

Mauren Fernanda Moller dos Santos

Estudo genético de síndromes associadas à obesidade

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Biologia/Genética.**

São Paulo

2014

Mauren Fernanda Moller dos Santos

Estudo genético de síndromes associadas à obesidade

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Biologia/Genética.**

Orientadora: Profa. Dra. Celia P. Koiffmann

São Paulo

2014

Santos, Mauren Fernanda Moller dos
Estudo genético de síndromes associadas à obesidade
174 pág.

Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

- 1 – Obesidade e/ou Hiperfagia
- 2 – Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
- 3 – Distúrbios de comportamento
- 4 – *SNP-array*
- 5 – *Array-CGH*
- 6 – Variação do número de cópias (CNV)

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Celia P. Koifmann

Orientadora

AGRADECIMENTOS

À Dra. Celia P. Koiffmann, pela oportunidade de participar de seu laboratório, pelos ensinamentos, por ter confiado em meu trabalho e pela sua paciência.

Às Dras. Carla Rosenberg, Debora Bertola e Regina Célia Mingroni Netto, que participaram da minha qualificação e pelas suas sugestões.

Aos pacientes e seus familiares que contribuíram para este trabalho, tornando possível o avanço dos estudos nesta área do conhecimento.

À Cláudia, Carla, Amanda, Cris, Estela, Rose, Monica e Luceleni, por me ajudarem sempre que preciso, pela amizade e risadas. Especialmente à Cláudia por me ensinar citogenética e possibilitar que eu continue trabalhando com isso e à Carla pela grande colaboração nas técnicas e análises e pelas revisões de texto.

Aos colegas do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e do Genoma pelas colaborações e empréstimo de materiais, principalmente à Simone, do laboratório da Dra. Maria Rita S. e Passos Bueno, e à Sílvia, do laboratório da Dra. Carla Rosenberg, por me ensinarem e auxiliarem nas técnicas de arrays.

Aos meus pais, ao Thiago, aos familiares e amigos que apoiaram e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

I – Introdução.....	1
Obesidade não síndrômica.....	4
Obesidade monogênica.....	4
Deficiência da leptina ou do receptor de leptina.....	5
Deficiência de pro-opiomelanocortina.....	6
Deficiência do receptor-4 de melanocortina.....	8
Gene <i>FTO</i>	8
Obesidade síndrômica.....	9
Síndrome de Prader-Willi.....	9
Síndromes associadas à obesidade e/ou hiperfagia.....	10
Deleção terminal em 1p36.....	10
Deleção terminal em 2q37.....	11
Deleção em 6q16.2 e haploinsuficiência do gene <i>SIM1</i>	12
Deleção terminal em 9q34.3.....	13
Síndrome de WAGR.....	14
Síndrome de Smith-Magenis.....	15
Síndrome de Bardet-Biedl.....	16
Hibridação Genômica Comparativa baseada em <i>arrays</i>	17
Deleção em 1p21.3.....	22
Deleção em 2p25.3.....	22
Translocação não equilibrada entre os cromossomos 8 e 12 – der(8)t(8;12)(p23.1;p13.31)	23
Locus 16p11.2.....	25
Deleção em 17q24.2.....	26

II – Objetivos.....	29
III – Casuística e Metodologia.....	31
Casuística.....	32
Metodologia.....	33
Cultura de linfócitos de sangue periférico.....	34
Análise cromossômica por bandamento GTG.....	36
Análise citogenética molecular por FISH (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)	36
<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (qPCR)	38
IV – Resultados e Discussão.....	40
Paciente 9.....	42
Paciente 11.....	50
Paciente 12.....	52
Paciente 16.....	55
Paciente 19.....	63
Paciente 20.....	68
Paciente 23.....	77
Paciente 31.....	82
Discussão.....	90
V – Conclusões	99
VI – Resumo.....	102
VII – <i>Abstract</i>	105
VIII – Anexo 1.....	108
Paciente 1.....	109
Paciente 2.....	111
Paciente 3.....	113
Paciente 4.....	115

Paciente 5.....	117
Paciente 6.....	119
Paciente 7.....	121
Paciente 8.....	123
Paciente 10.....	124
Paciente 13.....	126
Paciente 14.....	127
Paciente 15.....	128
Paciente 17.....	129
Paciente 18.....	131
Paciente 21.....	133
Paciente 22.....	135
Paciente 24.....	137
Paciente 25.....	138
Paciente 26.....	140
Paciente 27.....	141
Paciente 28.....	143
Paciente 29.....	145
Paciente 30.....	147
IX – Referências Bibliográficas.....	149
Referências Eletrônicas.....	150
Referências Bibliográficas.....	151

Introdução

I – Introdução

A obesidade se tornou uma das maiores preocupações de saúde pública, aumentando a taxa de mortalidade e o risco de morbidade entre os casos de hipertensão, dislipidemia, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (Calton *et al.*, 2009). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2005, a estimativa de adultos com sobrepeso (IMC > 25kg/m²) era de 1,6 bilhões de indivíduos e de adultos obesos (IMC > 30kg/m²) 400 milhões de indivíduos. Já a estimativa para as crianças menores que 5 anos era de 20 milhões com sobrepeso. Além disso, a OMS calcula que em 2015 haverá aproximadamente 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões de obesos.

O índice de massa corporal (IMC) é uma das principais medidas antropométricas utilizadas em estudos sobre obesidade, e é calculado pela divisão do peso do indivíduo em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (Bell *et al.*, 2005).

Tabela 1 - A Classificação Internacional do IMC para indivíduos adultos

Classificação	IMC (kg/m²)
Muito abaixo do peso	Abaixo de 17
Abaixo do peso	Entre 17 e 18,49
Peso normal	Entre 18,5 e 24,99
Sobrepeso	Entre 25 e 29,99
Obesidade I	Entre 30 e 34,99
Obesidade II (severa)	Entre 35 e 39,99
Obesidade III (mórbida)	Acima de 40

Adaptado de OMS (http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)

Diversos autores, como Bell *et al.* (2005), Mutch *et al.* (2006), Barness *et al.* (2007) e Calton *et al.* (2009), definem a obesidade como resultado da ingestão de calorias em excesso e um baixo gasto energético. Este último devido, inclusive, ao estilo de vida sedentário adotado pelas populações ocidentais. Apesar disso, Barness *et al.* (2007) referem que a atividade física representa apenas cerca de 10% da utilização da energia total em um adulto médio e, embora a diminuição da capacidade de exercício possa acompanhar a obesidade, falta de exercício físico não necessariamente resulta em obesidade.

Existem os fatores genéticos que também estão envolvidos no ganho de peso, de forma que os indivíduos que geneticamente tem uma susceptibilidade ao ganho de peso, em um ambiente obesogênico acabam se tornando excessivamente obesos. (Bell *et al.*, 2005).

Estudos realizados no final dos anos 80 e início dos anos 90 com gêmeos e crianças adotadas indicaram que 80% da variação do IMC é atribuída a fatores genéticos (Bouchard *et al.*, 1990,1994). Outros estudos baseados na composição corporal de gêmeos criados separados e estudos comparando a composição corporal de crianças adotadas com seus pais biológicos e com seus pais adotivos também sugerem forte influência genética sobre a composição corporal e distribuição da gordura (Barness *et al.*, 2007).

A obesidade é um distúrbio neuroendócrino no qual fatores ambientais e a predisposição genética agem em conjunto (Hebebrand, 2007; Hebebrand *et al.*, 2003, Hebebrand & Hinney, 2009). A última atualização do *Human obesity gene Map*, publicada em 2006, apresentou 127 genes candidatos, resultado de 426 associações positivas com o fenótipo obesidade.

A obesidade é, portanto, considerada uma doença multifatorial que envolve uma complexa interação entre componentes genéticos e influências ambientais, levando ao excesso de armazenamento de energia na forma de gordura corporal. A modulação da quantidade de energia que ingerimos envolve os mecanismos neurofisiológicos que conectam o cérebro com o intestino e possivelmente a outros sistemas que regulam a homeostase energética e o comportamento alimentar (Kousta *et al.*, 2009).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para abordar os determinantes genéticos da obesidade, incluindo estudos de associação, análises de varredura genômica (*genome-wide scan*), o estudo das formas monogênicas de obesidade e o estudo de síndromes genéticas com anomalias do desenvolvimento associadas à obesidade (Kousta *et al.*, 2009).

Centenas de estudos dos últimos 15 anos têm sugerido uma associação positiva das variantes comuns de um grande número de genes candidatos com fenótipos de obesidade ou relacionados a ela, porém os efeitos dessas variantes explicam apenas uma pequena porcentagem da variação no peso e IMC. Isso indica que a susceptibilidade à obesidade em humanos pode ser resultado dos efeitos aditivos das variantes genéticas comuns, de diferentes mutações raras em um grande conjunto de genes, ou da combinação de ambos, além dos efeitos do ambiente (Calton *et al.*, 2009; Hinney *et al.*, 2010).

Obesidade não sindrômica

Obesidade monogênica

Mutações em genes que codificam proteínas com provável função na regulação de apetite são responsáveis por doenças mendelianas em que a

obesidade é o fenótipo mais evidente (Bell *et al.*, 2005). Estudos sobre formas monogênicas de obesidade revelaram diversos genes e mutações envolvidos no equilíbrio de energia, fornecendo entendimento sobre alguns dos mecanismos relacionados à regulação do peso corporal (Kousta *et al.*, 2009).

Mutações nos genes da leptina (LEP), receptor da leptina (LEPR), pro-opiomelanocortina (POMC), pró-hormônio convertase e receptor-4 de melanocortina (MC4R), afetam a regulação do apetite resultando em um fenótipo de obesidade grave devido à hiperfagia, indicando que estas vias são criticamente importantes na regulação do peso e adiposidade em seres humanos (Barness *et al.*, 2007) (Figura1).

Deficiência da leptina ou do receptor de leptina

O hormônio anorexigênico leptina parece ser o principal indicador da adiposidade e do sinal do estado de nutrição, pois seus níveis no plasma são altamente correlacionados ao número de adipócitos e ao teor de gordura. Esse papel pode ser observado pela reposição de leptina em uma criança de 9 anos extremamente obesa com deficiência congênita de leptina. A injeção subcutânea diária de leptina recombinante humana por um ano levou a uma reversão completa da obesidade, com perda de massa gorda (Bell *et al.*, 2005).

O gene da leptina está localizado em 7q31.3, enquanto que o gene do receptor de leptina está em 1p31 (Beales *et al.*, 2009). A deficiência em qualquer um dos genes resulta no aumento do peso, sendo que os pacientes apresentam peso normal ao nascimento, porém nos primeiros meses de vida ocorre rápido ganho de peso, levando a obesidade grave. Quando a leptina não é detectada no soro há uma grande possibilidade de se diagnosticar a

deficiência congênita de leptina, decorrente da homozigose do gene mutado que leva à perda de função do gene. A mutação no gene do receptor de leptina resulta em um processamento (*splicing*) anormal do RNAm, gerando um receptor sem os domínios transmembrânico e intracelular. Assim, o receptor mutante circula em alta concentração, vinculado à leptina, levando a uma elevada concentração de leptina no soro.

Deficiência de pro-opiomelanocortina

O gene da pro-opiomelanocortina (POMC), localizado na região cromossômica 2p23.3, é transcrito em vários tecidos, incluindo as células corticotróficas da hipófise anterior, os neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo e as células na derme e do sistema linfático. Em todos estes tipos de células POMC sofre um processamento pós-traducional que resulta em uma série de peptídeos menores (Coll *et al.*, 2004).

Krude *et al.* (2009) citam que em dois estudos de ligação cobrindo todo o genoma o locus do gene *POMC* estava ligado com a ocorrência de fenótipos obesos. A triagem das mutações na região codificante do gene falhou em detectar alterações associadas ao fenótipo obeso, de maneira que os autores concluíram que mudanças na região não codificante devem existir e interferem na expressão apropriada do gene *POMC*. Devido às suas diversas funções, defeitos no gene resultam em uma doença complexa, com deficiência de corticotropina, obesidade severa de início precoce e hipopigmentação.

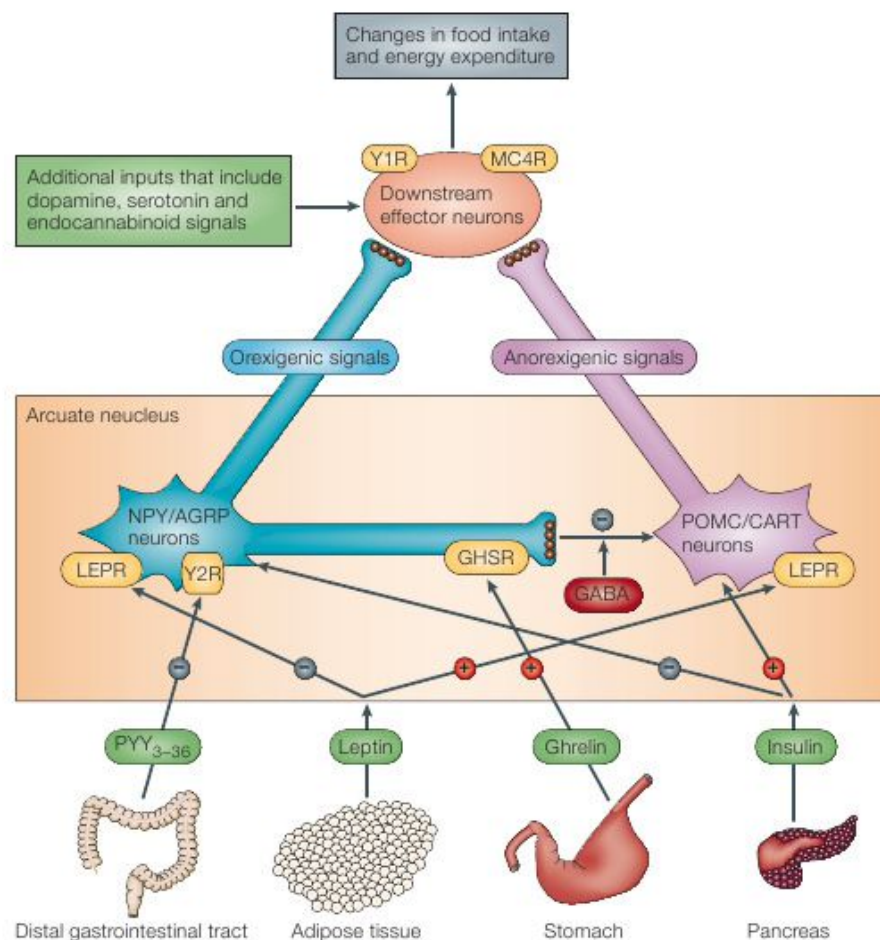


Figura 1 - Regulação fisiológica do balanço energético.

Os neurônios produtores de neuropeptídeo Y (NPY) / proteína relacionada a agouti (AGRP) e os neurônios produtores de pro-opiomelanocortina (POMC) / transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (CART) no núcleo arqueado do hipotálamo têm uma função chave na regulação do balanço energético. A ativação dos neurônios NPY/AGRP tem efeito orexigênico, promovendo a ingestão de alimento, enquanto que a ativação dos neurônios POMC/CART tem o efeito oposto anorexigênico. A POMC é ativada através de modificação pós-traducional dando origem ao hormônio melanócito-estimulante alfa (α -MSH, não mostrado). Essas duas classes de neurônios recebem sinais de vários hormônios. A leptina é secretada pelo tecido adiposo, circulando em níveis que são proporcionais às reservas de gordura corporal e exerce seu efeito através de seu receptor (LEPR), inibindo os neurônios NPY/AGRP e estimulando os neurônios POMC/CART. O pâncreas secreta a insulina, que tem influência anorexigênica sobre o núcleo arqueado. A grelina é produzida pelo estômago e duodeno, e estimula os neurônios NPY/AGRP através de seus receptores secretagogos de hormônio de crescimento (GHSRs). O peptídeo YY3-36 (PYY3-36) é secretado pelo trato gastrointestinal distal e sinaliza através dos receptores Y2 (Y2Rs) a produção de um efeito inibitório sobre os neurônios NPY/AGRP. Os neurônios NPY/AGRP também têm um efeito inibitório sobre os neurônios POMC/CART através da liberação do ácido γ -aminobutírico (GABA), que pode ser estimulado pela ligação da grelina aos GHSRs. Os sinais orexigênicos e anorexigênicos produzidos pelos neurônios NPY/AGRP e POMC/CART são então enviados até neurônios efetores de segunda ordem, que também recebem sinais modificadores da dopamina, serotonina e endocanabinóides. Esses neurônios efetores expressam receptores que incluem o receptor Y1 (Y1R) e o receptor-4 de melanocortina (MC4R). Esses diversos sinais atuam juntos para proporcionar o total equilíbrio entre a aquisição de alimento e o gasto energético. (Modificado de Bell *et al.*, 2005).

Deficiência do receptor-4 de melanocortina

A forma de obesidade de herança autossômica dominante mais freqüente é causada por mutações no gene que codifica o receptor-4 de melanocortina (MC4R), localizado na região 18q22 (Bell *et al.*, 2005; Mutch *et al.*, 2006). Está presente em 1-6% dos indivíduos obesos de diferentes grupos étnicos, com maior prevalência em casos de maior gravidade e idade de início precoce.

Os pacientes apresentam um acelerado crescimento linear e hiperinsulinemia precoce, além de pressão arterial baixa. Também apresentam hiperfagia, mas não tão grave como a observada na deficiência de leptina (Farooqi *et al.*, 2009).

Camundongos com deficiência em MC4R não são hiperfágicos ao serem alimentados com uma dieta pobre em gordura, porém a hiperfagia é observada após a introdução de um maior teor de gordura, indicando interações gene-ambiente.

Gene FTO

Recentemente, pesquisadores britânicos descobriram um gene (FTO) presente no cromossomo 16q12.2, que está fortemente associado com o controle de índice de massa corporal. Os 16% dos adultos que são homozigotos para o alelo de risco pesavam cerca de 3 kg a mais e tiveram um risco 1,67 vezes maior de obesidade, quando comparados com aqueles que não herdaram o alelo de risco (Barnes *et al.*, 2007). Outros pesquisadores testaram 48 SNPs em diferentes regiões intergênicas para estimar a distribuição de SNPs neutros em sua amostra de caso-controle para

obesidade. Eles observaram associação entre SNPs no primeiro íntron de FTO e um aumento no risco de obesidade (Beales *et al.*, 2009).

Obesidade síndrômica

Há entre 20 e 30 doenças herdadas de forma Mendeliana nas quais os pacientes são clinicamente obesos e também apresentam deficiência intelectual, características dismórficas e anomalias do desenvolvimento de órgãos específicos (Mutch *et al.*, 2006). Somente algumas dessas síndromes, tais como Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alström, Cohen, WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalias genitourinárias e deficiência intelectual) estão associadas à obesidade de início precoce (Choquet *et al.*, 2010).

A obesidade nestas síndromes parece envolver defeitos estruturais e/ou funcionais do hipotálamo que estão relacionados ao comportamento alimentar e a liberação de insulina, porém os mecanismos fisiopatológicos exatos não são totalmente conhecidos. (Barness *et al.*, 2007).

Síndrome de Prader-Willi

A síndrome de Prader-Willi (PWS) é a mais freqüente das síndromes que possui a obesidade como uma de suas características, com incidência de 1:25.000 nascimentos. É caracterizada por hipotonia neonatal com dificuldade de sucção, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), hiperfagia, obesidade, baixa estatura em adolescentes, mãos e pés pequenos, hipogonadismo, distúrbios do sono, características faciais dismórficas, deficiência intelectual leve a moderada e comportamento obsessivo-compulsivo (Varela *et al.*, 2005; Kousta *et al.*, 2009).

O segmento 15q11-q13 está relacionado ao *imprinting* genômico, sendo que vários genes nesta região são ativos apenas no cromossomo herdado do pai, enquanto outro(s) gene(s) é ativo apenas no cromossomo herdado da mãe. A PWS é uma das doenças humanas que está relacionada ao *imprinting* e resulta da ausência de expressão de genes ativos no cromossomo paterno. A perda dos genes ativos herdados paternamente contribui para o fenótipo completo da síndrome de Prader-Willi, no entanto, a ausência de um pequeno RNA organizador nucleolar (snoRNA), SNORD116 (HBII-85), parece produzir muitas das características clínicas, como hipotonia neonatal, obesidade mórbida de início precoce e hipogonadismo (Cassidy *et al.*, 2012).

Existem três mecanismos genéticos que resultam na síndrome de Prader-Willi. O principal deles é a deleção paterna dentro do segmento 15q11-q13, que ocorre em aproximadamente 70% dos casos. A dissomia uniparental materna (UPD) do cromossomo 15 ocorre em aproximadamente 25% dos casos e em torno de 2% dos pacientes têm um defeito no centro de *imprinting*. No caso da deleção, existem 5 tipos dependendo dos pontos de quebra, sendo que os dois mais encontrados são o tipo I, com pontos de quebra em BP1 e BP3, e o tipo II, com pontos de quebra em BP2 e BP3 (Varela *et al.*, 2005).

Síndromes associadas à obesidade e/ou hiperfagia

Deleção terminal em 1p36

Rearranjos subteloméricos ocorrem em aproximadamente 5% dos pacientes com deficiência intelectual idiopática, sendo que a deleção terminal de 1p é a mais comum, tendo uma incidência estimada de 1:5.000 (D'Angelo *et al.*, 2006).

A síndrome da deleção de 1p36 tem como características atraso no DNPM e/ou deficiência intelectual, hipotonia, perda auditiva, epilepsia, microcefalia, braquicefalia, olhos fundos, ponte nasal baixa, cardiomiopatias, dificuldades de alimentação na infância e alguns pacientes possuem obesidade e/ou hiperfagia (Beales *et al.*, 2009).

D'Angelo *et al.* (2010) sugerem que o segmento 1p36.33-36.32, na sua parte distal de 2-3 Mb , seria a região crítica para a manifestação da obesidade e hiperfagia.

Deleção terminal em 2q37

A síndrome de deleção de 2q37, também conhecida como osteodistrofia hereditária de Albright-like ou síndrome de braquidactilia e deficiência intelectual (BDMR), é outra síndrome de deleção terminal com mais de 100 pacientes já descritos (Leroy *et al.*, 2013). Possui uma variabilidade fenotípica significativa, sendo suas principais características o atraso no desenvolvimento, problemas de comportamento, transtorno do espectro do autismo, defeitos cardíacos, obesidade e braquidactilia do tipo E (braquimetafalangia), além de baixa estatura, deficiência intelectual, hipotonia e fâcies característica (Falk & Casas, 2007; Morris *et al.*, 2012).

Deleções ou mutações em heterozigose que envolvem o gene *HDAC4* são descritas como a causa para o fenótipo da síndrome. *HDAC4* regula fatores que são necessários para o desenvolvimento e regulação muscular, cardíaco e neurológico, sendo crítico para esquelotogênese e condrogênese adequadas, bem como a sobrevivência neuronal (Williams *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2012).

Deleção em 6q16.2 e haploinsuficiência do gene *SIM1*

A perda do gene *SIM1*, localizado em 6q16.2, tem sido associada com hiperfagia na obesidade síndrômica. Em humanos, a deleção ou quebra da região *SIM1* resulta em um fenótipo Prader-Willi-like ou uma forma de obesidade de início precoce associada com excesso de ingestão de alimentos, similar a hiperfagia vista em camundongos (Bell *et al.*, 2005). O gene *SIM1* desempenha um papel fundamental na diferenciação neuronal dentro do núcleo paraventricular do hipotálamo, região crítica na regulação da ingestão de alimentos (Bonfond *et al.*, 2013). Estes autores estudaram o envolvimento do gene *SIM1* com o desenvolvimento da obesidade em 44 crianças com características de síndrome de Prader-Willi-like, 198 crianças com obesidade grave de início precoce, 568 adultos com obesidade mórbida e 383 controles, encontrando três mutações que mostraram fortes efeitos de perda de função (p.T46R, p.H323Y e p.T714A) e foram associadas com alto risco para a obesidade severa.

Holder *et al.* (2000) estudaram uma menina com obesidade de início precoce que possuía uma translocação cromossômica *de novo* entre os cromossomos 1p22.1 e 6q16.2, na qual o gene *SIM1* foi rompido. Além disso, citam dois outros estudos de pacientes com fenótipo complexo, incluindo a obesidade de início precoce e pequenas deleções intersticiais que se sobrepõem à região de sua paciente.

Em um estudo com indivíduos apresentando fenótipo Prader-Willi-like, Varela *et al.* (2006) encontraram uma deleção de origem paterna do segmento 6q15-q21 em uma paciente, o que sugere que a obesidade de início precoce e a hiperfagia são determinadas pela haploinsuficiência do gene *SIM1*, enquanto

a hipotonia, o atraso no desenvolvimento, dismorfismos faciais e extremidades pequenas são causados pela deleção de outros genes localizados no segmento cromossômico 6q15-q21. Vignoli *et al.* (2013) realizaram uma revisão da literatura com 25 pacientes apresentando deleção entre os segmentos 6q15 e 6q23. Identificaram entre as características comuns da síndrome a ocorrência de deficiência intelectual – variando de grave (16% dos casos), moderada (24%) a leve (20%) e em 40% o grau de deficiência intelectual não foi especificado; problemas de comportamento (36%), principalmente transtorno do espectro do autismo e déficit de atenção com hiperatividade e agressividade; 44% com fenótipo PWS-like (que inclui obesidade, hipotonia e mãos e pés pequenos). Uma grande variabilidade foi observada entre os dismorfismos descritos, sendo os mais recorrentes: hipertelorismo (36%), olhos amendoados (16%), fissuras palpebrais oblíquas (28%), ponte nasal larga (24%), nariz bulboso (20%), orelhas dismórficas (80%), palato ogival (28%), microrretrognatia (32%) e mãos curtas ou dismórficas/dedos afilados nas pontas (48%).

Deleção terminal em 9q34.3

Beales *et al.* (2009) apresentaram um estudo no qual duas crianças com obesidade e hiperfagia, deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, hipotonia, além de outras características dismórficas, tinham uma deleção terminal na região cromossômica 9q34.3. Esta região contém cerca de 20 genes. Em outro estudo com 13 pacientes possuindo essa mesma deleção, apenas dois apresentavam obesidade, apesar de que três morreram recém-nascidos devido a problemas cardíacos congênitos (Goldstone *et al.*, 2008).

Atualmente esta síndrome é denominada síndrome de Kleefstra, em que já foram descritos mais de 100 pacientes com deleções submicroscópicas na região 9q34.3 ou com mutações intragênicas em *EHMT1*, causando a haploinsuficiência deste gene e conseqüentemente seu fenótipo. É caracterizada por atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual de moderados a severos, hipotonia e características faciais distintas, compreendendo braquicefalia, microcefalia, sinofre, formato incomum das sobrancelhas, hipoplasia da face média, lábio inferior evertido, língua protrusa e prognatismo. As características clínicas adicionais incluem defeitos cardíacos e urogenitais congênitos, epilepsia, distúrbios comportamentais e psiquiátricos e sobrepeso (Willemsen *et al.*, 2012).

Síndrome de WAGR

A síndrome de WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalias genito-urinárias, deficiência intelectual) é causada por deleções intersticiais da região 11p13 devido à haploinsuficiência de genes nesta região, incluindo *WT1* e *PAX6*. O gene *WT1* é responsável pelo desenvolvimento do tumor de Wilms e nefropatias enquanto que *PAX6* pela aniridia. Desta maneira, é reconhecida como uma síndrome de genes contíguos (Yamamoto *et al.*, 2014).

Deleções maiores, com pontos de quebra centroméricos e teloméricos atípicos que abrangem a região 11p14, têm sido descritas em pacientes com fenótipo WAGR em associação com deficiência intelectual e obesidade (Shinawi *et al.*, 2011). Este subgrupo que inclui obesidade é denominado WAGRO e tem sido associado com haploinsuficiência para o gene *BDNF*. O gene *BDNF*, presente na região 11p14.1, tem um papel fundamental na

diferenciação de células, sobrevivência neuronal, migração, arborização dendrítica, sinaptogênese e desenvolvimento da medula espinhal (Shinawi *et al.*, 2011). Rodríguez-López *et al.* (2013) afirmam que a região crítica para a obesidade infantil na síndrome de WAGR está localizada dentro de uma região de 80 kb do exon 1 de *BDNF*. Han *et al.* (2008) descreveram pacientes com haploinsuficiência de *BDNF* que apresentaram o IMC significativamente mais elevado durante a infância em comparação com controles, com uma prevalência de 100% de obesidade infantil.

Síndrome de Smith-Magenis

A síndrome de Smith-Magenis tem uma prevalência estimada de 1;15.000 – 25.000 nascimentos. Suas principais características são deficiência intelectual, distúrbios do sono (atribuído a um ritmo circadiano invertido), comportamento auto-agressivo, anomalias craniofaciais, neurológicas, baixa estatura e obesidade. Muitas das características pleiotrópicas da síndrome resultam da haploinsuficiência do gene *RAI1* presente na região cromossômica 17p11.2. Trata-se de uma região rica em *low copy repeats* (LCRs) em que mais de 75% dos pacientes apresentam deleções de cerca de 3,7Mb, aproximadamente 16% apresentam deleções atípicas de ~5Mb e aproximadamente 10% têm mutações pontuais em *RAI1* (Elsea & Williams, 2011). A duplicação recíproca desta região resulta na síndrome de Potocki–Lupski, com apresentação clínica variável que inclui deficiência intelectual, atraso de desenvolvimento, problemas de comportamento, características autistas, hipotonia, má alimentação e alterações cardiovasculares (Magoulas *et al.*, 2014).

Burns et al. (2010) estudaram o papel de *RAI1* na obesidade, através da haploinsuficiência de *Rai1* em camundongos. Os animais *Rai1*^{+/-} apresentaram fenótipo obeso e hiperfágico. Também verificaram que *RAI1* regula diretamente a expressão do *BDNF*, onde *Bdnf* é *downregulated* no hipotálamo dos camundongos *Rai1*^{+/-}. Além disso, observaram que em pacientes com a síndrome de Smith-Magenis a obesidade de início precoce está presente em mais de 50% dos indivíduos a partir de 9 anos de idade (percentil igual ou superior a 85) e a obesidade truncal é mais comumente constatada.

Síndrome de Bardet-Bield

A síndrome de Bardet-Bield (BBS) tem uma frequência estimada em 1:100.000 nascimentos e suas principais características são: distrofia retiniana, polidactilia, dificuldades de aprendizado, hipogonadismo, problemas renais e obesidade (Bell *et al.*, 2005). O fenótipo dessa síndrome é heterogêneo, provavelmente devido a mutações em diversos *loci* genéticos, sendo os já mapeados: *BBS1* em 11q13, *BBS2* em 16q21, *BBS3* em 3p13, *BBS4* em 15q22.3, *BBS5* em 2q31, *BBS6* em 20p12, *BBS7* em 4q27, *BBS8* em 14q32.11, *BBS9* em 7p14, *BBS10* em 12q21.2, *BBS11* em 9q33.1, *BBS12* em 4q27, *BBS13* em 17q23, *BBS14* em 12q21.3, *BBS15* em 2p15, *BBS16* em 1q43, *BBS17* em 3p21.31 e *BBS18* em 10q25.2 (Forsythe & Beales, 2013; Scheidecker *et al.*, 2014).

A herança desta síndrome é considerada como autossômica recessiva, entretanto, a ocorrência de herança trialélica vem sendo sugerida em algumas famílias. Mutch *et al.*, (2006) exemplificam que certas formas da BBS estão relacionadas com mutações recessivas em um dos *loci* associadas com outra

mutação em um segundo *locus*, levantando também a hipótese de modelo de transmissão trialélica.

Além da BBS, outras síndromes, como a síndrome de Alström e a síndrome de Carpenter, têm a patogênese da obesidade ligada a disfunções dos cílios, organelas presentes em quase todas as células eucariontes. A fisiopatologia na BBS não está totalmente clara, mas há evidências que sugerem que defeitos dos cílios no transporte de vesículas podem levar ao fenótipo da doença, incluindo a hiperfagia e a obesidade (Kousta *et al.*, 2009).

Mutações homólogas a *BBS7* e *BBS8* em *Caenorhabditis elegans* produzem defeitos na função ciliar, e mutações no *BBS5* em *Chlamydomonas* levam a uma perda de flagelos. Todos os genes *bbs* conhecidos em *C. elegans* são expressos exclusivamente em células com cílios e em camundongos mutantes *Bbs* há perturbação ciliar grave com defeitos no olfato, defeitos do tubo neural e interrupção de feixes ciliares da cóclea (Barness *et al.*, 2007).

Outras síndromes relacionadas ao fenótipo de obesidade estão brevemente descritas na Tabela 2.

Hibridação Genômica Comparativa baseada em *arrays*

A técnica de Hibridação Genômica Comparativa baseada em *arrays* (aCGH) é o método mais poderoso utilizado para detectar e localizar perdas e ganhos de material genético atualmente. (Mantripragada *et al.*, 2004). Ele permite mapear todo o genoma de uma só vez com uma alta resolução e revelar alterações submicroscópicas do número de cópias do DNA que não são

possíveis de avaliar por outras técnicas como o estudo do cariótipo tradicional (Vissers *et al.*, 2003).

Inicialmente, seu uso principal foi na pesquisa de câncer, mas a aplicação no estudo de doenças genéticas congênitas tornou-se importante. Mantripragada *et al.* (2004) citam estudos que identificaram deleções em pacientes com síndrome de DiGeorge, além da detecção de deleções terminais e intersticiais, cromossomos derivados e rearranjos complexos em pacientes com deficiência intelectual.

A técnica de aCGH é baseada na hibridação de DNA teste e DNA referência em uma placa contendo sondas relacionadas às regiões do genoma. A resolução do método é determinada pela distância genômica entre as sondas e o tamanho dos fragmentos de DNA clonados. O DNA teste (DNA genômico que se pretende estudar) e o DNA referência (amostra controle) são marcados com fluorocromos verde e vermelho, respectivamente, e hibridados no *array* na presença de DNA Cot1, que bloqueia as sequências repetitivas. Depois da hibridação os sinais fluorescentes são capturados e sua intensidade quantificada. Regiões com intensidades fluorescentes iguais de DNA teste e referência resultam na cor amarela. As regiões deletadas são detectadas em vermelho e as regiões duplicadas aparecem em verde.

Slater *et al.* (2005) abordaram em seu estudo as vantagens do *array* em relação à análise citogenética, como a utilização de uma pequena quantidade de DNA, além de não ser necessária a produção de cultura celular que é demorada e algumas vezes problemática. A resolução é superior, permitindo uma análise mais refinada, determinando os pontos de quebra de forma mais precisa, além de identificar pequenas duplicações e deleções, inclusive em

translocações aparentemente equilibradas. O *array* GeneChip Mapping 100K que utilizaram no trabalho, além de gerar dados do número de cópias como em outros aCGH, também ofereceu dados de genotipagem, possibilitando a detecção de alterações cromossômicas de cópias neutras, onde não há mudança no número de cópias, tais como dissomia uniparental (UPD). Gijsbers *et al.* (2009) também relatam que os *arrays* que pesquisam polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são utilizados na genotipagem e identificam variações do número de cópias (CNV) submicroscópicas, assim como baixos níveis de mosaicismos cromossômicos e UPDs. Em aproximadamente 25% dos pacientes com deficiência intelectual/anomalias congênitas múltiplas, CNVs são detectados por aCGH e SNP *array*. Para Mantripragada *et al.* (2004), tanto pequenas duplicações e deleções quanto determinados SNPs podem ser importantes na detecção de fatores de predisposição a doenças.

Da mesma forma, De Vries *et al.* (2005) demonstram que a resolução do *array* e a cobertura de todo o genoma permitem uma maior detecção de alterações do número de cópias comparado aos resultados da análise cromossômica e da análise quantitativa das regiões subteloméricas com o uso de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), pois as alterações encontradas em seu estudo eram intersticiais e 7 de 10 anormalidades eram menores que 4 Mb.

Porém, Slater *et al.* (2005) e Gijsbers *et al.* (2009) descreveram uma desvantagem no uso do *array* em relação ao cariótipo tradicional que é a incapacidade de detectar rearranjos equilibrados, tais como translocações recíprocas e inversões. Cerca de 6% dos casos diagnosticados no pré-natal que apresentaram esses rearranjos estão associados a fenótipos anormais.

Provavelmente, os pontos de quebra dos rearranjos interromperam um gene ou pequenas deleções ou duplicações além da resolução utilizada estão presentes. Dependendo da resolução do SNP *array*, sua análise pode detectar essas pequenas anomalias, mas o rompimento dos genes permanecerá desconhecido. A impossibilidade de detectar os rearranjos cromossômicos equilibrados é resultado do método de preparação, que inclui a fragmentação do genoma antes da hibridação aos BAC, PAC ou oligonucleotídeos do *array*, de forma que a informação linear não é preservada.

A população humana mostra extenso polimorfismo no número de cópias dos segmentos cromossômicos, algo conhecido como variação do número de cópias (CNV). Uma alta proporção do genoma, estimada em até 12% está sujeita a essa variação. Porém, a maior parte das variações é desvantajosa, e a mudança no número de cópias em algum gene específico pode levar a um grupo de condições patológicas conhecidas como doenças genômicas (Hastings *et al.*, 2009).

Kearney *et al.* (2011) publicaram diretrizes para a interpretação e relato de variações do número de cópias. Os fatores que podem ser utilizados para auxiliar a interpretação das CNVs são: o tamanho do segmento, a posição (intersticial, centromérica, regiões de repetição), o número de cópias, o conteúdo gênico da CNV, a origem da CNV (*de novo* ou herdada) e a frequência na população em geral. Uma vez que o tamanho de uma CNV está associado com o número de genes afetados, a probabilidade de patogenicidade aumenta com o tamanho da CNV (Hehir-Kwa *et al.*, 2013; Vulto-van Silfhout *et al.*, 2013).

Mudanças na quantidade de cópias de um ou mais genes são causas comuns de deficiência intelectual (Gijsbers *et al.*, 2009), sendo que as regiões subteloméricas são conhecidas por serem afetadas por rearranjos submicroscópicos em aproximadamente 5% dos pacientes com malformações e deficiência intelectual (de Vries *et al.*, 2005).

De Vries *et al.* (2005) relatam o caso de um paciente com a deleção do segmento envolvido com a síndrome de DiGeorge e VCFS (síndrome velocardiofacial) que apresentava deficiência intelectual leve, baixa estatura e algumas características faciais sugestivas, mas sem as características de diagnóstico da VCFS, como anomalias cardíacas, fenda palatina, dedos longos e finos, hipocalcemia ou hipoplasia tímica, o que demonstra que o *array* CGH também auxilia no diagnóstico de fenótipos atípicos de síndromes comuns de microdeleções.

Muitas síndromes têm sido descritas como resultado de alterações do número de cópias que ocorrem no genoma, sendo identificadas após o avanço de tecnologias que detectam CNVs, como o *array*-CGH. A seguir, algumas dessas síndromes, em que a obesidade está presente como uma de suas características, são descritas.

Deleção em 1p21.3

A síndrome de microdeleção em 1p21.3 é uma anomalia extremamente rara, com menos de 10 casos relatados até o momento, de ocorrência principalmente *de novo* que envolve o gene *DPYD* e o miRNA *MIR137*. É caracterizada por um atraso de linguagem grave, deficiência intelectual leve a moderada, transtorno do espectro do autismo, obesidade e características faciais dismórficas menores, como orelhas grandes, olhos profundos, ponte nasal larga e lábio inferior espesso (Willemsen *et al.*, 2011; Carter *et al.*, 2011).

Deleção em 2p25.3

A deleção da região de terminal do braço curto do cromossomo 2 já foi descrita na literatura em cerca de 13 pacientes, muitas vezes associada com um fenótipo de Prader-Willi-like (Doco-Fenzy *et al.*, 2014). Estes autores descreveram 5 pacientes com deleção em 2p25 apresentando obesidade de início precoce, hiperfagia, deficiência intelectual e alterações comportamentais. A análise dos genes contidos na região deletada levou-os a especular que os genes *ACP1*, *TMEM18*, e/ou *MYT1L* podem estar envolvidos na obesidade de início precoce. Além disso, a deficiência intelectual e problemas de comportamento podem ser explicados pela perda de heterozigose dos genes *SNTG2* e *MYT1L*.

Com o uso de *microarrays*, Stevens *et al.* (2011) identificaram deleções em 2p25.3, com tamanhos variando de 0.37 a 3.13Mb, em três irmãos adultos e três pacientes não relacionados, todos apresentando deficiência intelectual, obesidade ou excesso de peso, sem características faciais dismórficas evidentes. Ao combinarem os dados encontrados com outros três pacientes da

literatura definiram a região mínima de sobreposição que continha o gene *MYT1L*. Porém, não encontraram evidências na literatura de uma associação direta entre haploinsuficiência de *MYT1L* e excesso de peso. Já o gene *TMEM18*, previamente associado à obesidade, estava deletado em quatro dos pacientes.

Rio *et al.* (2013) relataram duas irmãs gêmeas monozigóticas com genótipos discordantes, resultado de uma alteração cromossômica na região 2p25.3, provavelmente devido a uma recombinação mitótica não-alélica que ocorreu durante as divisões do blastômero de um zigoto normal, levando a um fenótipo também discordante. Uma gêmea apresentava atraso no desenvolvimento global, excesso de peso e hiperatividade devido a deleção em 2p25.3 enquanto que a outra gêmea apresentava o transtorno do espectro autista devido ao mosaicismos, onde um terço das células mostrou uma deleção em 2p25.3, um terço das células uma duplicação em 2p25.3 e um terço das células eram normais. A gêmea com apenas a deleção exibiu um fenótipo compatível com o descrito na literatura para outros portadores desta deleção em que sua CNV, abrangendo os genes *MYT1L*, *SNTG2* e *TMEM18*, sugere ser uma ligação causal entre a alteração genômica e o fenótipo observado.

Translocação não equilibrada entre os cromossomos 8 e 12 - *der(8)t(8;12)(p23.1;p13.31)*

Goldlust *et al.* (2013) descreveram 7 pacientes compartilhando o mesmo rearranjo genômico, uma translocação não equilibrada entre os cromossomos 8 e 12, resultando numa perda de 7,0Mb no braço curto do cromossomo 8 e um ganho de 8,5Mb no braço curto do cromossomo 12 e fenótipo de deficiência

intelectual, macrocefalia, eczema, convulsões e obesidade. Há 23 genes dentro da deleção em 8p e 107 genes dentro da duplicação em 12p, com destaque para o gene *GNB3* no cromossomo 12, previamente associado com obesidade.

O gene *GNB3* codifica a subunidade G β 3 (proteína G β 3) que é expressa em todos os tecidos, representando um componente chave na transdução de sinal intracelular. Localiza-se no cromossomo 12p13 e compreende 11 éxons e 10 íntrons. O polimorfismo C825T no éxon 10 não afeta a sequência de aminoácidos, mas está associado com a ocorrência de uma proteína diferente, denominada G β 3s, devido a um splicing variante, que resulta em um ganho dominante de função, ou seja, um aumento na transdução de sinal em células e tecidos humanos. O polimorfismo C825T do gene *GNB3* tem sido associado com vários fenótipos, incluindo a hipertensão, arteriosclerose, obesidade, resistência à insulina, depressão e respostas imunes (Kenkle *et al.*, 2011).

Ou *et al.* (2011) forneceram evidência molecular que apoia que NAHR entre LCR intercromossômicas seja um potencial mecanismo para translocações recíprocas recorrentes. Análises do banco de dados de seus pacientes estudados por *array* retornou dois casos com der(8)t(8;12)(p23.1;p13.31). Análise bioinformática dos pontos de quebra nas regiões da t(8;12) revelou um cluster de LCR de ~579kb (posição genômica 7,52 - 8,10Mb) no cromossomo 8p23.1 e um cluster de LCR de ~287kb no cromossomo 12p13.31 (posição genômica 8,31 - 8,60Mb), que compartilham 285 kb de homologia significativa (sequência de identidade do DNA > 94%).

Locus 16p11.2

O braço curto do cromossomo 16 é rico em duplicações segmentares (*segmental duplications*) (trechos maiores que 1 kb com uma alta identidade com outras sequências). Os mais conhecidos distúrbios genômicos recorrentes resultam da recombinação homóloga não-alélica (NAHR) ou crossing-over desigual entre esses segmentos grandes e altamente idênticos (> 10 kb) (Girirajan *et al.*, 2010). Vários desequilíbrios genômicos (microdeleções ou microduplicações) já foram caracterizados tendo pontos de quebra mapeados dentro de duplicações segmentares do cromossomo 16, associados ao autismo, esquizofrenia, deficiência intelectual, anomalias congênitas e obesidade (Itsara *et al.*, 2009; Girirajan *et al.*, 2010; Bachmann-Gagescu *et al.*, 2010; Sahoo *et al.*, 2011).

Bochukova *et al.* (2010) estudaram 300 pacientes com obesidade severa de início precoce, sendo que 143 tinham também atraso no desenvolvimento. Foram identificados três pacientes com a deleção no cromossomo 16p11.2, sendo que em dois destes pacientes (que possuíam atraso leve de desenvolvimento) a deleção estendia-se por uma região de 593kb anteriormente associada a autismo e deficiência intelectual. Em outra amostra de 1.062 pacientes com apenas obesidade grave detectaram a deleção de 16p11.2 em mais dois pacientes. Assim, os autores relataram 5 pacientes portando a deleção em 16p11.2 com uma região mínima de sobreposição de 220kb (28.73–28.95 Mb, hg 18) que inclui o gene *SH2B1*, conhecido por estar envolvido na sinalização da insulina e leptina.

Walters *et al.* (2010) relataram uma forma altamente penetrante da obesidade, inicialmente observada em 31 indivíduos que eram heterozigotos

para deleções de aproximadamente 600kb em 16p11.2 (29.5–30.1 Mb) e também apresentavam déficits cognitivos. Os autores fizeram um levantamento a partir de GWAS realizados em 16.053 indivíduos de oito coortes europeias identificando dezenove deleções semelhantes ao seu achado. Essas deleções estavam ausentes dos controles não obesos e representavam 0,7% dos casos de obesidade mórbida.

A duplicação recíproca desta região de 600kb foi associada a um fenótipo espelho ao IMC extremo. Jacquemont *et al.* (2011) detectou 138 portadores da duplicação que mostram uma redução significativa no peso e IMC pós-natal ($IMC < 18,5\text{kg/m}^2$), tanto em indivíduos com atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual como em indivíduos sem essas características. Também detectou uma associação entre a deleção e a duplicação com aumento e redução do perímetro cefálico (26,7% apresentando microcefalia), respectivamente.

Al-Kateb *et al.*, (2014) estudaram 10 pacientes com rearranjos em 16p11.2, sugerindo que casos com rearranjos nesta região têm uma maior incidência de escoliose e anomalias vertebrais. Dois destes pacientes portavam uma deleção na região e tinham a obesidade como uma de suas características.

Deleção em 17q24.2

Vergult *et al.* (2012) descreveram 4 pacientes com deleções em 17q24.2 e fenótipo de atraso no desenvolvimento, atraso na fala, problemas de alimentação na infância, obesidade truncal e fácies semelhante. Eles apresentavam a menor região de sobreposição das deleções de 713 kb de

tamanho que contém um microRNA e cinco genes: *PRKCA*, *HELZ* e um conjunto de três genes *CACNG* que codificam a subunidade gama de um canal de cálcio dependente de voltagem.

Já Lestner *et al.* (2012) e Bartnik *et al.* (2014) descrevem pacientes com deleções que se sobrepõem parcialmente às descritas acima, apresentando algumas características clínicas comuns como atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, problemas de alimentação e características faciais dismórficas, como fronte alta e larga, hipertelorismo e epicanto, porém sem o fenótipo de obesidade.

PRKCA codifica uma proteína quinase C alfa, que tem um papel importante em muitos processos celulares diferentes. Uma análise de ligação do genoma ao IMC apontou *PRKCA* como um *locus* pleiotrópico a ser associado com o IMC e asma (Murphy *et al.*, 2009). A deleção de *PRKCA* pode contribuir para a obesidade truncal observada (Vergult *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Algumas síndromes genéticas que apresentam obesidade como característica clínica

Síndrome	Localização cromossômica	Gene	Principais características
Osteodistrofia Hereditária de Albright (AHO) e Pseudohipoparatiroidismo tipo Ia (PHP1A)	20q13	<i>GNAS1</i>	AHO (pseudo-pseudohipoparatiroidismo): baixa estatura, braquidactilia, obesidade, deformidades crânio-faciais, membros curtos ou ossos metacarpianos curtos, calcinose subcutânea; em alguns casos anomalias mentais e do desenvolvimento. PHP1A: fenótipo de AHO com a presença também de resistência multihormonal. Relacionadas ao <i>imprinting</i> do gene, sendo que o alelo materno mutado leva à PHP1A, enquanto que o alelo paterno mutado leva a AHO
S. Alström	2p13	<i>ALMS1</i>	Deficiência neurosensorial, obesidade na infância, resistência à insulina, hiperinsulinemia levando à diabetes tipo 2, hipogonadismo em homens, baixa estatura
S. Carpenter	6p11	<i>RAB23</i>	Oxicefalia, craniossinostose, braquidactilia e sindactilia nas mãos, polidactilia pré-axial nos pés, anomalias dentais. Obesidade presente em pacientes mais velhos
S. Cohen	8q22.2	<i>COH1</i>	Deficiência intelectual, microcefalia, fâcies típica, obesidade, baixa estatura, hipotonia, distrofia retiniana progressiva
S. Börjeson-Forssman-Lehmann	Xq26.3	<i>PHF6</i>	Deficiência intelectual, obesidade, ginecomastia, hipogonadismo, orelhas grandes
S. Wilson-Turner	Xq21.2-q22	<i>WTS</i>	Deficiência intelectual, obesidade, ginecomastia, dificuldades na fala, instabilidade emocional, dedos afilados, pés pequenos
S. Ahmad	Xp11.3-q23	-	Deficiência intelectual, obesidade, hipogonadismo, dedos afilados
MEHMO	Xp21.1-p22.13	-	Deficiência intelectual, epilepsia, hipogonadismo, microcefalia, obesidade

Baseado em Beales et al, 2009 e Kousta et al, 2009

Conclusões

V – Conclusões

1. O estudo genético de 31 pacientes com obesidade e/ou hiperfagia associada a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldades de aprendizagem, distúrbios de comportamento e outras características clínicas resultou na detecção de CNVs em 8 pacientes, o que corresponde a 25,8% da amostra estudada. Dentre essas alterações, a duplicação 16p13.11p12.3 foi descrita como provavelmente benigna.
2. Algumas CNVs presentes no genoma contribuem para a obesidade extrema associada à deficiência intelectual. A identificação de tais CNVs permite o diagnóstico de novas síndromes que apresentam fenótipos semelhantes aos de síndromes já conhecidas, explicando a variabilidade fenotípica presente nos pacientes.
3. As alterações encontradas foram: deleção em 1p22.1p21.2; deleção em 3q25.33q26.1 e deleção em 13q31.2q32.1; duplicação em 7q36.2; deleção em 8p23.3p23.1 e duplicação em 12p13.33p13.31; duplicação 16p13.11p12.3; duplicação em 17q11.2; deleção em 20p12.1; duplicação em 21q22.13.
4. Algumas alterações encontradas estão localizadas em regiões de síndromes descritas como tendo a obesidade com uma de suas principais características. A microdeleção de 1p21.3, as duplicações do cromossomo 21 e a duplicação do gene *GNB3* (cromossomo 12p13.31)

mostram pacientes com tendência a desenvolver a obesidade ou já obesos.

5. Nos segmentos alterados foram encontrados genes já descritos como associados à obesidade (*PTBP2*, *DPYD*, *MIR137*, *GNB3* e *PPM1L*) ou possivelmente envolvidos com este fenótipo (*HTR5A* e *KCNJ6*).
6. Os genes *RNF135*, *NF1*, *DPP6*, *GPC5*, *DYRK1A* e *MACROD2* são os prováveis causadores da deficiência intelectual, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldades de aprendizagem, distúrbios de comportamento e/ou outras características clínicas encontrados nos pacientes.
7. Dez genitores foram analisados por *array*-CGH, qPCR, FISH e/ou cariótipo. Apenas dois genitores eram portadores da CNV estudada, ambos os casos apresentando um significado clínico incerto. Em dois pacientes a CNV era comprovadamente *de novo*, tendo um risco de recorrência considerado desprezível.

Resumo

VI – Resumo

A obesidade se tornou uma das maiores preocupações de saúde pública. É um distúrbio neuroendócrino, no qual fatores ambientais e genéticos agem em conjunto, levando ao excesso de armazenamento de energia na forma de gordura corporal. A síndrome de Prader-Willi (PWS) é a mais freqüente das síndromes que possui a obesidade como uma de suas características, com incidência de 1:25.000 nascimentos. É caracterizada por hipotonia neonatal com dificuldade de sucção, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), hiperfagia, obesidade, baixa estatura em adolescentes, mãos e pés pequenos, hipogonadismo, distúrbios do sono, características faciais dismórficas, deficiência intelectual leve a moderada e comportamento obsessivo-compulsivo. Pacientes com atraso do DNPM e/ou dificuldade de aprendizado, distúrbios de comportamento, obesidade e/ou hiperfagia, com teste negativo para PWS, foram estudados com plataformas de SNP *array*, “The GeneChip® Mapping 500K Set” da Affymetrix, ou *array*-CGH, CytoSure ISCA 4x180k da OGT, para identificar genes relacionados a obesidade e hiperfagia, assim como, novas regiões genômicas implicadas na etiologia de síndromes genéticas associadas à obesidade. Dentre os 31 pacientes estudados, oito apresentaram variações de número de cópias (CNVs) em seu genoma: deleção em 1p22.1p21.2; deleção em 3q25.33q26.1 e deleção em 13q31.2q32.1; duplicação em 7q36.2; deleção em 8p23.3p23.1 e duplicação em 12p13.33p13.31; duplicação 16p13.11p12.3; duplicação em 17q11.2; deleção em 20p12.1; duplicação em 21q22.13. Duas dessas alterações foram herdadas de pais fenotipicamente normais. Algumas dessas

CNVs sobrepõem regiões genômicas previamente relacionadas com obesidade, incluindo a microdeleção de 1p21.3 e as duplicações dos cromossomos 12 e 21. Identificamos genes anteriormente descritos como associados à obesidade (*PTBP2*, *DPYD*, *MIR137*, *GNB3* e *PPM1L*), ou possivelmente envolvidos com este fenótipo (*HTR5A* e *KCNJ6*), mapeados em várias dessas CNVs. Além disso, os genes *RNF135*, *NF1*, *DPP6*, *GPC5*, *DYRK1A* e *MACROD2* são os prováveis causadores da deficiência intelectual, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldades de aprendizagem, distúrbios de comportamento e outras características clínicas encontrados nos pacientes. O diagnóstico e prognóstico dos pacientes e o Aconselhamento Genético aos pais e familiares é fornecido.

Abstract

VII – Abstract

Obesity has become a major concern for public health. It is a neuroendocrine disorder, in which genetic and environmental factors act together, leading to excessive storage of energy as fat. Prader-Willi syndrome (PWS) is the main obesity-related syndrome with a birth incidence of 1:25,000. It is characterized by neonatal hypotonia, poor sucking, developmental delay, hyperphagia, obesity, short stature in adolescents, small hands and feet, hypogonadism, sleep disturbance, dysmorphic facial features, mild to moderate intellectual disability and obsessive-compulsive behavior. Patients with psychomotor developmental delay and/or learning disabilities, behavior disorders, obesity and/or hyperphagia, who tested negative for PWS, were studied by chromosomal *microarray* analysis, including the SNP-based platform “The GeneChip® Mapping 500K Set” (Affymetrix), and the *array*-CGH platform “CytoSure ISCA 4x180k (OGT)”, to identify genes related to hyperphagia and obesity, as well as new genomic regions implicated in the etiology of genetic syndromes associated with obesity. Of 31 patients studied, eight had copy number variants (CNVs) in the genome: 1p22.1p21.2 deletion; 3q25.33q26.1 deletion and 13q31.2q32.1 deletion; 7q36.2 duplication; 8p23.3p23.1 deletion and 12p13.33p13.31 duplication; 16p13.11p12.3 duplication; 17q11.2 duplicaton; 20p12.1 deletion; 21q22.13 duplication. Two of these CNVs were inherited from an unaffected father. Some of these CNVs overlap genomic regions that have previously been related to obesity, including the 1p21.3 microdeletion and the duplications of chromosomes 12 and 21. Furthermore, we identified genes previously described as associated with obesity (*PTBP2*,

DPYD, *MIR137*, *GNB3* and *PPM1L*), or possibly involved with this phenotype (*HTR5A* and *KCNJ6*), mapped to several of these CNVs. In addition, the genes *RNF135*, *NF1*, *DPP6*, *GPC5*, *DYRK1A* and *MACROD2* are likely implicated in intellectual disability, developmental delay, learning disabilities, behavioral disorders and other clinical features found in patients. The diagnosis and prognosis of patients and genetic counseling to parents and families is provided.

Referências bibliográficas

IX – Referências Bibliográficas

Referências Eletrônicas

CHORI: bacpac.chori.org/bacpacmini.htm

DECIPHER: <http://decipher.sanger.ac.uk/>

DGV Toronto: dgv.tcag.ca/dgv/app/home/

Ensembl Genome Browser: www.ensembl.org/

GeneCards: www.genecards.org/

ISCA: www.iscaconsortium.org/

OMIM: www.omim.org/

PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics:

genome.ucsc.edu/

Referências Bibliográficas

Alders M, Koopmann TT, Christiaans I, Postema PG, Beekman L, Tanck MW, Zeppenfeld K, Loh P, Koch KT, Demolombe S, Mannens MM, Bezzina CR, Wilde AA. Haplotype-sharing analysis implicates chromosome 7q36 harboring DPP6 in familial idiopathic ventricular fibrillation. **Am J Hum Genet.** 2009 Apr;84(4):468-76.

Al-Kateb H, Khanna G, Filges I, Hauser N, Grange DK, Shen J, Smyser CD, Kulkarni S, Shinawi M. Scoliosis and vertebral anomalies: Additional abnormal phenotypes associated with chromosome 16p11.2 rearrangement. **Am J Med Genet A.** 2014 Jan 23.

Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. **Nature.** 2006 Jun 1;441(7093):595-600.

Bachmann-Gagescu R, Mefford HC, Cowan C, Glew GM, Hing AV, Wallace S, Bader PI, Hamati A, Reitnauer PJ, Smith R, Stockton DW, Muhle H, Helbig I, Eichler EE, Ballif BC, Rosenfeld J, Tsuchiya KD. Recurrent 200-kb deletions of 16p11.2 that include the SH2B1 gene are associated with developmental delay and obesity. **Genet Med.** 2010 Oct;12(10):641-7.

Barnes LA, Opitz JM, Gilbert-Barnes E. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. **Am J Med Genet.** 2007 Part A 143A:3016–3034.

Bartnik M, Nowakowska B, Derwińska K, Wiśniowiecka-Kowalik B, Kędzior M, Bernaciak J, Ziemkiewicz K, Gambin T, Sykulski M, Bezniakow N, Korniszewski L, Kutkowska-Kaźmierczak A, Kłapecki J, Szczałuba K, Shaw CA, Mazurczak T, Gambin A, Obersztyn E, Bocian E, Stankiewicz P. Application of *array* comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. **J Appl Genet.** 2014 Feb;55(1):125-44.

Beales, PF, Farooqi, IS. Introduction. In: **Genetics of Obesity Syndromes.** New York: Oxford University Press, Inc., 2009. P. 3-24.

Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. **Nat Rev Genet.** 2005 Mar;6(3):221-34.

Bi W, Pham J, Denham J, Roney E, Pursley AN, Stankiewicz P, Breman A, Lalani S, Smith J, Bacino C, Patel A, S. W. Cheung Baylor College of Medicine, Houston, TX. Parental Studies of 2,248 Chromosomal Microarray Analysis (CMA) Cases -Role of parental studies in facilitating the interpretation of copy number variants. Apresentação de Pôster no Congresso da ASHG – American Society of Human Genetics 2013, Boston, USA.

Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Purmann C, Blaszczyk K, Saeed S, Hamilton-Shield J, Clayton-Smith J, O'Rahilly S, Hurles ME, Farooqi

IS. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. **Nature**. 2010 Feb 4;463(7281):666-70.

Bonnefond A, Raimondo A, Stutzmann F, Ghossaini M, Ramachandrapa S, Bersten DC, Durand E, Vatin V, Balkau B, Lantieri O, Raverdy V, Pattou F, Van Hul W, Van Gaal L, Peet DJ, Weill J, Miller JL, Horber F, Goldstone AP, Driscoll DJ, Bruning JB, Meyre D, Whitelaw ML, Froguel P. Loss-of-function mutations in SIM1 contribute to obesity and Prader-Willi-like features. **J Clin Invest**. 2013 Jul 1;123(7):3037-41.

Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. **N Engl J Med**. 1990 May 24;322(21):1477-82.

Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Thériault G, Nadeau A, Lupien PJ, Moorjani S, Prudhomme D, Fournier G. The response to exercise with constant energy intake in identical twins. **Obes Res**. 1994 Sep;2(5):400-10.

Burns B, Schmidt K, Williams SR, Kim S, Girirajan S, Elsea SH. Rai1 haploinsufficiency causes reduced Bdnf expression resulting in hyperphagia, obesity and altered fat distribution in mice and humans with no evidence of metabolic syndrome. **Hum Mol Genet**. 2010 Oct 15;19(20):4026-42.

Calton MA, Vaisse C. Narrowing down the role of common variants in the genetic predisposition to obesity. **Genome Medicine**. 2009 Mar;11 1:31.

Carter MT, Nikkel SM, Fernandez BA, Marshall CR, Noor A, Lionel AC, Prasad A, Pinto D, Joseph-George AM, Noakes C, Fairbrother-Davies C, Roberts W, Vincent J, Weksberg R, Scherer SW. Hemizygous deletions on chromosome 1p21.3 involving the DPYD gene in individuals with autism spectrum disorder. **Clin Genet.** 2011 Nov;80(5):435-43.

Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. **Genet Med.** 2012 Jan;14(1):10-26.

Chen CP, Huang HK, Ling PY, Su YN, Chen M, Tsai FJ, Wu PC, Chern SR, Chen YT, Lee CC, Wang W. A de novo duplication of chromosome 21q22.11→qter associated with Down syndrome: prenatal diagnosis, molecular cytogenetic characterization and fetal ultrasound findings. **Taiwan J Obstet Gynecol.** 2011 Dec;50(4):492-8.

Choquet H, Meyre D. Genomic insights into early-onset obesity. **Genome Med.** 2010 Jun 23;2(6):36.

Coll, AP, Farooqi, IS, Challis, BG, Yeo, GSH, O'Rahilly, S. Proopiomelanocortin and Energy Balance: Insights from Human and Murine Genetics. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** 2004 89(6):2557–2562.

Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov

D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. A copy number variation morbidity map of developmental delay. **Nat Genet.** 2011 Aug 14;43(9):838-46.

Curran JE, McKay DR, Winkler AM, Olvera RL, Carless MA, Dyer TD, Kent JW Jr, Kochunov P, Sprooten E, Knowles EE, Comuzzie AG, Fox PT, Almasy L, Duggirala R, Blangero J, Glahn DC. Identification of pleiotropic genetic effects on obesity and brain anatomy. **Hum Hered.** 2013;75(2-4):136-43.

D'Angelo CS, Da Paz JA, Kim CA, Bertola DR, Castro CIE, Varela MC, Koiffmann CP. Prader-Willi-like phenotype: investigation of 1p36 deletion in 41 patients with delayed psychomotor development, hypotonia, obesity and/or hyperphagia, learning disabilities and behavioral problems. **European J Medical Genetics.** 2006 49(6):451-60.

D'Angelo CS, Kohl I, Varela MC, de Castro, CIE, Kim CA, Bertola DR, Lourenco CM, Koiffmann CP. Extending the phenotype of monosomy 1p36 syndrome and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia. **Am J Med Genet Part A** 2010 152A:102–110.

Deng Y, Deng H, Bi F, Liu J, Bemis LT, Norris D, Wang XJ, Zhang Q. MicroRNA-137 targets carboxyl-terminal binding protein 1 in melanoma cell lines. **Int J Biol Sci.** 2011 Jan 27;7(1):133-7.

Deutsch S, Lyle R, Dermitzakis ET, Attar H, Subrahmanyam L, Gehrig C, Parand L, Gagnebin M, Rougemont J, Jongeneel CV, Antonarakis SE. Gene expression variation and expression quantitative trait mapping of human chromosome 21 genes. **Hum Mol Genet.** 2005 Dec 1;14(23):3741-9.

de Vries, BBA, Pfundt, R, Leisink, M, Koolen, DA, Vissers,LELM, Janssen, IM, van Reijmersdal, S, Nillesen, WN, Huys, EHLPG, de Leeuw,N, Smeets, D, Sistermans, EA, Feuth, T, van Ravenswaaij-Arts, CMA, van Kessel, AG, Schoenmakers, EFPM, Brunner, HG, Veltman1, JA. Diagnostic Genome Profiling in Mental Retardation. **Am. J. Hum. Genet.** 2005 77:606–616.

Doco-Fenzy M, Leroy C, Schneider A, Petit F, Delrue MA, Andrieux J, Perrin-Sabourin L, Landais E, Aboura A, Puechberty J, Girard M, Tournaire M, Sanchez E, Rooryck C, Ameil A, Goossens M, Jonveaux P, Lefort G, Taine L, Cailley D, Gaillard D, Leheup B, Sarda P, Geneviève D. Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. **Eur J Hum Genet** 2014 Apr;22(4):471-9.

Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K. NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. **Human Molecular Genetics.** 2000 9(1): 35-46.

Douglas, J., Cilliers, D., Coleman, K., Tatton-Brown, K., Barker, K., Bernhard, B., Burn, J., Huson, S., Josifova, D., Lacombe, D., Malik, M., Mansour, S., Reid, E., Cormier-Daire, V., Cole, T., The Childhood Overgrowth Collaboration,

Rahman, N. Mutations in RNF135, a gene within the NF1 microdeletion region, causes phenotypic abnormalities including overgrowth. **Nature Genet.** 2007 39: 963-965.

Elsea SH, Williams SR. Smith-Magenis syndrome: haploinsufficiency of RAI1 results in altered gene regulation in neurological and metabolic pathways. **Expert Rev Mol Med.** 2011 Apr 19;13:e14.

Falk RE, Casas KA. Chromosome 2q37 deletion: clinical and molecular aspects. **Am J Med Genet C Semin Med Genet.** 2007 Nov 15;145C(4):357-71.

Farooqi, IS, O'Rahilly, S. Human Melanocortin 4 Receptor Deficiency. In: **Genetics of Obesity Syndromes.** New York: Oxford University Press, Inc., 2009. P.81-90.

Forsythe E1, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome. **Eur J Hum Genet.** 2013 Jan;21(1):8-13.

Gijsbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Bakker E, Ruivenkamp CA. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test *arrays* first. **Eur J Hum Genet.** 2009 Nov;17(11):1394-402.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC, Kidd JM, Browning SR, Browning BL, Dickel DE, Levy DL, Ballif BC, Platky K, Farber DM, Gowans GC, Wetherbee JJ, Asamoah A, Weaver DD, Mark PR, Dickerson J, Garg BP, Ellingwood SA, Smith R, Banks VC, Smith W, McDonald MT, Hoo JJ, French BN, Hudson C, Johnson JP, Ozmore JR, Moeschler JB, Surti U, Escobar LF, El-Khechen D, Gorski JL, Kussmann J, Salbert B, Lacassie Y, Biser A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Deardorff MA, Shaikh TH, Haan E, Friend KL, Fichera M, Romano C, Gécz J, DeLisi LE, Sebat J, King MC, Shaffer LG, Eichler EE. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. **Nat Genet.** 2010 Mar;42(3):203-9.

Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, Vu TH, Shafer N, Bernier R, Ferrero GB, Silengo M, Warren ST, Moreno CS, Fichera M, Romano C, Raskind WH, Eichler EE. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. **PLoS Genet.** 2011 Nov;7(11):e1002334.

Goldlust IS, Hermetz KE, Catalano LM, Barfield RT, Cozad R, Wynn G, Ozdemir AC, Conneely KN, Mulle JG, Dharamrup S, Hegde MR, Kim KH, Angle B, Colley A, Webb AE, Thorland EC, Ellison JW, Rosenfeld JA, Ballif BC, Shaffer LG, Demmer LA; Unique Rare Chromosome Disorder Support Group, Rudd MK, Searle BA, Wynn SL. Mouse model implicates GNB3 duplication in a childhood obesity syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013 Sep 10;110(37):14990-4.

Goldstone AP, Beales PL. Genetic obesity syndromes. **Front Horm Res.** 2008 36:37-60.

Grisart B, Rack K, Vidrequin S, Hilbert P, Deltenre P, Verellen-Dumoulin C, Destrée A. NF1 microduplication first clinical report: association with mild mental retardation, early onset of baldness and dental enamel hypoplasia? **European Journal of Human Genetics.** 2008 16, 305–311.

Han JC, Liu QR, Jones M, Levinn RL, Menzie CM, Jefferson-George KS, Adler-Wailes DC, Sanford EL, Lacbawan FL, Uhl GR, Rennert OM, Yanovski JA. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. **N Engl J Med.** 2008 Aug 28;359(9):918-27.

Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A, Stewart H, Hennekam RC, Cooper GM, Regan R, Knight SJ, Eichler EE, Vermeesch JR. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. **J Med Genet.** 2009 Apr;46(4):223-32.

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. **Nat Rev Genet.** 2009 Aug;10(8):551-64.

Hebebrand J, Friedel S, Schäuble N, Geller F, Hinney A. Perspectives: molecular genetic research in human obesity. **Obes Rev.** 2003 Aug;4(3):139-46.

Hebebrand J, Hinney A. Environmental and genetic risk factors in obesity. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.** 2009 Jan;18(1):83-94.

Hebebrand J. Obesity. In: Martin A, Volkmar FR, Lewis M (eds) **Lewis's Child and adolescent psychiatry: a comprehensive textbook.** Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 602-614, 2007.

Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. **Clin Genet.** 2013 Nov;84(5):415-21.

Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas.** 2011 May;69(1):41-9.

Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. **Eur Child Adolesc Psychiatry.** 2010 Mar;19(3):297-310.

Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. **Hum Mol Genet.** 2000 Jan 1;9(1):101-8.

Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss RM, Myers RM, Ridker PM, Chasman DI, Mefford H, Ying P, Nickerson DA, Eichler EE. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. **Am J Hum Genet.** 2009 Feb;84(2):148-61.

Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F, Harewood L, Walters RG, Kutalik Z, Martinet D, Shen Y, Valsesia A, Beckmann ND, Thorleifsson G, Belfiore M, Bouquillon S, Campion D, de Leeuw N, de Vries BB, Esko T, Fernandez BA, Fernández-Aranda F, Fernández-Real JM, Gratacòs M, Guilmatre A, Hoyer J, Jarvelin MR, Kooy RF, Kurg A, Le Caignec C, Männik K, Platt OS, Sanlaville D, Van Haelst MM, Villatoro Gomez S, Walha F, Wu BL, Yu Y, Aboura A, Addor MC, Alembik Y, Antonarakis SE, Arveiler B, Barth M, Bednarek N, Béna F, Bergmann S, Beri M, Bernardini L, Blaumeiser B, Bonneau D, Bottani A, Boute O, Brunner HG, Cailley D, Callier P, Chiesa J, Chrast J, Coin L, Coutton C, Cuisset JM, Cuvellier JC, David A, de Freminville B, Delobel B, Delrue MA, Demeer B, Descamps D, Didelot G, Dieterich K, Disciglio V, Doco-Fenzy M, Drunat S, Duban-Bedu B, Dubourg C, El-Sayed Moustafa JS, Elliott P, Faas BH, Faivre L, Faudet A, Fellmann F, Ferrarini A, Fisher R, Flori E, Forer L, Gaillard D, Gerard M, Gieger C, Gimelli S, Gimelli G, Grabe HJ, Guichet A, Guillin O, Hartikainen AL, Heron D, Hippolyte L, Holder M, Homuth G, Isidor B, Jaillard S, Jaros Z, Jiménez-Murcia S, Helas GJ, Jonveaux P, Kaksonen S, Keren B, Kloss-Brandstätter A, Knoers NV, Koolen DA, Kroisel PM, Kronenberg F, Labalme A, Landais E, Lapi E, Layet V, Legallic S, Leheup B, Leube B, Lewis S, Lucas J, MacDermot KD, Magnusson P, Marshall C, Mathieu-Dramard M, McCarthy MI, Meitinger T, Mencarelli MA, Merla G, Moerman A, Mooser V,

Morice-Picard F, Mucciolo M, Nauck M, Ndiaye NC, Nordgren A, Pasquier L, Petit F, Pfundt R, Plessis G, Rajcan-Separovic E, Ramelli GP, Rauch A, Ravazzolo R, Reis A, Renieri A, Richart C, Ried JS, Rieubland C, Roberts W, Roetzer KM, Rooryck C, Rossi M, Saemundsen E, Satre V, Schurmann C, Sigurdsson E, Stavropoulos DJ, Stefansson H, Tengström C, Thorsteinsdóttir U, Tinahones FJ, Touraine R, Vallée L, van Binsbergen E, Van der Aa N, Vincent-Delorme C, Visvikis-Siest S, Vollenweider P, Völzke H, Vulto-van Silfhout AT, Waeber G, Wallgren-Pettersson C, Witwicki RM, Zwolinski S, Andrieux J, Estivill X, Gusella JF, Gustafsson O, Metspalu A, Scherer SW, Stefansson K, Blakemore AI, Beckmann JS, Froguel P. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. **Nature**. 2011 Aug 31;478(7367):97-102.

Jankevicius G, Hassler M, Golia B, Rybin V, Zacharias M, Timinszky G, Ladurner AG. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. **Nat Struct Mol Biol**. 2013 Apr;20(4):508-14.

Jannot AS, Pelet A, Henrion-Caude A, Chaoui A, Masse-Morel M, Arnold S, Sanlaville D, Ceccherini I, Borrego S, Hofstra RM, Munnich A, Bondurand N, Chakravarti A, Clerget-Darpoux F, Amiel J, Lyonnet S. Chromosome 21 scan in Down syndrome reveals DSCAM as a predisposing locus in Hirschsprung disease. **PLoS One**. 2013 May 6;8(5):e62519.

Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality

Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. **Genet Med**. 2011 Jul;13(7):680-5.

Kirchhoff M, Bisgaard AM, Stoeva R, Dimitrov B, Gillessen-Kaesbach G, Fryns JP, Rose H, Grozdanova L, Ivanov I, Keymolen K, Fagerberg C, Tranebjaerg L, Skovby F, Stefanova M. Phenotype and 244k *array*-CGH characterization of chromosome 13q deletions: an update of the phenotypic map of 13q21.1-qter. **Am J Med Genet A**. 2009 May;149A(5):894-905.

Klenke S, Kussmann M, Siffert W. The GNB3 C825T polymorphism as a pharmacogenetic marker in the treatment of hypertension, obesity, and depression. **Pharmacogenet Genomics**. 2011 Sep;21(9):594-606.

Kohl, I. **Pesquisa de genes e/ou segmentos cromossômicos em pacientes com obesidade e/ou hiperfagia, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e/ou dificuldades de aprendizado e distúrbios de comportamento**. USP, 2010. 162p. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia. São Paulo, 2010.

Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, Grubert F, Erdman C, Gao MC, Lange K, Sobel EM, Barlow GM, Aylsworth AS, Carpenter NJ, Clark RD, Cohen MY, Doran E, Falik-Zaccai T, Lewin SO, Lott IT, McGillivray BC, Moeschler JB, Pettenati MJ, Pueschel SM, Rao KW, Shaffer LG, Shohat M, Van Riper AJ, Warburton D, Weissman S, Gerstein MB, Snyder

M, Korenberg JR. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Jul 21;106(29):12031-6.

Kosaki R, Kosaki K, Matsushima K, Mitsui N, Matsumoto N, Ohashi H. Refining chromosomal region critical for Down syndrome-related heart defects with a case of cryptic 21q22.2 duplication. **Congenit Anom (Kyoto)**. 2005 Jun;45(2):62-4.

Kousta, E, Hadjiathanasiou, CG, Tolis, G, Papathanasiou, A. Pleiotropic Genetic Syndromes with Developmental Abnormalities Associated with Obesity. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, 2009 22, 581-592.

Krude, H, Grüters, A. Pro-opiomelanocortin Deficiency. In: **Genetics of Obesity Syndromes**. New York: Oxford University Press, Inc., 2009. P.49-62.

Kuniba H, Tsuda M, Nakashima M, Miura S, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Moriuchi H, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Kinoshita A, Yoshiura KI, Niikawa N. Lack of C20orf133 and FLRT3 mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan. **J Med Genet**. 2008 Jul;45(7):479-80.

Lana-Elola E, Watson-Scales SD, Fisher EM, Tybulewicz VL. Down syndrome: searching for the genetic culprits. **Dis Model Mech**. 2011 Sep;4(5):586-95.

Leroy C, Landais E, Briault S, David A, Tassy O, Gruchy N, Delobel B, Grégoire MJ, Leheup B, Taine L, Lacombe D, Delrue MA, Toutain A, Paubel A, Mugneret F, Thauvin-Robinet C, Arpin S, Le Caignec C, Jonveaux P, Beri M, Leporrier N, Motte J, Fiquet C, Bricchet O, Mozelle-Nivoix M, Sabouraud P, Golovkine N, Bednarek N, Gaillard D, Doco-Fenzy M. The 2q37-deletion syndrome: an update of the clinical spectrum including overweight, brachydactyly and behavioural features in 14 new patients. **Eur J Hum Genet.** 2013 Jun;21(6):602-12.

Lestner JM, Ellis R, Canham N. Delineating the 17q24.2-q24.3 microdeletion syndrome phenotype. **Eur J Med Genet.** 2012 Dec;55(12):700-4.

Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, *et al.* Clinical Implementation of Chromosomal Microarray Analysis: Summary of 2513 Postnatal Cases. **PLoS ONE** 2007 2(3): e327.

Lupski JR. Genomic disorders ten years on. **Genome Med.** 2009 Apr 24;1(4):42.

Lyle R, Béna F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, Lespinasse J, Bottani A, Dahoun S, Taine L, Doco-Fenzy M, Cornillet-Lefèbvre P, Pelet A, Lyonnet S, Toutain A, Colleaux L, Horst J, Kennerknecht I, Wakamatsu N, Descartes M, Franklin JC, Florentin-Arar L, Kitsiou S, Aït Yahya-Graison E, Costantine M, Sinet PM, Delabar JM, Antonarakis SE. Genotype-phenotype correlations in

Down syndrome identified by *array* CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. **Eur J Hum Genet.** 2009 Apr;17(4):454-66

Ma, H, Shieh, KJ, Chen, G, Qiao, XT, Chuang, MY. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science,** 2006 2(3).

Maas NM, Van de Putte T, Melotte C, Francis A, Schrandt-Stumpel CT, Sanlaville D, Genevieve D, Lyonnet S, Dimitrov B, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. The C20orf133 gene is disrupted in a patient with Kabuki syndrome. **J Med Genet.** 2007 Sep;44(9):562-9.

Magoulas PL, Liu P, Gelowani V, Soler-Alfonso C, Kivuva EC, Lupski JR, Potocki L. Inherited dup(17)(p11.2p11.2): Expanding the phenotype of the Potocki-Lupski syndrome. **Am J Med Genet A.** 2014 Feb;164(2):500-4.

Mantripragada, KK, Buckley, PG, Stahl, TD, Dumanski, JP. Genomic *microarrays* in the spotlight. **Trends Genet.** 2004 Feb;20(2):87-94.

Margari L, Di Cosola ML, Buttiglione M, Pansini A, Buonadonna AL, Craig F, Cariola F, Petruzzelli MG, Gentile M. Molecular cytogenetic characterization and genotype/phenotype analysis in a patient with a de novo 8p23.2p23.3 deletion/12p13.31p13.33 duplication. **Am J Med Genet.** 2012 Part A 158A:1713–1718.

Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. **Am J Hum Genet.** 2008 Feb;82(2):477-88.

Moles KJ, Gowans GC, Gedela S, Beversdorf D, Yu A, Seaver LH, Schultz RA, Rosenfeld JA, Torchia BS, Shaffer LG. NF1 microduplications: identification of seven nonrelated individuals provides further characterization of the phenotype. **Genet Med.** 2012 14(5):508–514.

Møller RS, Kübart S, Hoeltzenbein M, Heye B, Vogel I, Hansen CP, Menzel C, Ullmann R, Tommerup N, Ropers HH, Tümer Z, Kalscheuer VM. Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. **Am J Hum Genet.** 2008 May;82(5):1165-70.

Morris B, Etoubleau C, Bourthoumieu S, Reynaud-Perrine S, Laroche C, Lebbar A, Yardin C, Elsea SH. Dose dependent expression of HDAC4 causes variable expressivity in a novel inherited case of brachydactyly mental retardation syndrome. **Am J Med Genet A.** 2012 Aug;158A(8):2015-20.

Murphy A, Tantisira KG, Soto-Quirós ME, Avila L, Klanderma BJ, Lake S, Weiss ST, Celedón JC. PRKCA: a positional candidate gene for body mass index and asthma. **Am J Hum Genet.** 2009 Jul;85(1):87-96.

Mutch DM, Clément K. Unraveling the genetics of human obesity. **PLoS Genet** 2006 2(12): e188.

Ou Z, Stankiewicz P, Xia Z, Breman AM, Dawson B, Wiszniewska J, Szafranski P, Cooper ML, Rao M, Shao L, South ST, Coleman K, Fernhoff PM, Deray MJ, Rosengren S, Roeder ER, Enciso VB, Chinault AC, Patel A, Kang SH, Shaw CA, Lupski JR, Cheung SW. Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between nonhomologous chromosomes. **Genome Res.** 2011 Jan;21(1):33-46.

Park J, Oh Y, Yoo L, Jung MS, Song WJ, Lee SH, Seo H, Chung KC. Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. **J Biol Chem.** 2010 Oct 8;285(41):31895-906.

Peñagarikano O, Geschwind DH. What does CNTNAP2 reveal about autism spectrum disorder? **Trends Mol Med.** 2012 Mar;18(3):156-63.

Quélin C, Bendavid C, Dubourg C, de la Rochebrochard C, Lucas J, Henry C, Jaillard S, Loget P, Loeuillet L, Lacombe D, Rival JM, David V, Odent S, Pasquier L. Twelve new patients with 13q deletion syndrome: genotype-phenotype analyses in progress. **Eur J Med Genet.** 2009 Jan-Feb;52(1):41-6.

Rio M, Royer G, Gobin S, de Blois MC, Ozilou C, Bernheim A, Nizon M, Munnich A, Bonnefont JP, Romana S, Vekemans M, Turleau C, Malan V. Monozygotic twins discordant for submicroscopic chromosomal anomalies in 2p25.3 region detected by *array* CGH. **Clin Genet.** 2013 Jul;84(1):31-6.

Roberson ED, Wohler ES, Hoover-Fong JE, Lisi E, Stevens EL, Thomas GH, Leonard J, Hamosh A, Pevsner J. Genomic analysis of partial 21q monosomies with variable phenotypes. **Eur J Hum Genet.** 2011 Feb;19(2):235-8.

Rodríguez-López R, Pérez JM, Balsera AM, Rodríguez GG, Moreno TH, García de Cáceres M, Serrano MG, Freijo FC, Ruiz JR, Angueira FB, Pérez PM, Estévez MN, Gómez EG. The modifier effect of the BDNF gene in the phenotype of the WAGRO syndrome. **Gene.** 2013 Mar 10;516(2):285-90.

Ronan A, Fagan K, Christie L, Conroy J, Nowak NJ, Turner G. Familial 4.3 Mb duplication of 21q22 sheds new light on the Down syndrome critical region. **BMJ Case Rep.** 2009 Jun 4.

Sahoo T, Theisen A, Rosenfeld JA, Lamb AN, Ravnan JB, Schultz RA, Torchia BS, Neill N, Casci I, Bejjani BA, Shaffer LG. Copy number variants of schizophrenia susceptibility loci are associated with a spectrum of speech and developmental delays and behavior problems. **Genet Med.** 2011 Oct;13(10):868-80.

Scheidecker S1, Etard C, Pierce NW, Geoffroy V, Schaefer E, Muller J, Chennen K, Flori E, Pelletier V, Poch O, Marion V, Stoetzel C, Strähle U, Nachury MV, Dollfus H. Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). **J Med Genet.** 2014 Feb;51(2):132-6.

Schmittgen, TD, Livak, KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nat Protoc.** 2008 3(6):1101-8.

Shinawi M, Sahoo T, Maranda B, Skinner SA, Skinner C, Chinault C, Zascavage R, Peters SU, Patel A, Stevenson RE, Beaudet AL. 11p14.1 microdeletions associated with ADHD, autism, developmental delay, and obesity. **Am J Med Genet A.** 2011 Jun;155A(6):1272-80.

Slater, HR, Bailey, DK, Ren, H, Cao, M, Bell, K, Nasioulas, S, Henke, R, Choo, KHA, Kennedy, GC. High-Resolution Identification of Chromosomal Abnormalities Using Oligonucleotide Arrays Containing 116,204 SNPs. **Am. J. Hum. Genet.** 2005 Nov;77(5):709-26.

Speliotes E. K., Willer C. J., Berndt S. I *et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. **Nature Genetics**, 2010 42: 937–948.

Stankiewicz P, Pursley AN, Cheung SW. Challenges in clinical interpretation of microduplications detected by *array* CGH analysis. **Am J Med Genet A**. 2010 May;152A(5):1089-100.

Stevens SJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Janssen JW, Klein Wassink-Ruiter JS, van Essen AJ, Dijkhuizen T, van Rheenen J, Heuts-Vijgen R, Stegmann AP, Smeets EE, Engelen JJ. MYT1L is a candidate gene for intellectual disability in patients with 2p25.3 (2pter) deletions. **Am J Med Genet A**. 2011 Nov;155A(11):2739-45.

Toriello H, Mathew M, Valdmanis V. Evidence that macrocephaly and obesity may be dependent traits. **Am J Med Genet A**. 2007 Dec 15;143A(24):3035-7

van Es MA, van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Van den Bosch L, de Jong SW, de Jong V, Baas F, van't Slot R, Lemmens R, Schelhaas HJ, Birve A, Slegers K, Van Broeckhoven C, Schymick JC, Traynor BJ, Wokke JH, Wijmenga C, Robberecht W, Andersen PM, Veldink JH, Ophoff RA, van den Berg LH. Genetic variation in DPP6 is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Genet**. 2008 Jan;40(1):29-31.

van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN, Hennekam RC, Hoovers JM, de Die-Smulders CE, Weber P, Mori AC, Bierau J, Fowler B, Macke K, Sass JO, Meinsma R, Hennermann JB, Miny P, Zoetekouw L, Vijzelaar R, Nicolai J, Ylstra B, Rubio-Gozalbo ME. Analysis of severely affected patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency reveals large intragenic

rearrangements of DPYD and a de novo interstitial deletion del(1)(p13.3p21.3). **Hum Genet.** 2009 Jun;125(5-6):581-90.

Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader–Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. **Clin Genet** 2005 67: 47–52.

Venturin M, Guarnieri P, Natacci F, Stabile M, Tenconi R, Clementi M, Hernandez C, Thompson P, Upadhyaya M, Larizza L, Riva P. Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2. **J Med Genet.** 2004 41:35–41.

Vergult S, Dauber A, Delle Chiaie B, Van Oudenhove E, Simon M, Rihani A, Loeys B, Hirschhorn J, Pfotenhauer J, Phillips JA 3rd, Mohammed S, Ogilvie C, Crolla J, Mortier G, Menten B. 17q24.2 microdeletions: a new syndromal entity with intellectual disability, truncal obesity, mood swings and hallucinations. **Eur J Hum Genet.** 2012 May;20(5):534-9.

Vignoli A, Scornavacca GF, Peron A, La Briola F, Canevini MP. Interstitial 6q microdeletion syndrome and epilepsy: a new patient and review of the literature. **Am J Med Genet A.** 2013 Aug;161A(8):2009-15.

Vissers, LELM, de Vries, BBA, Osoegawa, K, Janssen, IM, Feuth, T, Choy, CO, Straatman, H, van der Vliet, W, Huys, EHLPG, van Rijk, A, Smeets, D, van Ravenswaaij-Arts, CMA, Knoers, NV, van der Burgt, I, Jong, PJ, Brunner, HG,

van Kessel, AG, Schoenmakers, EFPM, Veltman, JA. *Array-Based Comparative Genomic Hybridization for the Genomewide Detection of Submicroscopic Chromosomal Abnormalities.* **Am. J. Hum. Genet.** 2003 Dec;73(6):1261-70.

Whitley P, Gibbard AM, Koumanov F, Oldfield S, *et al.* Identification of centaurin- α 2: A phosphatidylinositide-binding protein present in fat, heart and skeletal muscle. **European Journal of Cell Biology.** 2002 Apr 81:222-230.

Willemsen MH, Valle`s A, Kirkels LAMH, Mastebroek M, Loohuis NO, Kos A, Wissink-Lindhout WM, de Brouwer APM, Nillesen WM, PfunDT R, Holder-Espinasse M, Vallée L, Andrieux J, Coppens-Hofman MC, Rensen H, Hamel BCJ, van Bokhoven H, Aschrafi A, Kleefstra T. Chromosome 1p21.3 microdeletions comprising DPYD and MIR137 are associated with intellectual disability. **J Med Genet.** 2011 48:810-818.

Willemsen MH, Vulto-van Silfhout AT, Nillesen WM, Wissink-Lindhout WM, van Bokhoven H, Philip N, Berry-Kravis EM, Kini U, van Ravenswaaij-Arts CM, Delle Chiaie B, Innes AM, Houge G, Kosonen T, Cremer K, Fannemel M, Stray-Pedersen A, Reardon W, Ignatius J, Lachlan K, Mircher C, Helderma van den Enden PT, Mastebroek M, Cohn-Hokke PE, Yntema HG, Drunat S, Kleefstra T. Update on Kleefstra Syndrome. **Mol Syndromol.** 2012 Apr;2(3-5):202-212.

Williams SR, Aldred MA, Der Kaloustian VM, Halal F, Gowans G, McLeod DR, Zondag S, Toriello HV, Magenis RE, Elsea SH. Haploinsufficiency of HDAC4

causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. **Am J Hum Genet.** 2010 Aug 13;87(2):219-28.

Wright C, Turner JA, Calhoun VD, Perrone-Bizzozero N. Potential Impact of miR-137 and Its Targets in Schizophrenia. **Front Genet.** 2013 Apr 26;4:58.

Yamamoto T, Togawa M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Okamoto N. Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4. **Am J Med Genet A.** 2014 Mar;164(3):634-8.

Zhang Y, Smith EM, Baye TM, Eckert JV, Abraham LJ, Moses EK, Kissebah AH, Martin LJ, Olivier M. Serotonin (5-HT) receptor 5A sequence variants affect human plasma triglyceride levels. **Physiol Genomics.** 2010 Jul 7;42(2):168-76.