas entram em um período de quiescência, com regressão dos caracteres sexuais, dificultando o diagnóstico (26, 27). Por outro lado, outras meninas

experimentam episódios repetidos de sangramento vaginal, com progressão dos caracteres puberais e aumento do risco de perda na estatura final adulta (26).

O ultrassom pélvico é indicado rotineiramente devido sua característica cíclica/intermitente (27). O ultrassom geralmente evidencia cisto ovariano unilateral, com composição variada, podendo ser cística, sólido-cístico ou com aspecto hemorrágico. Estes achados muitas vezes são sobrepostos com achados de tumores de células granulosas, de forma que a criança pode ser submetida a uma ooforectomia desnecessariamente (26).

Pode ocorrer progressão para PP de origem central (puberdade precoce central – PPC - secundária) devido à ativação precoce do eixo gonadotrófico por exposição prolongada aos esteroides sexuais (26, 29-31).

No sexo masculino, apesar do envolvimento testicular ser frequente (85%) (19), a PP é menos comum (ocorre em 15% dos pacientes), visto que para esta ocorrer, a mutação somática deve estar presentes nas células de Leydig que expressam receptor de LH e sintetizam e secretam a testosterona. No entanto a ocorrência da mutação em receptores de FSH é predominante, sendo a macroorquidia o achado mais frequente (26). Em meninos a alteração gonadal é caracterizada por aumento do volume dos testículos e raramente sinais de precocidade sexual. Macroorquidia pode ser a primeira e única manifestação clínica em meninos, unilateral ou bilateral, devido à hiperfunção das células de Sertoli (26).

Outra manifestação descrita em meninos com SMA é a microlitíase testicular, prevalente em 30-62% deles, enquanto na população pediátrica em geral é encontrada em menos de 5%. Não obstante, a implicação clínica deste achado ainda não foi bem estabelecida (26).

1.6.3.2. Tireoidopatias

As doenças da tireoide são a segunda endocrinopatia mais comum na SMA, sendo reportadas em aproximadamente 50% (19). Hipertireoidismo ocorre em média em 38% dos pacientes (6), embora o espectro das tireoidopatias varie desde franco hipertireoidismo clínico com bócio a quadros assintomáticos com evidência apenas laboratorial de hipertireoidismo (6). Os achados clínicos e ultrassonográficos incluem aumento difuso, heterogeneidade e nódulos císticos ou sólidos (19).

Bioquimicamente, as mutações no *GNAS* resultam em atividade constitutiva da 5'-deiodinase, culminando com aumento da conversão de T4 em T3 e T3-toxicose (19).

É importante o diagnóstico precoce do hipertireoidismo no contexto de SMA, uma vez que pode resultar no avanço de idade óssea, um problema adicional para crianças que já apresentam PPP, além de contribuir para a baixa densidade mineral óssea (32). O hipertireoidismo na SMA responde bem a tionamidas, no entanto, por ser uma condição persistente, é aconselhável realizar terapia definitiva com cirurgia ou radioiodoterapia (27).

O desenvolvimento de câncer de tireoide é raro, mas deve ser monitorado (20).

1.6.3.3. Perda renal de fosfato

A hipofosfatemia na SMA é resultante da hiperprodução de FGF23 pelas células esqueléticas anormais (osteócitos), através da hiperativação da sinalização do AMPc (16). Enquanto a hiperfosfatúria é o achado mais frequente, a hipofosfatemia é rara (11). Tem sido observado que a hiperfosfatúria pode normalizar espontaneamente com o aumento da idade do paciente, isto reflete provavelmente as mudanças teciduais intrínsecas caracterizadas como “normalização” (22, 27). Os pacientes afetados podem abrir o quadro na infância com raquitismo ou na vida adulta com osteomalácia. A hipofosfatemia tem sido relacionada com idade mais precoce que ocorre a primeira fratura, maior risco de deformidades ósseas e pode contribuir para o desenvolvimento de dor óssea (12). Os níveis de FGF23 se correlacionam com a atividade da doença (11).

Para o diagnóstico é recomendado a dosagem de fósforo sérico e cálculo da fração de excreção do fósforo urinário (6). Ainda é questionável se a hipofosfatemia isolada deve ser tratada, ou se o tratamento deve ser reservado apenas para aqueles com evidência de raquitismo ou osteomalácia (6).

1.6.3.4. Excesso de GH

A ativação da $G\alpha_s$ leva a hiperplasia das células somatotóxicas, com conseqüente excesso de GH (19), e ocorre em cerca de 20% dos pacientes (33).

Aproximadamente 80% dos pacientes com hiperprodução de GH também desenvolvem hiperprolactinemia (20).

Os indivíduos afetados tipicamente apresentam aceleração da velocidade linear, e também podem desenvolver características acromegálicas. Clinicamente, o excesso do hormônio de crescimento deve ser diferenciado do hipertireoidismo e puberdade precoce, que também resultam em aceleração do crescimento (20). O diagnóstico geralmente é realizado em média aos 24 anos (34), e é confirmado pela dosagem de GH e IGF-1, além do teste oral de tolerância a glicose para avaliar supressão do GH (6).

O excesso de GH está relacionado com a piora das lesões faciais da DFO, levando a um pior prognóstico (6). O diagnóstico e tratamento precoces do excesso de GH podem prevenir a morbidade relacionada com a piora destas lesões, principalmente a perda de visão (27).

1.6.3.5. Síndrome de Cushing (Hiper cortisolismo)

Síndrome de Cushing é a manifestação endócrina mais rara na SMA (27), ocorrendo predominantemente no período neonatal em pacientes com SMA e acometimento de múltiplos órgãos (6).

O exame físico é sugestivo, com estigmas típicos: face em lua cheia, pletora, hirsutismo e ausência de crescimento linear (6).

O diagnóstico é feito pela dosagem de cortisol urinário livre de 24 horas, cortisol salivar à meia noite e cortisol após supressão com dexametasona (6).

A Síndrome de Cushing da SMA está associada à alta mortalidade, que na maioria das vezes decorre de infecções oportunistas, principalmente espécies de *Pneumocysts*. Portanto, o tratamento profilático deve ser sempre instituído para estas infecções (32).

Já é bem descrito na literatura que a Síndrome de Cushing pode ter remissão espontânea, por causa da involução da glândula suprarrenal fetal em aproximadamente 1/3 dos pacientes (19, 27). No entanto, é impossível prever em qual paciente isto ocorrerá (6, 32). Sequelas de longo prazo em pacientes com SMA envolvem distúrbios da cognição, atraso do desenvolvimento e apraxia de fala (27).

Apesar da síndrome de Cushing ser mais comumente descrita no período neonatal, Fragoso e *co/s.*(35) identificaram a mutação p.R201H em 2 pacientes com

média de idade de 33 anos e diagnóstico de hiperplasia adrenal macronodular ACTH-independente sem outras características clínicas de SMA, suscitando a discussão de novos espectros clínicos dentro da SMA (35). A Tabela 1 resume as principais características clínicas e a prevalência de cada manifestação em pacientes com o espectro DFO/SMA.

Tabela 1 - Prevalência das principais características clínicas na coorte do NIH de pacientes com displasia fibrosa/ Síndrome de McCune-Albright.

Características clínicas	% Pacientes ¹
Displasia Fibrosa Óssea	98
Manchas <i>café-au-lait</i>	66
Anormalidades Gonadais	
Masculino: (ultrassom) ²	70
Feminino: puberdade precoce	50
Anormalidades Tireoidianas	
Anormalidades na ultrassonografia	66
Hipertireoidismo + Anormalidades na ultrassonografia	28
Perda Renal de Fosfato	43
Hipofosfatemia	10
Excesso de Hormônio do crescimento	21
Síndrome de Cushing	4

FONTE: adaptado de Robinson *et al.*, 2016 (11).

¹ n= 140; 58 masculinos, 2 femininos

² detectado na ultrassonografia

1.7. Aspectos Terapêuticos da SMA

1.7.1. Displasia fibrosa óssea (DFO)

O tratamento da SMA é direcionado de acordo com os tecidos acometidos e suas respectivas características clínicas, além de variar com a intensidade dos sintomas apresentados.

Na DFO, o tratamento deve ser individualizado, sendo realizado mais adequadamente quando em conjunto com equipe multidisciplinar. Geralmente o tratamento da DFO é paliativo, visando principalmente manter a funcionalidade e reduzir morbidade relacionada a deformidades e fraturas (11), e embora não haja

terapia conhecidas até o momento que alterem o curso natural da DFO, a terapia antirreabsortiva pode ajudar a reduzir a dor óssea (12).

A dor óssea na SMA é multifatorial e requer avaliação clínica cuidadosa. Qualquer dor nova ou focal de início agudo deve ser investigada para fraturas subjacentes ou transformação maligna (12). O tratamento conservador da dor óssea inclui uso de analgésicos não-opioides, compressas quentes e massagens.

A terapia antirreabsortiva com bisfosfonatos e denosumabe tem recebido destaque por ser opção de tratamento promissora para DFO, devido à alta expressão de RANKL e alta atividade osteoclástica nas lesões (12). Bisfosfonatos endovenosos podem ser úteis para dor persistente moderada a severa (pamidronato ou ácido zoledrônico), e sua administração deve ser baseada nos sintomas clínicos do paciente, não por intervalos fixos de tempo e/ou marcadores de *turnover* ósseo (20). Devido à falta de evidências de efeitos de longo prazo na população pediátrica e efeitos colaterais relevantes, o uso dos bisfosfonatos é limitado (11). Denosumabe tem sido usado em alguns casos de DFO com redução significativa da dor óssea, no entanto também tem sido associado com distúrbios do metabolismo mineral ósseo, principalmente quando a terapia é descontinuada. O uso de denosumabe deve ser reservado para grandes centros com vasta experiência no tratamento da DFO, idealmente no contexto de estudos clínicos (20).

O procedimento cirúrgico na DFO é desafiador e os dados sobre técnicas e indicações apropriadas são escassos na literatura. Abordagens como placas, parafusos e outros aparelhos de fixação externa são frequentemente ineficazes e devem ser evitados (11). Dispositivos intramedulares são usados frequentemente em lesões de membros inferiores, e escoliose progressiva pode ser tratada com as técnicas padrões (6). Cirurgias para correção de deformidades craniofaciais são complicadas frequentemente por recidivas da DFO, portanto devem ser realizadas para corrigir deformidades que levem ao prejuízo funcional, como quando ocorre compressão do nervo óptico com perda visual. Os pacientes com lesões craniofaciais devem passar anualmente por avaliação com neuro-oftalmologista e otorrinolaringologista para monitoramento de perda visual e auditiva, respectivamente (19).

O desenvolvimento de novas medicações para DFO é necessário. Estudos controlados prospectivos ajudariam a determinar segurança e eficácia da terapia antirreabsortiva. Algumas medicações mais novas, como inibidores de interleucina-6

(IL-6) é uma terapia em potencial, uma vez que o tecido com DFO tem produção elevada de IL-6. Alguns estudos com tocilizumabe estão em andamento e podem representar outra opção terapêutica (12).

1.7.2. Puberdade precoce periférica

Em relação à PPP nas meninas, o tratamento consiste em bloquear a atividade estrogênica, seja inibindo a ação no receptor estrogênico ou bloqueando sua produção, com o objetivo de prevenir o sangramento vaginal, bloquear o avanço puberal, normalizar a taxa de maturação óssea e preservar a estatura adulta (28). Por causa da variabilidade do curso clínico, é prudente um período de observação antes de iniciar tratamento, devendo este ser reservado para aquelas meninas com cistos recorrentes, evoluindo com sangramento vaginal frequente, avanço de idade óssea e comprometimento da estatura adulta predita (36).

Existem vários tratamentos medicamentosos que já foram testados no decorrer dos anos para PPP da SMA em meninas. Inicialmente, a ciproterona e a medroxiprogesterona foram usadas, resultando em controle clínico adequado no curto prazo em relação ao desenvolvimento mamário e sangramento vaginal, com poucos efeitos na velocidade de crescimento e na estatura final (28).

O tamoxifeno é um membro dos moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM) e tem efeito antagonista ou agonista do estradiol a depender do tecido alvo (37). Em alguns estudos apresentou evidência de bom controle no desenvolvimento mamário e redução nos episódios de sangramento vaginal, velocidade de crescimento e maturação óssea (26, 37, 38). O uso do tamoxifeno foi relacionado a aumento do volume uterino e ovariano, portanto é recomendável o seguimento com ultrassom pélvico, embora nenhum caso de tumor estromal em SMA tenha sido reportado (28). O efeito agonista estrogênico nestes tecidos resultou no questionamento da segurança em longo prazo do tamoxifeno.

Mais recentemente os inibidores de aromatase cuja ação leva ao bloqueio da conversão de andrógenos em estrógenos, emergiram como uma alternativa plausível, sendo o letrozol a única droga dentre eles que demonstrou evidência tanto no controle dos caracteres sexuais secundários (desenvolvimento mamário e sangramento vaginal) quanto na redução da velocidade de crescimento, maturação óssea e preservação da estatura final em relação a controles (39). Houve relato de desenvolvimento de cisto ovariano volumoso com evolução para torção ovariana

durante o uso do letrozol, no entanto outros casos não foram observados (39, 40). O letrozol é considerado uma medicação segura, com estudos demonstrando evolução satisfatória em longo prazo (40). O anastrozol, testolactona e fadrazol (inibidores de aromatase), não tiveram o mesmo sucesso, principalmente no tocante a preservação da estatura adulta dentro do intervalo da estatura alvo (28).

O cetoconazol é um inibidor não-específico do citocromo p450, e sua ação envolve o bloqueio da esteroidogênese adrenal e gonadal (28). Apesar de demonstrar controle no sangramento vaginal, redução dos níveis de estradiol circulante, regressão dos caracteres sexuais secundários e atenuar a maturação óssea, o uso da medicação não é amplamente utilizado devido o risco de hepatotoxicidade e desenvolvimento de insuficiência adrenal com uso em longo prazo (28, 41).

O Fulvestrant, um bloqueador do receptor estrogênico de via intramuscular, apresentou resultados favoráveis em um estudo internacional e prospectivo, com redução do sangramento vaginal do avanço de idade óssea. No entanto não houve aumento da estatura adulta predita e redução da média da velocidade de crescimento (42).

Procedimentos cirúrgicos (cistectomia ou ooforectomia) não são rotineiramente recomendados, pela probabilidade de recorrência e impacto negativo na fertilidade. (28)

Poucos dados estão disponíveis em meninos com SMA e puberdade precoce tratada, sendo limitado apenas a relatos de casos (28). O objetivo do tratamento em meninos é reduzir a virilização e preservar a estatura final (26). Os dados da literatura mostram vários tipos de associações, principalmente entre inibidores da aromatase (testolactona, anastrozol ou letrozol), com bloqueadores competitivos do receptor androgênico (flutamida ou bicalutamida) e drogas com efeitos antiandrogênicos (espirolactona e ciproterona) ou drogas que reduzem esteroidogênese (cetoconazol). A maioria das associações evidenciaram controle do volume testicular, redução da virilização e redução da velocidade de crescimento, mas apenas a associação de cetoconazol e ciproterona evidenciou melhora da estatura adulta (26, 28).

1.7.3. Outras hiperfunções endócrinas

Os tratamentos relacionados às outras hiperfunções endócrinas são instituídos de acordo com presença destas em cada paciente.

Em relação ao hipertireoidismo, medicações anti-tireoideanas, como as tionamidas, são suficientes para controle da doença (6). No entanto como o hipertireoidismo na SMA costuma ser persistente, opções terapêuticas definitivas como cirurgia e radioiodoterapia são desejáveis para melhor controle. Tireoidectomia é um procedimento difícil de ser realizado em crianças muito pequenas, devendo ser postergados para um momento oportuno (27).

Nos casos de perda renal de fosfato o tratamento é semelhante a outras doenças hiperfosfatúricas mediadas por FGF23: administração de altas doses de fosfato e calcitriol, sendo indicado quando houver sinais de osteomalácia ou hipofosfatemia severa (6, 11, 32).

O excesso de GH deve ser tratado, principalmente porque está relacionado com piora da doença óssea, perda de visão e audição (6). O tratamento do excesso de GH na SMA é quase exclusivamente medicamentoso. Os ossos da base do crânio são frequentemente acometidos pela DFO e o acesso cirúrgico é bastante difícil. Além disso, o envolvimento hipofisário é tipicamente difuso, mesmo quando há adenomas visíveis em exames de imagem, razão pela qual a cirurgia preferencial é a hipofisectomia total e deve ser reservado para pacientes com doença descontrolada mesmo em uso de medicação em dose máxima (19). O objetivo do tratamento em crianças é atingir os níveis de IGF-1 no percentil 50, enquanto que nos adultos o objetivo é reduzir os níveis de IGF-1 o máximo possível (27). O tratamento medicamentoso inclui os análogos da somatostatina e/ou bloqueador do receptor de GH. A radioterapia não deve ser indicada de rotina, uma vez que a presença de DFO na base do crânio tem sido associada com risco de transformação sarcomatosa (19).

A hiperprolactinemia que geralmente acompanha o excesso de GH não é alterada pelos análogos da somatostatina e pegvisomanto, mas respondem bem ao tratamento com cabergolina ou bromocriptina (27).

A síndrome de Cushing pode cursar com resolução espontânea, mas na maioria dos casos o tratamento é necessário, sendo a adrenalectomia o procedimento de escolha (6, 32). Algumas vezes o tratamento medicamentoso é indicado para que a criança tenha tempo hábil de melhorar clinicamente até poder ser submetida à cirurgia. O uso do cetoconazol deve ser evitado, dado que crianças

com SMA e síndrome de Cushing podem apresentar hepatite colestática, tendo esta medicação potencial efeito hepatotóxico. A metirapona costuma ser efetiva, sendo iniciada com doses mais baixas, podendo ser titulada até doses de 1200 mg/m²/dia (32).

1.8. Diagnóstico Clínico da SMA

O diagnóstico de SMA é eminentemente clínico e inicialmente era estabelecido através da identificação da tríade: DFO, manchas *café-au-lait* e hiperfunções endócrinas. Mais recentemente, o grupo do NIH atualizou os critérios diagnósticos, estabelecendo a combinação de pelo menos 2 características clássicas da síndrome (19, 20).

No caso da DFO, a radiografia simples é suficiente para realizar o diagnóstico, mas a cintilografia óssea é mais sensível, detectando precocemente as lesões ósseas. A biópsia óssea confirma os casos duvidosos, mas não é feita rotineiramente (6).

As hiperfunções endócrinas devem ser rastreadas laboratorialmente mesmo quando ainda não há manifestação clínica clara.

1.9. Diagnóstico genético da SMA

Devido à natureza de mosaicismo somático presente na SMA, o teste genético no DNA de sangue periférico é de pouca utilidade, pois um resultado negativo não exclui a presença da mutação nos tecidos afetados (6), uma vez que a detecção da variante depende da concentração de mosaicismo presente no tecido estudado e da sensibilidade da técnica utilizada (20). Então, espera-se que a concentração de mosaicismo seja maior nos tecidos afetados pela síndrome e menor em leucócitos de sangue periférico.

Por causa do padrão mosaico das células carreadoras da mutação no *GNAS*, sua detecção nos pacientes com pequena quantidade de alelos mutados é desafiadora, pois a possibilidade de detecção da mutação é proporcional à gravidade da doença (43). Atualmente já se reconhece que apesar de inicialmente ser descrita como uma tríade, a SMA é muito heterogênea e tem ampla complexidade fenotípica, apresentando relatos de casos com apresentação clínica parcial (uma ou duas características clínicas) (44, 45).

No entanto, os atuais critérios diagnósticos da SMA não abrangem todas as variedades fenotípicas existentes, de modo que a confirmação da variante genética nestas formas parciais e/ou brandas seria valiosa para ajudar a reconhecer quadros com características clínicas isoladas como parte do espectro da SMA, estabelecendo uma classificação clínica mais inclusiva. Tal qual a síndrome de Li Fraumeni, que admite a classificação de síndrome Li Fraumeni- *like* para aqueles pacientes que apresentam características clínicas da síndrome, mas não preenchem todos os critérios para a determinação diagnóstica (46), o termo Síndrome de McCune-Albright-*like* (SMA-*like*) poderia ajudar a identificar estes pacientes e estabelecer um seguimento clínico mais cauteloso para eles.

Amostras de DNA para detectar a mutação somática no códon 201 do *GNAS* podem ser isoladas da pele, lesões provenientes da DFO, tecido gonadal, entre outros. No entanto, uma técnica que permita a identificação da mutação no DNA de sangue periférico é altamente desejável, uma vez que evitaria procedimentos invasivos para obtenção das amostras (43). Por esta razão, no decorrer dos anos foram propostas várias técnicas para aumentar a capacidade de detecção da mutação no *GNAS* em DNA de leucócitos periféricos.

Lumbroso *et al.*(45) utilizaram a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com um *primer* modificado, que permite que o produto da PCR oriundo de DNA *wild-type* (WT) seja digerido por uma enzima de restrição, enquanto o produto da PCR oriundo do DNA mutado não seja. Dessa forma, há um enriquecimento do alelo mutado. Em pacientes com pelo menos uma característica clínica da SMA, esta técnica permitiu a detecção da mutação em 90% destes quando os tecidos afetados eram analisados. No entanto, quando o DNA analisado provinha de sangue periférico a taxa de detecção caiu para 21% (45).

Kalfa *et al.*(47) compararam a técnica de Nested- PCR associada com enzima de restrição e PCR com uma probe de ácido peptídico nucleico (PNA), a qual forma um híbrido de DNA WT e inibe a sua amplificação, em 71 pacientes com pelo menos uma característica clínica da SMA. Em DNA de sangue periférico, a técnica de Nested- PCR com enzima de restrição e a de PCR com PNA foi capaz de detectar a mutação em 35,2% e 36,6% dos pacientes, respectivamente (47).

Mariani et al. (7) testaram a capacidade da detecção da mutação no gene *GNAS* pelo método de PCR real time junto com uma probe de PNA. No entanto, de

31 pacientes incluídos, só houve detecção da mutação em DNA de sangue periférico (p.R201H) em 1 paciente (7).

Narumi et al.(48) compararam a técnica de PCR convencional versus PCR com probe de PNA e posteriormente sequenciamento por Sanger versus sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) em 16 pacientes com pelo menos duas características clínicas da SMA. O SPLE representa um método com maior sensibilidade e possibilita uma melhor resolução da análise em detectar a mutação no *GNAS*. Enquanto a PCR com PNA e sequenciamento por Sanger detectou a mutação em 56% dos pacientes, o método SPLE-PNA aumentou a taxa de detecção da mutação do *GNAS* para 75% (48).

Fu-Sung et al. (43) usaram dois tipos de PNA, um que inibia a amplificação do DNA WT, este adicionado durante a reação de PCR, e outro associado a um PNA com fluoróforo, que serve como uma probe sensor, usado para quantificar *GNAS* mutante (adicionado após reação de PCR). O sequenciamento foi feito pelo método de Sanger. O estudo incluiu seis pacientes, 3 com SMA e 3 com DFO. O método foi capaz de identificar alelos mutantes em um ambiente de 200 vezes mais alelos WT, detectando a mutação do *GNAS* em todos os pacientes com SMA (43).

Romanet et al. (49) avaliaram 12 pacientes com DFO e SMA utilizando a técnica de reação de PCR digital em gotas (ddPCR). Esta metodologia, baseada na amplificação após o particionamento de volume da PCR, foi capaz de identificar a mutação p.R201H/C no *GNAS* em 58,3% dos pacientes em DNA de sangue periférico, com capacidade de detecção de frequências alélicas tão baixas quanto 0,03%. Adicionando à análise, a obtenção de *cell-free* DNA (cf-DNA), que consiste no DNA fragmentado liberado no plasma por meio de apoptose, necrose ou secreção ativa das lesões, resultou melhora da sensibilidade do método ddPCR para 80% (n=5), detectando a mutação em frequência alélica tão baixas quanto 0,1% (provavelmente porque o cf- DNA, por ser proveniente de lesões da SMA, como DFO e manchas *café-au-lait*, apresenta uma maior quantidade de alelos mutados) (49).

A técnica da PCR digital (dPCR), a qual ao invés de particionar a amostra em gotas, particiona através de um chip nanofluídico (com múltiplos poços, onde cada reação de PCR ocorre isolada), foi utilizada em DNA de sangue periférico por *Elli et al.* (50) em 37 pacientes portadores de pelo menos uma característica clínica da

SMA. Enquanto o método de Sanger não foi capaz de identificar nenhuma mutação, a dPCR conseguiu confirmar a mutação em 37,8% (14/37) das amostras (50).

Recentemente Rosko *et al.*(51) utilizaram cf-DNA de pacientes com pelo menos uma característica clínica da SMA, e compararam a metodologia de ddPCR com PCR Taqman alelo-específico competitivo (castPCR), o qual utiliza um primer específico para detecção do alelo mutante, que por sua vez compete com um oligonucleotídeo bloqueador que inibe a amplificação do alelo WT. A ddPCR e castPCR foram capazes de identificar as variantes R201 em 62% dos casos, e quando combinadas a taxa de detecção subiu para 68% dos pacientes (51). A comparação entre os diferentes métodos utilizados para o diagnóstico genético da SMA está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Taxa de detecção da mutação no GNAS por diferentes metodologias para o diagnóstico genético da SMA.

Metodologia	Taxa de detecção total	Taxa de detecção em pacientes portadores da tríade da SMA	Taxa de detecção em pacientes portadores de 2 características clínicas da SMA	Taxa de detecção em pacientes portadores de 1 característica clínica da SMA	Ref.
Sanger	0%(0/37)	ND	ND	ND	(50)
Nested-PCR	21% (21/98)	46% (11/24)	21% (7/33)	8% (3/40)	(45)
PCR+PNA	35,2% (25/71)	ND	ND	ND	(47)
rt-PCR	(1/31)	ND	ND	ND	(7)
SPLE	62,5% (10/16)	75% (6/8)	50% (4/8)	0% (0/0)	(48)
SPLE+PNA	75% (12/16)	100% (8/8)	50% (4/8)	0% (0/0)	(48)
castPCR (cf-DNA)	62,1% (41/66)	ND	ND	ND	(51)
ddPCR (DNA de leucócitos)	58,3% (7/12)	67% (2/3)	67% (4/6)	33% (1/3)	(49)
	37,8% (14/37)	ND	ND	ND	(50)
ddPCR (cf-DNA)	62,1% (41/66)	ND	ND	ND	(51)
	80% (4/5)	100%(1/1)	67% (2/3)	100% (1/1)	(49)

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

PCR: Reação em cadeia da polimerase; PNA: *Peptidic nucleic acids*; rt-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; SPLE: sequenciamento paralelo em larga escala; cast-PCR: reação em cadeia da polimerase Taqman alelo-específico competitivo; cf-DNA: *cell-free* DNA; ddPCR: reação em cadeia da polimerase digital em gotas; SMA: Síndrome de McCune-Albright; ND: dado não disponível.

1.10. Princípios das metodologias mais sensíveis no diagnóstico de mutações somáticas

1.10.1. Sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE)

O SPLE consiste no sequenciamento de milhões de pequenos fragmentos de DNA de maneira simultânea (52), com a vantagem adicional de poder analisar vários genes e/ou regiões de genes em uma única corrida (53).

O SPLE consegue identificar uma gama de variações no DNA humano: mutações em ponto, inserções, deleções, inversões e translocações de genes e éxons (52), e é uma metodologia bem estabelecida tanto para mutações germinativas como somáticas (53).

A técnica permite análise de vários genes ao mesmo tempo, podendo ser por meio de um painel de genes (que englobam geralmente vários genes associados a determinado fenótipo), ou quando o estudo direcionado não permite o diagnóstico, análise de exoma ou genoma (53).

O primeiro passo para a realização da técnica é a extração do DNA, seguido pela preparação da biblioteca, que consiste em preparar o DNA para ser usado no sequenciador, fragmentando o DNA em pequenas sequências de 50 a 300 pares de bases e acoplando adaptadores (sequência de nucleotídeos previamente conhecidos) em suas extremidades. Posteriormente, é feito o enriquecimento do alvo, que pode ser feito através de hibridização com sequências complementares ou através de PCR (53).

Uma das plataformas mais comumente utilizadas é a Illumina (incluindo a HiSeq, MiSeq e NexSeq), que usa uma *flowcell* para fixar os fragmentos de DNA através de sequências que hibridizam com os adaptadores (53). A partir daí, ocorre a amplificação em ponte, no qual cada fragmento de DNA acoplado é usado como substrato para reações de amplificação que ocorrem repetidamente (54). Esta amplificação cria clusters de aproximadamente 1000 cópias idênticas de um fragmento de DNA.

Os sequenciadores Illumina usam sequenciamento por síntese, que consiste na incorporação de nucleotídeos marcados com fluorescência junto com um bloqueador que impede a adição de mais de um nucleotídeo por rodada. Posteriormente, um laser lê a fluorescência do nucleotídeo que está incorporado, registra o dado, e então o bloqueador é clivado, para que uma nova rodada possa começar com um novo nucleotídeo sendo incorporado na sequência (53, 54).

Os arquivos gerados são lidos por programas de chamadas de variantes, permitindo a identificação de mutações genéticas que possam estar presentes no DNA estudado.

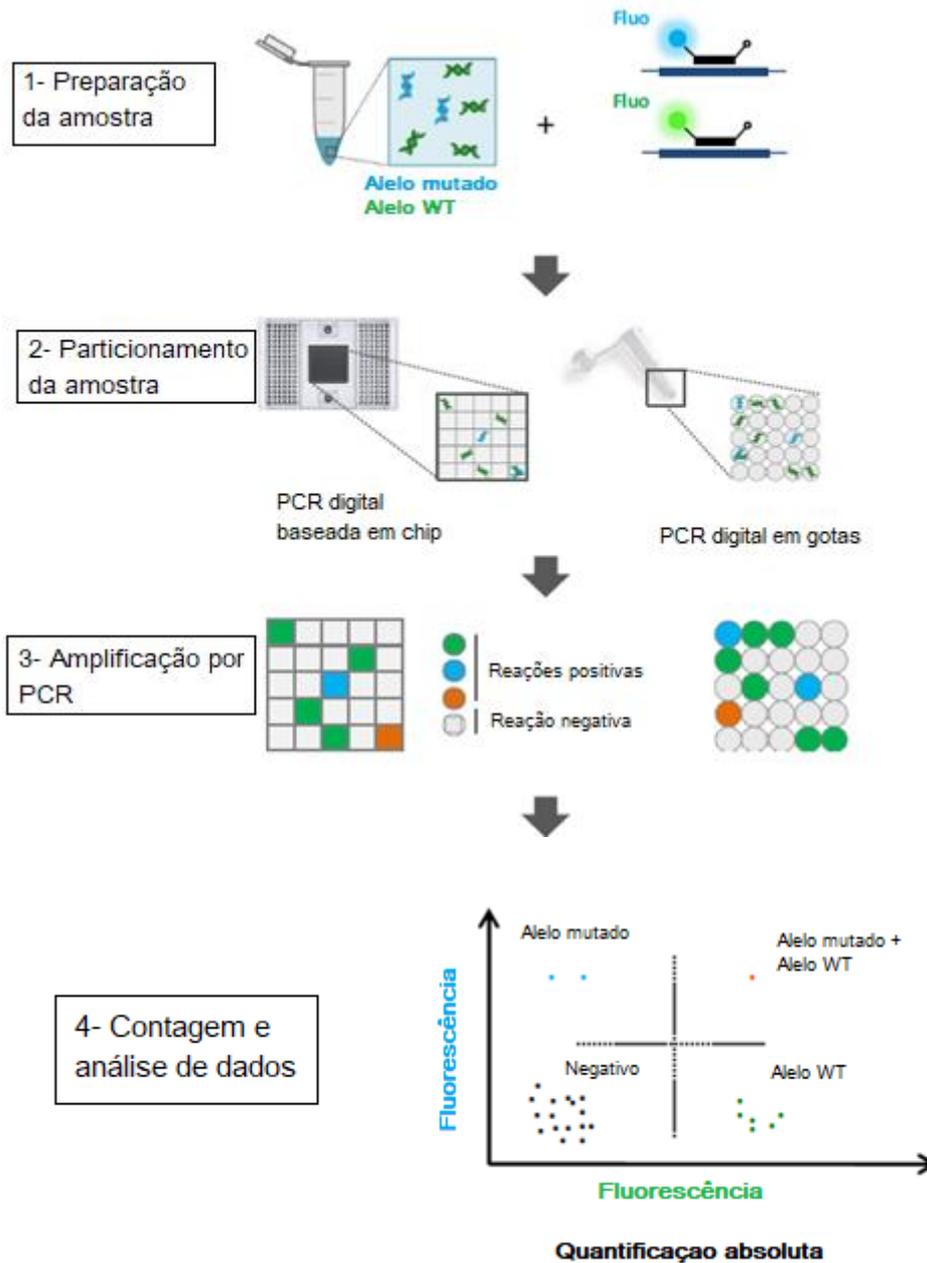
1.10.2. PCR digital em gotas

Em contraste com a PCR quantitativa (qPCR), que é realizada em um único volume de reação, a ddPCR permite o fracionamento da amostra em centenas a milhares de partições, cada uma contendo nenhum, um ou alguns DNA alvo. Cada partição comporta-se como uma reação de PCR individual. Tal qual uma reação de PCR em tempo real, são usadas sondas fluorescentes para identificar o DNA alvo amplificado. Este fracionamento das amostras reduz a sobreposição do sinal do alelo WT sobre o alelo mutado, de forma a facilitar a identificação de mutação em baixas frequências alélicas(55).

Cada partição é avaliada individualmente, recebendo o resultado 1 ou 0, que indica se as cópias do DNA alvo estão presentes ou ausentes, respectivamente. Usando os números de eventos positivos e negativos das partições, podemos estimar a concentração de DNA alvo por meio da estatística de Poisson, de forma que o número de cópias é estimado por partição. Sabendo o volume de cada partição, as cópias por partição podem ser convertidas em números de cópias por μL , revelando conseqüentemente o número absoluto de DNA alvos testados no início do teste da amostra (55).

Com a necessidade de aumentar a capacidade de detecção de baixas frequências de mutações em ponto em DNA, plataformas que fornecem um maior número de partições são necessárias, de tal forma que a emulsão PCR, ou PCR digital em gotas, ddPCR, emergiu como uma técnica mais sensível. A ddPCR usa gotas aquosas dispersas em óleo para a compartimentalização da PCR, o que possibilita a formação teórica de um número de compartimentos ilimitados (dependendo do volume das gotas e da amostra disponível). Os princípios deste método estão representados na Figura 3.

Figura 3 - Princípios da PCR digital.



FONTE: Adaptado de *Nectoux et al*, 2018 (55).

1- Preparação da amostra: o mix é preparado com junto com a amostra de DNA e as *probes* marcadas com fluoróforos (HEX para o alelo WT e 6-FAM para o alelo mutado); 2- Partição: a amostra é particionada em até 20.000 gotas após emulsificação com óleo; 3- Amplificação do PCR: após o particionamento, uma reação de PCR isolada ocorre em cada gota; 4- Contagem e análise: Após a reação de PCR, a fluorescência de cada gota é lida e classificada como positiva (fluorescência para o alelo WT ou mutado) ou negativa (gota sem DNA, portanto, sem fluorescência). Usando o número de gotas positivas e negativas, é possível estimar a concentração de DNA da amostra.

WT: *wild-type*.

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que a SMA é suspeitada, ela é usualmente diagnosticada por meio de história clínica e exame físico minucioso, exames de imagem e rastreamento laboratorial das doenças relacionadas aos tecidos que podem ser afetados, uma vez que não há uma relação entre genótipo/fenótipo e, portanto, o conhecimento de uma mutação específica não alteraria o manejo clínico (6). Todavia, devido ao amplo espectro fenotípico da síndrome e a existência de quadros clínicos parciais, incluindo aqueles com apenas uma alteração clínica cuja fisiopatologia envolve hiperativação da sinalização via $G\alpha_s$, o diagnóstico não consegue ser estabelecido clinicamente, de forma que o teste genético para detectar variantes no *GNAS* pode ser útil para confirmar o diagnóstico e auxiliar no manejo adequado e preciso.

Quando a SMA foi primeiramente descrita em 1936, as técnicas para diagnóstico genético não eram disponíveis, e até que o defeito molecular que originava a síndrome fosse elucidado, se passaram 55 anos. Portanto, os critérios diagnósticos estabelecidos eram essencialmente clínicos. Atualmente, as técnicas para o diagnóstico genético das doenças que cursam com mosaicismo estão cada vez mais avançadas, possibilitando obter maior taxa de detecção de mutação no *GNAS*, consequentemente estabelecendo o diagnóstico genético da SMA e aumentando a possibilidade de ampliar o espectro clínico reconhecido como parte da síndrome.

A confirmação do defeito genético em DNA de sangue periférico pode representar um grande avanço no diagnóstico, acompanhamento e manejo terapêutico dos pacientes portadores das formas clássicas e principalmente parciais da doença, que na maioria das vezes são subdiagnosticadas. Na maioria dos casos, não há disponibilidade de amostras de tecidos acometidos, tais como osso, pele, tecido ovariano ou hipofisário, havendo a necessidade de uma técnica sensível para detecção da mutação no *GNAS* com muito baixa frequência alélica no sangue periférico.

Desta forma, o SPLE e a ddPCR emergem como métodos mais sensíveis que podem aprimorar o diagnóstico molecular da SMA, com consequente impacto no seguimento clínico em curto e longo prazo dos pacientes. Hipotetizamos que estas metodologias permitirão o diagnóstico genético em um percentual maior de pacientes com manifestações clínicas da SMA.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Primários

- a) pesquisar a mutação p.R201H/C no gene *GNAS* em DNA de leucócitos periféricos pela técnica de ddPCR em pacientes com SMA (clássica ou com duas manifestações) e formas isoladas (puberdade precoce de origem ovariana e DFO);
- b) comparar a técnica da ddPCR com o SPLE nas amostras de DNA de pacientes com SMA que foram submetidas ao painel de endocrinopatias da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP ou sequenciamento exômico global (WES) quanto a taxa de detecção e capacidade de detecção de baixas frequências alélicas.

3.2. Objetivos secundários

- c) caracterizar clínica e laboratorialmente uma coorte de pacientes com manifestações clínicas que indicam o diagnóstico de SMA;
- d) descrever a apresentação inicial, diagnóstico laboratorial e aspectos terapêuticos de curto e longo prazo da puberdade precoce periférica de origem ovariana associada ou não a outras manifestações da SMA.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de coorte longitudinal retrospectivo e prospectivo, quanto aos aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos, e coorte transversal quanto ao diagnóstico genético.

4.2. Considerações éticas

O estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos e orientações contidas na declaração de Helsinque e pelos termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq- HCFMUSP), CAAE: 21308819.0.0000.0068 (Anexo A). O termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) por escrito foi obtido de todos os pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisas sejam iniciados. A confidencialidade dos resultados obtidos foi garantida a todos os pacientes.

Os achados de defeitos genéticos relacionados às doenças em investigação foram informados aos pacientes e/ou seus responsáveis legais, que terão aconselhamento genético e seguimento conforme o recomendado pela Sociedade Brasileira de Genética Médica e a Política Nacional de Atenção Integral à Pessoa com Doença Rara.

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html

4.3. Pacientes estudados

Foram incluídos 64 pacientes com características clínicas e laboratoriais da SMA, sendo 53 pacientes provenientes dos ambulatórios da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) que fazem seguimento nas Unidades de Endocrinologia do Desenvolvimento, Doenças Osteometabólicas, Suprarrenal ou Neuroendocrinologia e 11 pacientes provenientes de uma coorte espanhola seguidos em diferentes centros participantes do Registo Espanhol PUBERE (Hospitais Universitários La Paz, Niño Jesús e Sanitas La Moraleja).

4.3.1. Critérios de inclusão

- a) portadores da SMA com diagnóstico clínico confirmado;
- b) portadores de uma característica clínica da SMA (displasia fibrosa óssea ou autonomia ovariana).

O diagnóstico da SMA foi baseado na presença de pelo menos dois componentes da tríade clínica clássica: manchas *café-au-lait*, com bordos irregulares; displasia fibrosa óssea (confirmada por cintilografia e/ou radiografia) e hiperfunção endócrina (puberdade precoce periférica, acromegalia, síndrome de Cushing, perda renal de fosfato, hipertireoidismo), comprovadas pela presença das características clínicas e confirmação laboratorial de cada hiperfunção.

4.3.2. Coleta de dados

Os prontuários dos pacientes avaliados entre 1988 e 2022 foram sistematicamente revisados, e os seguintes itens foram avaliados: apresentação clínica e laboratorial inicial, parâmetros clínicos e laboratoriais durante o seguimento clínico e manejo terapêutico das endocrinopatias.

As 38 pacientes que apresentaram PPP (27 pacientes com SMA e 11 pacientes com puberdade precoce de origem ovariana sem outras manifestações da SMA) constituíram um subgrupo de particular interesse, e os seguintes dados foram avaliados: idade cronológica (IC) no início dos primeiros sinais puberais (telarca e/ou sangramento vaginal), IC na primeira avaliação médica, altura (cm e desvio-padrão - DP), estadiamento puberal (Marshall & Tanner), estatura alvo (EA), intervalo da EA ($EA \pm 8,5$ cm), idade óssea (IO) analisada pelos atlas de Greulich & Pyle (56), avanço de IO ($\Delta IO - IC$) e altura adulta predita pelas tabelas de Bayley-Pinneau para idade óssea média (57).

A análise do perfil hormonal incluiu concentrações de LH e FSH basais e estimulados por GnRH, medidos por ensaios de eletroquimioluminescência (ECLIA, Roche Diagnósticos) após 2012, ou ensaios imunofluorométricos (IFMA, Perkin Elmer) antes de 2012; além de concentrações basais de estradiol ou testosterona, medidos por ECLIA (Roche Diagnostics) após 2012, ou fluoroimunoensaios (FIA, Perkin Elmer) antes de 2012. As concentrações de LH basal e estimulado por GnRH foram consideradas na faixa pré-puberal se $\leq 0,3$ UI/L (ECLIA) ou $\leq 0,6$ UI/L (IFMA), e ≤ 5 UI/L usando ECLIA ou $\leq 6,9$ UI/L em meninas, respectivamente. O valor de

corte para estradiol basal sérico ser considerado puberal foi > 25 pg/mL (FIA) ou > 28 pg/mL (ECLIA).

A análise de imagens incluiu ultrassom pélvico para as meninas com PPP e cintilografia óssea para diagnóstico de DFO.

Durante o tratamento da PPP foi documentado o uso de terapia medicamentosa (isolada ou em combinação), recorrência de sangramento vaginal, dados antropométricos, estadiamento puberal e ocorrência de PPC secundária.

A duração do tratamento medicamentoso, altura adulta e padrão de regularidade dos ciclos menstruais também foram analisados.

4.4. Avaliação Genética

4.4.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de 12 ml (3 tubos de 4 ml) de sangue periférico colhido em tubo EDTA. O sangue foi incubado em solução para lise de glóbulos vermelhos (14 mM cloreto de amônia; 1 mM carbonato de amônia) durante 30 minutos a 4 °C. Após este período a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o botão de células ressuspenso em solução tampão constituída de 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH8,0; 1 mM EDTA pH 8,0 contendo 1% SDS e 0,2 mg/ml proteinase K e mantido durante a noite a 37 °C. No dia seguinte, a amostra foi submetida a duas extrações com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1) e a uma extração com clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com acetato de sódio 0,3 M em pH 7,0 e com dois volumes de etanol absoluto gelado. Posteriormente, o DNA foi lavado em etanol 70% por 5 minutos e ressuspenso em tampão de TE (10 mM Tris- HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrometria com luz ultravioleta (*Ultrspec III- Pharmacia Biotech, EUA*); o grau de pureza foi avaliado pela relação A260/A280. As amostras foram armazenadas a 4 °C até sua utilização.

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42).

4.4.2. Detecção da mutação p.R201H e p.R201C pela ddPCR

O total de 64 amostras de DNA genômico foram analisadas em duplicata, usando dois ensaios de detecção de mutação de ddPCR, visando como alvo a mutações p.R201C e p.R201H. Para cada ensaio foi utilizado o sistema *Taqman* de PCR da com duas sondas: a primeira marcada com HEX (VIC), com alvo para o alelo WT, e a segunda marcada como 6-FAM (EvaGreen), com alvo para o alelo mutado. Os ensaios R201C e R201H foram adquiridos da Bio-Rad (Hercules, Califórnia) e foram processados no sistema QX200™ Droplet Digital PCR (ddPCR™) (Bio-Rad Laboratories, Inc).

Para execução das reações R201C e R201H foram adicionados 1 µl da sonda marcada com FAM, 1 µl da sonda marcada com HEX, 10 µl do supermix ddPCR, 50 ng de DNA, e água esterilizada para um volume final de 20 µl. No Anexo C encontram-se informações adicionais sobre cada sonda utilizada no ensaio.

A mistura (reagentes + DNA) foi emulsionada com 70 µl de óleo, sendo particionada em 20.000 nano gotas. Posteriormente, 40 µl de cada amostra já particionada foi transferida para placa de PCR e amplificadas por PCR usando o seguinte protocolo: 10 minutos a 98°C (1 ciclo), seguidos por 40 ciclos de 3 etapas: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C e 10 minutos a 98°C (esta última etapa é responsável por parar a reação e coagular as gotas). Por fim, um ciclo a 12°C por 99 minutos e 59 segundos. Após a PCR, a fluorescência de cada gota foi lida no sistema 200 Droplet Digital PCR (Bio- Rad). Após a leitura, cada nano gota foi classificada em positiva (gota contendo a sequência alvo, seja ela mutada ou WT) e negativa (que não possui a sequência alvo), segundo as instruções do fabricante.

Para avaliação mais precisa dos resultados, em todas as corridas foram incluídos controles positivos (com amostras sabidamente carreadoras da mutação), controles negativos (amostra com DNA WT) e controles *no template control* (NTC), ou seja, sem amostras sem DNA, com o objetivo de identificar possíveis contaminações na amostra. Amostras com formação de gotas acima de 10000 foram consideradas de boa qualidade.

Os resultados foram analisados utilizando o *software* Quantasoft (Bio-Rad) para determinar a fração de gotas de PCR positivas na amostra original. Durante a partição da amostra em gotas, algumas delas podem conter mais de uma molécula alvo. A análise estatística de Poisson permite estimar o número de reações positivas

e negativas, possibilitando a quantificação absoluta de alelos WT ou mutados no modelo inicial, sem a necessidade de curvas padrão. Neste caso, $P(k; \lambda)$ é a probabilidade de haver k alvos em uma gota, quando a população de todas as gotas contém uma média de “carregamento” de λ alvos por gota. Por exemplo, em um sistema em que 50 moléculas são particionadas em 100 gotas, λ é 0,5.

$$(1) P(k; \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

A fração de gotas negativas (p^-) é:

$$(2) p^- = P(0; \lambda) = e^{-\lambda}$$

E a fração e gotas positivas (p), que inclui todas as gotas com uma molécula ou mais de DNA é

$$(3) p = 1 - p^- = 1 - e^{-\lambda}$$

A distribuição de Poisson é automaticamente calculada pelo *software* Quantasoft, juntamente com o intervalo de confiança, pré-determinado em 95%. Os resultados foram relatados na forma de abundância fracional, correspondente a porcentagem dos alelos mutados dentre o total de alelos (razão alelos mutados/alelos mutados+ WT) x 100.

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Genética Mitocondrial no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.4.2.1. Validação do método da ddPCR

Para validação do método ddPCR foi necessário determinar a taxa de falso positivo (TFP), limite de branco (LoB) e o limite de detecção (LoD). A TFP se refere à especificidade do ensaio, enquanto o LoB e LoD são métricas que descrevem a sensibilidade de um procedimento analítico (58).

Falsos positivos podem ocorrer por ruídos na detecção de fluorescência tanto do sistema como do ensaio analisado, por reação cruzada das sondas ou erros na indução da polimerase. Por isso, as amostras devem ser sempre analisadas concomitantemente com controles negativos, para classificação do *status* mutacional como positivo ou negativo de uma maneira mais acurada (58).

O LoB é definido como a maior medida de moléculas positivas que é provável ser observada em uma amostra em branco (amostra sabidamente negativa para a mutação), enquanto o LoD é definido como a menor concentração de moléculas

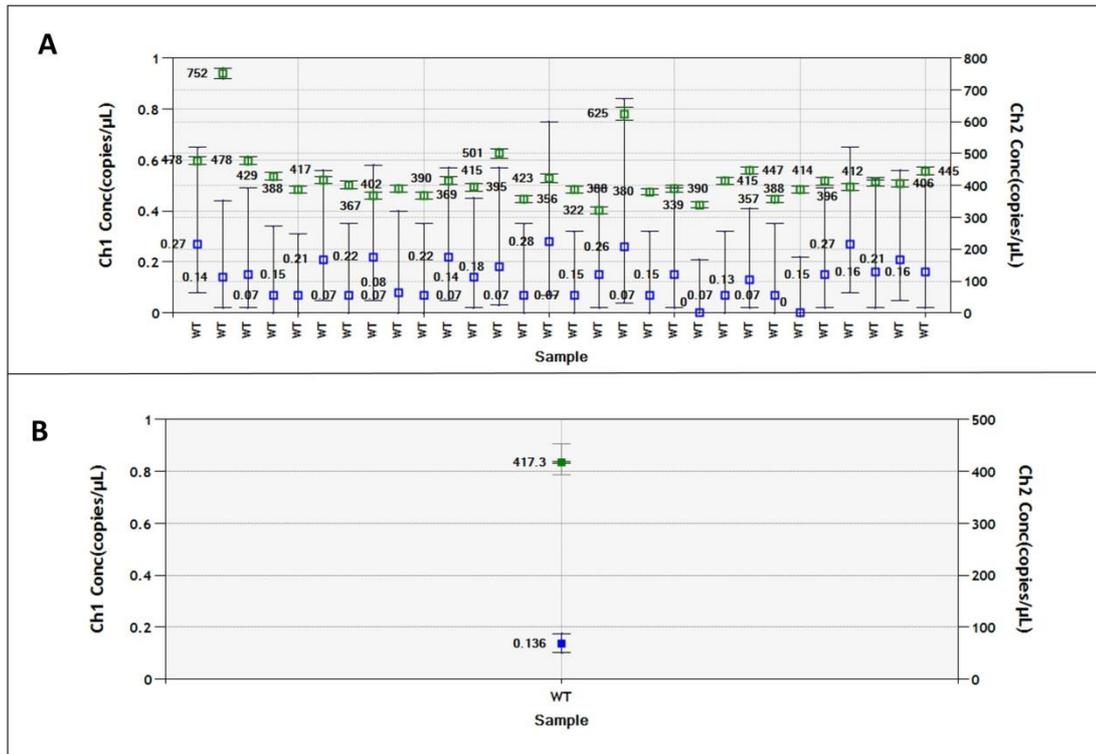
mutadas que podem ser distinguidas confiavelmente de um controle negativo (contendo somente moléculas WT) (58).

4.4.2.1.1. Cálculo da taxa de falso positivo (TFP)

A taxa de falso positivo foi obtida por meio do cálculo da média de moléculas falso-positivas (Λ_{FP}) em 30 amostras de controles negativos (WT) medidas na concentração de 50ng/ μ l. O valor é obtido na forma de razão média de falsos-positivos (RFP), que é a proporção média de cópias falsos-positivas de todas as amostras de controles negativos.

Para a mutação p.R201C, após análise de 30 amostras de controles negativos (Figura 4) foi encontrada uma média de falso positivo de 0,136 cópias/ μ l (Figura 4). Considerando que a amostra final continha 40 μ l, a Λ_{FP} foi 5,44 cópias por amostra. A razão média de falsos-positivos foi 0,00033. Houve formação de gotas positivas no controle NTC, indicando contaminação das amostras por controles positivo. Houve uma formação média de 15887 gotas por amostra, variando de 8942 a 18440 gotas (Figura 5). Apenas uma amostra teve formação de gotas abaixo de 10000.

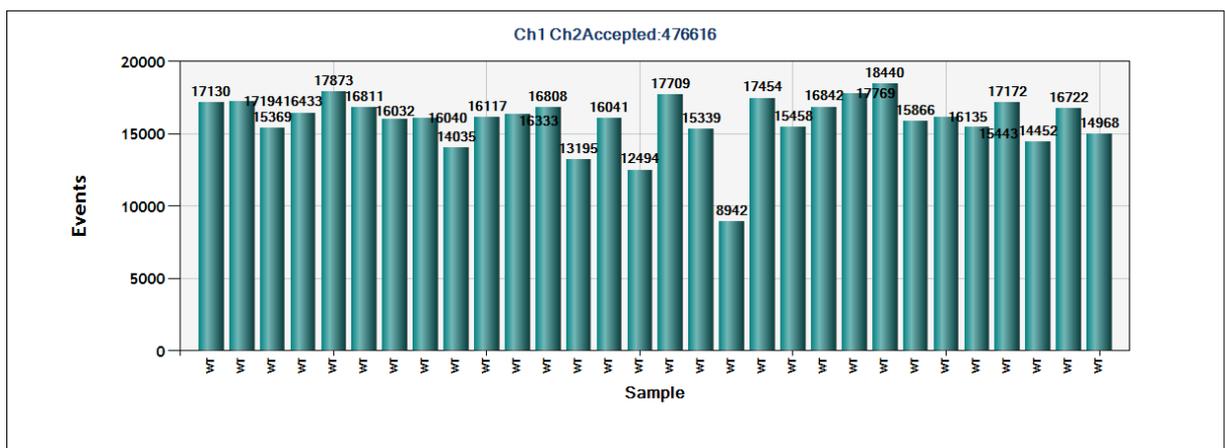
Figura 4 - Cálculo de taxa de falso positivos para o ensaio p.R201C.



FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

Trinta amostras de DNA WT (A) foram utilizadas para cálculo da média de cópias falso-positivas (cópias/ μ L) (B).

Figura 5 - Formação de gotas das 30 amostras WT para cálculo da taxa de falso-positivos do ensaio p.R201C

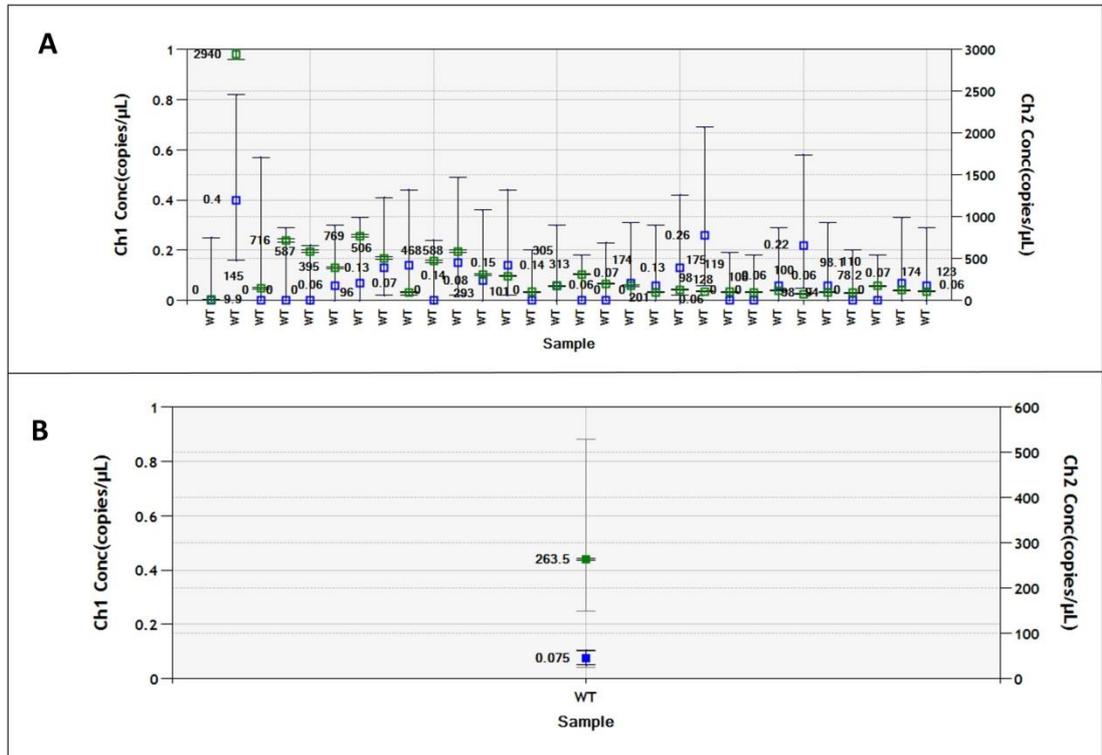


FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

Para a mutação p.R201H, após análise de 30 amostras de controles negativos (Figura 6), encontramos uma média de falso positivo de 0,075 cópias/ μ L (Figura 6). Considerando que a amostra final continha 40 μ L, a nossa Λ_{FP} foi 3 cópias por amostra. A razão média de falsos-positivos foi 0,00028. Não houve formação de

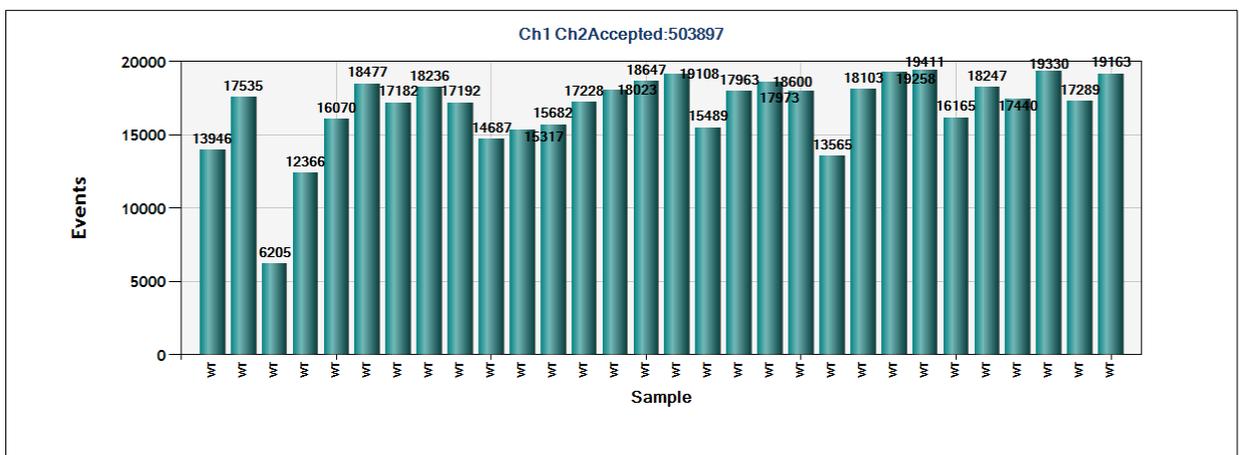
gotas positivas no controle NTC. Houve uma formação média de 16796 gotas por amostra, variando de 6250 a 19411 gotas (Figura 7). Apenas uma amostra teve formação de gotas abaixo de 10000.

Figura 6 - Cálculo de taxa de falso positivos para o ensaio p.R201H.



FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.
Trinta amostras de DNA WT (A) foram utilizadas para cálculo da média de cópias falso-positivas (cópias/μL) (B).

Figura 7 - Formação de gotas das 30 amostras WT para cálculo da taxa de falso-positivos do ensaio p.R201H.



FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

4.4.2.1.2. Cálculo LoB e LoD

O Anexo D representa o cálculo do LoB e do LoD de acordo com várias médias de Λ_{FP} assumindo um modelo de probabilidade de Poisson ajustado a dados empíricos. Para a análise, os erros tipo α e tipo β foram de 5%. Para Λ_{FP} maior que 0,05, uma aproximação normal com uma correção foi utilizada para descrever a distribuição de Poisson, visando simplificar o cálculo de LoB e LoD com uma expressão analítica.

Baseado no exposto previamente, já com os valores da Λ_{FP} e usando os cálculos representados no Anexo D, o LoB para a mutação p.R201C em uma amostra com uma média de 16692 cópias de DNA genômico é 1 mutante em 1662 cópias WT, e o LoD é 1 em 995, o que representa 0,1% de abundância fracional. Já para a mutação p.R201H, o LoB em uma amostra com uma média de 10540 cópias de DNA genômico é 1 mutante em 1585 cópias WT, enquanto o LoD é 1 em 846 cópias WT, representando uma abundância fracional de 0,12%. Isto representa a sensibilidade máxima que pode ser alcançada com uma amostra nestes ensaios.

4.4.3. Detecção da mutação p.R201H e p.R201C por SPLE

Amostras de DNA de leucócitos de sangue periférico de 18 pacientes (13 pacientes com tríade e 5 pacientes com 2 características clínicas) foram analisados no painel customizado da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP por SPLE. Este painel englobou o sequenciamento de 746 genes (2.5 Mb – Tier 2) associados a distúrbios endócrinos e/ou metabólicos. O processo foi desenvolvido no laboratório de sequenciamento em larga escala (SELA) da FMUSP. As amostras foram preparadas pelo sistema de captura de sondas (SureSelect XT). (Agilent Technologies, CA, USA) e as sequências foram geradas utilizando a plataforma NextSeq 500, Kit MidOutput V2 2x150 (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA).

Todas as sequências foram alinhadas tendo como referência o GRCh37/hg19. Uma equipe de bioinformática vinculada ao SELA (Dr. Antônio Lerário [Departamento de Medicina Interna da Divisão de Metabolismo, Endocrinologia e Diabetes da Universidade de Michigan], Dr. Lucas Santana [HCFMUSP] e Anna Flavia Benedetti [SELA]) foi responsável pela análise dos dados brutos e geração dos arquivos analisáveis (VCF anotada).

Adicionalmente, o total de 17 pacientes (sendo 4 portadores da tríade clínica da SMA, 4 portadores de SMA com 2 características clínicas e 9 pacientes com

puberdade precoce ovariana ou displasia fibrosa) foram analisados por WES. As bibliotecas foram construídas no SELA utilizando o kit SureSelect XT HS Human All Exon V8 (*Agilent Technologies*, CA, USA), e as sequências foram geradas no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, utilizando a plataforma *NovaSeq 6000*, *Kit XGen IDT Exome*, v.1.0 (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA), de acordo com protocolos previamente publicados (59).

As sequências foram alinhadas usando o programa GATK tendo como referência o GRCh37/hg19. O programa Integrative Genomics Viewer (IGV) foi utilizado para análise dos arquivos BAM (Binary Alignment/Map), os quais foram visualmente analisados nas regiões genômicas 20:57484420-57484421 e 20:57484595-57484597 (GRCh37/hg19), onde as mutações associadas com a SMA estão localizadas. O anexo E demonstra as mutações pesquisadas no *GNAS* que já foram associadas a SMA.

Foram analisados 35 controles negativos, que não apresentavam nenhuma alteração clínica e laboratorial relacionadas com a SMA. Após esta análise, consideramos resultados positivos os achados de variantes alélicas representadas por 6 ou mais leituras independentes com balanço das fitas de leituras.

4.5. Análise estatística

Os resultados dos dados clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e genéticos foram expressos como valores numéricos (porcentagens) para variáveis categóricas, e como média e desvio padrão (DP) ou medianas e intervalo interquartil (IQ) para variáveis contínuas, devido à distribuição paramétrica ou não-paramétrica, respectivamente (testados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk).

Associações entre variáveis categóricas foram realizadas pelos testes de qui-quadrado (variáveis independentes) e McNemar (variáveis dependentes). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste post-hoc de Dunn foram utilizados para comparação entre variáveis contínuas não paramétricas, enquanto o teste-T para amostras independentes e o teste-T pareado foram utilizados para comparações entre variáveis contínuas com distribuição normal. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação de variáveis contínuas independentes quando a distribuição da variável era não paramétrica. A análise estatística foi realizada na

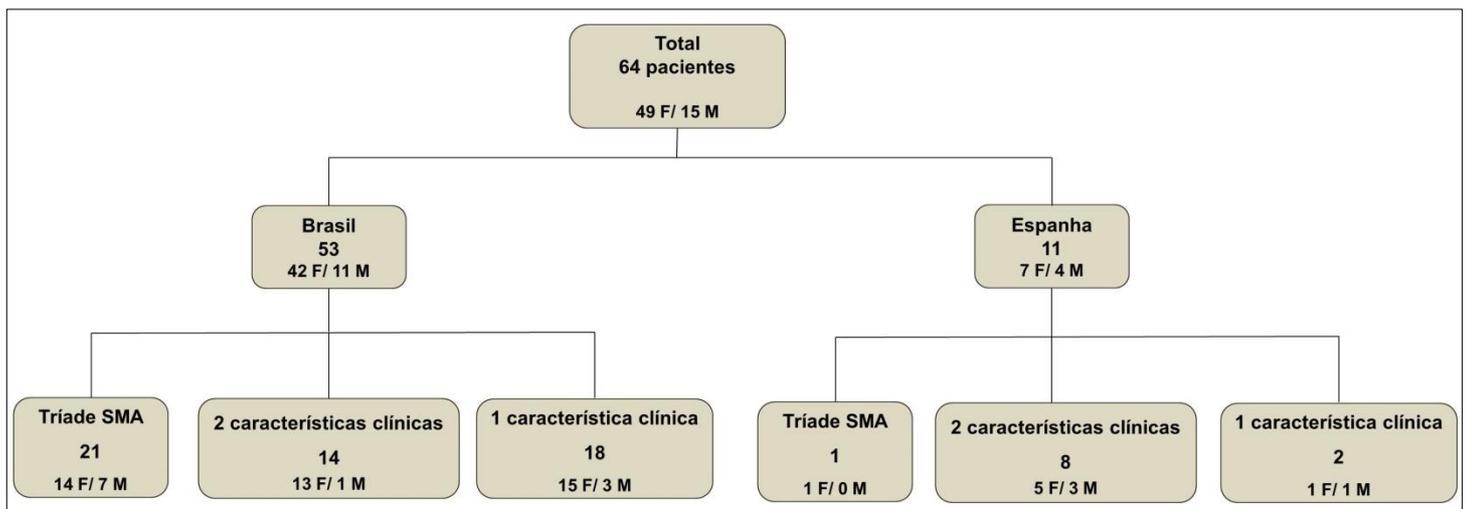
plataforma R x 64 (v 4.1.0, 2021, Viena, Áustria). A significância estatística foi estabelecida por $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização clínica dos pacientes portadores SMA e portadores de uma característica clínica da SMA

No total foram incluídos 64 pacientes, sendo 53 pacientes provenientes de uma coorte brasileira (HCFMUSP) e 11 pacientes de centros terciários espanhóis. O sexo feminino compunha 76,5% da casuística. Manchas *café-au-lait* e DFO estavam presentes em 54,7% e 73,4% dos pacientes. A PPP foi a hiperfunção hormonal mais prevalente (59,4%), seguida de acromegalia (12,5%) e hipertireoidismo (11%). Veja na Figura 8 e Tabela 3 a distribuição do número das características clínicas entre os pacientes de cada coorte

Figura 8- Distribuição das características clínicas e procedência dos pacientes incluídos no estudo.



FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

SMA: Síndrome de McCune-Albright; F: sexo feminino; M: sexo masculino.

Tabela 3 - Características clínicas individuais dos pacientes incluídos no estudo

Paciente	Sexo	Manchas <i>café-au- lait</i>	Displasia Fibrosa Óssea	Puberdade Precoce Periférica	Acromegalia	Hipertireoidismo
1	F	+	+	+	-	-
2	F	+	+	+	-	-
3	M	+	+	-	+	-
4	F	+	+	+	-	-
5	M	+	+	-	+	+
6	F	+	+	+	-	-
7	F	+	+	+	-	-
8	F	+	+	+	-	+
9	F	+	+	+	-	-
10	F	+	+	+	-	+
11	M	+	+	-	-	+
12	F	+	+	-	+	-
13	M	+	+	-	+	-
14	F	+	+	+	-	-
15	M	+	+	-	+	-
16	F	+	+	+	+	+
17	F	+	+	+	-	-
18	F	+	+	+	-	-
19	F	+	+	+	-	-
20	F	+	+	+	-	-
21	M	+	+	-	-	+
22	M	+	+	-	+	-
23	F	-	+	+	-	-
24	F	+	-	+	-	-
25	F	-	+	+	-	-
26	F	-	+	+	-	-
27	F	-	+	+	-	-
28	F	+	-	+	-	-
29	F	+	+	-	-	-
30	M	-	+	-	-	+
31	F	+	-	+	-	-
32	F	+	-	+	-	-
33	F	+	-	+	-	-
34	M	+	+	-	-	-
35	M	-	+	-	+	-
36	F	-	+	+	-	-
37	F	+	+	-	-	-
38	F	-	+	+	-	-
39	F	+	+	-	-	-
40	M	+	+	-	-	-
41	F	+	+	-	-	-
42	F	+	+	-	-	-
43	F	-	+	+	-	-
44	F	+	-	+	-	-
45	F	-	-	+	-	-
46	F	-	-	+	-	-
47	M	-	+	-	-	-

(Continua)

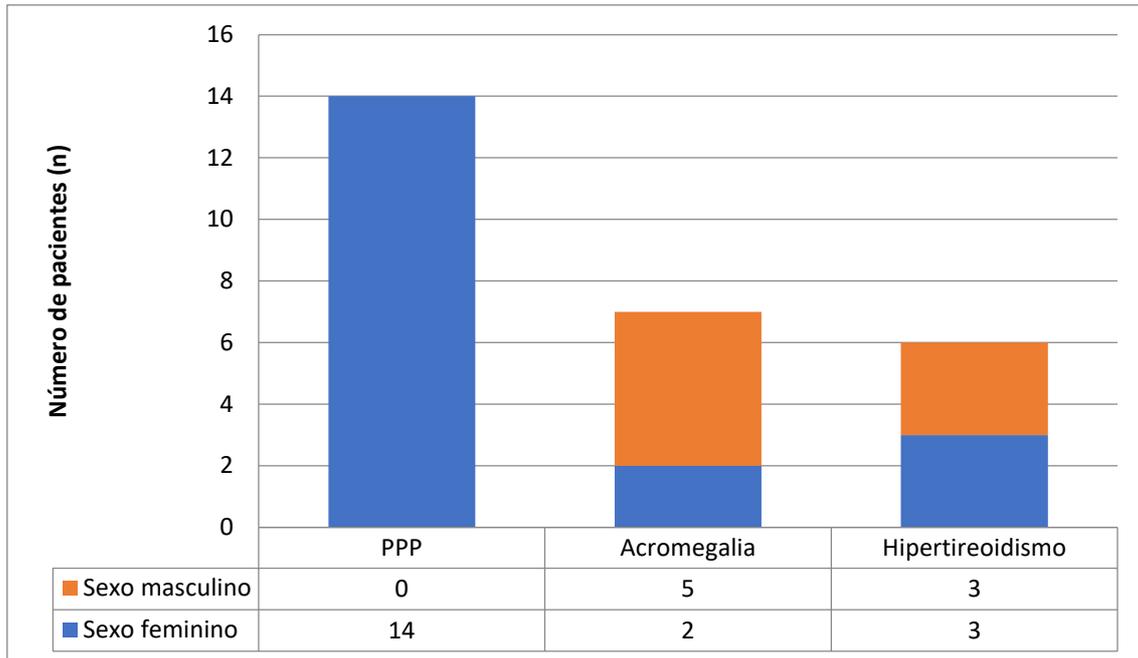
Paciente	Sexo	Manchas <i>café-au- lait</i>	Displasia Fibrosa Óssea	Puberdade Precoce Periférica	Acromegalia	Hipertireoidismo
48	M	-	+	-	-	-
49	F	-	-	+	-	-
50	M	-	+	-	-	-
51	F	-	+	-	-	-
52	F	-	-	+	-	-
53	F	-	-	+	-	-
54	F	-	-	+	-	-
55	F	-	-	+	-	-
56	M	-	+	-	-	-
57	F	-	-	+	-	-
58	F	-	-	+	-	-
59	F	-	-	+	-	-
60	F	-	+	-	-	-
61	F	-	+	-	-	-
62	F	-	+	-	-	-
63	F	-	+	-	-	-
64	F	-	-	+	-	-
Total (n)	49 F; 15 M	35 (54,7%)	47 (73,4%)	38 (59,4%)	8 (12,5%)	7 (11%) (Conclusão)

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

(+) presente; (-) ausente; F: sexo feminino; M: sexo masculino.

No grupo de portadores da tríade clássica da SMA, 22 pacientes no total foram incluídos. Com relação às hiperfunções hormonais, PPP, acromegalia, hipertireoidismo estavam presentes em: 14, 7 e 6 pacientes, respectivamente (Figura 9). Combinação de 2 e 3 hiperfunções hormonais estavam presentes em 2 e 1 pacientes, respectivamente.

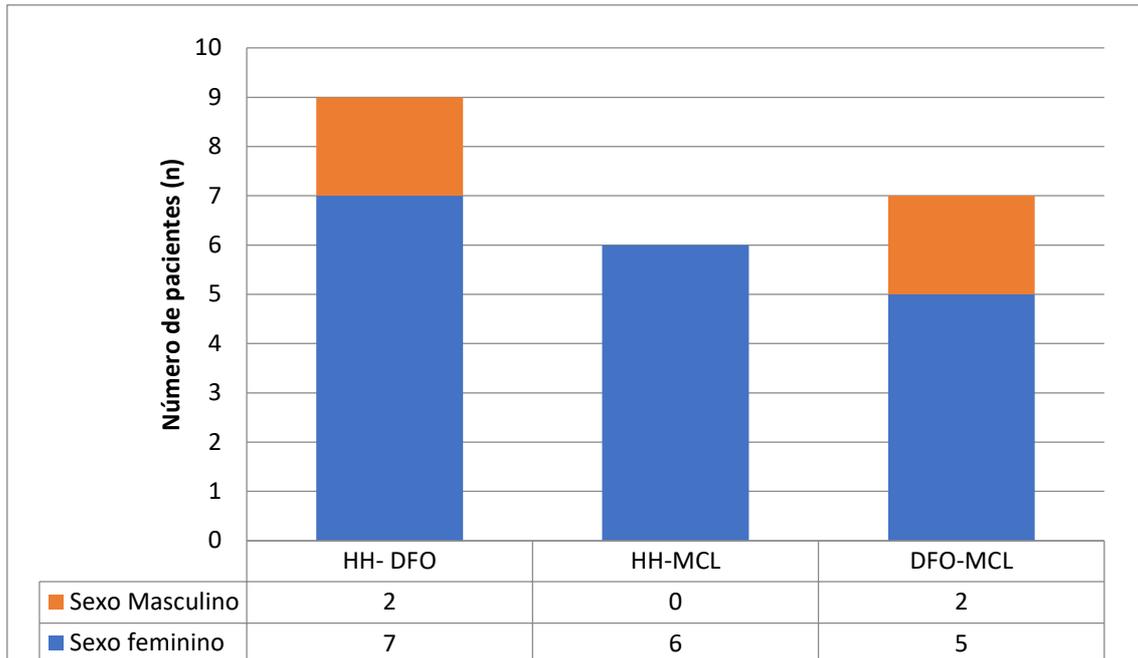
Figura 9 - Distribuição das hiperfunções hormonais nos pacientes portadores da tríade clássica da Síndrome de McCune-Albright



FONTE: Elaborada pelo próprio autor.
 PPP: Puberdade precoce periférica

No grupo de pacientes portadores da SMA com 2 características clínicas foram incluídos 22 pacientes, e nos subgrupos de associação entre hiperfunção hormonal e DFO, hiperfunção hormonal e manchas *café-au-lait* e DFO e manchas *café-au-lait* foram incluídos 9, 6 e 7 pacientes, respectivamente (Figura 10). No subgrupo com pacientes portadores de associação de hiperfunção hormonal e DFO, todas as pacientes do sexo feminino tinham diagnóstico de PPP, enquanto um paciente do sexo masculino apresentava diagnóstico de hipertireoidismo e o outro acromegalia. No subgrupo de portadores da associação de hiperfunção hormonal e manchas *café-au-lait*, todas as pacientes eram do sexo feminino e foram diagnosticadas com PPP.

Figura 10 - Subgrupos de pacientes com 2 características clínicas Síndrome de McCune-Albright

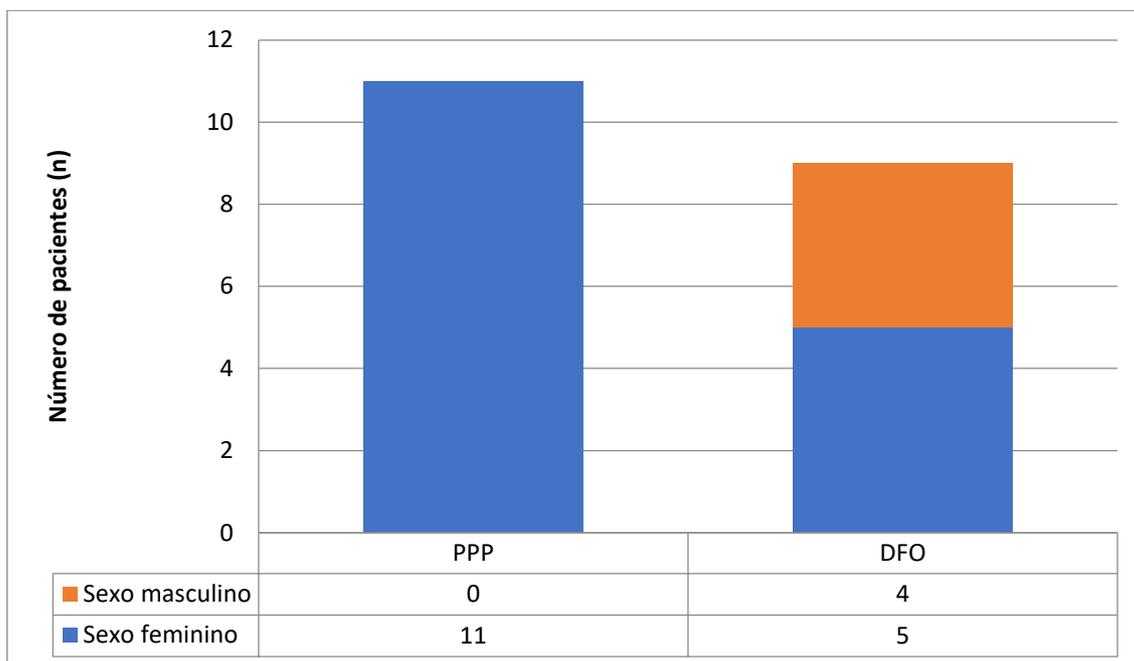


FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

HH- DFO: associação entre hiperfunção hormonal e displasia fibrosa óssea; HH- MCL: associação entre hiperfunção hormonal e mancha *café-au-lait*; DFO- MCL: associação entre displasia fibrosa óssea e mancha *café-au-lait*.

No grupo de pacientes portadores de 1 característica clínica da SMA foram incluídos 20 pacientes, dentre eles 11 pacientes com diagnóstico de PPP e 9 pacientes com DFO (Figura 11).

Figura 11 – Grupo de pacientes portadores de 1 característica clínica da SMA



FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

PPP: Puberdade precoce periférica; DFO: displasia fibrosa óssea

5.2. Características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de PPP

Dados clínicos, laboratoriais e de imagem do início do diagnóstico de 33 pacientes com diagnóstico PPP estavam disponíveis, sendo 22 pacientes portadores de SMA (tríade clássica ou 2 características clínicas) e 11 pacientes portadores de PPP isolada.

Todas as pacientes eram do sexo feminino. A média da idade de início dos sintomas da PPP foi $3,7 \pm 2,03$ e $4,3 \pm 2,24$ anos para meninas do grupo portadoras da SMA e PPP isolada, respectivamente ($p=0,49$). Após o início dos sintomas, a primeira consulta ocorreu com a média de idade de $5,6 \pm 2,2$ e $5,8 \pm 1,7$ para meninas do grupo portadoras da SMA e PPP isolada, respectivamente ($p=0,76$). Os primeiros sintomas no grupo das meninas com SMA foram telarca (41,6%), sangramento vaginal (37,5%) e associação de telarca e sangramento vaginal (20,8%), enquanto no grupo das pacientes com PPP isolada 82% das meninas queixavam-se apenas de telarca, ao passo que sangramento vaginal isolado e associação de telarca e sangramento vaginal ocorreu em apenas em 1 e 1 menina, respectivamente ($<0,001$).

Na primeira avaliação, todas as meninas no grupo de portadoras de SMA apresentaram desenvolvimento mamário, enquanto no grupo da PPP isolada apenas

1 paciente apresentou Tanner 1 de mamas (paciente 64- na primeira consulta, aos 3 anos e 10 meses, já havia realizado ooforectomia bilateral por cistos ovarianos e PPP em outro serviço).

Avanço de idade óssea (Δ IO-IC) estava presente em 73,3% e 72,7% das pacientes do grupo de portadores da SMA e PPP isolada, respectivamente. A média de Δ IO-IC foi $2,53 \pm 1,92$ e $1,73 \pm 1,49$ no grupo de portadoras da SMA e PPP isolada, respectivamente. A altura adulta predita estava em média 6,4 cm ($p=0,2$) e 7,2 cm ($p=0,1$) abaixo da EA no grupo de portadoras da SMA e grupo da PPP isolada, respectivamente, estando 50% e 71,4% das pacientes portadores de SMA e PPP isolada com altura adulta predita abaixo do intervalo de EA ($p=0,003$), respectivamente. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as médias do DP da altura na primeira consulta, avanço de IO (Δ IO-IC) e DP da altura adulta predita calculada pela tabela de Bayley-Pinneau.

Ao diagnóstico, 100% das pacientes de ambos os grupos apresentaram LH basal na faixa pré-puberal. A mediana do pico de LH foi 0,8 (IQ 0,3; 2,54) UI/L e 1,5 (IQ 1,1; 1,59) UI/L ($p=0,22$) no grupo portador de SMA e PPP isolada, respectivamente. A mediana do estradiol ao diagnóstico foi 35,6 (IQ 12,25; 239,4) pg/mL e 31 (IQ 13; 284,8) pg/mL ($p=0,87$). Notavelmente, 5 pacientes (45,4%) no grupo da PPP isolada apresentaram estradiol em níveis pré-puberais, enquanto no grupo de pacientes com SMA, foram 7 pacientes (31,8%) ($p=0,11$).

No primeiro exame de ultrassonografia pélvica, cistos ovarianos estavam presentes em 88% dos pacientes no grupo de pacientes portadores de SMA e em 91% dos pacientes portadores de PPP isolada. A Tabela 4 mostra os dados clínicos e laboratoriais das pacientes com diagnóstico de PPP associada ou não à SMA.

Tabela 4- Características clínico-laboratoriais de pacientes com PPP associadas ou não a SMA no início do diagnóstico.

Características clínico-laboratoriais	Grupo SMA (n= 22)	Grupo PPP isolada (n=11)	p [#]
IC primeira manifestação clínica (anos)	3,7 ± 2,03	4,3 ± 2,24	0,49
IC primeira consulta (anos)	5,6 ± 2,2	5,8 ± 1,7	0,76
Primeira manifestação clínica			
Telarca	41% (9/22)	82% (9/11)	<0,001
Sangramento vaginal	36% (8/22)	9% (1/11)	
Telarca + sangramento vaginal	23% (5/22)	9% (1/11)	
Desenvolvimento mamário (estádio ≥ M2)			
	100%	91%	0,006
Avanço IO (anos)	2,53 ± 1,9	1,73 ± 1,49	0,25
DP altura	1,1±1,4	1,9 ± 1,2	0,165
DP altura adulta predita	-2,1± 2,4	-1,34 ± 1,8	0,44
LH basal* (UI/L)	0,1 (IQ 0,1; 0,6)	0,13 (IQ 0,1; 0,6)	0,65
FSH basal* (UI/L)	1,0 (IQ 0,3; 1,0)	1,0 (IQ 0,7;1,2)	0,34
Estradiol (pg/mL)	35,6 (IQ 12,25; 239,4)	31 (IQ 13; 284,8)	0,87
Pico LH após estímulo GnRH* (UI/L)	0,8 (IQ 0,3; 2,54) (n=10)	1,5 (IQ 1,1; 1,59) (n=8)	0,22
Presença de cistos	79% (15/19)	91% (10/11)	0,02

FONTE: Elaborado pelo próprio autor

#O p valor foi calculado para a comparação de dois grupos usando o teste t de Student para variáveis contínuas com distribuição normal e teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas com distribuição não normal. O teste de qui-quadrado foi usado para variáveis categóricas. P valor estatisticamente significativo foi destacado em negrito.

*Para fins estatísticos; apenas hormônios medidos por IFMA foram considerados.

IC: idade cronológica; IO: idade óssea; DP: desvio-padrão; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo- estimulante; GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas; SMA: Síndrome de McCune-Albright; PPP: puberdade precoce periférica.

No grupo de pacientes portadoras de SMA, o tratamento foi heterogêneo (dados de 23 pacientes disponíveis), e incluiu como primeira escolha tamoxifeno (10-20 mg) em 34,7% (8/23) das pacientes, seguido de inibidores da aromatase (anastrozol 1-2mg/dia ou letrozol 2,5 mg/dia) em 17,4% (4/23), medroxiprogesterona (50-100mg a cada 2 semanas) em 8,6% (2/23) e cetoconazol (200mg/dia) em 8,6% (2/23) das pacientes, respectivamente. Duas pacientes foram submetidas à ooforectomia antes de iniciar qualquer tratamento medicamentoso e 5/23 (21,7%) pacientes não realizaram tratamento medicamentoso (pelo fato de terem iniciado acompanhamento após a puberdade ou quadro autolimitado). A combinação de pelo menos duas classes medicamentosas ocorreu em 58,8% (10/17) das pacientes que realizaram uso de medicamentos para controle da PPP.

Recorrência de sangramento vaginal ocorreu em 50% (6/12) das pacientes durante o tratamento. PPC secundária ocorreu em 52,9% (9/17) das pacientes.

No grupo de pacientes com PPP isolada, a primeira escolha do tratamento incluiu tamoxifeno em 72,7% (8/11) das pacientes, enquanto 2 pacientes foram submetidas a ooforectomia e 1 paciente utilizou letrozol. Das pacientes que usaram tamoxifeno, duas usaram em combinação com acetato de ciproterona e uma paciente usou combinado com acetato de medroxiprogesterona. Uma paciente (paciente 58) apresentou sangramento vaginal recorrente durante o tratamento medicamentoso. PPC secundária ocorreu em 50% (5/10) das pacientes.

Hipertricose relacionada ao uso de tamoxifeno foi reportada em 4 pacientes (pacientes 2, 4, 25 e 54), enquanto hiperandrogenismo laboratorial ocorreu em uma paciente em uso de inibidores da aromatase (paciente 24). Esta mesma paciente, desenvolveu cisto volumoso com risco de torção durante o tratamento medicamentoso, sendo submetida à ooforoplastia esquerda. Uma paciente (paciente 33) desenvolveu insuficiência adrenal parcial com uso de cetoconazol (já chegou ao nosso serviço em uso da medicação), sendo a medicação descontinuada.

A média do tempo de tratamento foi $5,8 \pm 3$ anos e $2,8 \pm 1,4$ anos no grupo da SMA e da PPP isolada, respectivamente ($p=0,005$).

No grupo de pacientes com SMA a média do DP da altura adulta foi $-1,5 \pm 1,3$. Após o tratamento, houve ganho de altura final em média 4,7 cm acima da altura adulta prevista pelo método de Bayley-Pinneau ($p=0,5$) e apenas 2 pacientes não atingiram o intervalo da EA ($EA \pm 8,5$ cm).

No grupo de pacientes com PPP isolada, a média do DP da altura adulta foi $0,38 \pm 0,8$. Após o tratamento, houve ganho de altura adulta em média 5,1 cm acima da altura adulta predita pelo método de Bayley-Pinneau ($p=0,26$) e apenas 1 não atingiu o intervalo da EA. Houve diferença estatística entre altura adulta do grupo de portadoras de SMA e PPP isolada ($p=0,004$).

Ciclos menstruais regulares foram relatados por 61,5% e 71,5% das pacientes que terminaram o tratamento medicamentoso ($p<0,001$). A Tabela 5 resume as características clínicas das pacientes com PPP durante e após tratamento.

Tabela 5- Características clínicas de pacientes com PPP associada ou não à SMA durante e após tratamento

Dados durante e após tratamento	Grupo SMA (n= 23)	Grupo PPP isolada (n=11)	p [#]
	Média ± DP	Média ± DP	
Recorrência de SV durante o tratamento	50% (n=12)	9%	<0,001
Incidência de PPC secundária	52,9%	50% (n=10)	0,78
Duração do tratamento (anos)	5,8 ± 3	2,8 ± 1,4	0,005
DP altura adulta	-1,5 ± 1,3	0,38 ± 0,8	0,004
Ciclos menstruais regulares	61,5% (n= 13)	71,5% (n= 7)	<0,001

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

#O p valor foi calculado para a comparação de dois grupos usando o teste t de Student para variáveis contínuas com distribuição normal. O teste de qui-quadrado foi usado para variáveis categóricas. P valor estatisticamente significativo foi destacado em negrito.

SMA: Síndrome de McCune-Albright; PPP: puberdade precoce periférica; SV: sangramento vaginal; PPC: puberdade precoce central secundária; DP: desvio-padrão.

5.3. Características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMA e hipertireoidismo

No total, 7 pacientes desenvolveram hipertireoidismo (4 pacientes do sexo masculino e 3 pacientes do sexo feminino). A idade média ao diagnóstico foi 16,9 ± 11,5 anos (variando de 2 anos a 36 anos). Todos os pacientes (100%) apresentaram TSH suprimido com T4 livre e/ou T3 total acima do limite superior da normalidade. A média do T4 livre e T3 total foi 2,44± 0,92 ng/dL e 335 ± 119 ng/dL, respectivamente. Todos os valores de TRAB eram negativos.

Dados de ultrassonografia da tireoide de 4 pacientes estavam disponíveis (pacientes 5, 10, 11 e 21) e todos apresentaram bócio multinodular, com nódulos medindo até 2 cm no maior diâmetro. Dados de cintilografia de tireoide de 3 pacientes (pacientes 10, 11 e 30) estavam disponíveis, sendo bócio multinodular tóxico identificados nos pacientes 10 e 30, enquanto o paciente apresentava captação da tireoide normal, com irregulares cintilográficas em lobo esquerdo.

Propiltiouracil e metimazol foram primeira escolha de tratamento nos pacientes 10 e 21, e 7 e 11, respectivamente. Posteriormente, os pacientes 7 e 21 foram submetidos a radioiodoterapia, enquanto o paciente 10 foi submetido a tireoidectomia total. O paciente 11 mantém uso de metimazol até o momento.

Radiodoterapia e tireoidectomia total representaram as primeiras medidas de tratamento instituídas nos pacientes 5 e 30, e na paciente 12, respectivamente.

5.4. Características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMA e acromegalia

Oito pacientes foram diagnosticados com gigantismo/acromegalia. Dados clínicos de 6 pacientes estavam disponíveis (pacientes 3, 5, 12, 13, 15 e 22). A idade média ao diagnóstico foi $19,9 \pm 13$ anos (variando de 2 a 32 anos). A média de GH e IGF1 basais foi $10,3 \pm 8,7$ $\mu\text{g/L}$ e 709 ± 247 ng/mL . No teste de supressão de GH com glicose, 100% dos os pacientes obtiveram valores acima de 1 $\mu\text{g/L}$. Metade dos pacientes (pacientes 3, 5 e 15) apresentavam hiperprolactinemia associada.

No exame de ressonância magnética da hipófise, 4 pacientes apresentavam hipófise normal, enquanto os pacientes 12 e 13 apresentaram microadenoma de 8 mm e macroadenoma de 2,2 cm, respectivamente.

O paciente 12 foi tratado com cirurgia transesfenoidal, com bom controle clínico-laboratorial no seguimento de longo prazo. O paciente 13 não pode ser abordado cirurgicamente devido dificuldade de abordagem por localização do adenoma, no entanto é bem controlado clínico laboratorialmente com uso de lanreotide e cabergolina. Os demais pacientes mantêm controle da doença em uso de análogos da somatostatina (octreotide, lanreotide ou pasireotide) em associação ou não com cabergolina.

5.5. Características clínico-laboratoriais dos pacientes portadores de DFO

Dados de 37 pacientes com DFO estavam disponíveis, sendo 30 pacientes portadores da SMA e 7 pacientes com DFO isolada.

No grupo de pacientes portadores de SMA, 76,7% dos pacientes são portadores de DFO com envolvimento craniofacial e do esqueleto axial e/ou apendicular, enquanto 23,3% são portadores de DFO de acometimento exclusivo craniofacial. Já entre os pacientes com DFO isolada, o predomínio é de DFO

craniofacial em 85,7%, enquanto 14,3% dos pacientes possuem DFO com envolvimento craniofacial e do esqueleto axial e/ou apendicular ($p < 0,001$).

Não houve fraturas no grupo de pacientes portadores da DFO isolada, enquanto 40% dos pacientes portadores da SMA sofreram pelo menos 1 fratura óssea patológica ($p < 0,001$).

Houve compressão das vias ópticas em 4 pacientes no grupo da DFO isolada (pacientes 41, 47, 48 e 62) e 3 pacientes portadores da SMA (pacientes 4, 10 e 21). Quanto à compressão das vias aéreas, ocorreu em dois pacientes portadores de DFO isolada (pacientes 47 e 52) e em 3 pacientes portadores de SMA (pacientes 4, 30 e 42). No grupo de pacientes portadores da SMA, 3 pacientes evoluíram com escoliose (pacientes 9, 10 e 27) e 2 pacientes com compressão das vias auditivas (pacientes 10 e 30). Não houve casos de escoliose e compressão das vias auditivas no grupo de DFO isolada.

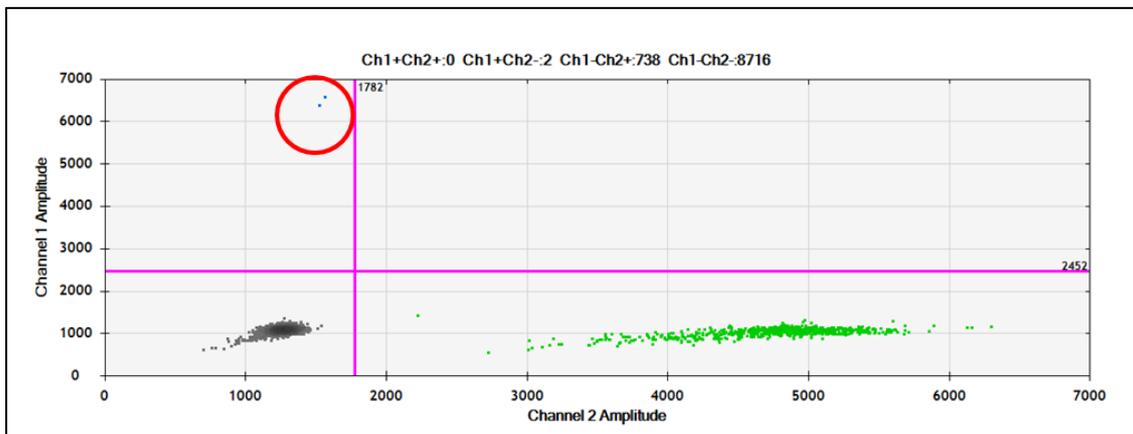
O uso de bisfosfonatos (pamidronato ou ácido zoledrônico) foi útil para pacientes com queixas de dores ósseas. O uso de bisfosfonatos ocorreu em 67% e 57% dos pacientes portadores de DFO isolada e SMA, respectivamente ($p = 0,19$).

5.6. Análise genética por ddPCR

A ddPCR foi realizada em todos os 64 pacientes incluídos neste presente estudo. A mediana das gotas formadas para o ensaio p.R201C foi 14556 (IQ 12.782; 16.016), variando de 10.283 a 18.138. Nenhuma amostra obteve formação de gotas inferior a 10.000.

Para o ensaio p.R201H a mediana das gotas formadas foi 14.281 (IQ 11.497; 16.623), variando de 8.556 a 18.707. Quatro amostras apresentaram formação de gotas inferior a 10.000 (Pacientes 4, 17, 47 e 48). Dos pacientes com baixa contagem de gotas, três apresentaram teste molecular negativo (Pacientes 17, 47 e 48) e a paciente 4 apresentou resultado positivo para a mutação p.R01H, com abundância fracional de 0,26% e uma formação de gotas 9.456 (Figura 12).

Figura 12 - Representação de gotas do ensaio ddPCR para a mutação p.R201H da paciente 4

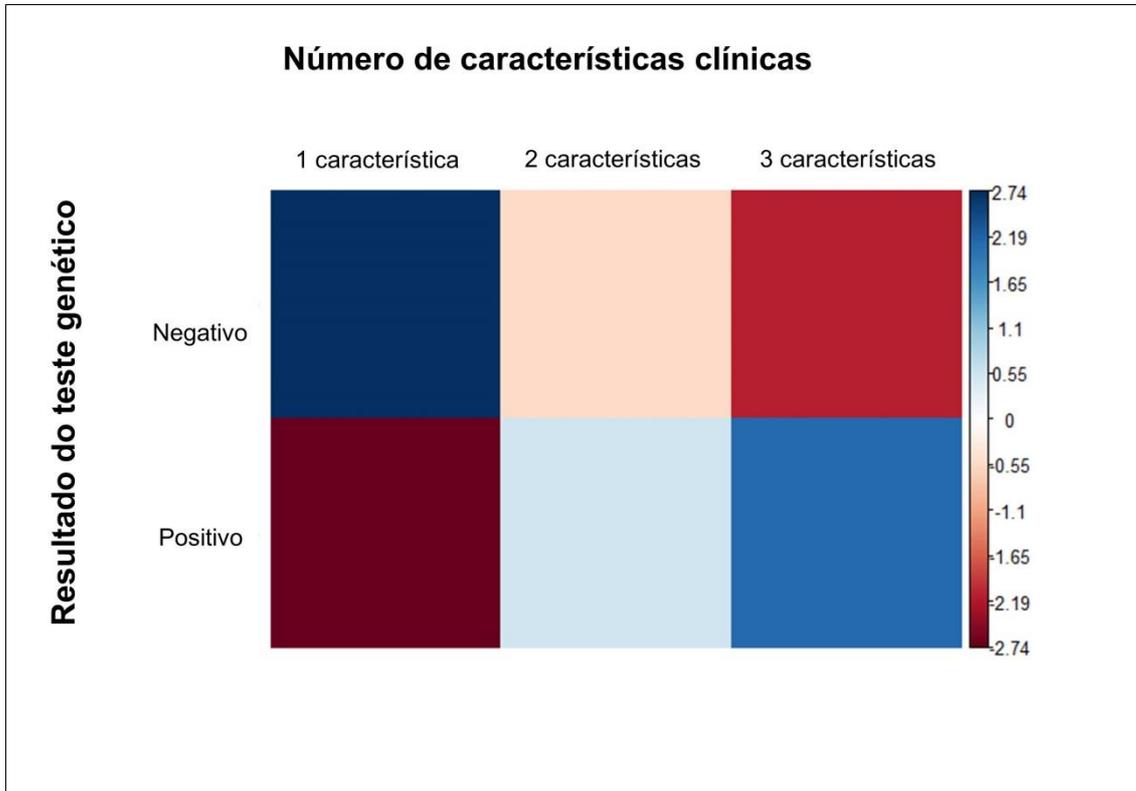


FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

As gotas verdes e azuis (circuladas em vermelho) são positivas e demonstram fluorescência para o alelo WT e mutado (p.R201H), respectivamente, enquanto as gotas cinzas são negativas (sem DNA e fluorescência).

Dos 64 pacientes analisados, 29 (45,3%) obtiveram resultado molecular positivo pela ddPCR. No grupo de pacientes com a tríade clássica da SMA, 14/22 pacientes (63,6%) apresentaram resultado molecular positivo, sendo identificada a mutação p.R201C e p.R201H em 8 e 6 pacientes, respectivamente. No grupo dos pacientes portadores de 2 características clínicas da SMA, 11/22 (50%) apresentaram resultado molecular positivo, sendo identificada a mutação p.R201C e p.R201H em 4 e 7 pacientes, respectivamente. Já no grupo portador de uma característica clínica, 4/20 (20%) dos pacientes apresentaram resultado molecular positivo, sendo identificada a mutação p.R201C e p.R201H em 1 e 3 pacientes, respectivamente. Houve associação entre o número das características clínicas e o resultado molecular positivo ($p=0,0154$). A análise dos resíduos padronizados ajustados mostrou que há menos testes positivos no grupo portador de uma característica clínica e mais testes positivos no grupo da tríade clássica (Figura 13).

Figura 13 - Análise dos resíduos padronizados ajustados da associação entre o resultado do teste genético positivo e o número de características clínicas dos pacientes



FONTE: produção do próprio autor.

A cor azul representa o desvio padrão positivo e a cor vermelha o desvio-padrão negativo. Quanto mais intensa a cor, mais estatisticamente significativo o dado (o dado é considerado estatisticamente significativo quando maior ou menor que 2 DP (1,96). No grupo de 1 característica clínica, percebe-se que menos testes positivos foram observados do que o esperado para a amostra se não houvesse diferença entre os grupos, enquanto no grupo de 3 características clínicas mais testes positivos foram observados do que o esperado para a amostra se não houvesse diferença entre os grupos.

A mediana da abundância fracional foi 0,58 (IQ 0,16; 1,7), variando de 0,1% a 14,8%. A Tabela 6 lista os pacientes com resultado molecular positivo e suas respectivas abundâncias fracionais. Não houve diferença entre as medianas das taxas de abundância fracional e o número de manifestações clínicas presentes ($p=0,07$), e a análise *post-hoc* confirmou que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 14).

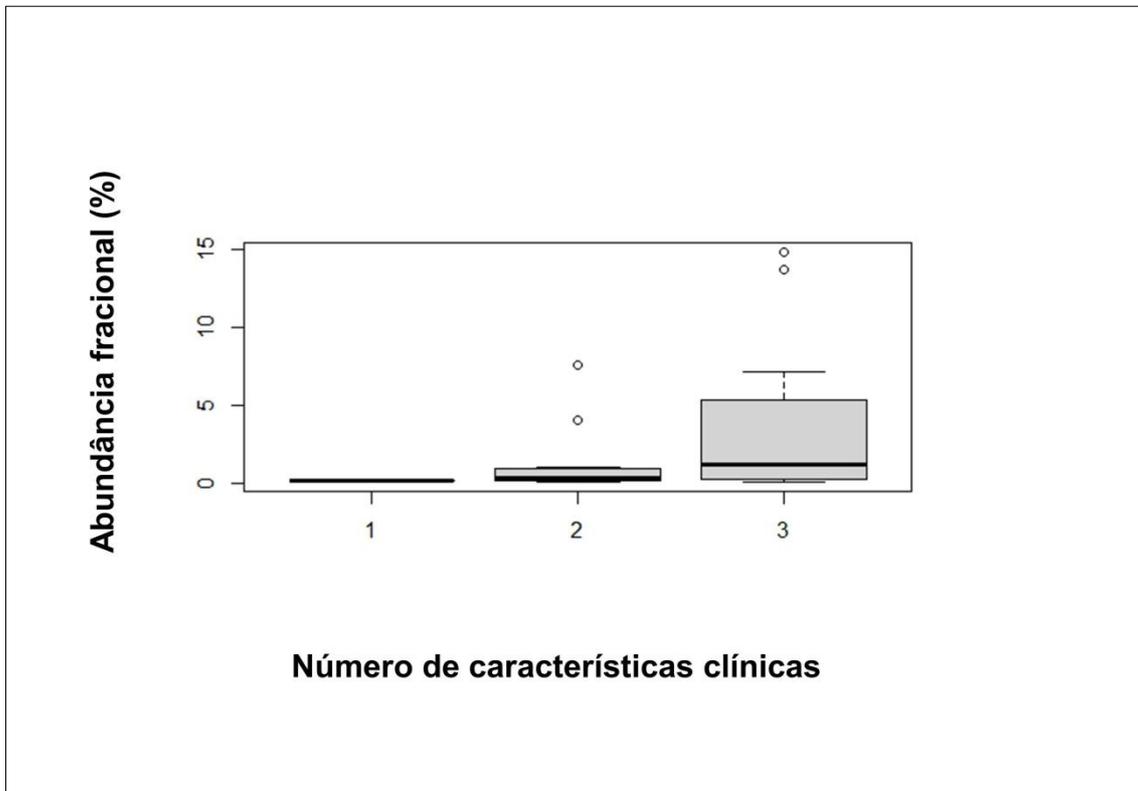
Tabela 6 - Pacientes com teste genético positivo pela ddPCR e suas respectivas abundâncias fracionais

Paciente	Número de características clínicas	c.601C>T (p.R201C)	c.602G>A (p.R201H)	Abundância fracional (%)
3	3		+	1,7
4	3		+	0,26
6	3	+		1,2
7	3		+	1,1
8	3		+	5,0
9	3	+		0,58
10	3	+		7,15
11	3	+		5,3
13	3		+	0,12
14	3	+		0,11
16	3	+		1,2
17	3	+		0,13
21	3		+	12,4
22	3	+		18,9
Mediana (IQ)				1,2 (0,34; 5,22)
23	2		+	0,66
25	2		+	4,9
26	2		+	0,25
30	2	+		7,6
31	2		+	0,13
32	2	+		0,13
34	2	+		0,11
36	2		+	1,0
37	2		+	0,33
38	2	+		0,16
43	2		+	0,9
Mediana (IQ)				0,33 (0,14; 0,95)
46	1	+		0,1
58	1		+	0,17
59	1		+	0,18
62	1		+	0,17
Mediana (IQ)				0,17 (0,15; 0,17)

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

+: mutação presente.

Figura 14 - Distribuição dos dados da abundância fracional entre os grupos com 1, 2 e 3 características clínicas da SMA obtidos na ddPCR.

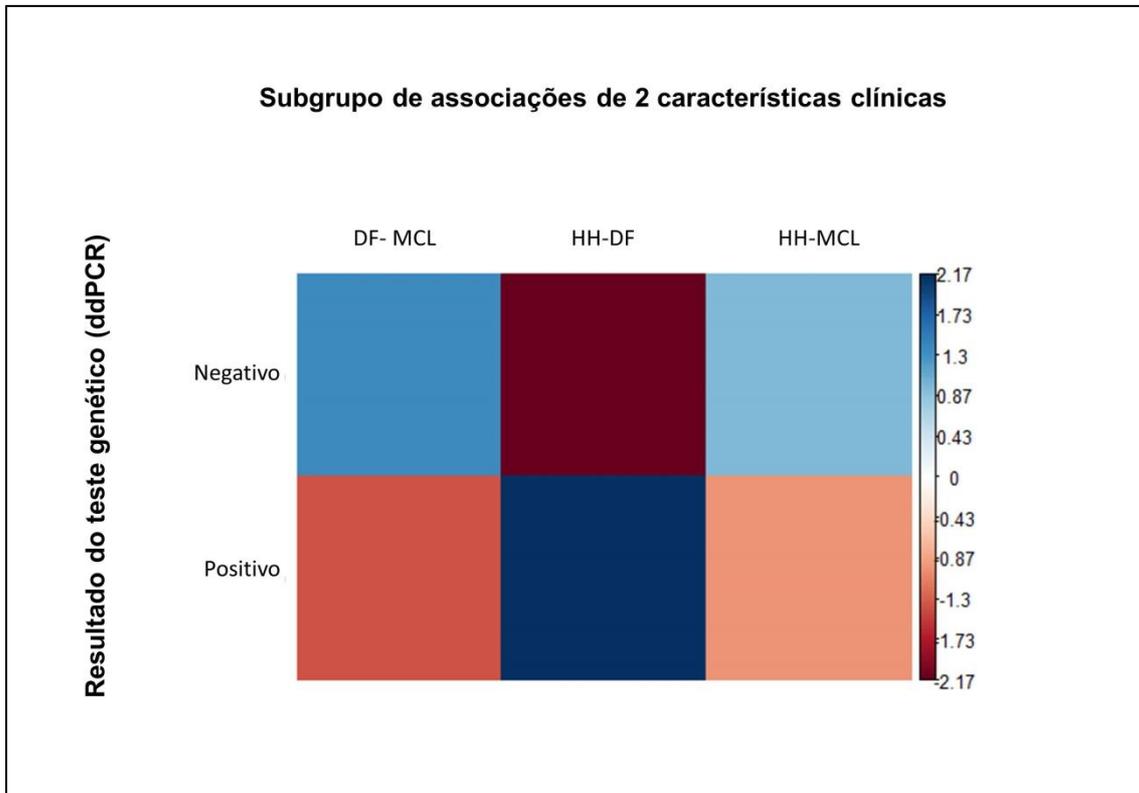


FONTE: produção do próprio autor.

Não houve diferença estatística entre as medianas dos grupos ($p=0,07$). As caixas cinza representam a distribuição interquartil que contém 50% dos dados, enquanto a linha dentro da caixa representa a mediana. Os pequenos círculos representam *outliers*.

Considerando o grupo portador de 2 características clínicas, e respectivos subgrupos: associação entre hiperfunção hormonal e DFO, entre hiperfunção hormonal e mancha *café-au-lait*, e entre DFO e mancha *café-au-lait*, não houve associação entre o resultado do teste molecular positivo e os subgrupos citados acima ($p=0,094$). No entanto, a análise dos resíduos padronizados ajustados, mostrou que há mais testes positivos no subgrupo de portadores de hiperfunção hormonal e DFO (Figura 15).

Figura 15 - Análise dos resíduos padronizados ajustados da associação entre o resultado do teste genético positivo e os subgrupos de associação de 2 características clínicas



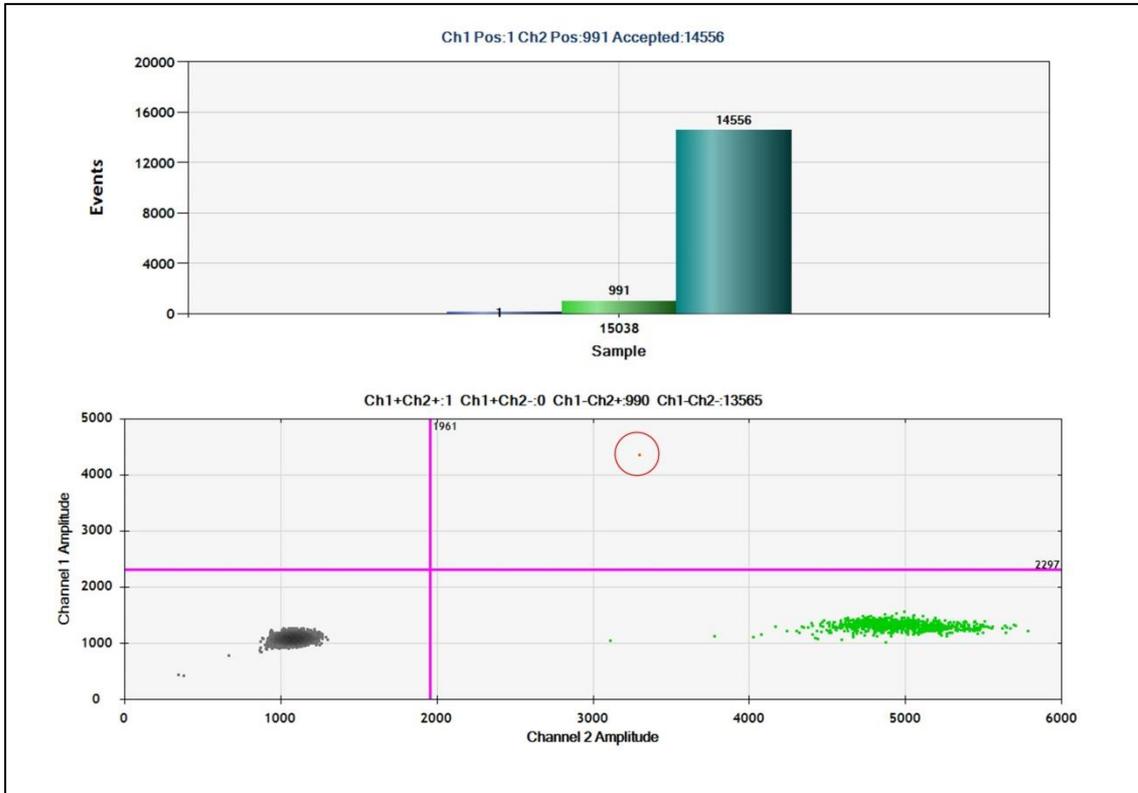
FONTE: produção do próprio autor.

A cor azul representa o desvio padrão positivo e a cor vermelha o desvio-padrão negativo. Quanto mais intensa a cor, mais estatisticamente significativo o dado (o dado é considerado estatisticamente significativo quando maior ou menor que 2 DP (1,96)). No subgrupo referente à associação de Hiperfunção Hormonal e Displasia fibrosa óssea (HH-DF), percebe-se que mais testes positivos foram observados do que o esperado para a amostra se não houvesse diferença entre os grupos.

DF-MCL: associação entre displasia fibrosa óssea e mancha *café-au-lait*; HH-DF: associação entre hiperfunção hormonal e displasia fibrosa óssea; HH-MCL: associação entre hiperfunção hormonal e mancha *café-au-lait*.

No grupo de pacientes portadoras de apenas uma característica clínica, das 4 pacientes que apresentaram resultado molecular positivo, 3 eram portadoras de PPP (pacientes 46, 58 e 59) e uma de DFO (paciente 62). As taxas de abundância fracional das pacientes 46, 58, 59 e 62 foram: 0,1%, 0,17%, 0,18% e 0,17%, respectivamente. As figuras 16, 17, 18 e 19 mostram a formação de gotas de cada paciente e sua respectiva distribuição de gotas positivas e negativas.

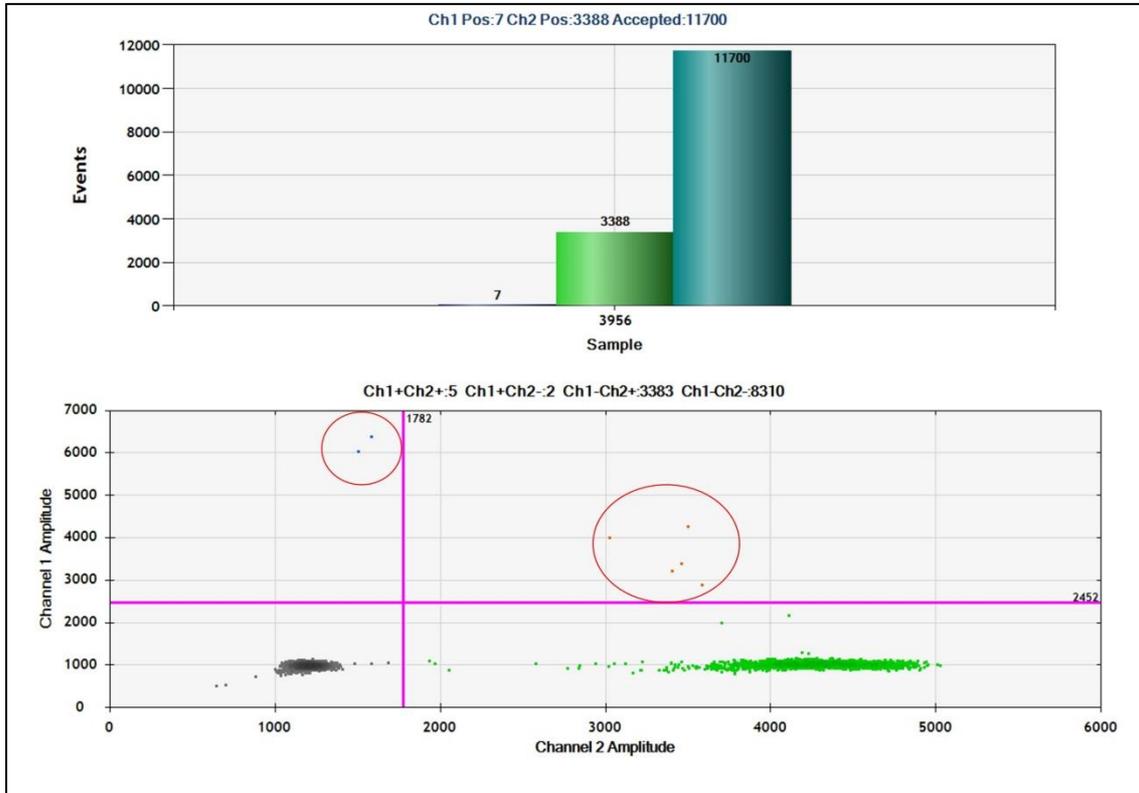
Figura 16 – Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201C) da paciente 46, portadora de PPP isolada



FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

A imagem superior evidencia a quantidade total de gotas (coluna verde água), e a formação de gotas positivas para WT (coluna verde) e para a mutação p.R201C (coluna azul). A imagem inferior evidencia a distribuição das gotas. As gotas verdes e laranjas (destacada em vermelho) são positivas e demonstram fluorescência para o alelo WT e associação de alelo WT e mutado (p.R201C), respectivamente, enquanto as gotas cinzas são negativas (sem DNA e fluorescência).

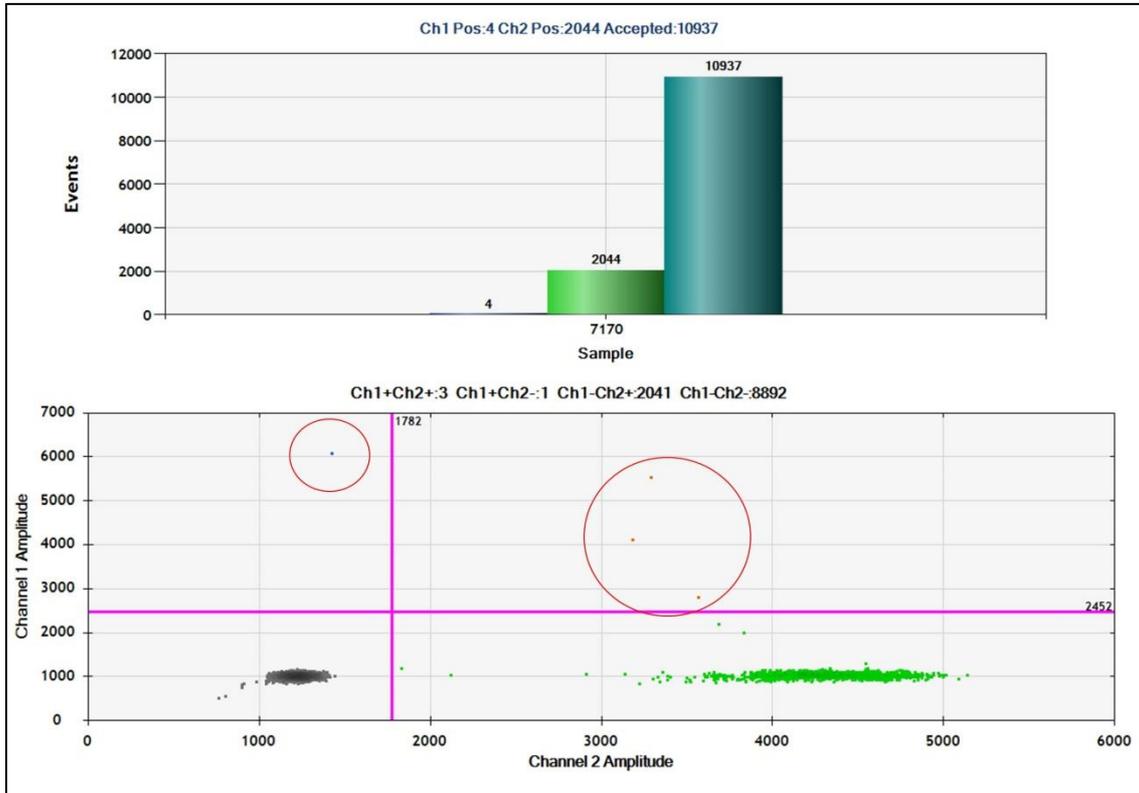
Figura 17 - Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201H) da paciente 58, portadora de PPP isolada



FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

A imagem superior mostra a quantidade total de gotas (coluna verde água), e a formação de gotas positivas para WT (coluna verde) e para a mutação p.R201H (coluna azul). A imagem inferior evidencia a distribuição das gotas. As gotas verdes, azuis e laranjas (destacadas em vermelho) são positivas e demonstram fluorescência para o alelo WT, mutado, e associação de alelo WT e mutado (p.R201H), respectivamente, enquanto as gotas cinzas são negativas (sem DNA e fluorescência).

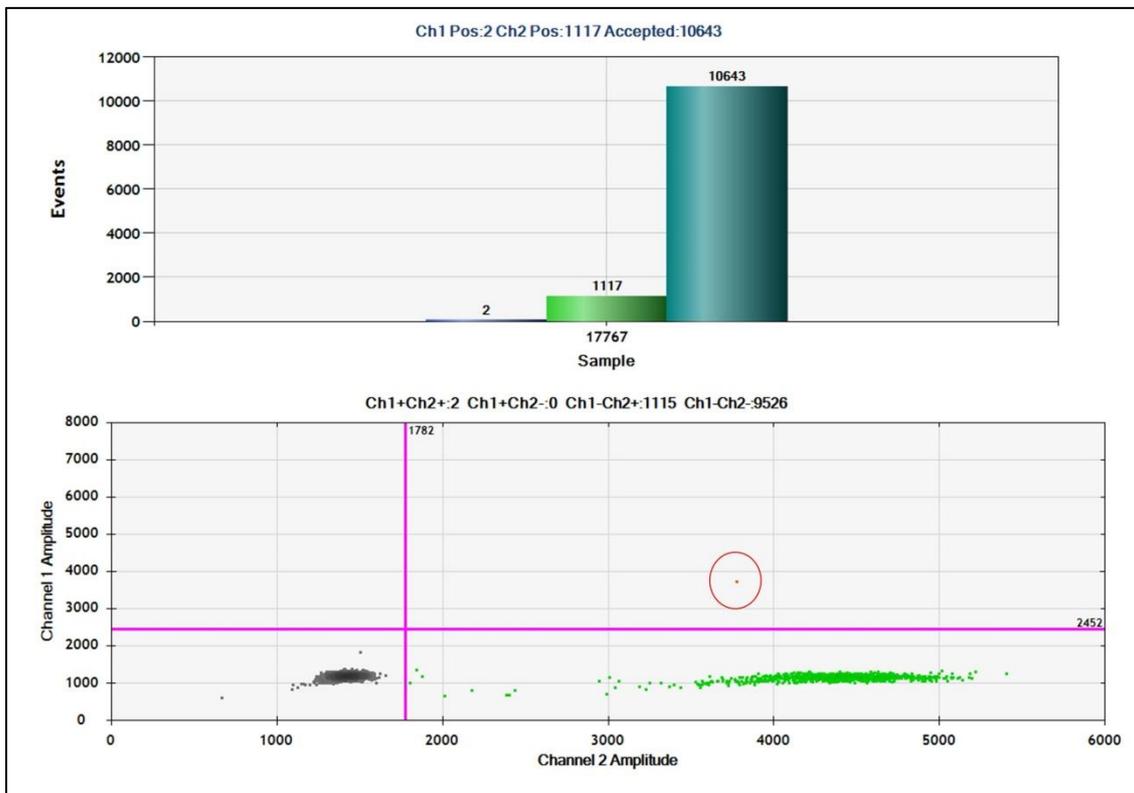
Figura 18 - Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201H) da paciente 59, portadora de PPP isolada



FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

A imagem superior evidencia a quantidade total de gotas (coluna verde água), e a formação de gotas positivas para WT (coluna verde) e para a mutação p.R201H (coluna azul). A imagem inferior evidencia a distribuição das gotas. As gotas verdes, azuis e laranjas (destacadas em vermelho) são positivas e demonstram fluorescência para o alelo WT, mutado, e associação de alelo WT e mutado (p.R201H), respectivamente, enquanto as gotas cinzas são negativas (sem DNA e fluorescência).

Figura 19 - Representação do resultado do estudo genético por ddPCR (ensaio p.R201H) da paciente 62, portadora de DFO



FONTE: Software QuantaSoft; dados do autor.

A imagem superior evidencia a quantidade total de gotas (coluna verde água), e a formação de gotas positivas para WT (coluna verde) e para a mutação p.R201H (coluna azul). A imagem inferior evidencia a distribuição das gotas. As gotas verdes e laranjas (destacadas em vermelho) são positivas e demonstram fluorescência para o alelo WT e associação de alelo WT e mutado (p.R201H), respectivamente, enquanto as gotas cinzas são negativas (sem DNA e fluorescência).

5.7. Análise genética por SPLE

Foram estudados os DNAs de 35/64 pacientes (54,7%) por SPLE, sendo 18/35 (51,4%) sequenciados por painel de genes customizados e 17/35 (48,6%) por WES.

5.7.1. Caracterização clínica dos pacientes estudados por SPLE

Dos pacientes estudados, 17 eram portadores da tríade clássica da SMA, 9 apresentavam duas características clínicas e 9 pacientes apenas uma característica clínica.

No grupo de pacientes com a tríade clássica da SMA, 10 pacientes eram do sexo feminino e 7 pacientes do sexo masculino. Todas as pacientes do sexo feminino, exceto uma (paciente 12- Tabela 7) apresentaram PPP de origem

ovariana. Além de PPP, as pacientes 8 e 10 desenvolveram hipertireoidismo (Tabela 7). Acromegalia foi diagnosticada na paciente 12. Dentre os pacientes do sexo masculino, nenhum apresentou PPP, enquanto hipertireoidismo e acromegalia foram diagnosticados em 3 e 5 pacientes, respectivamente (Tabela 7). O paciente 5 foi diagnosticado com as duas hiperfunções mencionadas anteriormente.

No grupo de pacientes com 2 características clínicas da SMA, 8 pacientes eram do sexo feminino e 1 paciente do sexo masculino (paciente 28). Hiperfunção hormonal associado com DFO estava presente em 5 pacientes, enquanto associação de mancha *café-au-lait* com hiperfunção hormonal ou DFO estavam presentes em 3 e 1 pacientes, respectivamente.

No grupo de pacientes com uma característica clínica da SMA, a PPP estava presente em 6 pacientes (todas do sexo feminino) e DFO em 3 pacientes (2 pacientes do sexo masculino e 1 do sexo feminino). As características clínicas dos pacientes estudados por SPLE estão listadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características clínicas dos pacientes estudados por SPLE.

Paciente	Sexo	Manchas <i>café-au- lait</i>	Displasia Fibrosa Óssea	Puberdade Precoce Periférica	Acromegalia	Hipertireoidismo
1	F	+	+	+	-	-
2	F	+	+	+	-	-
3	M	+	+	-	+	-
4	F	+	+	+	-	-
5	M	+	+	-	+	+
6	F	+	+	+	-	-
7	F	+	+	+	-	-
8	F	+	+	+	-	+
9	F	+	+	+	-	-
10	F	+	+	+	-	+
11	M	+	+	-	-	+
12	F	+	+	-	+	-
13	M	+	+	-	+	-
14	F	+	+	+	-	-
15	M	+	+	-	+	-
21	M	+	+	-	-	+
22	M	+	+	-	+	-
23	F	-	+	+	-	-
24	F	+	-	+	-	-
25	F	-	+	+	-	-
26	F	-	+	+	-	-
27	F	-	+	+	-	-
28	F	+	-	+	-	-
29	F	+	+	-	-	-
30	M	-	+	-	-	+
31	F	+	-	+	-	-
45	F	-	-	+	-	-
46	F	-	-	+	-	-
48	M	-	+	-	-	-
49	F	-	-	+	-	-
50	M	-	+	-	-	-
51	F	-	+	-	-	-
52	F	-	-	+	-	-
53	F	-	-	+	-	-
54	F	-	-	+	-	-
Total	25 F; 10 M	21 (60%)	26 (74,3%)	22 (62,9%)	6 (17,1%)	6 (17,1%)

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

(+) presente; (-) ausente; F: sexo feminino; M: sexo masculino.

5.7.2. Análise genética por SPLE

A média da profundidade de leitura para o códon 201 do *GNAS* estudado por painel foi $268,8 \pm 32,2$ (variando entre 180 e 317), enquanto média da profundidade de leitura do códon 201 do *GNAS* estudado por WES foi $67,5 \pm 16,5$ (variando entre

46 e 113). A média da profundidade de leitura dos pacientes estudados por WES foi muito inferior àqueles estudados por painel ($p < 0,0001$). A média da profundidade de leitura para o códon 227 do *GNAS* estudado por painel foi $499,6 \pm 87,2$ (variando entre 363 e 686), enquanto média da profundidade de leitura do códon 227 do *GNAS* estudado por WES foi $44,3 \pm 9,8$ (variando entre 25 e 59). A média da profundidade de leitura dos pacientes estudados por WES foi muito inferior àqueles estudados por painel ($p < 0,0001$).

Os protocolos de análise de variantes germinativas utilizados pelos programas convencionais de chamadas de variantes (*freebayes*), não identificaram variante no gene *GNAS*. Partindo para a análise visual no IGV, mutação no *GNAS* foi identificada em 7 dos 35 pacientes (20%), sendo 6 pacientes portadores da tríade clássica e 1 paciente portador de 2 características clínicas da SMA. A mutação R201C foi identificada em 4 pacientes, enquanto a mutação R201H foi identificada em 3 pacientes. A média da abundância fracional das mutações foi $8,7 \pm 6$ % e variou entre 2,9% e 19%. Não houve associação entre o número de características clínicas e o resultado molecular positivo ($p = 0,075$).

Resultados moleculares de 5 pacientes foram considerados inconclusivos (pacientes 2, 3, 4, 7 e 23) por causa da baixa frequência de leituras (≤ 5 reads) e ou desbalanço das fitas de leitura, ou seja, quando a mutação foi identificada em apenas uma fita (*sense* ou *anti-sense*), sugerindo um erro de leitura (falso positivo). Todos os resultados moleculares dos pacientes estudados por WES foram negativos. A Tabela 8 representa as mutações identificadas no *GNAS* e suas frequências alélicas.

Tabela 8 - Mutações identificadas no gene *GNAS* pelo SPLE e suas respectivas abundâncias fracionais.

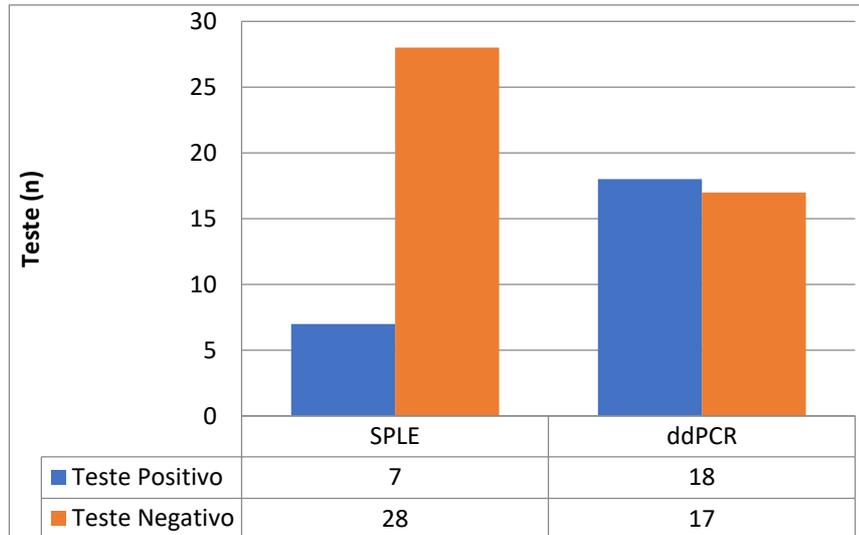
Paciente	Número de características clínicas	c.601C>T (p.R201C)	c.602G>A (p.R201H)	Abundância fracional (%)
6	3	251C(137+,114-): 10T(4+,6-)	---	3,8
8	3	---	283G (153+,130-): 16A(10+,6-)	5,3
10	3	224C(116+,108-): 32T(17+,15-)	---	12,4
11	3	269C(149+,120-): 8T(4+,4-)	---	2,9
21	3	---	226G (118+,108-): 32A(14+,18-)	12,4
22	3	219C(118+,101-): 51T(26+,25-)	---	19
25	2	---	235 G (130+, 105-): 13A (7+,6-)	5,2

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

5.8. Comparação entre os resultados obtidos por SPLE e ddPCR

No total, 35 pacientes foram estudados tanto por SPLE quanto por ddPCR. Enquanto pelo método do SPLE houve identificação da mutação no *GNAS* em 7/35 pacientes (20%), o método da ddPCR identificou mutação em 18/35 pacientes (51,4%), portanto, houve diferença na proporção entre resultados de testes positivos e negativos usando metodologias distintas ($p=0,002$). Vide figura 20.

Figura 20- Representação de número de testes positivos ou negativos de acordo com a metodologia



FONTE: produção do próprio autor.

SPLE: sequenciamento paralelo em larga escala; ddPCR: reação da cadeia da polimerase digital em gotas.

Dos 5 pacientes com resultado inconclusivo analisados por SPLE, a ddPCR foi capaz de confirmar 4 deles (pacientes 3, 4, 7 e 23). Entre os pacientes que apresentaram teste genético positivo pela as duas metodologias, houve concordância entre as variantes encontradas (p.R201C/H). Não houve diferença entre as médias das taxas de abundância fracional e o tipo de teste molecular realizado ($p=0,34$). A Tabela 9 demonstra os dados de testes positivos entre os pacientes que foram estudados tanto por SPLE quanto por ddPCR.

Tabela 9 - Pacientes com mutação no GNAS identificadas por SLPE e/ou ddPCR e suas respectivas abundâncias fracionais.

Paciente	Mutação no GNAS	SPLE Abundância fracional (%)	ddPCR Abundância fracional (%)	
3	p.R201H	-	1,7	
4	p.R201H	-	0,26	
6	p.R201C	3,6	1,2	
7	p.R201H	-	1,1	
8	p.R201H	5,3	5	
9	p.R201C	-	0,58	
10	p.R201C	12,4	7,15	
11	p.R201C	2,9	5,3	
13	p.R201H	-	0,12	
14	p.R201C	-	0,11	
21	p.R201H	12,4	13,7	
22	p.R201C	18,9	14,8	
23	p.R201H	-	0,66	
25	p.R201H	5,2	4,9	
26	p.R201H	-	0,25	
30	p.R201C	-	7,6	
31	p.R201H	-	0,13	
46	p.R201C	-	0,1	
Média ± DP		8,7 ± 5,9	3,5 ± 4,7	p=0,34

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

6. DISCUSSÃO

Desde sua primeira descrição em 1936, a SMA representa uma doença desafiadora tanto no aspecto diagnóstico quanto terapêutico das suas diferentes morbidades relacionadas. Após a identificação da base molecular da síndrome (mutação ativadora pós-zigótica no gene *GNAS* e padrão de mosaicismo), foi possível a compreensão da fisiopatologia envolvida, bem como a identificar um amplo espectro fenotípico, que abrange tanto casos com graus distintos de gravidade como casos cuja tríade clássica está incompleta. A identificação da hiperativação da *G α s* ainda permitiu incluir nos critérios diagnósticos outras hiperfunções hormonais além da PP de origem ovariana, tais quais hipertireoidismo, acromegalia, síndrome de Cushing, e outras (20).

A SMA tem critérios diagnósticos já bem estabelecidos. Nos pacientes portadores da tríade clássica ou de 2 características clínicas, o diagnóstico é determinado pela avaliação clínica, laboratorial e exames de imagem. Por outro lado, a confirmação do diagnóstico genético em pacientes com formas incompletas ou fenótipos brandos, os quais são mais difíceis de serem reconhecidos, pode impactar o manejo terapêutico destes, estabelecendo vigilância e rastreamento ativo de outras manifestações relacionadas à SMA. Logo, a confirmação do diagnóstico genético é almejada, embora ainda desafiadora, principalmente pelo estado de mosaicismo da mutação no *GNAS*. Apesar da taxa de detecção da mutação no *GNAS* ser maior quando se estuda o DNA de tecidos acometidos (45), a disponibilidade destas amostras é limitada. A detecção da mutação no *GNAS* em DNA de leucócitos periféricos tornou-se uma realidade a partir do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, como a ddPCR e o SPLE (48, 49, 51).

A maioria dos pacientes incluídos neste estudo apresentou diagnóstico clínico da SMA (presença de pelo menos 2 características clínicas associadas). A hiperfunção hormonal mais prevalente foi a PPP (59,4%), sendo todos os casos identificados apenas no sexo feminino. Apesar de a literatura descrever a prevalência de 15-21% de PPP em meninos (26, 28), não identificamos nenhum caso na nossa casuística, talvez pelo tamanho da nossa amostra de pacientes do sexo masculino (n=15) ou a maior dificuldade de identificação dos sinais clínicos de PP pelos pais/responsáveis neste grupo de pacientes.

Com relação à PPP, os dados demonstraram que as características clínicas e laboratoriais foram semelhantes entre pacientes portadores de SMA e PPP isolada. No entanto, mais pacientes no grupo de pacientes com SMA apresentaram sangramento vaginal como primeira manifestação clínica, enquanto uma maior prevalência de cistos ovarianos foi identificada no primeiro USG no grupo de pacientes portadores de PPP isolada. Semelhante à literatura atual disponível, evidenciamos idade mais jovem ao início dos sinais e sintomas da PP, associado a avanço importante de idade óssea (acima de 1 ano) e predição da estatura adulta abaixo da estatura alvo (26, 28, 36). Apesar de o quadro inicial da PPP ser bastante característico, seu curso clínico é imprevisível, uma vez que os cistos são intermitentes e podem involuir, passando por longos períodos de quiescência (26).

O perfil laboratorial de todas as pacientes evidenciou valores séricos de LH basal e após estímulo com GnRH em níveis suprimidos ou pré-puberais, compatível com quadro de puberdade precoce de origem periférica. Notavelmente, algumas pacientes em ambos os grupos de PPP, isolada ou associada à SMA, apresentaram estradiol sérico em valores pré-puberais. Contudo, o conjunto das demais características clínicas e exames de imagem (desenvolvimento mamário, avanço de idade óssea e identificação de cistos ao ultrassom) permitiram confirmar o diagnóstico de PPP. Portanto, na presença de casos com sinais clínicos inequívocos de atividade estrogênica, a medida seriada de estradiol é recomendada. Há evidências cumulativas das limitações dos imunoenaios para estradiol, assim, a determinação do estradiol sérico em pacientes pediátricos deve ser realizada por métodos de alta sensibilidade e especificidade, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (60).

O tratamento da PPP foi bastante heterogêneo, principalmente no grupo de pacientes portadores de SMA. Por este motivo, é difícil atribuir os desfechos de longo prazo a uma medicação específica. Houve mais associação de classes medicamentosas em pacientes com SMA, provavelmente reflexo de maior recorrência de sangramento vaginal e cistos ovarianos funcionantes neste grupo.

No nosso serviço, entre o período de 2003 a 2018, o tamoxifeno representou a primeira escolha de tratamento nas pacientes portadoras de PPP, sendo usado em monoterapia ou associado a outras classes medicamentosas a depender da evolução clínica de cada paciente. A partir de 2018, o letrozol foi considerado primeira linha de tratamento da PPP em pacientes com SMA, em luz de novos

estudos envolvendo seu uso, com bons desfechos clínicos e perfil de segurança (28, 39, 40, 61).

A despeito da heterogeneidade do tratamento clínico instituído nas nossas pacientes, o controle clínico adequado foi atingido, com poucos efeitos colaterais e preservação da estatura adulta em relação à estatura predita no início do tratamento, que muito embora não tenha alcançado significância estatística, certamente contribuiu para que a maioria das pacientes atingisse o intervalo da estatura alvo.

A taxa de detecção das mutações p.R201C/H utilizando ddPCR neste estudo foi 45,3%, e, levando em consideração o tamanho da casuística, é um resultado expressivo. A taxa de outros estudos que utilizaram PCR digital variou de 37,8% a 80% (49-51), utilizando DNA de sangue periférico e/ou *cell-free* DNA (cf-DNA). Vale ressaltar que no estudo de Romanet *et al.*(49), a taxa de detecção da ddPCR em sangue periférico reduziu de 58,3% para 47% quando considerado todos os pacientes com DNA de sangue periférico testados. Quatro de 5 pacientes (80%) que tiveram amostras de cf-DNA estudadas apresentaram resultado positivo para detecção da mutação no *GNAS*.

Neste estudo, a ddPCR teve amostras de boa qualidade, com formação adequada de gotas. Apenas 1 paciente com resultado positivo obteve formação de gotas abaixo de 10.000. No entanto o valor foi próximo (gotas totais 9.456), apresentando gotas positivas com boa amplitude de sinal. Alguns estudos consideram a amostra inválida somente quando a formação de gotas é abaixo de 8.000 (51).

Apesar de haver associação estatisticamente significativa entre o resultado do teste genético positivo pela técnica de ddPCR e o número de características clínicas da SMA nos pacientes, não houve diferença estatística significativa entre a mediana da taxa de abundância fracional e o número de características clínicas dos pacientes, sugerindo que a taxa de abundância fracional dos leucócitos de sangue periférico não se correlaciona diretamente com a taxa de abundância fracional dos tecidos afetados pela SMA.

No grupo de pacientes com SMA portadores de 2 características clínicas, o subgrupo portador de hiperfunção hormonal e DFO apresentou mais testes genéticos positivos (ddPCR), quando comparado aos demais grupos.

Um paciente da coorte espanhola (paciente 35, portador de DFO e acromegalia), apesar de ter resultado molecular negativo em DNA de sangue periférico (testado por ddPCR), teve disponível teste genético pelo método de Sanger em DNA de tecido ósseo, com resultado positivo para a mutação p.R201C em mosaico, com abundância fracional de 27% (dados não mostrados). No ensaio da ddPCR, a abundância fracional deste paciente para a mesma mutação foi 0,06%, abaixo do LoD, e por isso considerado resultado negativo. É interessante notar que mesmo um tecido acometido diretamente pela SMA apresentou taxa de abundância fracional menor que 50%.

Neste estudo, uma menor taxa de detecção da mutação (20%) foi obtida utilizando o SPLE, provavelmente causada pela baixa profundidade de leitura quando comparado a estudo prévio (48). O método de SPLE (sem PNA) realizado por Narumi *et al.* (48), que identificou a mutação no *GNAS* em 62,5% (10/16), apresentou cobertura de sequencia mais profunda (profundidade de leitura aproximada 100.000). Deste modo, o estudo conseguiu identificar taxa de abundância fracional muito baixa (<0,03%) quando comparada a nossa metodologia de SPLE (2,9%).

A ddPCR foi um método mais efetivo para o diagnóstico genético da SMA quando comparado com o SPLE (taxa de detecção 51,4% vs. 20%, $n=35$, $p=0,002$). Vale ressaltar que o WES teve uma menor profundidade de leitura quando comparado ao painel, o que pode influenciar o resultado. Os 17 pacientes que foram analisados por WES foram incluídos em um ensaio com 240 pacientes (o n de pacientes foi estabelecido pela da calculadora da Illumina), provavelmente influenciando a cobertura mais baixa. Além disso, o método da ddPCR também apresentou melhor sensibilidade, identificando taxas de abundância fracional menores quando comparado ao SPLE. Logo, o método da ddPCR apresentou melhores resultados, com menor tempo de execução e com um custo menor por amostra (incluindo os dois ensaios da mutação) equivalente a aproximadamente 40% do valor do SPLE.

Este estudo não realizou técnica para enriquecimento de alelos. Apesar de estas técnicas permitirem bons níveis de detecção de baixas abundâncias fracionais, também apresentam algumas limitações, como maior risco de gerar artefatos de PCR, contaminação cruzada e serem mais demoradas para execução da técnica (50). Na técnica da ddPCR só foram utilizadas sondas que tinham como alvo as

mutações p.R201C/H, e apesar destas mutações abrangerem aproximadamente 95% daquelas relacionadas a SMA, é possível que algum paciente cujo resultado do teste genético foi negativo tenha outra substituição no códon 201 ou 227 do *GNAS*.

A metodologia da ddPCR realizada neste estudo foi capaz de identificar a mutação p.R201C/H em pacientes com características isoladas da SMA: a mutação p.R201H foi identificada em uma paciente portadora de DFO craniofacial (paciente 62) e a mutação p.R201C e p.R201H em uma (paciente 46) e duas pacientes (pacientes 58 e 59) portadoras de PPP isolada, respectivamente. A taxa abundância fracional foi baixa (variando de 0,1 a 0,18%). No entanto, estes valores encontrados foram iguais ou maiores que o LoD de cada ensaio, além da formação de gotas ter sido adequada (>10.000). As pacientes com manifestação clínica isolada da SMA e diagnóstico genético estabelecido devem ser rastreadas periodicamente para outras hiperfunções endócrinas, o que possibilita o diagnóstico precoce e manejo apropriado.

Comparativamente, outros estudos que utilizaram diferentes metodologias para estabelecer o diagnóstico genético da SMA também incluíram pacientes com apenas uma característica clínica da SMA (45, 49, 51) e obtiveram alguns resultados positivos. Romanet *et al.* (49) identificaram a mutação p.R201H em uma paciente com diagnóstico de PPP isolada (abundância fracional de 0,04% em DNA de leucócitos de sangue periférico) utilizando a ddPCR. Lumbroso *et al.* (45) identificaram a mutação p.R201C/H em DNA de leucócitos em 3 pacientes portadoras de PPP isolada, utilizando PCR e enzima de restrição (técnica para enriquecimento de alelos mutados). Já Roszko *et al.* (51) identificaram a mutação no *GNAS* em apenas um paciente com DFO monostótica, utilizando a técnica de ddPCR e cf-DNA.

É importante ressaltar que o diagnóstico genético não foi incluído nos critérios diagnósticos originais da SMA, uma vez que estes foram estabelecidos na era que antecedeu os estudos moleculares e genéticos. A partir do momento que podemos identificar o defeito genético da SMA em pacientes com apenas uma manifestação clínica da síndrome, se torna desafiador classificar esse tipo de condição, uma vez que ela não se enquadra nos critérios clínicos, mas possui o defeito genético no *GNAS* compatível a SMA.

Este estudo representa um avanço no diagnóstico da SMA, uma vez que a confirmação do diagnóstico genético abre precedentes para ampliar o espectro

fenotípico da doença, permitindo abranger pacientes com características clínicas isoladas cuja fisiopatologia envolva hiperativação de receptores acoplados à proteína G. Estudos prévios de Fragoso *et al.* (35) e Landis *et al.* (62) evidenciaram mutações ativadoras no *GNAS* em tecidos de adrenal (pacientes portadores de hiperplasia adrenal macronodular) e hipófise (pacientes portadores de acromegalia), respectivamente, sem outras características clínicas associadas a SMA. O advento de técnicas moleculares mais avançadas nos permite repensar os critérios diagnósticos da SMA, proporcionando um seguimento mais diligente para os pacientes e, possivelmente, desfechos mais favoráveis.

Assim sendo, propusemos empregar a nomenclatura *SMA-like* para pacientes que não preencheram critérios clínicos da SMA, mas são portadores da mutação no *GNAS*. Desta forma, nos possibilitaria implementar estratégias de vigilância mais rigorosas para pacientes portadores de espectros fenotípicos mais brandos da SMA com diagnóstico genético estabelecido, evitando perda de seguimento destes pacientes e instituição mais rápida de tratamentos se necessário.

Salienta-se que mais estudos de longo prazo são necessários nestes pacientes com *SMA-like*, estabelecendo se o seguimento prolongado e rastreamento periódico de características clínicas e laboratoriais relacionadas com a SMA auxiliará no diagnóstico e manejo terapêutico nestes pacientes.

7. CONCLUSÕES

- A ddPCR se mostrou sensível para o diagnóstico genético da SMA, sendo capaz de confirmar as mutações p.R201C/H em 45,3% dos pacientes, além de conseguir identificar baixas abundâncias fracionais em DNA de leucócitos periféricos.
- O diagnóstico genético da SMA foi estabelecido pela ddPCR em pacientes com apenas uma manifestação clínica da síndrome. Propusemos a nomenclatura *SMA-like* para definir essa condição. Esta nova classificação permite ampliar o espectro fenotípico da doença, contribuindo para a vigilância e o manejo adequado dos pacientes.
- Comparado à ddPCR, o SPLE foi menos sensível na taxa de detecção da mutação no *GNAS*, além de não apresentar acurácia para confirmar o diagnóstico em amostras com abundância fracional inferior a 2,9%. Houve concordância entre os resultados das amostras testadas pelas duas metodologias aplicadas.
- Quanto maior o número de manifestações clínicas da SMA, maior foi a probabilidade de estabelecer o diagnóstico genético da SMA.
- A manifestação endócrina mais prevalente foi a PPP, exclusivamente no sexo feminino. Os sinais e sintomas da PPP iniciaram em idade precoce. Os valores séricos de gonadotrofinas hipofisárias basais ou após estímulo com GnRH foram suprimidos ou pré-puberais, enquanto os níveis de estradiol foram extremamente variáveis. O diagnóstico foi realizado pelos sinais clínicos de hiperestrogenismo, associado à combinação de dados laboratoriais e de imagem. Apesar da heterogeneidade terapêutica utilizada, houve resposta clínica satisfatória aos diferentes agentes farmacológicos, isolados ou em associação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBRIGHT F, BUTLER AM, HAMPTON AO, SMITH P. Syndrome Characterized by Osteitis Fibrosa Disseminata, Areas of Pigmentation and Endocrine Dysfunction, with Precocious Puberty in Females. *New England Journal of Medicine*. 1937;216(17):727-46.
2. DJ. M. Osteitis fibrosa cystica: The case of a 9 year old girl who also exhibits precocious puberty, multiple pigmentation of the skin and hyperthyroidism. *Transaction of the Society for Pediatric Research. Annual Meeting. Am J Dis Child*1936.
3. Rivkees SA. McCune-Albright syndrome: 70 years of fascination and discovery. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2007;20(8):849-51.
4. Danon M, Crawford, J. PERIPHERAL ENDOCRINOPATHY CAUSING SEXUAL PRECOCITY IN ALBRIGHT'S SYNDROME. *Pediatr Res*. 1974;8:368.
5. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med*. 1991;325(24):1688-95.
6. Dumitrescu CE, Collins MT. McCune-Albright syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:12.
7. MARIANI BMdP. Padronização das técnicas de PNA e PCR em tempo real para detecção das mutações ativadoras no *GNAS* na síndrome de McCune-Albright. Dissertação (Mestrado em Endocrinologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
8. Molina PE. Princípios gerais da fisiologia endócrina. In: Molina PE, editor. *Fisiologia Endócrina*. 4ª Edição ed. AMGH2014. p. 310.
9. Turan S, Bastepe M. *GNAS* Spectrum of Disorders. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(3):146-58.
10. Boyce AM, Collins MT. Fibrous Dysplasia/McCune-Albright Syndrome: A Rare, Mosaic Disease of Gas Activation. *Endocr Rev*. 2020;41(2).
11. Robinson C, Collins MT, Boyce AM. Fibrous Dysplasia/McCune-Albright Syndrome: Clinical and Translational Perspectives. *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14(5):178-86.
12. Hartley I, Zhadina M, Collins MT, Boyce AM. Fibrous Dysplasia of Bone and McCune-Albright Syndrome: A Bench to Bedside Review. *Calcif Tissue Int*. 2019;104(5):517-29.
13. Michienzi S, Cherman N, Holmbeck K, Funari A, Collins MT, Bianco P, et al. *GNAS* transcripts in skeletal progenitors: evidence for random asymmetric allelic expression of Gs alpha. *Hum Mol Genet*. 2007;16(16):1921-30.
14. Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(5):543-59.
15. Boyce AM, Collins MT. Fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome: a rare, mosaic disease of Gas activation. *Endocr Rev*. 2019.
16. de Castro LF, Ovejero D, Boyce AM. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Mosaic disorders of FGF23 excess: Fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome and cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2020;182(5):R83-R99.
17. Campbell IM, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet*. 2015;31(7):382-92.

18. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*. 2017;355(6331):1330-4.
19. Spencer T, Pan KS, Collins MT, Boyce AM. The Clinical Spectrum of McCune-Albright Syndrome and Its Management. *Horm Res Paediatr*. 2019;92(6):347-56.
20. AM B. Fibrous Dysplasia/McCune-Albright Syndrome. In: Florenzano P dCL, et al., editor. *GeneReviews*® [Internet]2015 Feb 26 [Updated 2018 Aug 16].
21. Kabali TM, Moshy JR, Owibingire SS, Sohal KS, Simon ENM. Craniofacial fibrous dysplasia associated with McCune-Albright syndrome: challenges in diagnosis and treatment: case reports. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):180.
22. Kuznetsov SA, Cherman N, Riminucci M, Collins MT, Robey PG, Bianco P. Age-dependent demise of *GNAS*-mutated skeletal stem cells and "normalization" of fibrous dysplasia of bone. *J Bone Miner Res*. 2008;23(11):1731-40.
23. Leet AI, Chebli C, Kushner H, Chen CC, Kelly MH, Brillante BA, et al. Fracture incidence in polyostotic fibrous dysplasia and the McCune-Albright syndrome. *J Bone Miner Res*. 2004;19(4):571-7.
24. Blanco P, Schaefferbeke T, Baillet L, Lequen L, Bannwarth B, Dehais J. Chondrosarcoma in a patient with McCune-Albright syndrome. Report of a case. *Rev Rhum Engl Ed*. 1999;66(3):177-9.
25. Ruggieri P, Sim FH, Bond JR, Unni KK. Malignancies in fibrous dysplasia. *Cancer*. 1994;73(5):1411-24.
26. Corica D, Aversa T, Pepe G, De Luca F, Wasniewska M. Peculiarities of Precocious Puberty in Boys and Girls With McCune-Albright Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:337.
27. Collins MT, Singer FR, Eugster E. McCune-Albright syndrome and the extraskeletal manifestations of fibrous dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7 Suppl 1(Suppl 1):S4.
28. Neyman A, Eugster EA. Treatment of Girls and Boys with McCune-Albright Syndrome with Precocious Puberty - Update 2017. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2017;15(2):136-41.
29. Agopianz M, Journeau P, Lebon-Labich B, Sorlin A, Cuny T, Weryha G, et al. McCune-Albright syndrome, natural history and multidisciplinary management in a series of 14 pediatric cases. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016;77(1):7-13.
30. Pasquino AM, Tebaldi L, Cives C, Maciocci M, Boscherini B. Precocious puberty in the McCune-Albright syndrome. Progression from gonadotrophin-independent to gonadotrophin-dependent puberty in a girl. *Acta Paediatr Scand*. 1987;76(5):841-3.
31. Schmidt H, Kiess W. Secondary central precocious puberty in a girl with McCune-Albright syndrome responds to treatment with GnRH analogue. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 1998;11(1):77-81.
32. Collins MT, Singer FR, Eugster E. McCune-Albright syndrome and the extraskeletal manifestations of fibrous dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7 Suppl 1:S4.
33. Yao Y, Liu Y, Wang L, Deng K, Yang H, Lu L, et al. Clinical characteristics and management of growth hormone excess in patients with McCune-Albright syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2017;176(3):295-303.
34. Salenave S, Boyce AM, Collins MT, Chanson P. Acromegaly and McCune-Albright syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):1955-69.
35. Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MA, Zerbini MC, et al. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent

macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of *GNAS1* gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):2147-51.

36. Haddad NG, Eugster EA. Peripheral precocious puberty including congenital adrenal hyperplasia: causes, consequences, management and outcomes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019;33(3):101273.

37. Eugster EA, Rubin SD, Reiter EO, Plourde P, Jou HC, Pescovitz OH, et al. Tamoxifen treatment for precocious puberty in McCune-Albright syndrome: a multicenter trial. *J Pediatr.* 2003;143(1):60-6.

38. de G Buff Passone C, Kuperman H, Cabral de Menezes-Filho H, Spassapan Oliveira Esteves L, Lana Obata Giroto R, Damiani D. Tamoxifen Improves Final Height Prediction in Girls with McCune-Albright Syndrome: A Long Follow-Up. *Horm Res Paediatr.* 2015;84(3):184-9.

39. Estrada A, Boyce AM, Brillante BA, Guthrie LC, Gafni RI, Collins MT. Long-term outcomes of letrozole treatment for precocious puberty in girls with McCune-Albright syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(5):477-83.

40. Feuillan P, Calis K, Hill S, Shawker T, Robey PG, Collins MT. Letrozole treatment of precocious puberty in girls with the McCune-Albright syndrome: a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2100-6.

41. Syed FA, Chalew SA. Ketoconazole treatment of gonadotropin independent precocious puberty in girls with McCune-Albright syndrome: a preliminary report. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1999;12(1):81-3.

42. Sims EK, Garnett S, Guzman F, Paris F, Sultan C, Eugster EA, et al. Fulvestrant treatment of precocious puberty in girls with McCune-Albright syndrome. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2012;2012(1):26.

43. Lo FS, Chen TL, Chiou CC. Detection of Rare Somatic *GNAS* Mutation in McCune-Albright Syndrome Using a Novel Peptide Nucleic Acid Probe in a Single Tube. *Molecules.* 2017;22(11).

44. Bercaw-Pratt JL, Moorjani TP, Santos XM, Karaviti L, Dietrich JE. Diagnosis and management of precocious puberty in atypical presentations of McCune-Albright syndrome: a case series review. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2012;25(1):e9-e13.

45. Lumbroso S, Paris F, Sultan C, Study EC. Activating Gsalpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome--a European Collaborative Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2107-13.

46. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1250-6.

47. Kalfa N, Philibert P, Audran F, Ecochard A, Hannon T, Lumbroso S, et al. Searching for somatic mutations in McCune-Albright syndrome: a comparative study of the peptidic nucleic acid versus the nested PCR method based on 148 DNA samples. *Eur J Endocrinol.* 2006;155(6):839-43.

48. Narumi S, Matsuo K, Ishii T, Tanahashi Y, Hasegawa T. Quantitative and sensitive detection of *GNAS* mutations causing mccune-albright syndrome with next generation sequencing. *PLoS One.* 2013;8(3):e60525.

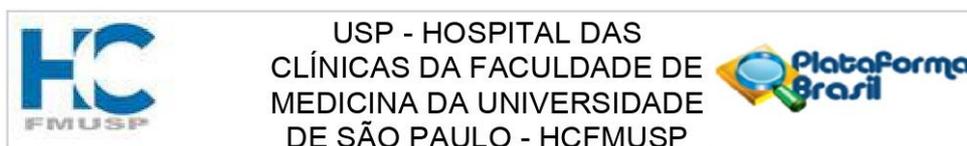
49. Romanet P, Philibert P, Fina F, Cuny T, Roche C, Ouafik L, et al. Using Digital Droplet Polymerase Chain Reaction to Detect the Mosaic *GNAS* Mutations in Whole Blood DNA or Circulating Cell-Free DNA in Fibrous Dysplasia and McCune-Albright Syndrome. *J Pediatr.* 2019;205:281-5.e4.

50. Elli FM, de Sanctis L, Bergallo M, Maffini MA, Pirelli A, Galliano I, et al. Improved Molecular Diagnosis of McCune-Albright Syndrome and Bone Fibrous Dysplasia by Digital PCR. *Front Genet.* 2019;10:862.

51. Roszko KL, Guthrie L, Li X, Collins MT, de Castro LF, Boyce AM. Identification of *GNAS* Variants in Circulating Cell-Free DNA from Patients with Fibrous Dysplasia/McCune Albright Syndrome. *J Bone Miner Res.* 2023;38(3):443-50.
52. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8.
53. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(11):1544-57.
54. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59.
55. Nectoux J. Current, Emerging, and Future Applications of Digital PCR in Non-Invasive Prenatal Diagnosis. *Mol Diagn Ther.* 2018;22(2):139-48.
56. Greulich WW. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. In: Pyle SI, editor. 2nd Edition ed. Stanford University Press 1950.
57. BAYLEY N, PINNEAU SR. Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for use with the Greulich-Pyle hand standards. *J Pediatr.* 1952;40(4):423-41.
58. Milbury CA, Zhong Q, Lin J, Williams M, Olson J, Link DR, et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomol Detect Quantif.* 2014;1(1):8-22.
59. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.
60. Casals G, Costa RF, Rull EU, Escobar-Morreale HF, Argente J, Sesmilo G, et al. Recommendations for the measurement of sexual steroids in clinical practice. A position statement of SEQC. *Adv Lab Med.* 2023;4(1):52-69.
61. Wang X, Yu Q. Management of precocious puberty in girls with McCune-Albright syndrome using letrozole. *Endocr Connect.* 2018;7(12):1424-31.
62. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature.* 1989;340(6236):692-6.

ANEXOS

Anexo A- Parecer consubstanciado do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase digital em gotas (ddPCR) na identificação das mutações no gene GNAS1 em pacientes portadores de formas típicas e atípicas da Síndrome de McCune Albright

Pesquisador: VINICIUS NAHIME DE BRITO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21308819.0.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.618.596

Apresentação do Projeto:

trata-se de uma investigação que propõe o estudo do mosaicismismo por uma técnica que permita a identificação da mutação no sangue periféricos e evitaria procedimentos invasivos para obtenção das amostras de tecidos.

Objetivo da Pesquisa:

Pesquisar a mutação R201H/C no gene GNAS1 em DNA de leucócitos periféricos, e de tecidos acometidos, quando disponíveis, pela técnica de ddPCR.- Determinar a capacidade da ddPCR na confirmação do diagnóstico molecular em casos típicos e atípicos da SMA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

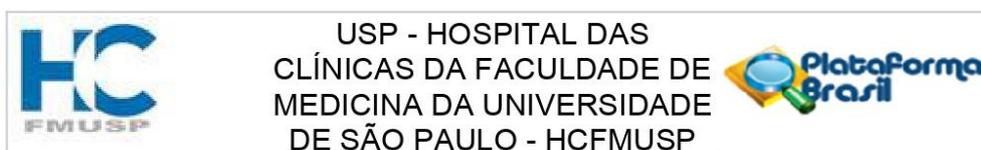
Riscos: Uma vez que o DNA será proveniente de leucócitos de sangue periférico, por meio de punção de veia periférica, o paciente poderá sentir dor durante a punção venosa, e posteriormente poderá formar um hematoma local, que desaparecerá dentro de poucos dias. **Benefícios:** Os pacientes com a forma típica e atípica terão confirmação biomolecular do diagnóstico. Os pacientes com forma atípica, que antes não tinham o diagnóstico confirmado, poderão se beneficiar de um seguimento voltado para Síndrome de McCune Albright, com rastreios frequentes de comorbidades, com diagnóstico e tratamento precoces.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.618.596

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto sera o doutorado da aluna Aline G de Faria.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

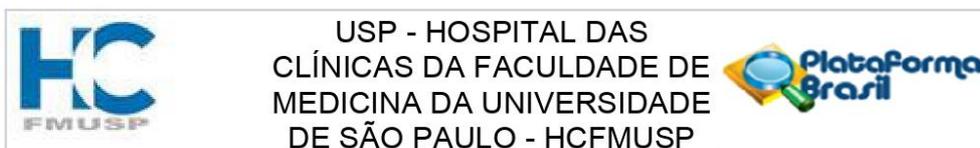
Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1402206.pdf	17/09/2019 15:28:17		Aceito
Outros	Declaracao_de_matricula.pdf	17/09/2019 15:26:24	Aline Guimarães de Faria	Aceito
Outros	Termo_Anuencia.pdf	17/09/2019 15:23:02	Aline Guimarães de Faria	Aceito
Outros	Custos.pdf	17/09/2019 15:19:50	Aline Guimarães de Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	05/09/2019 09:47:59	Aline Guimarães de Faria	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	05/09/2019 09:45:00	Aline Guimarães de Faria	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.618.596

Cronograma	CRONOGRAMA.docx	03/09/2019 13:36:04	Aline Guimarães de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	03/09/2019 13:34:55	Aline Guimarães de Faria	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	03/09/2019 13:32:41	Aline Guimarães de Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Outubro de 2019

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B- Termo de consentimento livre e esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: "Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase digital em gotas (ddPCR) na identificação das mutações no gene *GNAS1* em pacientes portadores de formas típicas e atípicas da Síndrome de McCune Albright"

Pesquisador principal: Vinicius Nahime de Brito

Cargo/Função: Médico Responsável

Inscrição Conselho Regional: Nº 84778

Departamento/Instituto: Departamento de Clínica Médica - Endocrinologia. Unidade de Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios e Genética LIM-42. Instituto Central do Hospital das Clínicas FMUSP

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Convidamos o Sr (a) para participar desta pesquisa: Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase digital em gotas (ddPCR) na identificação das mutações no gene *GNAS1* em pacientes portadores de formas típicas e atípicas da Síndrome de McCune Albright

- 1) **Justificativa e objetivos do estudo:** O (a) Sr. (a) é portador de pelo menos 1 característica clínica da Síndrome de McCune Albright, que compreende: manchas café com leite, displasia fibrosa óssea e hiperfunções endócrinas (puberdade precoce periférica, hipertireoidismo, Síndrome de Cushing, etc.). O (a) Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar a mutação R201H e R201C no Gene *GNAS1*, mutações estas relacionadas a ocorrência da Síndrome de McCune Albright, de forma a confirmar o diagnóstico biomolecular da síndrome. Outros genes não serão avaliados neste estudo.

- 2) **Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados:** Para a pesquisa de defeitos (mutações) no gene *GNAS1* será necessário a coleta de uma amostra de sangue de aproximadamente 5ml. O DNA (conjunto de genes das células) será obtido a partir das células do seu sangue.
O material obtido da coleta de sangue será estocado no Laboratório de Homônios e Genética Molecular LIM 42, PAMB 2º andar, bloco 6, fazendo parte do biorepositório de material biológico humano – amostras de DNA do referido laboratório. Há a possibilidade desse estudo não conseguir esclarecer a causa da doença. Assim, material doado poderá ser utilizado em pesquisas futuras que possam vir a esclarecer o diagnóstico da doença. Neste caso uma nova aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa e um novo consentimento serão solicitados.

- 3) **Desconfortos e riscos esperados:** O desconforto associado ao exame de sangue consiste naquele relacionado a dor da picada da agulha para a coleta do sangue e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana sem a necessidade do uso de medicamentos.

- 4) **Benefícios que poderão ser obtidos:** benefício ao participar desse estudo será a identificação de possíveis defeitos no gene, responsáveis pelo aparecimento da doença que gerou as alterações e a confirmação diagnóstica, que possibilitará um acompanhamento voltado para os rastreios das outras comorbidades envolvidas na Síndrome.

- 5) **Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência:** O paciente participante da pesquisa terá seguimento na Unidade A1MN 1008 (Ambulatório de puberdade

precoce da Unidade de Desenvolvimento da Endocrinologia), ou encaminhamento para outras unidades que seguem outros aspectos da Síndrome (por exemplo, unidade dos Ossos e ortopedia para manejo da displasia fibrosa óssea). Suas amostras, dados genéticos e informações de saúde serão armazenadas e compartilhadas com outros pesquisadores. As amostras e informações estarão disponíveis para qualquer questão de pesquisa, como pesquisa para entender o que causa certas doenças (por exemplo doenças cardíacas, câncer ou distúrbios psiquiátricos), desenvolvimento de novos métodos científicos ou o estudo de onde diferentes grupos de pessoas podem ter vindo.

- 6) É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 7) É garantido o direito do paciente em receber uma via do termo de consentimento rubricado pelo pesquisador principal;
- 8) Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 9) Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 10) Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 11) O material coletado neste projeto será armazenado no laboratório e não será descartado após o fim desta pesquisa. O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) (de acordo com a resolução 441/2011). Garantias de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade.
- 12) Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr Vinicius Nahime de Brito que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar Bloco 6- CEP: 05403-000- Cerqueira César, Telefone (0xx11) 3069-7512, e-mail vinicius.brito@hc.fm.usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo "**Aplicabilidade da reação em cadeia da polimerase digital em gotas (ddPCR) na identificação das mutações no gene *GNAS1* em pacientes portadores de formas típicas e atípicas da Síndrome de McCune Albright**". Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Vinicius Nahime de Brito ou pessoa (s) por ele delegada (s) (Aline Guimarães de Faria) sobre a minha decisão em participar

Anexo C- Sondas marcadas utilizadas na ddPCR para detecção da mutação p.R201C/H

Ensaio	Fluoróforo	Sequência
WT R201C	FAM	5'TTTCGGTTGGCTTTGGTGAGATCCATTGACCTCAATTTT GTTTCAGGACCTGCTTCGCTGC[C/T]GTGCCTGACTTCTG GAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACTT CCAGTA 3'
p.R201C	HEX	5'TTTCGGTTGGCTTTGGTGAGATCCATTGACCTCAATTTT GTTTCAGGACCTGCTTCGCTGC[C/T]GTGCCTGACTTCTG GAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACTT CCAGTA 3'
WT R201H	FAM	5'TTCGGTTGGCTTTGGTGAGATCCATTGACCTCAATTTTG TTTCAGGACCTGCTTCGCTGCC[G/A]TGTCCTGACTTCTG GAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACTT CCAGTAA 3'
p.R201H	HEX	5'TTCGGTTGGCTTTGGTGAGATCCATTGACCTCAATTTTG TTTCAGGACCTGCTTCGCTGCC[G/A]TGTCCTGACTTCTG GAATCTTTGAGACCAAGTTCCAGGTGGACAAAGTCAACTT CCAGTAA3'

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

Anexo D- Cálculo do LoB e LoD a partir da contagem média de falsos-positivos

Δ_{FP}	LoB	LoD
0	0	3
0-0,05	1	5
>0,05	$\Delta_{FP} + 1,645\sqrt{\Delta_{FP}} + 0,8$	$(1,645 + \sqrt{1,645^2 + 4LoB})^2/4$

FONTE: adaptado de Milbury CA, *et al.*, Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations, 2014 (58).

Anexo E- Mutações analisadas no IGV

Mutações	Região Genômica (GRCh37)
NM_000516.6(GNAS):c.601C>G (p.Arg201Gly)	20:57484420
NM_000516.6(GNAS):c.601C>A (p.Arg201Ser)	20:57484420
NM_000516.6(GNAS):c.601C>T (p.Arg201Cys)	20:57484420
NM_000516.6(GNAS):c.602G>T (p.Arg201Leu)	20:57484421
NM_000516.6(GNAS):c.602G>A (p.Arg201His)	20:57484421
NM_000516.6(GNAS):c.679C>A (p.Gln227Lys)	20:57484595
NM_000516.6(GNAS):c.680A>T (p.Gln227Leu)	20:57484596
NM_000516.6(GNAS):c.680A>G (p.Gln227Arg)	20:57484596
NM_000516.6(GNAS):c.681G>T (p.Gln227His)	20:57484597

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.