Ilana Kohl

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.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Biologia/Genética.

São Paulo

2010

Ilana Kohl

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.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Célia P. Koiffmann

São Paulo

2010

Kohl, Ilana
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.
162 pg

Tese de Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia.

1- Obesidade e/ou Hiperfagia
2- Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
3- Distúrbios de comportamento
4- MLPA
5- SNP-Array

Comissão Julgadora

_____ _____

_____ _____

_____
Profa. Dra. Célia P. Koiffmann
Orientadora

AGRADECIMENTOS

À Dra. Célia P. Koiffmann, minha orientadora, pelo estímulo, apoio, pela confiança em mim depositada e por todos os ensinamentos;

A toda equipe da Unidade de Genética do Instituto da Criança-HC, em especial, à Dra. Chong Ae Kim que acompanha de perto o trabalho do laboratório a muitos anos;

Às Dras. Ângela Maria Vianna Morgante, Carla Rosenberg e Maria Rita dos Santos e Passos Bueno, que participaram da minha qualificação, pelas sugestões;

Aos pais e familiares dos pacientes, pela confiança no nosso trabalho e pelas lições de vida no convívio durante as consultas;

À CAPES, pelo auxílio financeiro (Bolsa de Doutorado), sem o qual este trabalho não teria sido realizado;

Às amigas do U.A.G, Cláudia, Carla, Cris, Mônica, Claudia F, Mariana, Estela, Mari-Mini, Mauren, Rose e Luceleni que sempre me ajudaram. Agradeço a Clau, por todo apoio e incentivo, pela paciência e principalmente pela amizade. À Carla, por estar sempre ao meu lado, desde o começo de nossa vida científica, nos momentos de alegrias e também nos de insegurança e angustia. À Cristiane, pelo companheirismo, pelos conselhos e amizade. À Mo e Rose, por terem me ajudado sempre que preciso. À Estela pelas conversas e pela confiança. À Clau 2 e Mari, pelas risadas e amizade. A todas vocês, que acompanharam de perto esse trabalho e me apoiaram sempre;

À Fernanda Jehee, por ter me ensinado a técnica de SNP-Array, pelas conversas e conselhos.

À equipe de funcionários do Genoma por toda ajuda.

Aos amigos do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Dra. Anita Wajtal, Dra. Cristina Miyaki, Nádia, Luciana, Monize, Inês, Toninha, Naila, Simone, Vanessa, Larissa, Adriana, Elenice, Cicero e Deisy, pela convivência diária, amizade, sugestões ou empréstimo de material;

Aos meus amigos especiais, Lu, Allon, Karen, Gy, Michele, David, Thais, Arthur, Du, Ro, Natan, Keren, Michelle, Dib, Rick, Carol, Ra, Jairo, Cala, Simone, Laila, Sylvia, Juliana, Renata, Etiene, Larissa e Alice pelas conversas, risadas, encontros, viagens, jantares e pela felicidade de tê-los ao meu lado.

Aos meus familiares, minha avó, tios e primos por sempre torcerem pelo meu sucesso;

E, principalmente aos meus pais, por acreditarem em mim e pela dedicação para que eu chegasse até aqui. A minha mãe agradeço por ter agüentado sozinha meu mau-humor e a meu pai, por sempre acreditar que eu sou o futuro da ciência.

ÍNDICE

I – Introdução..... 1
I.1 – Conceito..... 2
I.2 - Obesidade não sindrômica..... 4
I.2.1 - Obesidade Monogênica..... 4
I.2.1.1 - Deficiencia de Leptina ou do Receptor de Leptina..... 6
I.2.1.2 - Deficiência de pro-opiomelanocortina..... 7
I.2.1.3 - Deficiência do receptor 4 de melanocortina humana..... 9
I.3 - Obesidade Sindrômica..... 10
I.3.1 - Síndrome de Prader-Willi..... 12
I.3.2 - Diagnósticos Diferenciais da Síndrome de Prader-Willi..... 13
I.3.2.1 - Síndrome de deleção terminal 1p36..... 14
I.3.2.2 - Haploinsuficiência de *SIM1* e deleção da região cromossômica 6q16.2..... 16
I.3.2.3 - Deleção terminal 9q34..... 17
I.3.3 - Síndrome de Bardet-Biedl..... 17
I.3.4 - Síndrome de Cohen..... 19
I.3.5 - Síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann..... 20
I.3.6 - Síndrome de Wilson-Turner..... 22
I.3.7 - Síndrome de Ahmad..... 22
I.3.8 - Segmento cromossômico Xq28 e o gene *MECP2*..... 23
II – Objetivos..... 29
III – Casuística e Métodos..... 31
III.1 – Casuística..... 32
III.2 – Métodos..... 33
III.2.1 – Estudos Moleculares..... 33
III.2.1.1 – Extração de DNA a partir de células sanguíneas..... 33
III.2.1.2 – Estudo do DNA por MLPA ("multiplex ligation-dependent probe amplification")..... 34

III.2.1.3 – Interpretação dos resultados de MLPA..... 36
III.2.1.4 – Técnica de array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" da Affymetrix..... 37
III.2.1.5 – Interpretação dos resultados de array..... 39
III.2.2 – Estudos citogenéticos..... 45
III.2.2.1 – Cultura de linfócitos 45
III.2.2.2 – Análise cromossômica por coloração convencional.... 46
III.2.2.3 – Análise cromossômica por bandamento GTG..... 46
III.2.2.4 – Análise por Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando BACs..... 47
IV – Resultados..... 49
IV.1 – Estudo subtelomérico por *MLPA*..... 50
IV.2 – Estudo de Retardo Mental ligado ao X por *MLPA*..... 55
IV.3 – Estudo do gene *MECP2* por MLPA..... 56
IV.4 – Estudo do segmento cromossômico 3p25 por MLPA..... 56
IV.5 – Estudo por SNP Array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" - Affymetrix..... 57
IV.6 – Estudo do segmento cromossômico 6q16 por MLPA..... 65
V – Discussão..... 90
V.1 - Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)..... 92
V.2 - *SNP Array*..... 93
V.3 - Pacientes com síndrome de monossomia 1p36..... 96
V.4 - Paciente OS63..... 96
V.5 - Paciente OS80..... 98
V.6 - Paciente OS18..... 102
V.7 - Paciente OS57..... 103
V.8 - Paciente OS96..... 104
V.9 - Pacientes OS117 e OS118..... 106
V.10 - Paciente OS36..... 108
V.11 - Aconselhamento genético..... 109
VI – Conclusões..... 112

VII – Resumo..... 116
VIII – Abstract..... 119
IX – Anexos..... 122
IX.1 – Parecer de aprovação pelo Comite de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo..... 123
IX.2 – Termo de consentimento livre e esclarecido..... 124
IX.3 - Anamnese Genético-Clínica..... 126
IX.4 - 154 Syndromes with Reported Generalized Obesity - Winter Baraitser Dysmorphology Database..... 134
X – Referências..... 140
X.1 – Referências Eletrônicas..... 141
X.2 – Referências Bibliográficas..... 142

Abreviaturas e siglas utilizadas:

A maioria das siglas foi mantida em inglês pelo fato de estarem consolidadas desta forma na literatura.

AS - síndrome de Angelman

BAC - cromossomos artificiais de bactérias

BBS - síndrome de Bardet-Biedl

BFLS - síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann

DNPM - desenvolvimento neuropsicomotor

DQ - quociente de dosagem

FISH - hibridação *in situ* fluorescente

IMC - índice de massa corporal

MLPA - multiplex ligation-dependent probe amplification

PWS - síndrome de Prader-Willi

RM - retardo mental

UPD - dissomia uniparental

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Conceito

Obesidade é definida como o resultado de um desequilíbrio entre a ingestão de calorias e o gasto de energia (Chung and Leibel, 2005).

A obesidade sempre existiu na população humana, mas até pouco tempo era comparativamente rara. Nunca antes na historia houve tamanha abundância de alimentos processados e tão ricos em energia. Porém, o preço deste progresso esta começando a ser percebido na população com o grande aumento dos índices de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. A última estimativa feita pela Organização Mundial da Saúde em 2006 calculou que 400 milhões de pessoas no mundo estão obesas. Esta transição nutricional combinada com o aumento considerável do estilo de vida sedentário está promovendo um ambiente "obeso", que de acordo com a Organização Mundial da Saúde, é o maior fator de risco para a saúde humana no mundo (Drewnowski and Popkin, 1997).

O índice de massa corporal (IMC) é um método simples e amplamente difundido para se medir a gordura corporal. A medida foi desenvolvida na Bélgica, no século XIX pelo estatístico Adolphe Quételet. O IMC é calculado dividindo-se o peso do indivíduo em quilos pelo quadrado de sua altura em metros. A seguinte convenção de valores, publicada em 2000 pela Organização Mundial de Saúde, estabelece que quem apresenta IMC abaixo de 18,5 está abaixo do peso normal, IMC entre 18,6 e 24,9 é

considerado de peso normal, IMC entre 25 e 29,9 apresenta sobrepeso, IMC entre 30 e 39,9 a pessoa esta obesa e IMC acima de 40 é considerado obesidade mórbida (Cole *et al.*, 2000).

Diferentes causas da obesidade foram apontadas nos últimos 100 anos. No começo do século vinte, assumiu-se que disfunções do hipotálamo levavam a obesidade (Frohlich, 1901). Dos anos 40 até os anos 70, achava-se que os aspectos psicológicos tinham o papel mais importante na causa da obesidade (Bruch, 1964). No final dos anos 70, a atribuição da causa aos aspectos psicológicos começou a ser discutida e 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, 1990,1994). Uma análise do gasto de energia na infância sugeriu que filhos de mães com sobrepeso têm tendência aumentada de armazenar gordura, quando comparados com filhos de mães com peso "saudável" (Barness *et al.*, 2007).

Mais recentemente, aumentaram as evidências para a hipótese de que a obesidade é um distúrbio neuroendócrino, no qual fatores ambientais e a predisposição genética agem em conjunto (Hebebrand, 2007; Hebebrand *et al.*, 2003, Hebebrand *et al.*, 2009). O *Human Obesity Gene Map* é um catalogo que lista todos os marcadores, genes e mutações associados com o fenótipo obesidade e é revisado e atualizado regularmente. A última atualização, publicada em 2006 apresentou 127 genes candidatos, resultado de 426 associações positivas com o fenótipo obesidade. Dentre estes genes, 23 são ressaltados por terem pelo menos

cinco estudos positivos cada (Tabela 1, pág 5). Estudos de associação de grande escala por todo genoma demonstraram que a predisposição genética, em muitos casos, é decorrente do efeito da combinação de variantes poligênicas (Hinney *et al.*., 2010).

I.2 - Obesidade não sindrômica

I.2.1 - Obesidade Monogênica

A importância destes fatores é também ilustrada pela identificação de formas monogênicas de obesidade, caracterizadas pela presença de obesidade prematura grave como principal característica (O'Rahilly *et al.*, 2003). Há uma forte hipótese de que alguns genes tenham papel fundamental na regulação do funcionamento da célula de gordura (Dahlman and Arner, 2007).

Estudos com famílias, principalmente as consangüíneas, com indivíduos extremamente obesos, na maioria dos casos com alguma característica adicional, como hiperinsulinismo ou infertilidade, tiveram muito sucesso na detecção de mutações em genes humanos; essas estão descritas na Tabela 2 (pág 11). Estes trabalhos foram fundamentais para a elucidação da via da leptina-melanocortina (Farooqi *et al.*, 2005; Farooqi *et al.*, 2008).

Tabela 1: Lista de 23 associações positivas de genes com obesidade ou fenótipos relacionados à obesidade.

Símbolo do gene	Nome completo	Localização	Num. de estudos
ACE	Enzima conversora da angiotensina 1 (peptidyl-dipeptidase A)	17q24.1	6
ADIPOQ	Adiponectina, CIQ e domínio de colágeno	3q27	11
ADRB2	Receptor de superfície adrenergico beta-2	5q31-q32	20
ADRB3	Receptor Adrenergico beta-3	8p12-p11.2	29
DRD2	Receptor de dopamina D2	11q23.2	5
FTO	Fatso (massa de gordura e obesidade associadas)	16q12.2	6
GNB3	Peptídeo beta 3 da proteína de ligação de nucleotídeos Guanina (proteína G)	2p13.31	14
HTR2C	Receptor 2C de 5-hidroxitriptamina (serotonina)	Xq24	10
IL6	Interleucina-6 (interferon, beta 2)	7p21	6
INS	Insulina	11p15.5	7
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade (hipercolesterolemia familiar)	19p13.2	5
LEP	Leptina	7q31.3	10
LEPR	Receptor de Leptina	1p31	16
LIPE	Lipase, hormonio-sensitiva	19q13.2	5
MC4R	Receptor 4 de Melanocortina	18q22	8
NR3C1	Receptor Nuclear 1 da subfamília 3, grupo C (receptor glicocorticóide)	5q31	10
PLIN	Perlipina	15q26	5
PPARG	Receptor gama ativado de peroxisoma ploriferativa	3p25	30
RETN	Resistina	19p13.2	5
TNF	Fator de necrose tumoral (membro 2 da superfamília TNF)	6p21.3	9
UCP1	Proteína desacopladora 1 (mitocondrial, transportador de prótons)	4q28-q31	10
UCP2	Proteína desacopladora 2 (mitocondrial, transportador de prótons)	11q13.3	11
UCP3	Proteína desacopladora 3 (mitocondrial, transportador de prótons)	22q13	12

Adaptada de Walley *et al.* (2006) e http://obesitygene.pbrc.edu/

I.2.1.1 - Deficiencia de Leptina ou do Receptor de Leptina

A leptina é um hormônio de saciedade, secretado pelo tecido adiposo na corrente sangüínea, que sinaliza no hipotálamo a quantidade de gordura depositada. Níveis aumentados de leptina são registrados pelo receptor de leptina. O sinal é então encaminhado para o receptor 4 de melanocortina (*MC4R*). O hormônio produzido pelo gene pro-opiomelanocortina (*POMC*) induz o efeito de saciedade via *MC4R*. Os estudos mostraram que mutações em qualquer um dos genes desse sistema podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade (Farooqi *et al.*, 2008). Esta via interage com outros centros cerebrais para coordenar o apetite e modular sinais para a periferia, regulando o metabolismo e o gasto energético. Níveis reduzidos de leptina enviam um sinal de privação nutricional, iniciando uma resposta adaptativa para conservar energia, manifestada pelo aumento de ingestão de alimentos, diminuição do gasto de energia e distúrbios endócrinos (Flier, 1998).

Dentre os pacientes com obesidade prematura grave e hiperfagia de famílias consangüíneas, a prevalência de mutações em *LEP* é de 1% e em *LEPR* 2%-3%. Em 1997, Montague *et al.*, relataram dois primos gravemente obesos, de uma família consangüínea de origem paquistanesa, que eram homozigotos para uma mutação no gene *LEP*, que resultava em uma proteína truncada, que não era secretada. A primeira mutação no gene *LEPR* foi relatada em 1998, em três adultos de uma família consangüínea de origem Algeriana, resultando em um receptor de leptina

mutante com falta de domínios intracelulares e de transmembrana, o que resultava em níveis muito elevados de leptina (Clement *et al.*, 1998).

Os fenótipos associados à deficiência de leptina ou de receptor de leptina são similares. Os portadores apresentam peso normal ao nascimento, porém nos primeiros meses de vida ocorre um rápido ganho de peso, levando à obesidade grave. A porcentagem de gordura corpórea é de aproximadamente 58% para portadores de mutação em *LEP* e 52% para a mutação em *LEPR*, enquanto que o normal é entre 15% e 25%. Todos os portadores apresentam níveis de insulina desregulados e alguns desenvolvem diabetes tipo 2 na terceira ou quarta década de vida (Farooqui *et al.*, 2007).

Apesar da deficiência de leptina ser rara, a doença é inteiramente tratável com injeções subcutâneas diárias de leptina humana recombinante, com efeitos benéficos contra a hiperfagia e o acumulo de gordura corporal (Licinio *et al.*, 2004).

I.2.1.2 - Deficiência de pro-opiomelanocortina

O gene codificante de pro-opiomelanocortina, *POMC*, foi um dos primeiros genes do genoma humano a ser clonado há mais de vinte anos atrás (Takeuchi *et al.*, 1999). Por muito tempo se soube que neurônios do hipotálamo estavam envolvidos na regulação do peso corpóreo, a partir da observação que tumores nesta região, assim como lesões em modelos animais, resultavam em obesidade (Elmquist *et al.*, 1999). Observou-se então que a expressão do gene *POMC* aumentava nestes neurônios,

quando se administrava a leptina (Fan *et al.*, 1997). Ao mesmo tempo, o papel principal do receptor 4 de melanocortina, relacionado com a manutenção do peso corpóreo, foi descoberto (Huszar *et al.*, 1997). Baseado nesses conhecimentos e de vários estudos realizados em varias espécies, foi descrita a via que liga a leptina, o receptor de leptina, a pro-opiomelanocortina e finalmente o estimulo do receptor 4 de melanocortina.

Os portadores da deficiência de pro-opiomelanocortina apresentam insuficiência adrenal causando deficiência de corticotropina, levando ao hipocortisolismo. Os primeiros estudos procurando mutações no gene *POMC* foram realizados devido à insuficiência adrenal , que pode ser letal devida a hipoglicemia, ocorrendo principalmente em infecções graves ou falha hepática, durante a vida neonatal. A administração de hidrocortisona via oral reverte os sintomas, portanto pacientes com deficiência de corticotropina podem viver normalmente (Nussey *et al.*, 1993). Ao observarem modelos animais com obesidade nos estudos da via leptina-melanocortina, da qual a pro-opiomelanocortina faz parte, começou-se a procurar mutações em *POMC* em um grupo de crianças que apresentavam obesidade, hipocortisolismo e hipopigmentação na pele e nos cabelos. Foram encontradas mutações que inativam o gene *POMC* em seis crianças de famílias diferentes com estas características (Krude *et al.*, 1998, 2003; Farooqui *et al.*, 2006). Estas crianças são homozigotas ou heterozigotas compostas para as mutações, o que leva a perda total de funcionamento do gene *POMC*. Os genitores são heterozigotos, com níveis

normais de cortisol, evidenciando o padrão de herança recessivo destas mutações.

I.2.1.3 - Deficiência do receptor 4 de melanocortina humana

Os receptores 3 e 4 de melanocortina são altamente expressos no sistema nervoso central e tem um papel importante no controle de ingestão de alimentos e equilíbrio energético. Em 1998, mutações heterozigotas em *MC4R* foram identificadas em humanos, as quais foram associadas à obesidade de herança dominante (Vaisse *et al.*,1998; Yeo *et al.*, 1998). Desde então, mutações heterozigotas em *MC4R* encontradas em pessoas obesas de todas as etnias têm sido relatadas e representam a causa conhecida mais comum de obesidade monogênica em humanos (Alharbi *et al.*, 2007).

Enquanto a maioria dos estudos encontrou uma penetrância de 100% em portadores heterozigotos com obesidade prematura, outros descreveram portadores da mutação que não eram obesos. Outros estudos realizados em varias famílias com indivíduos homozigotos para a mutação em *MC4R* relataram que os indivíduos homozigotos eram mais obesos que os heterozigotos e coincidentemente nessas famílias havia indivíduos portadores heterozigotos da mutação que não eram obesos. Levando em conta todas estas observações, codominância com variação de expressividade e penetrância, seria o modo de herança mais apropriado para a deficiência do receptor 4 de melanocortina (Farooqui *et al.*, 2003).

Além do aumento de gordura corporal, os portadores desta deficiência também apresentam aumento da massa magra, o que não é observado nas outras formas monogênicas de obesidade. As crianças portadoras apresentam crescimento linear aumentado, assim como hiperinsulinemia precoce (Farooqui *et al.*, 2000). A deficiência do receptor 4 de melanocortina também causa pressão arterial baixa (Ni *et al.*, 2006). Os portadores da deficiência apresentam hiperfagia, mas não tão grave como a observada na deficiência de leptina. Uma característica notável desta deficiência é que alguns sinais fenotípicos são amenizados com o tempo. Adultos portadores relatam sentir menos fome e são menos hiperinsulinêmicos (Farooqui *et al.*, 2003).

Apesar de se crer que as formas comuns de obesidade são causadas pela interação do meio ambiente com um pequeno número de genes, cada um com um impacto limitado, estes modelos de obesidade citados acima têm sido cruciais para a determinação dos mecanismos de regulação do equilíbrio de energia.

I.3 - Obesidade Sindrômica

Outro grupo de casos de obesidade pode ser distinguido pela presença de várias anormalidades associadas, as quais incluem o retardo mental (RM) na maioria dos casos. Obesidade sindrômica é definida como a obesidade ocorrendo em conjunto com várias características clínicas distintas. Mais de vinte e cinco formas sindrômicas de obesidade já foram

Tabela 2: Genes de obesidade monogênica.

Número OMIM	Gene	Localização
600456	*NTRK2*	9q22.1
601751	*GPR24*	22q13.3
162150	*PCSKI*	5q15-q21
176830	*POMC*	2p23.3
164160	*LEP*	7q31.3
602034	*CRHR2*	7614.3
155541	*MC4R*	18q22
122561	*CRHRI*	17q12-q22
601007	*LEPR*	1p31
603128	*SIMI*	6q16.3-q21
601665	*MC3R*	20q13.2-q13.3

Adaptada de http://obesitygene.pbrc.edu/

identificadas (Chung and Leibel, 2005). Para os clínicos, o diagnóstico destas síndromes é um desafio devido a sobreposição de seus fenótipos, enquanto que para os pesquisadores estas síndromes são uma potencial fonte de esclarecimento das causas das formas comuns de obesidade (Delrue and Michaud, 2004).

Algumas das formas de obesidade sindrômica, nas quais a base genética já foi parcial ou completamente elucidada, estão nas tabelas 3, 4 e 5 e descritas a seguir.

I.3.1 - Síndrome de Prader-Willi

A síndrome de Prader-Willi (PWS) é a forma sindrômica mais comum de obesidade, com incidência estimada entre 1:15.000 e 1:20.000 nascimentos.

A PWS é caracterizada por hipotonia neonatal com dificuldade de sucção, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), hiperfagia, obesidade, baixa estatura na adolescência, mãos e pés pequenos, hipogonadismo, dificuldade no aprendizado e comportamento obsessivo-compulsivo (Prader *et al.*, 1956; Holm *et al.*, 1993).

PWS e a síndrome de Angelman (AS) foram os primeiros exemplos de doenças relacionadas ao *imprinting* genômico no Homem: enquanto que a PWS é uma síndrome de genes contíguos e resulta da ausência de expressão de genes ativos no cromossomo paterno, a AS resulta da ausência de expressão de um gene, *UBE3A*, que apresenta expressão

exclusivamente materna no cérebro, atuando particularmente nas células de Purkinje, neurônios do hipocampo e células mitrais do bulbo olfatório (Albretch *et al.*, 1997).

Existem três classes de alterações moleculares que podem originar PWS: aproximadamente 70% dos casos apresentam deleção paterna do segmento 15q11-q13, 20-25% são provenientes de dissomia uniparental do cromossomo 15 (UPD) materna e por volta de 5% apresentam defeito no centro de *imprinting* (IC) do cromossomo 15 paterno.

Comparações entre o fenótipo de pacientes com PWS por deleção e por UPD mostraram que a hipopigmentação é mais freqüente entre os pacientes com deleção, enquanto que o aumento da idade materna e o menor comprimento ao nascimento são mais freqüentes em pacientes com UPD (Cassidy *et al.*, 1997, Gunay-Aygun *et al.*, 1997; Fridman *et al.*, 2000; Varela *et al.*, 2005). Além disso, Boer *et al.* (2002) observaram que pacientes PWS por UPD eram mais susceptíveis a distúrbios psicóticos e Webb *et al.* (2002) relataram maior freqüência no alto limiar para dor e nos distúrbios de sono entre pacientes com UPD, enquanto que menor capacidade de regulação da temperatura corpórea e habilidade em montar quebra-cabeças eram mais freqüentes entre os indivíduos com deleção.

I.3.2 - Diagnósticos Diferenciais da Síndrome de Prader-Willi

Para fazer o diagnóstico diferencial da PWS é necessário considerar as diferentes fases da doença. Na primeira fase, a PWS pode ser

confundida com uma série de afecções que causam a hipotonia neonatal, particularmente os distúrbios neuromusculares, tais como as miopatias congênitas, a atrofia muscular espinal, miastenia neonatal, distrofia muscular congênita grave, síndrome de Charcot-Marie-Tooth e síndrome de Zellweger. Posteriormente, na infância e idade adulta, um número de afecções nas quais retardo mental e do desenvolvimento estão associados com obesidade são incluídas no diagnóstico diferencial. Doenças acompanhadas de RM nas quais a obesidade é ocasional, como por exemplo, a síndrome do X-frágil, podem ser confundidas com a PWS. Nos últimos anos, a ocorrência de deleções nas regiões cromossômicas 6q16.2 (Gilhuis *et al.*, 2000; Faivre *et al.*, 2002; Varela., 2006), 9q34 (Cormier-Daire *et al.*, 2003) e 1p36 (D'angelo *et al.,* 2006) que caracterizam síndromes, têm se revelado importantes no diagnóstico diferencial da PWS.

I.3.2.1 - Síndrome de deleção terminal 1p36

As deleções cromossômicas distais 1p36 são resultantes de deleções terminais e intersticiais, que apresentam variações no tamanho genômico perdido e diferentes pontos de quebra (Wu *et al.*, 1999) e a gravidade do fenótipo está associada com a extensão das deleções (Shapira *et al.*, 1997). A sua prevalência está estimada em 1 para 5000 recém nascidos, tornando-a a deleção terminal mais comum (Shaffer *et al.*, 2001).

Esta deleção está associada a hipotonia e atraso do DNPM, anomalias do crescimento (atraso, microcefalia e obesidade), dismorfismos craniofaciais e malformações congênitas (malformações cardíacas menores, cardiomiopatia e dilatação do ventrículo cerebral) (Slavotinek *et al.*, 1999).

A similaridade fenotípica entre pacientes com deleções 1p36 e pacientes com a síndrome de Prader-Willi foi pela primeira vez mencionada por Wargowski *et al.*, 1991 e em seguida por Keppler-Noreuil *et al.*, (1995), que descreveram pacientes com a deleção 1p terminal que apresentavam problemas de alimentação na infância com pouco ganho de peso, mas que subseqüentemente desenvolveram obesidade e/ou macrossomia, semelhante aos pacientes com PWS. Outros autores também descreveram pacientes com a deleção 1p36 e um fenótipo semelhante ao da síndrome de Prader-Willi (Shapira *et al.*, 1997; Rio *et al.*, 2002, D´Angelo *et al.*, 2006), bem como um caso de mosaicismo para esta deleção com quadro clínico da PWS (Eugster *et al.*, 1997). Em um estudo realizado com pacientes com a deleção 1p36 e fenótipo Prader-Willi-*like*, D´Angelo *et al.* (2010) sugeriram uma região em 1p36 para obesidade e hiperfagia, compreendida entre 2.0-3.0 Mb do telômero de 1p, onde estão localizados os genes *PRKCZ,* que está envolvido com a via sinalizadora de insulina, e, o gene *PLCH2,* que tem função nos processos metabólicos de lipídios.

I.3.2.2 - Haploinsuficiência de *SIM1* e deleção da região cromossômica 6q16.2

Oito pacientes com fenótipo semelhante ao da síndrome de Prader-Willi foram descritos apresentando deleções intersticiais no braço longo do cromossomo 6 (Turleau *et al.*, 1988; Stein *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1995; Gilhuis *et al.*, 2000; Faivre *et al.*, 2002; Varela *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Esses pacientes apresentaram basicamente hipotonia (7/8), problemas de alimentação na infância (4/6), obesidade (7/8), atraso grave do DNPM (8/8), hiperfagia (4/6) e distúrbios de comportamento (3/6). Todos apresentaram alguma malformação craniofacial e problemas oftalmológicos, baixa implantação das orelhas (5/8) e poucos apresentaram problemas cardíacos (2/8).

A região cromossômica 6q16.2 contém o gene *SIM1* que codifica o fator de transcrição bHLH-PAS. Várias observações sugerem que a haploinsuficiência de *SIM1* contribui na obesidade presente em crianças que apresentaram deleção intersticial em 6q16.2. Inclusive, uma criança com uma translocação equilibrada que interrompeu o gene *SIM1* apresentou obesidade grave associada a alta estatura (Holder *et al.*, 2000). Avaliações metabólicas não revelaram diminuição no gasto de energia, porém, ela apresentava hiperfagia. Verificou-se também que *SIM1* é expresso em uma região discreta do hipotálamo que está envolvida com controle do consumo de alimentos (Micheud *et al.*, 2001).

I.3.2.3 - Deleção terminal 9q34

Cormier-Daire *et al.* (2003) descreveram dois pacientes com deleção terminal de 9q34 portadores de atraso do DNPM, RM, obesidade, braquicefalia, prognatismo, criptorquidia, distúrbios de sono e de comportamento. A partir da descrição destes casos, essa deleção passou a ser considerada como hipótese diagnóstica para casos de obesidade e RM sem causa esclarecida. Pelo menos 20 genes estão localizados na região deletada. Dos outros treze pacientes descritos com deleção terminal de 9q34, apenas dois apresentaram obesidade, apesar de que três deles morreram recém-nascidos devido a problemas cardíacos congênitos (Goldstone and Beales, 2008).

I.3.3 - Síndrome de Bardet-Biedl

A síndrome de Bardet-Biedl (BBS) tem incidência estimada em 1:100.000 nascimentos, caracterizada por obesidade acompanhada por várias complicações metabólicas, RM, atraso do DNPM, hipogenitalismo, distrofia retiniana, polidactilia, problemas renais, fibrose hepática, diabetes e hipertensão (Barness *et al.*, 2007).

BBS é uma síndrome geneticamente heterogênea, causada por mutações em pelo menos doze *loci* genéticos já mapeados até o momento: *BBS1* em 11q13 (Mykytyn *et al.*, 2002), *BBS2* em 16q21 (Nishimura *et al.*, 2001), *BBS3* em 3q11 (Fan *et al.*, 2004), *BBS4* em 15q22 (Mykytyn *et al.*,

2001), *BBS5* em 2q31 (Li *et al.*, 2004), *BBS6* em 20p12 (Katsanis *et al.*, 2000), *BBS7* em 4q27 (Badano *et al.*, 2003a), *BBS8* em 14q32 (Ansley *et al.*, 2003), *BBS9* em 7p14 (Nishimura *et al.*, 2005), *BBS10* em 12q21 (Stoetzel *et al.*, 2006), *BBS11* em 9q31 (Chiang *et al.*, 2006) e *BBS12* em 4q27 (Stoetzel *et al.*, 2007), o que ocasiona uma grande variabilidade clínica, dificultando a correlação genótipo-fenótipo. Algumas observações foram documentadas, como por exemplo, os portadores de *BBS1* são mais altos que seus pais comparados aos portadores de *BBS2* e *BBS4* (Farooqi e O'Rahilly, 2005). Provavelmente mais genes serão identificados, pois apenas 70% dos portadores da síndrome de Bardet-Biedl apresentam mutações nos genes já descritos.

A BBS sempre foi considerada uma doença de herança autossômica recessiva, porém um estudo realizado em 2001, por Katsanis *et al.*, mostrou que ela também pode ser herdada de uma forma mais complexa, a herança trialélica. O estudo investigou os genes *BBS2* e *BBS6* em 163 famílias, e em quatro delas foram encontrados portadores que apresentavam três mutações, duas em um gene *BBS*, conforme o esperado, e mais uma mutação em outro gene BBS. Mutações nos genes relacionados a BBS são muito raras na população, e a terceira mutação não foi considerada condicional para o aparecimento da síndrome, porém pode ser necessária para a manifestação da doença em alguns casos, como em uma das famílias, onde dois filhos do casal apresentaram as duas mutações no gene *BBS2*, o que era o esperado. Porém, um dos filhos não manifestava a doença, até que se descobriu que o filho afetado tinha

uma terceira mutação em outro gene, o *BBS6,* que o irmão não apresentava. O trialelismo é relativamente raro, ocorrendo em talvez 10% dos casos. Depois da descoberta deste tipo de herança em 2001 muitos outros estudos foram realizados, e foram encontrados vários outros casos. Em 2003(b), Badano *et al.*, encontraram uma família com duas filhas afetadas que apresentavam as duas mutações em *BBS1*, como esperado e uma delas também apresentava uma terceira mutação em *BBS6* e todas as características eram mais graves nesta paciente do que em sua irmã, o que sugeriu que a terceira mutação possa estar interferindo na gravidade do fenótipo.

I.3.4 - Síndrome de Cohen

A síndrome de Cohen é uma doença de herança autossômica recessiva, que foi descrita em 1973 quando Cohen *et al.*, relataram três pacientes com problemas graves de aprendizado, dismorfismos faciais, obesidade, hipotonia, microcefalia, hiperextensibilidade nas juntas e problemas oftalmológicos. Desde então, mais de 200 casos da síndrome de Cohen foram relatados, inclusive um grupo grande de pacientes, com características clínicas iguais aos pacientes originais, na Finlândia, onde a síndrome é muito representada (Norio, 2003).

O gene causador da síndrome de Cohen, chamado de *COH1*, foi descoberto por estudos de ligação feitos em 4 famílias finlandesas e está localizado no segmento cromossômico 8q22 (Tahvanainen *et al.*, 1994).

Desde a descoberta do gene, vários estudos envolvendo pacientes de diversas populações foram publicados (Hennies *et al.*l, 2004; Kolehmainen *et al.*, 2004; Mochida *et al.*, 2004; Falk *et al.*, 2004). Estes estudos demonstraram uma grande variabilidade fenotípica em pacientes com diferentes mutações em *COH1*, o que não ocorre na população finlandesa portadora da síndrome de Cohen que é geneticamente homogênea. Já foram descritas mais de 70 mutações em *COH1* associadas a síndrome de Cohen, o que explica a variabilidade fenotípica encontrada na síndrome (Seifert *et al.*, 2006).

Um grupo de características clínicas essenciais para o diagnóstico da síndrome de Cohen, foi proposto por Kivitie-Kallio e Norio, em 2001, após o estudo detalhado de 29 pacientes finlandeses, sendo elas: atraso de DNPM, distrofia retiniana e miopia, obesidade, RM, características faciais típicas, microcefalia, hipotonia, mãos estreitas e alongadas, problemas cardíacos e neutropenia. A síndrome de Cohen é considerada um dos diagnósticos diferencias da síndrome de Bardet-Biedl, devido a características clínicas em comum como distrofia retiniana e obesidade (Beales *et al.*, 1999).

I.3.5 - Síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann

A síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann (BFLS) foi descrita em 1962, em três homens de uma mesma família, que apresentavam retardo mental grave, obesidade, hipogenitalismo, baixa estatura, inchaço dos tecidos subcutâneos da face, fissura palpebral estreita e orelhas grandes

(Borjeson *et al.*, 1962). Uma revisão clínica realizada com 25 homens com BFLS, de nove famílias não relacionadas, mostrou que as características clínicas raramente são tão graves quanto as documentadas na família original e que o fenótipo evolui com a idade. As características clínicas essenciais para o diagnóstico de BFLS são: hipotonia, RM, obesidade com ginecomastia, hipogenitalismo, fáceis característico com fissura palpebral estreita e orelhas grandes (Turner *et al.*, 2004).

Quando originalmente descrita em 1962, a causa genética da BLFS era suspeita de ser ligada ao X, devido ao padrão de herança da doença. Este modo de herança foi confirmado em 1989 quando a região critica da doença foi mapeada em uma grande região do braço longo do cromossomo X (Mathews *et al.*, 1989; Turner *et al.*, 1989). Em 1996 esta localização foi reduzida a uma região de 25 Mb em Xq26-27 (Gedeon *et al.*, 1996), e então ainda mais reduzida a aproximadamente 9 Mb em 2002, contendo 62 genes já identificados, entre eles o *PHF6*, no qual mutações causadoras da doença foram identificadas, inicialmente em sete famílias e dois casos esporádicos de BFLS (Lower *et al.*, 2002). Um total de treze casos familiais e seis esporádicos de BLFS, contendo mutações em *PHF6*, foram relatados até o momento (Lower *et al.*, 2002; Lower *et al.*, 2004; Baumstark *et al.*, 2003; Vallee *et al.*, 2004; Just ando Mucke, 2005).

Por ser uma síndrome ligada ao cromossomo X, a família pode querer saber se outras mulheres, assim como as mães dos meninos afetados, são portadoras de mutações em *PHF6.* Um desvio de inativação do cromossomo X em mulheres de famílias de portadores de BLFS é

considerado sinal de mutação em *PHF6.* Mulheres heterozigotas podem mostrar um fenótipo mais suave e características clínicas variáveis, como retardo mental moderado, obesidade e fáceis característico com orelhas grandes, porém muitas mulheres portadoras não são afetadas (Crawford *et al.*, 2006).

I.3.6 - Síndrome de Wilson-Turner

A síndrome de Wilson-Turner foi descrita por Wilson et al., em 1991, que descreveram uma família com quatorze homens afetados por RM, obesidade, ginecomastia, dificuldades de fala, dedos afilados e pés pequenos. Muitas características são compatíveis com as da síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann, porém nenhum dos pacientes desenvolveu hipermetropia ou catarata na idade adulta e nem apresentavam lóbulo da orelha grande.

Estudos de ligação apontaram o segmento cromossômico Xp21-Xq22 como região crítica responsável pela síndrome de Wilson-Turner (Frezal, 1992).

I.3.7 - Síndrome de Ahmad

Ahmad *et al.* (1999) descreveram uma família com 10 homens afetados que apresentavam RM, obesidade, hipogonadismo, micropênis, ausência de pêlos no corpo, deficiência na fala e força física diminuída.

Estudos de ligação mostraram que o gene responsável por esse quadro está localizado no segmento cromossômico Xp11.3 – Xq23. Esta região se sobrepõe à região crítica da síndrome de Wilson-Turner, localizada em Xp21-Xq22 (Gedeon *et al.*, 1996). Apesar de os pacientes descritos com a síndrome de Ahmad não apresentarem ginecomastia, como os portadores da síndrome de Wilson-Turner, a possibilidade de que um mesmo gene esteja envolvido em ambas as síndromes não pode ser descartada.

I.3.8 - Segmento cromossômico Xq28 e o gene *MECP2*

Van Esch *et al.* (2005) identificaram, por estudo de array-CGH (*Array Comparative Genomic Hybridization*), uma pequena duplicação em Xq28 em uma grande família com retardo mental grave, em seguida realizaram um estudo em dezessete pacientes com RM e fenótipo semelhante e outras três duplicações foram encontradas. O tamanho das duplicações dos quatro pacientes varia de 0,4 a 0,8 Mb e engloba vários genes, inclusive o gene *MECP2* e o gene relacionado com retardo mental *L1CAM*. O tamanho e local exato da duplicação era diferente em cada um dos quatro pacientes. Uma comparação das características clínicas destes pacientes, com outro paciente anteriormente relatado, sugere que o aumento da dosagem de *MECP2* resulta em RM. Vários estudos (Lugtenberg *et al.,* 2009; Sanlaville *et al.,* 2009) demonstraram que duplicações em *MECP2* ocorrem com freqüência em pacientes do sexo

masculino com retardo mental grave o que justifica em estudo detalhado do gene *MECP2* neste grupo de pacientes.

Kleefstra *et al.* (2002) descreveram um paciente com RM, obesidade e ginecomastia que apresentou uma deleção "de novo" de dois pares de base no gene *MECP2*, que está localizado no segmento cromossômico Xq28. Como algumas destas características são sugestivas da síndrome de Prader-Willi, foi sugerido um estudo de mutações em *MECP2* a fim de detectar alguma mutação em pacientes com características de PWS, mas que não apresentam anomalias no segmento cromossômico 15q11-13.

Tabela 3: Algumas síndromes de herança autossômica dominante que contem obesidade como característica clínica.

Número OMIM	Síndrome	Localização	Gene
100800	Acondroplasia	4p16.3	*FGFR3*
103580	Osteodistrofia hereditária de Albrigtht	20q13.2-q13.3	*GNAS*
103581	Osteodistrofia hereditária de Albrigtht 2	15q11-q13.3	*AH02**
105830	Sindrome de Angelman com obesidade	15q11-q12	*ANCR**
605746	Anisomastia	16q13-q21	*ANMA**
600430	Síndrome de braquidactilia e retardo mental	2q37.3	*ATK25*
		2q35-q37	*GPCI*
		2q37.3	*GPR35*
665244	Complexo de Carney com doença primária de adrenocortical nodular pigmentado e síndrome de Cushing (CNC2)	2p16	_
160980	Complexo de Carney com doença primária de adrenocortical nodular pigmentado e síndrome de Cushing (CNC1)	17q24.3	*PRKARIA*
604367	Lipodistrofia parcial familiar, Dunnigan tipo 3	3p25	*PPARG*
151660	Lipodistrofia parcial familiar, Dunnigan tipo 2	1q23.1	*LMNA*
147670	Insulin resistance syndromes	19p13.3-p13.2	*INSR*
139250	Deficiência isolada de hormônio de crescimento	17q22-q24	*GHI*
131100	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 causando doença de Cushing 11q13	11q13	*MENI*
122000	Distrofia polimorfa posterior da córnea (cr 1)	IP34.3	*COL8A2*
		20p11.21	*VSXI*
605020	Distrofia polimorfa posterior da córnea (cr 20)	20p11.21	*VSXI*

Tabela 3: Continuação.

Número OMIM	Síndrome	Localização	Gene
176270	Síndrome de Prader-Willi	15q11.2	*IPW*
		15q11.2	*MKRN3*
		15q11.2	*PWCRI*
		15q12	*SNRPN*
		15q11.2	*MAGEL2*
		15q11.2	*NDN*
		15q11-q12	*GABRG-3*
603128	Síndrome de Prader-Willi like (cr 6q)	6q16.3-q21	*SIMI*
188830	Doença primária de adrenocortical nodular pigmentado	17q24.3	*PRKARIA*
190160	Síndrome de resistência ao hormônio da tireóide	3p24.1	*THRB*
181450	Síndrome ulnar mamária (Schinzel)	12q24.21	*TBX3*
194072	Síndrome WAGR com obesidade	11p13	*WT1*

Adaptada de http://obesitygene.pbrc.edu/

Tabela 4: Algumas síndromes de herança autossômica recessiva que contem obesidade como característica clínica.

Número OMIM	Síndrome	Localização	Gene
203800	Síndrome de Alström	2p13	*ALMS1*
209901	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 1	11q13.1	*BBS1*
209900	Síndrome de Bardet -Biedl tipo 2	16q21	*BBS2*
600151	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 3	3q11.2	*BBS3 (ARL6)*
600374	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 4	15q22.3-23	*BBS4*
603650	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 5	2q31	*BBS5*
209900	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 6	20p12	*MKKS*
607590	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 7	4q27	*BBS7*
608132	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 8	14q32.1	*BBS8 (TTC8)*
607968	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 9	7p14	*PTH-B1 (BBS9)*
60148	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 10	12q21.2	*BBS10*
602290	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 11	9q31-q34.1	*TRIM32*
610683	Síndrome de Bardet-Biedl tipo 12	4q27	*BBS12*
269700	Lipodistrofia congênita de Berardinelli-Seip tipo 1	9q34.3	*AGPAT2*
606158	Lipodistrofia congênita de Berardinelli-Seip tipo 2	11q13	*BSCL2*
212065	Glicoproteína carboidrato-deficiente Tipo 1a	16p.13.2	*PMM2*
201000	Síndrome de Carpenter	6p11	*RAB23*
216550	Síndrome de Cohen	8q22.2	*COH1*
601538	Deficiência de hormônio pituitario combinado	5q35.3	*PROP1*
227810	Síndrome de Fanconi-Bickel	3q26.31	*SLC2A2*
139191	Deficiência isolada de hormônio de crescimento	7p14	*GHRHR*

Adaptada de http://obesitygene.pbrc.edu/

Tabela 5: Algumas síndromes de herança ligada ao cromossomo X que contém obesidade como característica clínica.

Número OMIM	Síndrome	Localização	Gene
301900	Síndrome de Börjeson-Forssmann-Lehmann	Xq26.3	*PHF6*
303110	Coroideremia com surdez	Xq21.2	*CHM*
		Xq21.1	*DFN3*
309550	Síndrome do X frágil com o fenótipo Prader-Willi-like	Xq28	*FMR1*
300148	Síndrome de MEHMO	Xp22.13-p21.1	*MEHMO*
300218	Retardo mental ligado ao X sindrômico tipo 7	Xp11.3-q22.1	*MRXS7*
300458	Retardo mental ligado ao X sindrômico tipo 16	Xq28	*MECP2*
300238	Retardo mental ligado ao X sindrômico tipo 11	Xq26-q27	*MRXS11*
176270	Síndrome de Prader-Willi-like ligada ao X	Xq23-q25	*PWLSX*
312870	Simpson-Golabi-Behmel tipo 1	Xq26.2	*GPC3*
		Xq26.1	*GPC4*
300209	Simpson-Golabi-Behmel tipo 2	Xp22	*SGBS2*
309585	Síndrome de Wilson-Turner	Xq21.2-q22	*WTS*

Adaptada de http://obesitygene.pbrc.edu/

II - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo investigar pacientes com obesidade sindrômica visando à identificação de genes e/ou segmentos cromossômicos envolvidos e para isso estabelecemos as seguintes metas:

- Investigar as regiões subteloméricas de todos os cromossomos em pacientes com obesidade e/ou hiperfagia, RM e/ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e distúrbios de comportamento.
- Investigar as regiões relacionadas com RM ligado ao X em pacientes do sexo masculino com obesidade, retardamento mental e distúrbio de comportamento.
- Investigar por SNP – array pacientes com obesidades sindrômica associada a malformações major e/ou minor. Esse objetivo só foi possível alcançar no transcorrer da pesquisa quando a técnica foi incorporada ao Centro de Estudos do Genoma Humano.
- Correlacionar diferentes mutações e/ou extensão de deleções/duplicações à variabilidade fenotípica observada entre os pacientes.
- Proporcionar o diagnóstico e prognóstico dos pacientes e Aconselhamento Genético aos pais e familiares.

III - CASUÍSTICA E MÉTODOS

III.1 - Casuística

Os pacientes com suspeita de diagnóstico clínico de PWS, AS e obesidade sindrômica são encaminhados ao nosso Serviço pelas Unidades de Endocrinologia (Dr Durval Damiani) e Genética (Dra Chong A. Kim) do Instituto da Criança da FMUSP, pelo Serviço da Neurologia Infantil do Hospital das Clínicas da FMUSP (Dr Fernando Kok) e por médicos neurologistas de outros Estados: Dra Ana Van Der Linden (Recife, PE), Dra Adélia Henriques de Souza (Recife, PE), Dra Fabiana Poerner (Curitiba, PR), Dra Juliana G. Giannetti (Hospital das Clínicas da UFMG, MG), Dra Ana Beatriz Alvarez Perez da UNIFESP-EPM para o diagnóstico molecular.

A nossa casuística é constituída de 141 pacientes, selecionados de maneira retro e/ou prospectiva. Os pré-requisitos estabelecidos para a inclusão de pacientes no presente estudo foram: atraso do DNPM e/ou dificuldade de aprendizado, distúrbios de comportamento, obesidade e/ou hiperfagia.

Para cada paciente foi preenchida uma ficha de anamnese genético-clínica contendo dados gestacionais, familiais e fenotípicos. As características comportamentais fornecidas pelos genitores, assim como as observadas durante a consulta, foram anotadas. No momento da consulta, o (os) responsável (is) legal (is) pelo paciente assinou um termo de consentimento livre e esclarecido autorizando a realização dos exames

moleculares e o armazenamento do DNA. O sangue dos genitores também foi colhido para extração de DNA e quando necessário para a realização do cariótipo. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo no 021/2004)

III.2 - Métodos

III.2.1 - Estudos moleculares

III.2.1.1 - Extração de DNA a partir de células sanguíneas

A extração do DNA de linfócitos foi feita a partir da coleta de 10 ml de sangue total com 1 ml de EDTA 5% (pH=8,0). O sangue foi diluído em 50 ml de 1x *blood lysis buffer* e imerso em gelo por 30 minutos e então centrifugado por 15 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante deste foi descartado. O precipitado foi homogeneizado em 5 ml de 1x *blood lysis buffer* e, em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado homogeneizado em 5 ml de 1x *blood lysis buffer* e centrifugado por 5 minutos a 1800 rpm novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 3 ml de 1x *nucleus lysis buffer.* A mistura foi homogeneizada em vortex e foram acrescentados 150 µl de SDS 20% e 40 µl de proteinase K (20mg/ml) e misturados cuidadosamente com a solução anterior. As soluções foram incubadas durante a noite a 37°C. Passado este período, foi acrescentado 1ml de NaCl 6M saturado e a solução foi centrifugada

por 30 min a 2800 rpm. O precipitado foi descartado, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon e centrifugado novamente por 30 min a 2800 rpm. Mais uma vez o precipitado foi descartado e desta vez o sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e o DNA foi precipitado adicionando 2 volumes de etanol absoluto. O DNA foi retirado com a ajuda de um capilar de vidro e lavado em etanol 70%, e então, dissolvido em 400 µl de TE. Em seguida, a amostra de DNA foi levada a banho Maria a 65°C por 30 min. As amostras foram estocadas a 4°C.

III.2.1.2 - Estudo do DNA por MLPA ("multiplex ligation-dependent probe amplification")

Para realização do projeto utilizamos os seguintes kits: "SALSA P036 HUMAN TELOMERE MLPA KIT", para investigar alterações nas regiões subteloméricas; "SALSA P106 MRX MLPA KIT", para investigar genes de retardo mental ligado ao X nos pacientes do sexo masculino; "SALSA P015 MRX MLPA KIT" para investigar o gene MECP2 em alguns pacientes do sexo masculino; "SALSA P224 PPARG1 MLPA KIT" para investigar o segmento 3p25, onde esta o gene PPARG1 relacionado a obesidade e o kit "SALSA P220 OBESITY MLPA KIT" para investigar o segmento 6q16, onde está o gene *SIM1* , também relacionado a obesidade. Os kits estão descritos nas tabelas 6, 7, 8, 9 e 10.

Todas as reações da MLPA foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research) e, de acordo com as instruções do fabricante como descrito em Schouten *et al.* (2002). O protocolo para MLPA é dividido em

dois dias. No primeiro dia, o DNA é quantificado e diluído para 50ng/μl em volume total de 50 ou 25 μl com TE. Após a diluição adiciona-se 5 μl deste DNA em tubo de 0,2 ml. Os tubos são colocados no termociclador no programa MLPA-Den (98°C por 5 minutos, 25°C "for ever"). Enquanto o DNA está na máquina é preparada a solução de anelamento (1,5 μl probe mix, 1,5 μl de Buffer para cada reação). Quando o programa MLPA-Den termina, retira-se o DNA da máquina, adiciona-se 3 μl de solução de anelamento em cada tubo. Os tubos são levados de volta para a máquina no programa MLPA-Ann (95°C por 1 minuto e 60°C "for ever"). Deixa-se overnight (por 16 horas).

No segundo dia, a solução Máster Mix (3 μl de ligase Buffer A, 3μl de ligase Buffer B, 25 μl de água mili-Q e 1μl de ligase para cada reação) é preparada. A ligase só é acrescentada na hora de adicionar a solução aos tubos. Completadas as 16 horas no programa MLPA-Ann liga-se o "instant incubation" à 54°C. Acrescenta-se a ligase ao Máster Mix e com os tubos ainda na máquina adiciona-se 32 μl da solução. Liga-se o programa de PCR MLPA-Lig (54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos, 4° "for ver"). Neste intervalo, é preparada a solução Máster Mix I (4 μl PCR Buffer e 26 μl água mili-Q para cada reação) e acrescenta-se 30 μl desta solução em novos tubos. Também é preparada a solução Máster Mix II (2μl enzyme dilution Buffer, 2 μl Primer, 5,5 μl água mili-Q, 0,5 μl da enzima Taq polimerase para cada reação), a Taq só é adicionada quando acrescentarmos a solução Máster Mix II às reações. Terminado o programa

MLPA-Lig, retira-se os tubos da máquina e adiciona-se 10 μl desta reação nos tubos novos com a solução Máster Mix I. Esses novos tubos são colocados na máquina em "instant incubation" à 60°C. Acrescenta-se a enzima Taq à solução Máster Mix II e adiciona-se 10 μl desta solução às reações que estão na máquina. Liga-se o programa MLPA-PCR (95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto – 32 ciclos – 4°C "for ever"). Depois de completado, retiram-se os tubos da máquina e dilue-se 1μl de cada reação com 0,25 μl de "Size Standart" e 7 μl de "louding solution". Essas diluições então são submetidas a eletroforese em um seqüenciador e os resultados armazenados em um banco de dados no computador.

III.2.1.3 - Interpretação dos resultados de MLPA

Os resultados são obtidos por picos de fluorescência analisados a partir do programa Fragment Profiler. Cada pico corresponde ao quociente de dosagem (DQ) de cada sonda amplificada. A interpretação dos picos se dá pela comparação dos tamanhos dos picos dos pacientes com os picos dos indivíduos controles. Se os picos forem do mesmo tamanho entre o paciente e o controle significa DQ normal, ou seja, o paciente não tem a deleção. Se o pico do paciente tiver aproximadamente metade do tamanho do pico controle, então este paciente tem uma deleção desta seqüência alvo. Mas, se o pico do paciente for maior, então ele apresenta uma duplicação na região-alvo desta sonda.

Para melhor confiabilidade dos resultados foi desenvolvido um programa para análise de MLPA criado em Excel (NGRL, Manchester Analysis Sheets). Este programa utiliza a média obtida do quociente de dosagem de cada produto da amplificação. Um DQ normal representa o indivíduo diplóide (2n) e tem o valor próximo a 1. Deste modo, a presença de duas cópias da seqüência alvo da sonda no DNA genômico pode variar de aproximadamente 0,85 a 1,15. Se a seqüência estiver com apenas uma cópia (haplóide – n) a variação é de aproximadamente 0,35 a 0,65 e três cópias da seqüência alvo (3n) o DQ normal é aumentado em uma vez e meia e a variação é de cerca de 1,35 a 1,65.

III.2.1.4 - Técnica de array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" da Affymetrix

O kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" é composto por dois arrays, que usam duas enzimas de restrição diferentes (Xba I ou Hind III), cada um contendo mais de 50,000 SNPs. A cobertura do kit é de 92% do genoma, sendo uma boa ferramenta para se detectar alterações no numero de cópias genômicas.

Todas as reações de *array* foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research) e, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA é quantificado e diluído para 50ng/μl em volume total de 50 ou 25 μl com EB Buffer. Após a diluição adiciona-se 5 μl deste DNA em tubo de 0,2 ml. Então é realizada a digestão com enzimas especificas (Xba I ou Hind III). A solução de digestão é preparada (10,5 μl de H20, 2 μl de NE Buffer, 2 μl

de BSA e 0,5 μl de enzima para cada reação) e adiciona-se 15 μl de solução em cada tubo. Os tubos são colocados no termociclador no programa Affy - DIG (37°C por 120 minutos, 70°C por 20 minutos, 4°C "for ever"). Em seguida é realizada a ligação, adicionando-se ao DNA digerido 5 μl de mix de ligação (0,625 μl de H20, 2,5 μl de T4 DNA Ligase Buffer, 0.625 μl de T4 DNA Ligase e 1,25 μl de adaptador Xba I ou Hind III para cada reação). Os tubos são colocados no termociclador no programa Affy - LIG (16°C por 120 minutos, 70°C por 20 minutos, 4°C "for ever"). Em seguida, os 25 μl de DNA ligado são diluídos em 75 μl de H20. Então é preparado o PCR Master Mix (44 μl de H20, 10 μl de Pfx Amplification Buffer, 10 μl de PCR Enhancer, 2 μl de MgSO4, 12 μl de dNTP, 10 μl de PCR Primer, 2 μl de Pfx Polymerase e 10 μl de DNA ligado diluído para cada reação), nesta etapa são feitos 3 tubos para cada amostra. Os tubos são levados de volta para a máquina no programa Affy - PCR (94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 68°C por 60 segundos, depois 68°C por 7 minutos e 4°C "for ever"). Em seguida, o produto de PCR é purificado, quantificado e diluído para 40ng/μl em volume total de 45 μl com EB Buffer. A próxima etapa é a fragmentação e para isso adiciona-se 5 μl de Fragmentation Buffer aos 45 μl de produto de PCR purificada. Prepara-se o reagente de fragmentação, e os tubos são levados ao termociclador novamente no programa Affy – FRAG (37°C por 35 minutos, 95°C por 15 minutos, 4°C "for ever"). Em seguida é preparado o mix de marcação (14 μl de TdT Buffer, 2 μl de

GeneChip DNA labelling Reagent, 3,5 μl de TdT para cada reação), adiciona-se 19,5 do mix em cada amostra e os tubos são levados de volta para a máquina no programa Affy-LAB (37°C por 120 minutos, 95°C por 15 minutos e 4°C "for ever"). O DNA marcado é misturado ao mix de hibridação (12 μl de MES, 13 μl de DMSO, 13 μl de Denhardt's, 3 μl de EDTA, 3 μl de HSDNA, 2 μl de OCR 0100, 3 μl de Cot-1 Humano, 1 μl de Tween-20 e 140 μl de TMACL para cada reação). Os tubos são levados ao termociclador para a desnaturação, Affy – HYB (95°C por 10 minutos e 48°C por 2 minutos). São colocados 200 μl da mistura de hibridação desnaturada de cada amostra nos *chips* de *array*. Os *chips* são levados ao forno de hibridação e deixados a 48°C por 16 horas, a 60 rotações por minuto. Após a hibridação os *chips* são levados à estação fluídica onde ocorre a lavagem e coloração dos *arrays*. Então, os arrays são escaneados e os resultados armazenados em um banco de dados no computador.

III.2.1.5 - Interpretação dos resultados de array

A análise do numero de cópias é feita pela intensidade de hibridação. Cada sonda do *array* é analisada e dividida em 4 categorias quanto a sua intensidade de hibridação, sendo "zero" não informativo, "um" deleção, "dois" sem alteração e "três" duplicação. Os dados são analisados no programa CNAG, da Universidade de Tokyo, específico para estudo de variação de numero de copias, no qual são comparados a controles normais e é possível observar as alterações e obter as informações sobre elas, como tamanho, localização e sondas envolvidas.

Tabela 6: kit MLPA – "Salsa P036B Human Telomere"

Localização cromossômica	Gene detectado pela sonda	Nome da sonda
1p	*CAB45*	2271-L1763
2p	*ACP1*	2274-L1765
3p	*CHL1*	1721-L1329
4p	*FLJ20265*	2005-L2047
5p	*PDCD6*	1723-L1327
6p	*IRF4*	1724-L2048
7p	*CENTA1*	2275-L2049
8p	*FBXO25*	2397-L1845
9p	*DMRT1*	1727-L2050
10p	*KIAA0934*	2277-L1768
11p	*RIC-8*	3315-L2733
12p	*SLC6A12*	2276-L1767
"13p"	*PSPC1*	2399-L1847
"14p"	*HEI10*	1732-L1318
"15p"	*CYFIP1*	1733-L1317
16p	*POLR3K*	1734-L1316
17p	*RPH3AL*	1735-L1315
18p	*USP14*	1736-L2051
19p	*CDC34*	1737-L1313
20p	*SOX12*	2396-L1844
"21p"	*RBM11*	1739-L1311
"22p"	*BID*	1740-L1310
X/Yp	*SHOX*	1148-L1331
1q	*KIAA1720*	2392-L2149
2q	*CAPN10*	1742-L1308
3q	*BDH*	2013-L2052
4q	*FRG1*	2582-L2055
5q	*GNB2L1*	3319-L2737
6q	*PSMB1*	1746-L1304
7q	*VIPR2*	1747-L1303
8q	*KIAA0150*	1748-L1302
9q	*MRPL41*	1749-L1301
10q	*PAO*	2554-L2018
11q	*KIAA0056*	1751-L1299
12q	*ZNF10*	2687-L2154
13q	*F7*	1753-L1297
14q	*MTA1*	2778-L2201
15q	*ALDH1A3*	1755-L1295
16q	*GAS11 / GAS8*	3201-L2669
17q	*TBCD*	1757-L1293
18q	*FLJ21172*	1758-L1292
19q	*BC-2*	3226-L2938
20q	*OPRL1*	2688-L2884
21q	*HMT1*	2586-L2059
22q	*RABL2B*	1762-L1289
X/Yp	*SYBL1*	1763-L2150

Tabela 7: kit MLPA – "Salsa P106 MRX"

Localização cromossômica	Gene detectado pela sonda	Nome da sonda
2q14		Sonda controle sitética
Y-014.5	*UTY*	NPK001-L0464
Y-014.0	*DBY (DDX3Y)*	NPK003-L0313
Xq11.2	Sonda controle	*1690-L0423*
Xq28	*GDI1*	2916-L4199
Xq27.3	*FMR1*	2928-L3720
Xq22.3	*FACL4*	2935-L2326
Xq28	*FMR2*	3511-L4202
Xp11.4	*TM4SF2*	2903-L2297
Xq27.3	*FMR1*	2927-L3721
Xq26	*ARHGEF6*	2901-L2295
Xp22.2	*RPS6KA3*	2907-L2301
Xq22.3	*FACL4*	2155-L1607
Xp22.1	*ARX*	3514-L2291
Xq26	*ARHGEF6*	2902-L4460
Xq23	*DCX*	4123-L3480
Xp22.1	*ARX*	2898-L4200
Xp22.1	*IL1RAPL1*	2922-L4201
Xq28	*FMR2*	3516-L2322
Xq22.3	*FACL4*	3512-L1606
Xq28	*FMR2*	2933-L2324
Xp11.4	*TM4SF2*	2904-L2298
Xq23	*DCX*	4124-L3481
Xq28	*FMR2*	0493-L0369
Xp22.1	*IL1RAPL1*	2920-L2314
Xq28.1	*SLC6A8*	1876-L1445
Xp11.23	*PQBP1*	2918-L2878
Xq23	*DCX*	4121-L3478
Xp22.1	*IL1RAPL1*	2921-L2315
Xq28	*FMR2*	2932-L2323
Xq26	*ARHGEF6*	3719-L2293
Xq24	*AGTR2*	2925-L2319
Xp22.2	*RPS6KA3*	2906-L2300
Xq12	*OPHN1*	2912-L2306
Xq28	*GDI1*	2917-L2311
Xq23	*PAK3*	2908-L3178
Xp11.23	*PQBP1*	3520-L2313
Xq23	*PAK3*	3521-L2304
Xq12	*OPHN1*	2913-L2307
Xq23	*PAK3*	2909-L2303
Xp22.1	*IL1RAPL1*	2923-L2317
Xq12	*OPHN1*	2914-L2308
Xq26	*ARHGEF6*	3720-L2294
Xp22.2	*RPS6KA3*	3762-L2299
Xq28.1	*SLC6A8*	1872-L1441
Xq12	*OPHN1*	2915-L2309

Tabela 8: kit MLPA – "Salsa P015 MECP2"

Localização cromossômica	Gene detectado pela sonda	Nome da sonda
8q24	Sonda controle	05169-L04550
Xq28	*GDI1*	02916-L04199
Exon 10	*CDKL5*	06466-L06567
1p13 Exon 1	*NTNG1*	06478-L06568
Exon 2	*ARX*	06453-L06569
10q26	Sonda controle	08222-L07936
Xq28	*SLC6A8*	01879-L01448
Xq28	*IRAK1*	10835-L12500
Exon 1	*MECP2*	10836-L11493
Exon 3	*CDKL5*	06458-L05984
Exon 3	*MECP2*	10839-L11496
10q21	Sonda controle	08747-L11148
Exon 1	*MECP2*	03409-L02797
Exon 4	*MECP2*	10842-L12494
Exon 1	*MECP2*	03770-L13387
Xq28	*FVIII*	06288-L05892
Exon 5	*ARX*	06455-L05981
Xq28	*L1CAM*	07051-L06660
Exon 2	*MECP2*	03768-L03229
Exon 4	*MECP2*	01769-L01333
5q35	Sonda controle	01306-L11227
Exon 4	*MECP2*	01768-L01332
Exon 6	*CDKL5*	06462-L05988
Exon 1	*MECP2*	02002-L01335
1p13 Exon 5	*NTNG1*	06487-L06013
13q14	Sonda controle	01789-L01353
Xq28	*DKC1*	08629-L08645
Exon 15	*CDKL5*	06471-L05997
Exon 4	*MECP2*	01347-L12498
Exon 4	*MECP2*	10841-L11498
Exon 3	*MECP2*	01348-L12499
9q34	Sonda controle	03013-L02453
Exon 2	*MECP2*	01349-L12497
Xq28	*IDH3G*	01887-L01456
Exon 3	*MECP2*	10840-L11497
Exon 9	*CDKL5*	06465-L05991
13q14	Sonda controle	01796-L01359
Xq28	*IRAK1*	01770-L01334
1p13Exon 6	*NTNG1*	06488-L06014
1p13Exon 3	*NTNG1*	06483-L06009
Xq28	*FLNA*	04138-L03495
Xq28-PAR	*VAMP7 (SYBL1)*	01094-L00659
11q23	Sonda controle	02674-L02141

Tabela 9: kit MLPA – "Salsa P224 PPARG"

Localização cromossômica	Gene detectado pela sonda	Nome da sonda
17q11	Sonda controle	3780-L3289
Exon 4	*PPARG*	6903-L7132
Exon 7	*PPARG*	6906-L7672
16q24	Sonda controle	1706-L1274
Exon 5	*PPARG*	6904-L7673
Exon 8	*PPARG*	6907-L7133
3p21	Sonda controle	3560-L2926
Exon 6	*PPARG*	6905-L6485
Exon 1	*PPARG*	7470-L6479
3p25 (XPC)	Sonda controle	6113-L5568
Exon 2	*PPARG*	6900-L6480
15q21	Sonda controle	2470-L1914
Exon 2B	*PPARG*	6901-L7674
3q11	Sonda controle	5296-L4684
3p25 (GHRL)	Sonda controle	2266-L1752
9p21	Sonda controle	1293-L0838
Exon 3	*PPARG*	6902-L6482
11q23	Sonda controle	2663-L2130

Tabela 10: kit MLPA – "Salsa P220 Obesity"

Localização cromossômica	Gene detectado pela sonda	Nome da sonda
Exon 3	*LEP*	8882-L08938
Exon 1	*SIM1*	7292-L06929
Exon 1	*MC4R*	2848-L02278
6q16.3	*CDC2L6*	3945-L03403
Exon 1	*SIM1*	7293-L09970
Exon 1	*MC3R*	8885-L08941
Exon 2	*SIM1*	7294-L06931
Exon 17	*LEPR*	8873-L09971
Exon 10	*LEPR*	8870-L09983
Exon 3	*SIM1*	7295-L06932
Exon 4	*LEPR*	8867-L08923
Exon 2	*LEP*	8880-L08936
Exon 4	*SIM1*	7296-L09972
6q16.3	*COQ3*	7312-L06949
Exon 4	*POMC*	8879-L08935
Exon 1	*MC3R*	8884-L08940
Exon 6	*LEPR*	8868-L08924
Exon 6	*LEPR*	7298-L06935
Exon 19	*MC4R*	8874-L08930
Exon 1	*SIM1*	8883-L08939
Exon 7	*NR2E1*	7299-L06936
6q16.3	*SIM1*	3939-L09973
Exon 8	*LEPR*	7300-L06937
Exon 20	*LEP*	8875-L09974
Exon 3	*SIM1*	8881-L08937
Exon 9	*POMC*	7301-L06938
Exon 2	*LEPR*	8877-L08933
Exon 2	*SIM1*	8866-L08922
Exon 9	*POMC*	7302-L06939
Exon 3	*POMC*	8878-L08934
Exon 15	*LEPR*	8872-L08928
Exon 10	*SIM1*	7303-L09975
Exon 13	*LEPR*	8871-L08927
6q16.3	*GRIK2*	7309-L06946
Exon 11	*SIM1*	7304-L09976
Exon 8	*LEPR*	8869-L08925
Exon 1	*MC2R*	2847-L02277
Exon 1	*POMC*	8876-L08932

III.2.2 - Estudos citogenéticos

III.2.2.1 - Cultura de linfócitos

A análise citogenética foi feita a partir de cultura temporária de linfócitos, segundo método descrito por Moorhead et al. (1960) modificado e empregado rotineiramente no laboratório.

Para o estudo cromossômico foram coletados, de cada paciente e de seus pais, 5ml de sangue periférico em seringa esterilizada com paredes heparinizadas, a fim de evitar a coagulação sangüínea. Para cada paciente foi feito um vidro de cultura de 10 ml. Ao meio de cultura RPMI foram adicionados 20% de soro fetal bovino, 1% de fitohemoglutamina e 0,1% de L-glutamina. Os vidros com o meio de cultura já com sangue inoculado foram colocados na estufa a 37° C, lá permaneceram por 72 horas. Pouco antes de completar este período adicionou-se 200 µl de colchicina 4.10^{-7} ao meio de cultura e os vidros permaneceram na estufa por mais 45 minutos. Ao término deste período, o conteúdo dos vidros foi transferido para tubos e centrifugados durante 5 minutos a 1500 rpm. Depois de desprezar todo o sobrenadante foi adicionado 7 ml de solução hipotônica em cada tubo dando um intervalo de 30 minutos. Após o intervalo, adicionou-se 2 ml de fixador em cada tubo. O fixador é preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético. O material foi ressuspendido e centrifugou-se, novamente, por 5 minutos na mesma rotação. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 5 ml de fixador, ressuspendeu-se o material e centrifugou-se, novamente, por 5 minutos

na mesma rotação. Este processo foi realizado mais duas vezes, portanto, ocorreram três etapas de lavagem. Pingou-se o material em lâminas previamente molhadas e geladas, e colocadas sobre o banho Maria.

III.2.2.2 - Análise cromossômica por coloração convencional

Para análise convencional as lâminas foram coradas com Giemsa. Para coloração colocou-se uma solução tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,03M e NaH2PO4 0,03M) sobre a lâmina e corante Giemsa a 4% por cinco minutos e foram observadas em microscópio óptico. Onze metáfases de cada um dos pacientes e de seus pais foram analisadas.

III.2.2.3 - Análise cromossômica por bandamento GTG

A técnica de bandamento GTG foi usada para a identificação dos cromossomos. As lâminas foram envelhecidas uma semana em média e então colocadas na estufa a 37° C durante a noite e encubadas em 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,03M) por 5 minutos a 65°C. Em seguida, foram lavadas em 2xSSC à temperatura ambiente, em água destilada e tratadas com uma solução de tripsina 0.025% em tampão fosfato Sorensen (Na_2HPO_4 0,03M e KH_2PO_4 0,03M) pH 6,8 à temperatura ambiente por tempo variável de 10 a 50 segundos. Posteriormente foram lavadas em água destilada e coradas com solução Giensa a 4% em tampão fosfato Sorensen por 10 minutos.

As metáfases com boa dispersão cromossômica foram selecionadas em estudo microscópico e analisadas. A captação das imagens foi pelo programa Ikaros Metasystem por câmara de vídeo.

III.2.2.4 - Análise por Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando BACs

Foram utilizados, como sondas, segmentos cromossômicos clonados em cromossomos artificiais de bactérias (BACs), mapeados nas regiões cromossômicas de interesse. Os clones foram selecionados nos mapas obtidos dos bancos de dados *Ensemble Genome Browser, University of Califórnia Santa Cruz Genome Bioinformatics* (UCSC). Os BACs foram gentilmente cedidos pela Dra. Carla Rosemberg, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

As linhagens bacterianas foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar com o antibiótico pertinente para a seleção das bactérias resistentes que continham os BAC. Após crescimento por um dia em estufa a 37ºC, as colônias foram amplificadas em meio TYB, em agitador com temperatura constante de 37ºC *overnight*. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo CHORI, com substituição do último passo por 30 minutos em banho a 37ºC.

As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina ou digoxigenina pela incorporação dos nucleotídeos Bio-16-dUTP ou Dig-11-dUTP, utilizando-se os *Kits Biotin-Nick Translation Mix* ou *Dig-Nick*

Translation Mix (Roche), respectivamente, conforme instruções do fabricante. As sondas foram submetidas à supressão de seqüências repetitivas pela adição de DNA humano *COT-1* (Invitrogen). As sondas foram ressuspendidas em cerca de 20 µl de meio de hibridação, que consiste de formamida 50% e dextran sulfato a 10%, em 2xSSC e desnaturadas a 100ºC por 10 minutos. Para a desnaturação dos cromossomos, utilizou-se formamida 70% em 2xSSC por 2 minutos a 70ºC – 75ºC. A sonda foi aplicada sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida em estufa a 37ºC *overnight*. Seguiram-se dois banhos de 50% formamida em 2xSSC, de um minuto, um banho de 2xSSC a 37ºC, de cerca de 3 minutos, e um banho de 5 minutos de PBT (PBS acrescido de 0,1% Tween 20 e 0,15% BSA-Sigma) à temperatura ambiente. Para a imunocoloração, no caso de sonda marcada com biotina, utilizou-se avidina conjugada a FITC (1:50 em PBT). Para as sondas marcadas com digoxigenina, utilizou-se a anti-digoxigenina conjugada a rodamina (1:100 em PBT). A incubação foi realizada em câmara úmida, no escuro, em estufa a 37ºC por 45 minutos. Após dois banhos de PBT de 5 minutos cada à temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com o corante DAPI (Sigma; 0,8 ng/µl). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 motorizado (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As metáfases foram capturadas com o auxílio de uma vídeo câmera de alta resolução e do programa ISIS Metasystem. Para cada paciente foram analisadas no mínimo 30 metáfases.

IV - RESULTADOS

Estudamos 141 pacientes, dos quais 116 vieram ao nosso serviço com suspeita clínica de síndrome de Prader-Willi. Esses pacientes foram analisados pelo teste genético específico para diagnosticar a síndrome de Prader-Willi chamado "Estudo do padrão de metilação da região PWS/AS. Esses testes genéticos foram realizados pela Dra. Mônica Castro Varela e apresentaram resultado negativo para esta síndrome. Foi preenchida uma ficha de anamnese com a história gestacional, as características físicas e de comportamento dos pacientes. Todos os pacientes apresentam atraso do DNPM e/ou dificuldade de aprendizado, distúrbio de comportamento e obesidade e/ou hiperfagia. Os pacientes estudados tem idades entre 8 meses e 31 anos, 85 são do sexo masculino e 56 do sexo feminino.

IV.1 - Estudo subtelomérico por *MLPA*

Estudos revelaram que rearranjos subteloméricos crípticos são responsáveis por uma proporção considerável de casos de RM inespecífico, associado ou não a dismorfismos e/ou anomalias congênitas (Flint and Knight, 2003), portanto todos os pacientes foram estudados com o kit subtelomérico.

Dentre os pacientes estudados, 137 deles apresentaram resultado normal e 4 apresentaram alterações. Foram encontradas duas deleções no

braço curto do cromossomo 1, uma deleção no braço curto do cromossomo 2 e uma deleção no braço curto do cromossomo 3 e duplicação no braço longo do cromossomo 11.

Paciente OS15

A análise de MLPA do paciente OS15 com o kit P036 levou ao diagnóstico da síndrome de monossomia 1p36 e é apresentada na Figura 1 (pág 66).

A paciente do sexo feminino, com 8 anos de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2002), apresentou história clínica de retardo de crescimento pré-natal, hipotonia, dificuldade de alimentação, atraso de DNPM (andou com 3 anos e aos 7 começou a falar), obesidade e hiperfagia, alto limiar para dor, (auto) agressão, microcefalia e braquicefalia, orelhas baixo implantadas e posteriorizadas, olhos fundos, sinofre, fenda palpebral com inclinação para baixo, teve estrabismo nos dois olhos corrigido, ponte nasal rebaixada, microstomia, lábios finos, queixo pontudo, pescoço curto, mãos pequenas, clinodactilia de 4º e 5º dedos. Esta paciente foi encaminhada ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado o teste genético específico que foi normal.

Paciente OS63

A análise de MLPA do paciente OS63 com o kit P036 levou ao diagnóstico de uma deleção no braço curto do cromossomo 2 e é apresentada na Figura 2 (pág 66).

A paciente do sexo feminino, com 7 anos e 6 meses de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2006), apresentou história clínica de atraso de DNPM, obesidade e hiperfagia, distúrbios de comportamento, distúrbios do sono, hipogonadismo, macrocefalia, orelhas grandes, sinofre, epicanto, telecanto, fenda palpebral com inclinação para baixo, estrabismo, boca triangular, macrostomia, lábios grossos. Esta paciente foi encaminhada ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado o teste genético específico que apresentou resultado normal. Os cariótipos da paciente e dos genitores também foram estudados e apresentaram resultado normal. Os genitores deste paciente foram analisados com o kit P036 e apresentaram resultado normal.

Assim que a técnica de SNP array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" da Affymetrix se tornou disponível em nosso laboratório a paciente OS63 também foi estudada por esta técnica. A análise por SNP array confirmou a deleção no braço curto do cromossomo 2 encontrada na análise por MLPA e é apresentada na Figura 3 (pág 67).

O emprego do GeneChip Mapping 100K (Affymetrix) mostrou que a deleção no cromossomo 2 (p25.3→pter) é de 3,1Mb. O ponto de quebra

está localizado em 2p25.3 entre os SNPs SNP_A-1748852 localizado em 3194600pb e SNP_A-1684916 localizado em 3481042pb, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).

A análise por *SNP-array* dos genitores do paciente OS63 apresentou resultados normais.

Paciente OS80

A análise de MLPA do paciente OS80 com o kit P036 levou ao diagnóstico de uma deleção no braço curto do cromossomo 3 e duplicação no braço longo do cromossomo 11 e é apresentada na Figura 4 (pág 68).

O paciente do sexo masculino, com 8 meses de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2003), apresentou história clínica de retardo de crescimento pré-natal, hipotonia, dificuldade de alimentação, atraso de DNPM, obesidade e hiperfagia, microcefalia, fronte estreita, olhos amendoados, boca pequena, mãos pequenas e dedos afilados nas pontas. Este paciente foi encaminhado ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado o teste genético específico que apresentou resultado normal. O seu cariótipo foi estudado e apresentou um cromossomo 3 derivado com material do braço longo do cromossomo 11 (fig 5, pág 68). O cariótipo de sua mãe foi normal, o pai não teve o cariótipo estudado pois não compareceu às consultas para nova coleta de material. Os genitores deste paciente foram analisados com o kit P036 e apresentaram resultado normal.

A fim de analisar os pontos de quebra envolvidos no rearranjo encontrado neste paciente, foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) por clones de BACs. Duas sondas foram utilizadas: RP11-10H6 situada em 3p26.2 e RP11- 86C13 situada em 3p26.3. Na hibridação com a sonda RP11-10H6 foram observadas marcações nos dois cromossomos 3, já na hibridação com a sonda RP11- 86C13 apenas um dos cromossomos 3 encontrava-se marcado (Figura 6, pág 69). Concluímos então que o ponto de quebra estaria entre RP11-10H6 e RP11-86C13 e o tamanho da deleção seria de no máximo 3.3Mb.

Assim que a técnica de SNP array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" da Affymetrix se tornou disponível em nosso laboratório o paciente OS80 também foi estudado por esta técnica.

A análise por array do paciente OS80 confirmou a deleção no braço curto do cromossomo 3 e a duplicação no braço longo do cromossomo 11 e é apresentada na Figura 7 (pág 70).

O emprego do GeneChip Mapping 100K (Affymetrix) mostrou que a deleção no cromossomo 3 (p26.3→pter) é de 1,27Mb e o ponto de quebra está localizado em 3p26.3 entre os SNPs SNP_A-1665245 localizado em 1248300pb e SNP_A-1715718 localizado em 1275820pb e a duplicação no cromossomo 11(q22.3→qter) de 28,42Mb e o ponto de quebra está localizado em 11q22.3 entre os SNPs SNP_A-1719231 localizado em 105697057pb e SNP_A-1755713 localizado em 105756688pb, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).

A análise por *SNP-array* dos genitores do paciente OS80 apresentou resultados normais.

Paciente OS108

A análise de MLPA do paciente OS108 com o kit P036 levou ao diagnóstico da síndrome de monossomia 1p36 e é apresentada na Figura 8 (pág 71).

A paciente do sexo feminino, com 31 anos e 5 meses de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2007), apresentou história clínica de atraso de DNPM, atraso da fala, obesidade e hiperfagia, distúrbios de comportamento, hipotonia, dificuldade de alimentação, hipercolesterolemia. Esta paciente foi encaminhada ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado o teste genético específico que apresentou resultado normal.

As duas pacientes que apresentaram deleção 1p36 tiveram seus estudos aprofundados em outro projeto, específico para esta síndrome, realizado em nosso laboratório (D'Angelo *et al.,* 2010).

VI.2 - Estudo de Retardo Mental ligado ao X por *MLPA*

O retardo mental de herança ligada ao cromossomo X representa 3% de todos os casos de RM na população geral, associado ou não a dismorfismos e/ou anomalias congênitas. A síndrome do cromossomo X-frágil é a causa em 15-25% desses casos, constituindo a forma mais

comum de RM herdado. Dos 75% restantes, a maioria permanece sem diagnóstico específico (Rejeb *et al.*, 2009). Portanto todos os pacientes do sexo masculino foram estudados com o kit MRX. Todos os pacientes estudados apresentaram resultado normal. A figura 9 (pág 71) ilustra o teste realizado em um dos pacientes estudados.

IV.3 - Estudo do gene *MECP2* por MLPA

Estudos demonstraram que duplicações em *MECP2* ocorrem com freqüência em pacientes do sexo masculino com retardamento mental grave (Lugtenberg *et al.,* 2009; Sanlaville *et al.,* 2009) e também foi descrito um paciente com retardamento mental, obesidade e ginecomastia que apresentou uma deleção "de novo" no gene *MECP2* (Kleefstra *et al.,* 2002). Selecionamos 12 pacientes da nossa amostra, que apresentavam estas três características, para serem estudados com o kit de MLPA do gene *MECP2.* Todos os pacientes estudados apresentaram resultado normal. A figura 10 (pág 72) ilustra o teste realizado em um dos pacientes estudados.

IV.4 - Estudo do segmento cromossômico 3p25 por MLPA

Utilizamos o kit PPARG1 de MLPA para investigar o segmento 3p25, onde está o gene *PPARG1* relacionado a obesidade em 23 pacientes com características semelhantes ao paciente OS80, que apresentou uma

deleção no braço curto do cromossomo 3. Todos os pacientes estudados apresentaram resultado normal. A figura 11 (pág 72) ilustra o teste realizado em um dos pacientes estudados.

IV.5 - Estudo por SNP Array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" - Affymetrix

No decorrer de nosso projeto a técnica de SNP array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" da Affymetrix se tornou disponível. Foram então escolhidos 19 pacientes que apresentavam retardo mental, obesidade e outro sinal ao exame físico que sugerisse alteração cromossômica, tais como: orelhas de baixa implantação, clinodactilia de 5º dedo das mãos, fosseta pré-auricular bilateral, mamilos invertidos, microcefalia e implantação anormal dos artelhos.

Os pacientes OS63 e OS80, como referidos acima, também foram estudados por esta técnica.

Dos 19 pacientes estudados, 13 apresentaram resultados normais e seis apresentaram alterações, que serão descritas a seguir:

Paciente OS18

A análise por SNP array do paciente OS18 levou ao diagnóstico de uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 6 e é apresentada na Figura 12 (pág 73).

O emprego do GeneChip Mapping 100K (Affymetrix) mostrou que a deleção intersticial no cromossomo 6 (q16.1-q21) é de 13,2Mb. O ponto de quebra proximal está localizado em 6q16.1 entre os SNPs SNP_A-1649558 localizado em 95629083pb e SNP_A-1670933 localizado em 95943353pb, e o ponto de quebra distal está localizado em 6q21 entre os SNPs SNP_A-1735655 localizado em 108117633pb e SNP_A-1656503 localizado em 108158265pb, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).

O paciente do sexo masculino, com 10 anos de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2006), apresentou história clínica de hipotonia, atraso de DNPM, dificuldade de aprendizagem, distúrbio de comportamento, problemas na articulação da fala, obesidade, braquicefalia, fronte estreita, orelhas pequenas, mãos pequenas, dedos curtos e afilados nas pontas e implantação anormal dos artelhos. Este paciente foi encaminhado ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado teste genético que apresentou resultado normal.

O cariótipo do paciente foi estudado e confirmou a deleção intersticial no braço longo do cromossomo 6 (fig 13, pág 73). Os genitores também tiveram seus cariótipos analisados e foram estudados pela técnica de array, apresentando resultados normais.

Paciente OS57

A análise por SNP array do paciente OS57 levou ao diagnóstico de uma duplicação intersticial no braço longo do cromossomo 14 e é apresentada na Figura 14 (pág 74).

O emprego do GeneChip Mapping 100K (Affymetrix) mostrou que a duplicação intersticial no cromossomo 14 (q11.2) é de 1Mb. O ponto de quebra proximal está localizado em 14q11.2 entre os SNPs SNP_A-1712407 localizado em 20987688pb e SNP_A-1740552 localizado em 20989352pb, e o ponto de quebra distal está localizado em 14q11.2 entre os SNPs SNP_A-1672055 localizado em 21987568pb e SNP_A-1702463 localizado em 21995892pb, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).

O paciente do sexo masculino, com 4 anos e 3 meses de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2006), apresentou história clínica de hipotonia, atraso de DNPM, dificuldade de aprendizagem, agressividade, hiperatividade, problemas na articulação da fala, obesidade, achatamento da porção mediana da face, microcefalia, braquicefalia, sobrancelha alongada, sinofre, olhos fundos, hipotelorismo, estrabismo, orelhas posteriorizadas, clinodactilia e mamilos invertidos. Este paciente foi encaminhado ao nosso serviço para investigação da síndrome de Prader-Willi, porém por não possuir as principais características desta síndrome foi redirecionado ao estudo das regiões

subteloméricas de todos os cromossomos e apresentou resultado normal para este teste. O cariótipo deste paciente foi normal.

Os genitores também tiveram seus cariótipos analisados e foram estudados pela técnica de array, apresentando resultados normais.

A fim de validar a duplicação encontrada neste paciente, foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) por clones de BACs. Duas sondas foram utilizadas: RP11- 84C10 situada em 14q11.2 dentro da região duplicada e RP11- 98N22 situada em 14q11.2 fora da região duplicada. Na hibridação com a sonda RP11- 84C10 foram observadas marcações nos dois cromossomos 14, com intensidades diferentes, já na hibridação com a sonda RP11- 98N22, marcações nos dois cromossomos 14, com a mesma intensidade (Figura 15, pág 75).

Paciente OS96

A análise por SNP array do paciente OS96 levou ao diagnóstico de uma deleção intersticial no braço curto do cromossomo X e é apresentada na Figura 16 (pág 76).

O emprego do GeneChip Mapping 100K (Affymetrix) mostrou que a deleção intersticial no cromossomo X (p22.13–p22.12) é de 2,6Mb. O ponto de quebra proximal está localizado em Xp22.12 entre os SNPs SNP_A-1658263 localizado em 20373693pb e SNP_A-1736705 localizado em 19593291pb, e o ponto de quebra distal está localizado em Xp22.13 entre os SNPs SNP_A-1693167 localizado em 17973677pb e SNP_A-

1646355 localizado em 17764213pb, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).

A paciente do sexo feminino, com 4 anos e 9 meses de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2006), apresentou história clínica de atraso de DNPM, obesidade, convulsões, ausência de fala e fossetas pré-auriculares. Esta paciente foi encaminhada ao nosso serviço diretamente para o estudo de obesidade sindrômica. O cariótipo da paciente e de sua mãe foram normais.

Os genitores do paciente OS96 não foram estudados pela técnica de array, pois não compareceram às consultas marcadas para a coleta de material.

A fim de validar o rearranjo encontrado neste paciente, foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) por clones de BACs. Duas sondas foram utilizadas: RP11- 421K1 situada em Xp22.13, dentro da região deletada e RP11- 431J24 situada em Xp22.2, fora da região deletada. Na hibridação com a sonda RP11 –431J24, foram observadas marcações nos dois cromossomos X, já na hibridação com a sonda RP11-421K1 apenas um dos cromossomos X encontrava-se marcado (Figura 17, pág 77).

Paciente OS117

A análise por SNP array da paciente OS117 (irmã gêmea de OS118) levou ao diagnóstico de uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 12 e é apresentada na Figura 18 (pág 78).

O emprego do GeneChip Mapping 100K (Affymetrix) mostrou que a deleção intersticial no cromossomo 12 (q15–q21.1) é de 2,6Mb. O ponto de quebra proximal está localizado em 12q15 entre os SNPs SNP_A-1700417 localizado em 68738230pb e SNP_A-1696062 localizado em 68844599pb, e o ponto de quebra distal está localizado em 12q21.1 entre os SNPs SNP_A-1731040 localizado em 71595491pb e SNP_A-1664949 localizado em 71643924pb, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).

A paciente do sexo feminino, com 9 anos e 5 meses de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2006), apresentou história clínica de atraso de DNPM, obesidade, agressividade, leucemia com 1 ano e 8 meses, convulsões durante a quimioterapia, atraso da fala, fácies grande e quadrada, orelhas de baixa implantação, lábios finos, clinodactilia e alterações oftalmológicas. Esta paciente foi encaminhada ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado teste genético que apresentou resultado normal. O cariótipo da paciente também foi normal.

A fim de validar o rearranjo encontrado neste paciente, foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) por clones de BACs.

Duas sondas foram utilizadas: RP11- 11G4 situada em 12q15, dentro da região deletada e RP11- 444B24 situada em 12q15, fora da região deletada. Na hibridação com a sonda RP11 – 444B24, foram observadas marcações nos dois cromossomos 12, já na hibridação com a sonda RP11-11G4 apenas um dos cromossomos 12 encontrava-se marcado (Figura 19, pág 79). O mesmo teste foi realizado em sua irmã gêmea, revelando que ela também apresenta a deleção no braço longo do cromossomo 12 (Figura 20, pág 80).

Paciente OS118

A análise por SNP array da paciente OS118 foi realizada depois do teste de FISH pois o DNA não apresentou boa qualidade para estudo e uma nova coleta de material se fez necessária. O estudo por array, assim como em sua irmã, levou ao diagnóstico de uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 12 e é apresentada na Figura 21 (pág 81).

A paciente do sexo feminino, assim como sua irmã (OS117), compareceu a primeira consulta em nosso serviço (2006) com 9 anos e 5 meses de idade, apresentou história clínica de atraso de DNPM, obesidade, atraso da fala, déficit de atenção, hiperatividade, fácies grande e quadrada, orelhas de baixa implantação, lábios finos, clinodactilia e alterações oftalmológicas. Esta paciente foi encaminhada ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado teste genético que

apresentou resultado normal. O cariótipo da paciente também foi normal.

Os genitores das pacientes OS117 e OS118 também tiveram seus cariótipos analisados e foram estudados pela técnica de array, apresentando resultados normais.

Paciente OS36

A análise por SNP array do paciente OS36 levou ao diagnóstico de uma duplicação intersticial no braço longo do cromossomo X e é apresentada na Figura 22 (pág 82).

O emprego do GeneChip Mapping 100K (Affymetrix) mostrou que a duplicação intersticial no cromossomo X(q26.3) é de 1,2Mb, o ponto de quebra proximal esta localizado entre o SNP_A-1704115 e o SNP_A-1723642 (localizados em 136303783pb e 136351855, respectivamente, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).) e o ponto de quebra distal esta localizado entre o SNP_A-8288135 e o SNP_A-1687271 (localizados em 137530619pb e 137638471pb, respectivamente, conforme o *Ensembl Genome Browser* (versão 57.37b).

O paciente do sexo masculino, com 11 anos e 6 meses de idade na ocasião da primeira consulta em nosso serviço (2006), apresentou história clínica de atraso de DNPM, obesidade, epilepsia parcial, déficit de linguagem, mãos e pés pequenos. Este paciente foi encaminhado ao nosso serviço com suspeita da síndrome de Prader-Willi e foi realizado teste

genético que apresentou resultado normal. O cariótipo do paciente também foi normal.

Apesar da confirmação deste resultado não ter sido realizada por outra técnica, pois o paciente não compareceu à consulta marcada para nova coleta de material, consideramos o resultado válido pelo fato de o teste do *array* ser dividido em dois chips com sondas de *SNPs* diferentes e o mesmo resultado foi encontrado nos dois, portanto é como se um teste validasse o outro. Outros estudos serão realizados assim que o DNA estiver disponível.

IV.6 - Estudo do segmento cromossômico 6q16 por MLPA

Utilizamos o kit "Obesity" de MLPA para investigar o segmento 6q16, onde está localizado o gene *SIM1* relacionado a obesidade em 28 pacientes com características semelhantes ao paciente OS18, que apresentou uma deleção no braço longo do cromossomo 6, e que também foi estudado por este teste como controle. Todos os pacientes estudados apresentaram resultado normal. A figura 23 (pág 83) ilustra o teste realizado no paciente OS18.

A Tabela 11 (pág 84) apresenta os testes realizados em cada paciente estudado.

As fotos dos pacientes que apresentaram alterações cromossômicas estão na figura 24 (pág 89).

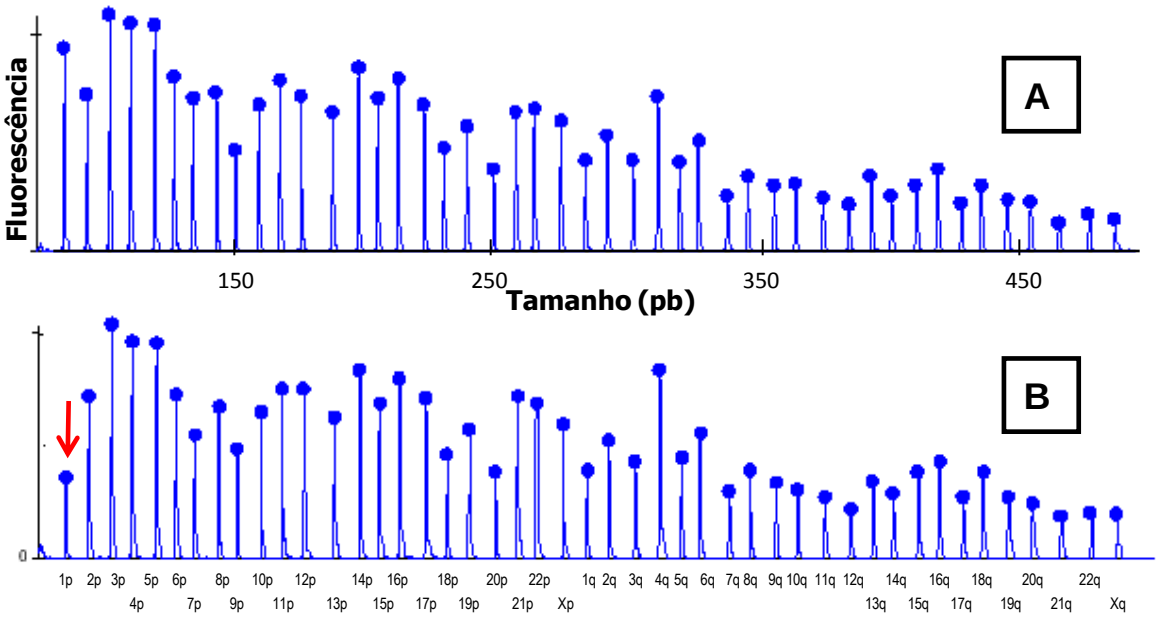

Figura 1: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o kit subtelomérico ("P036 Human Telomere MLPA kit"). (A) DNA controle (B) DNA da paciente OS15. Comparada a reação controle, o pico de área relativo do produto de amplificação da sonda da região 1p está diminuído em ~ 35-50% no DNA genômico do paciente (seta).

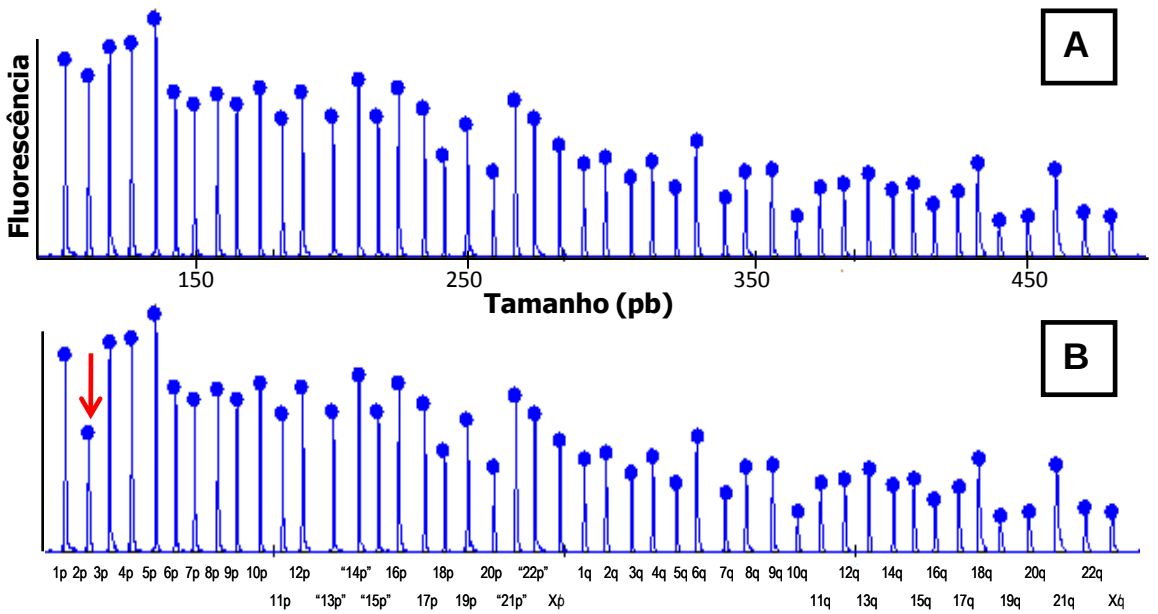

Figura 2: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o kit subtelomérico ("P036 Human Telomere MLPA kit"). (A) DNA controle (B) DNA da paciente OS63. Comparada a reação controle, o pico de área relativo do produto de amplificação da sonda da região 2p está diminuído em ~ 35-50% no DNA genômico do paciente (seta).

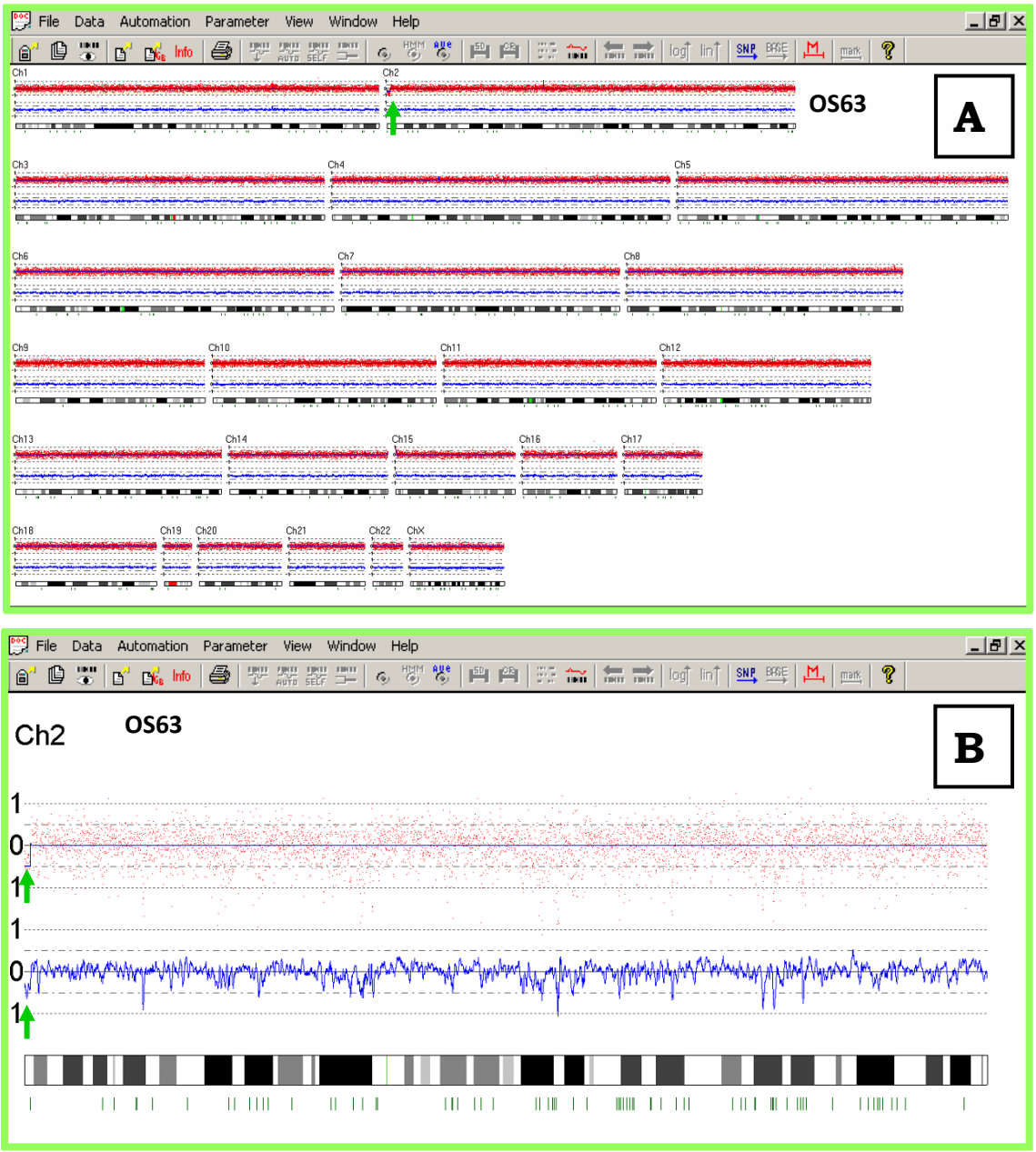

Figura 3: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" na paciente OS63, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, a seta indica alteração no cromossomo 2. (B) Tela de visualização do cromossomo 2, as setas indicam a deleção em 2p25.3.

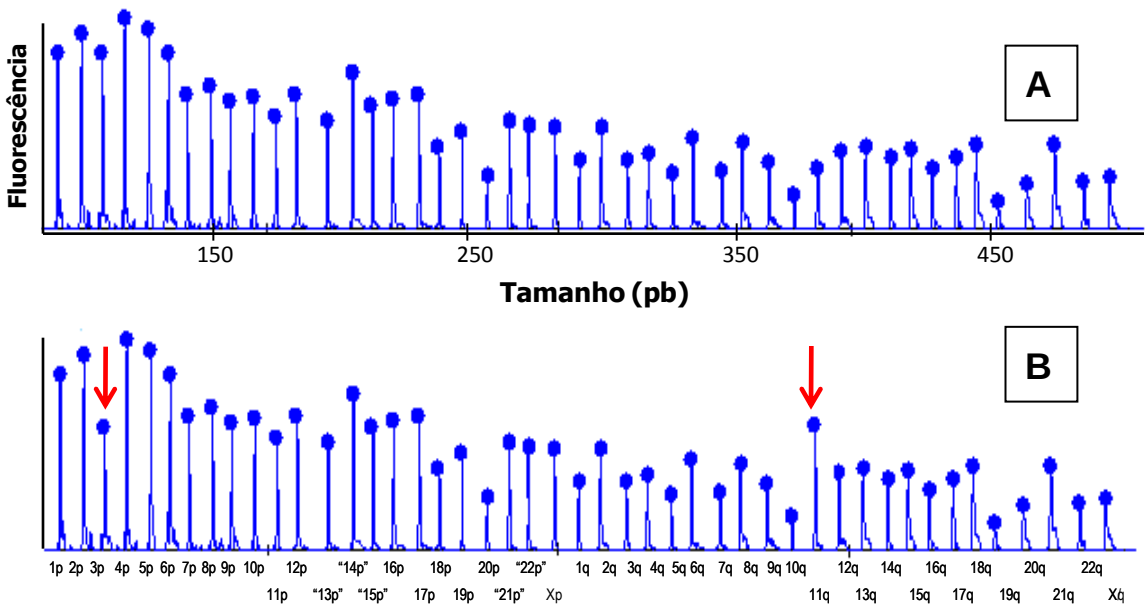

Figura 4: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o kit subtelomérico ("P036 Human Telomere MLPA kit"). (A) DNA controle (B) DNA do paciente OS80. Comparada a reação controle, o pico de área relativo do produto de amplificação da sonda da região 2p está diminuído em ~ 35-50% no DNA genômico do paciente e o pico em 11q aumentado (setas).

Figura 5: Cariótipo parcial do paciente OS80. Par de cromossomos 3 em bandamento GTG A seta indica o cromossomo 3 derivado com material do braço longo do cromossomo 11.

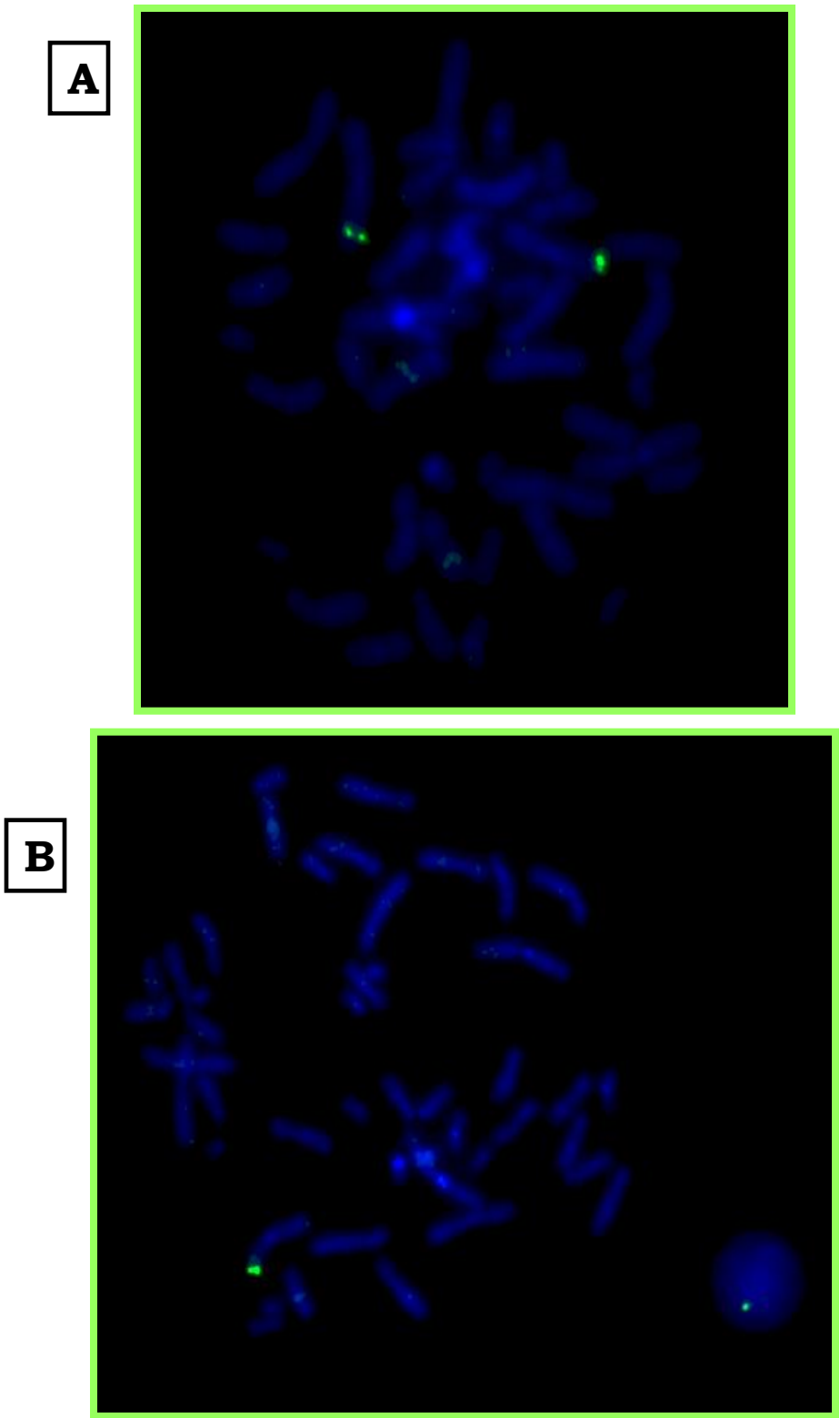

Figura 6: FISH do paciente OS80. (A) utilizando a sonda RP11-10H6, os dois cromossomos 3 estão marcados. (B) utilizando a sonda RP11- 86C13, apenas uma marcacao é observada evidenciando a ausência desta região em um dos cromossomos 3.

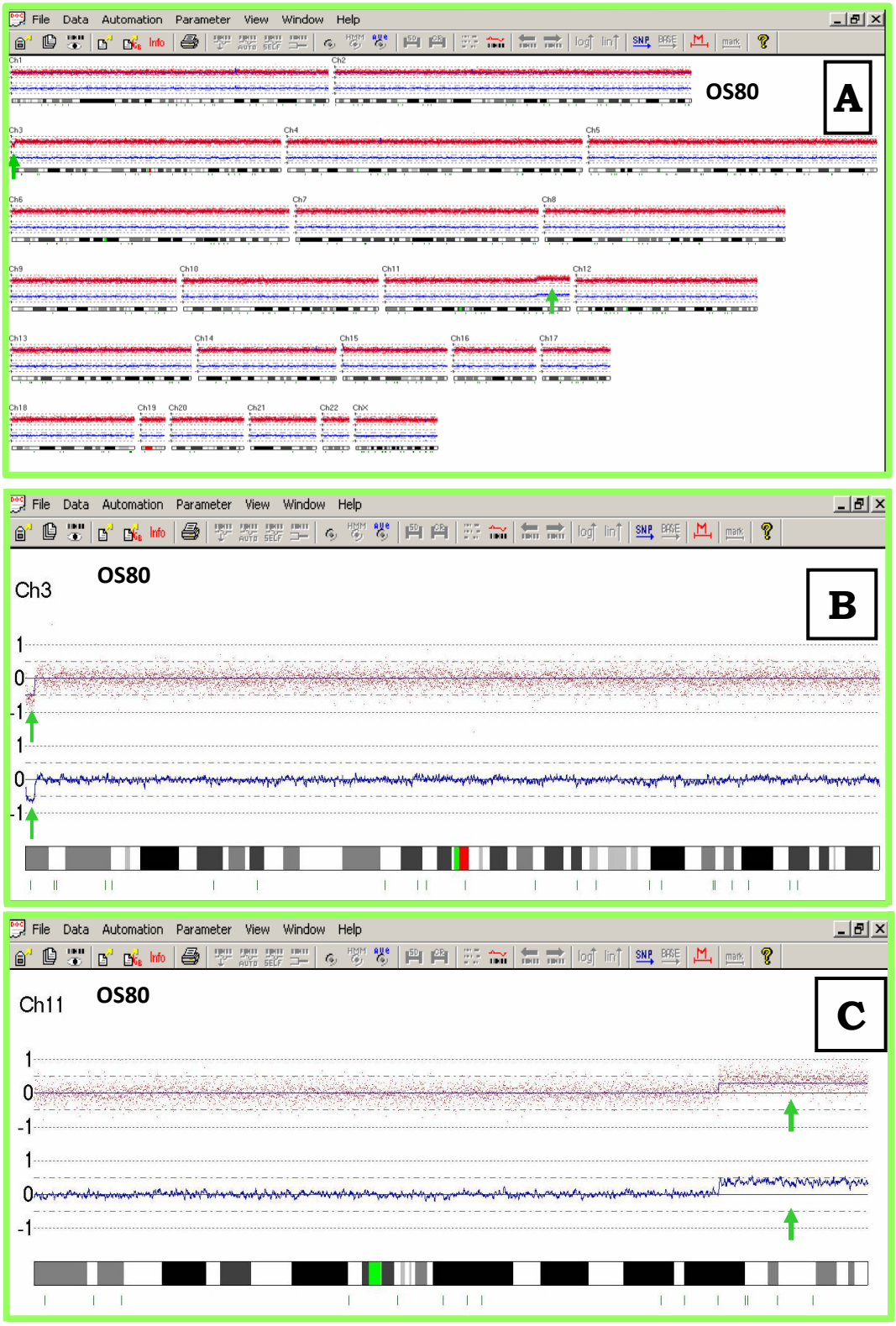

Figura 7: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" no paciente OS80, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, as setas indicam as alterações nos cromossomos 3 e 11. (B) Tela de visualização do cromossomo 3, as setas indicam a deleção em 3p26.3. (C) Tela de visualização do cromossomo 11, as setas indicam a duplicação em 11q22.3.

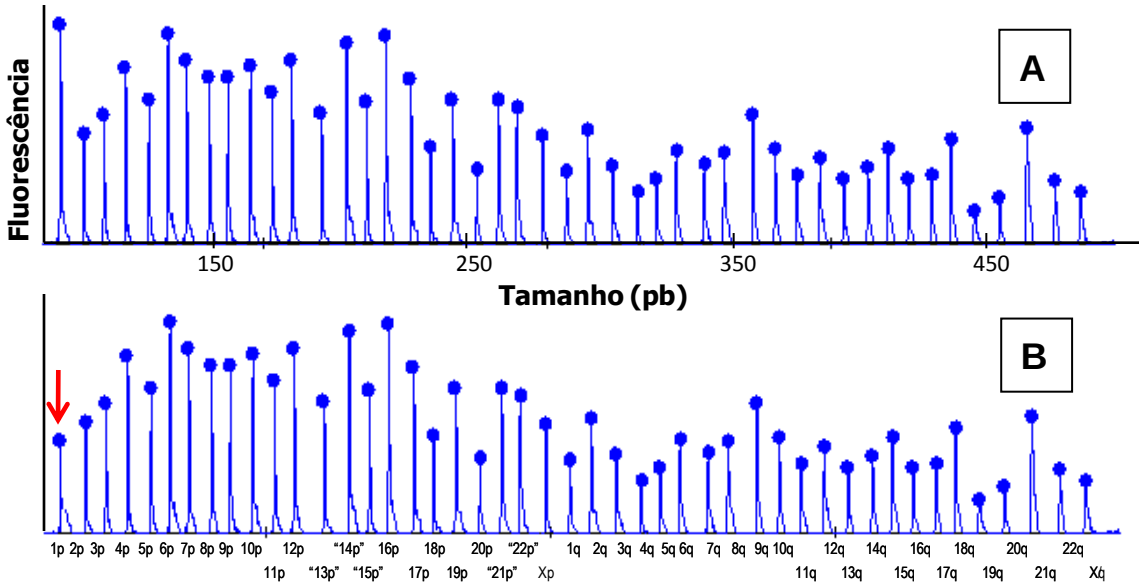

Figura 8: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o kit subtelomérico ("P036 Human Telomere MLPA kit"). (A) DNA controle (B) DNA da paciente OS108. Comparada a reação controle, o pico de área relativo do produto de amplificação da sonda da região 1p está diminuído em ~ 35-50% no DNA genômico do paciente (seta).

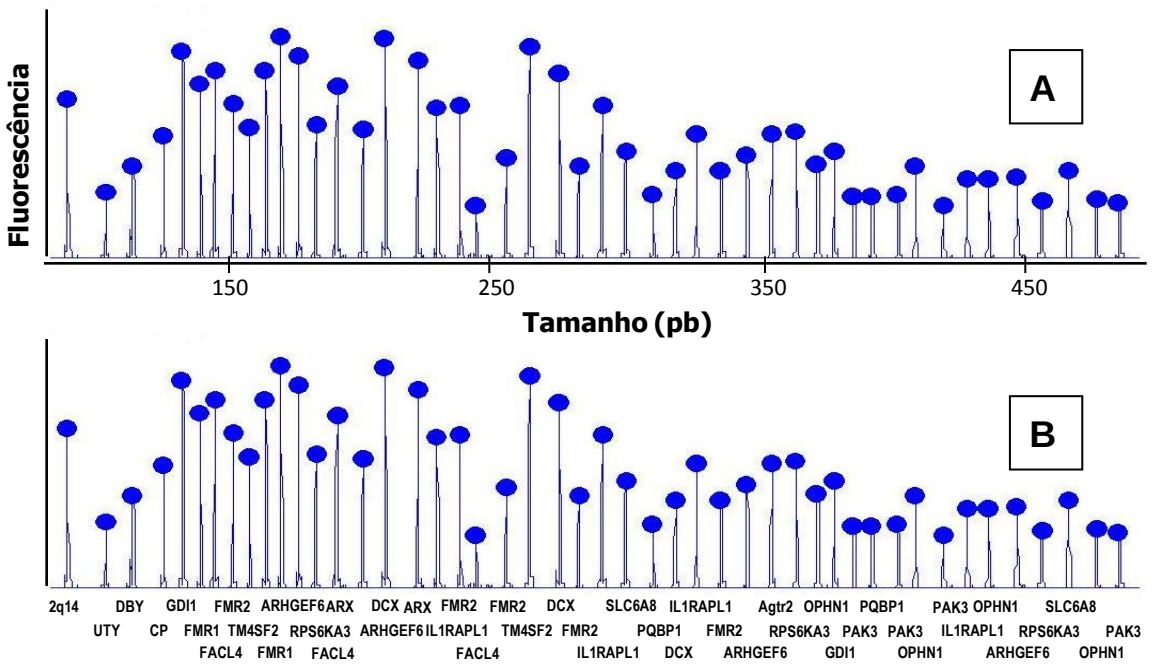

Figura 9: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o kit Retardo mental ligado ao X ("P106 MRX MLPA kit"). (A) DNA controle (B) DNA do paciente OS4. Os picos de área relativo do produto de amplificação de todas as sondas estão do mesmo tamanho dos da reação controle, indicando resultado normal para este teste.

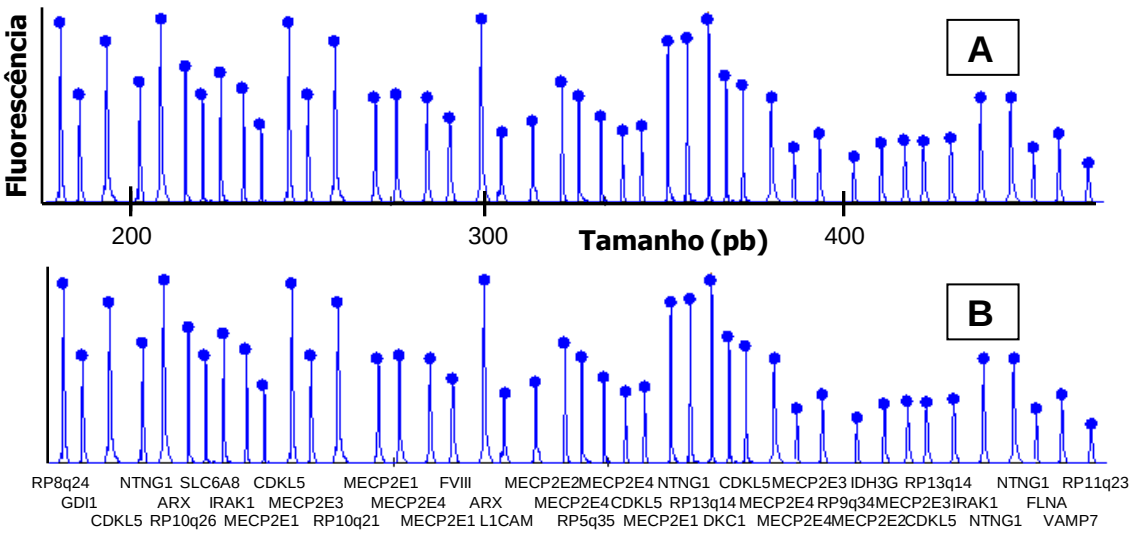

Figura 10: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o kit do gene *MECP2* ("P015 MECP2 MLPA kit"). (A) DNA controle (B) DNA do paciente OS10. Os picos de área relativo do produto de amplificação de todas as sondas estão do mesmo tamanho dos da reação controle, indicando resultado normal para este teste.

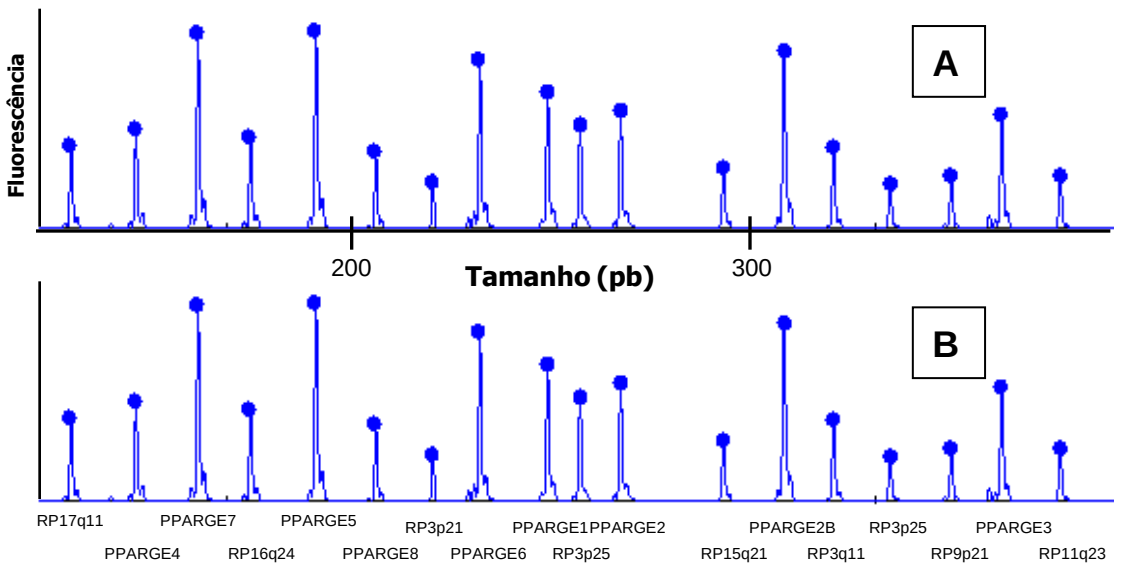

Figura 11: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o kit do gene *PPARG* ("P224 PPARG MLPA kit"). (A) DNA controle (B) DNA da paciente OS25. Os picos de área relativo do produto de amplificação de todas as sondas estão do mesmo tamanho dos da reação controle, indicando resultado normal para este teste.

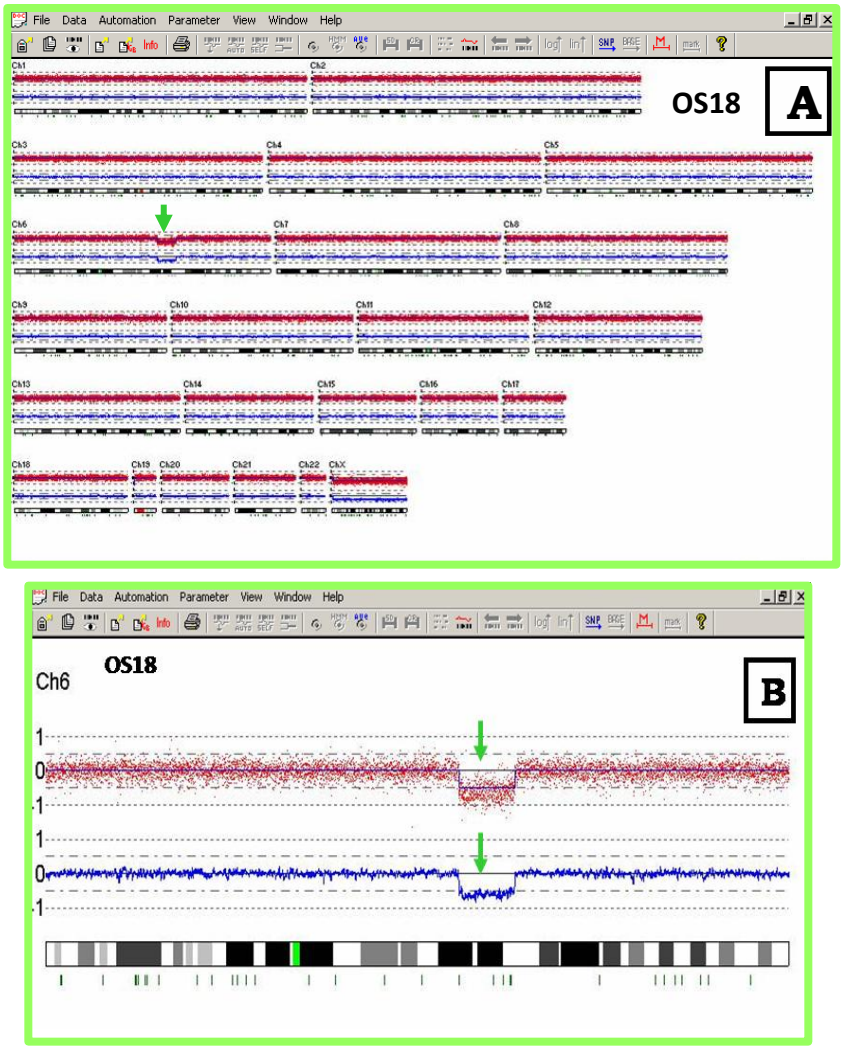

Figura 12: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" no paciente OS18, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, a seta indica alteração no cromossomo 6. (B) Tela de visualização do cromossomo 6, as setas indicam a deleção em 6q16-q21.

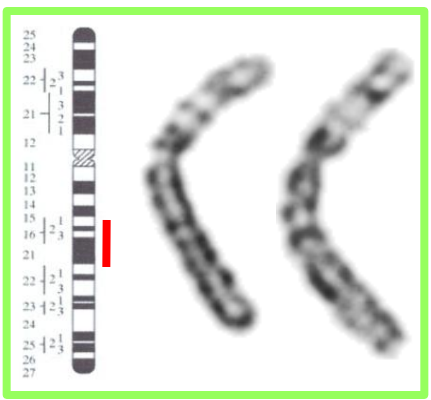

Figura 13: Cariótipo parcial do paciente OS18. Ideograma e par de cromossomos 6 em bandamento GTG, mostrando o cromossomo deletado (à esquerda) e o não-deletado (direita). A barra vermelha indica a região da deleção.

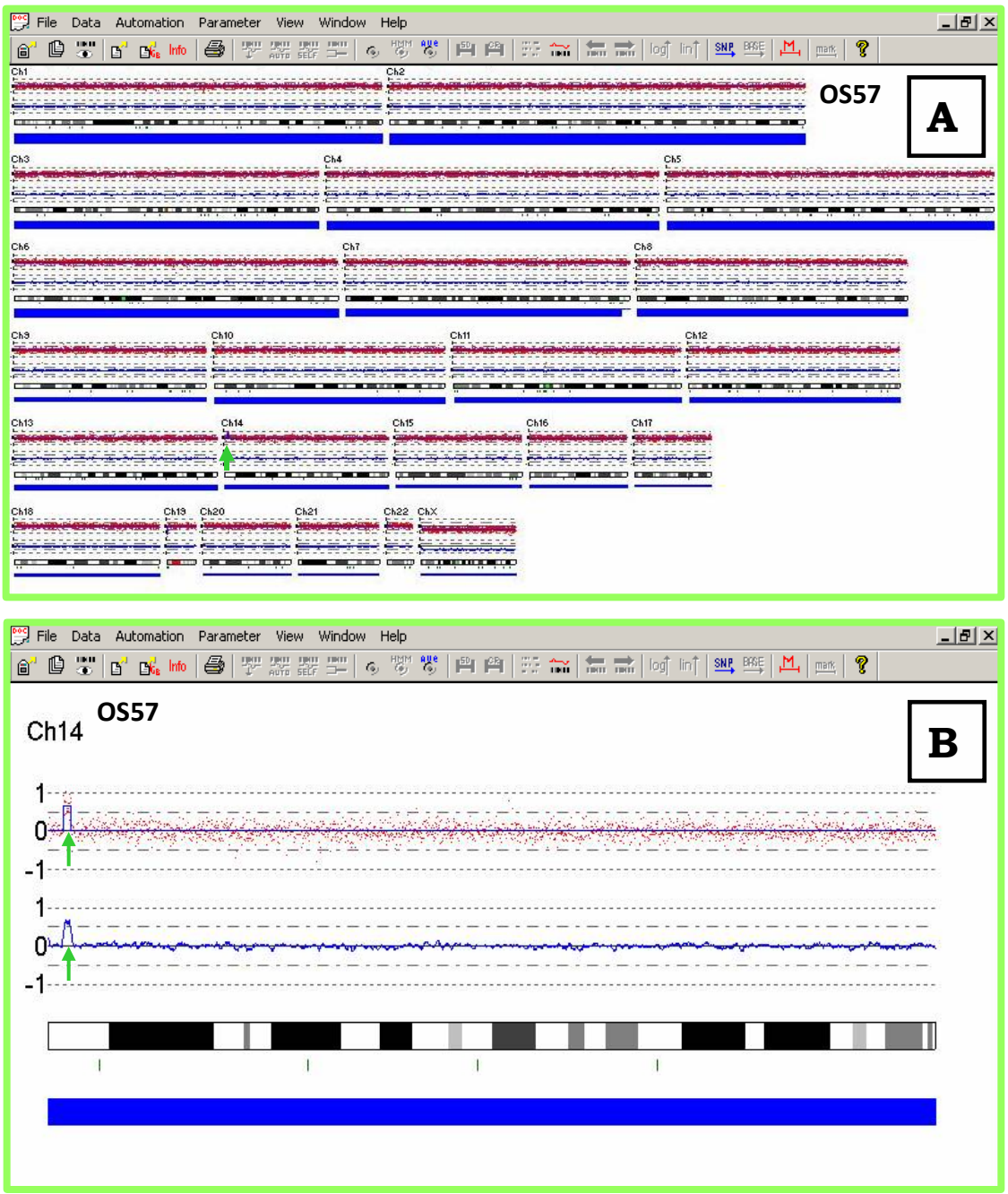

Figura 14: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" no paciente OS57, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, a seta indica alteração no cromossomo 14. (B) Tela de visualização do cromossomo 14, as setas indicam a duplicação em 14q11.2 .

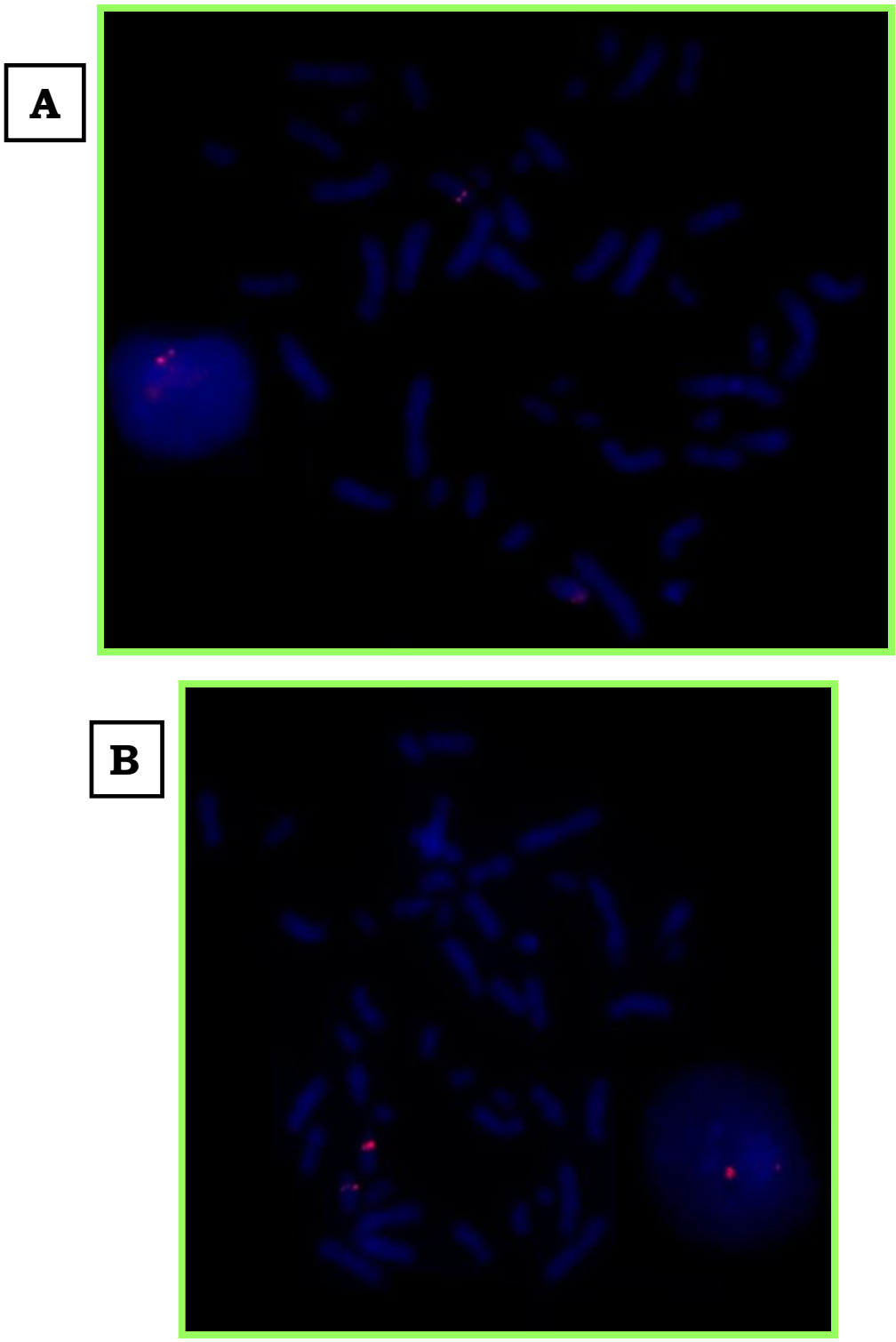

Figura 15: FISH do paciente OS57. (A) utilizando a sonda RP11- 98N22 , os dois cromossomos 14 estão marcados com a mesma intensidade. (B) utilizando a sonda RP11-84C10, os dois cromossomos 14 estão marcados com intensidades diferentes, assim como em todas as metafases analisadas, evidenciando a duplicação desta região.

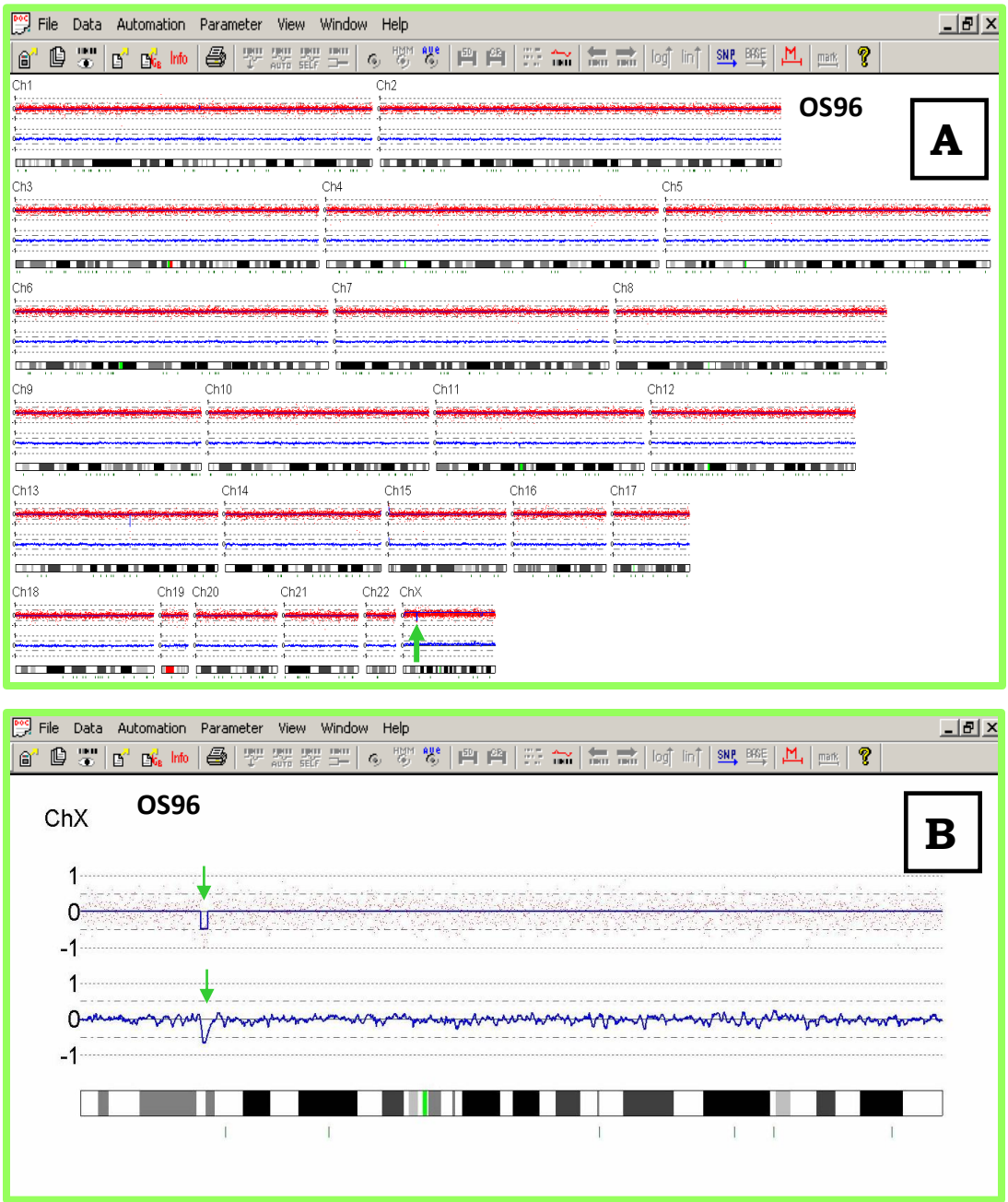

Figura 16: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" na paciente OS96, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, a seta indica alteração no cromossomo X. (B) Tela de visualização do cromossomo X, as setas indicam a deleção em Xp22.13–p22.12.

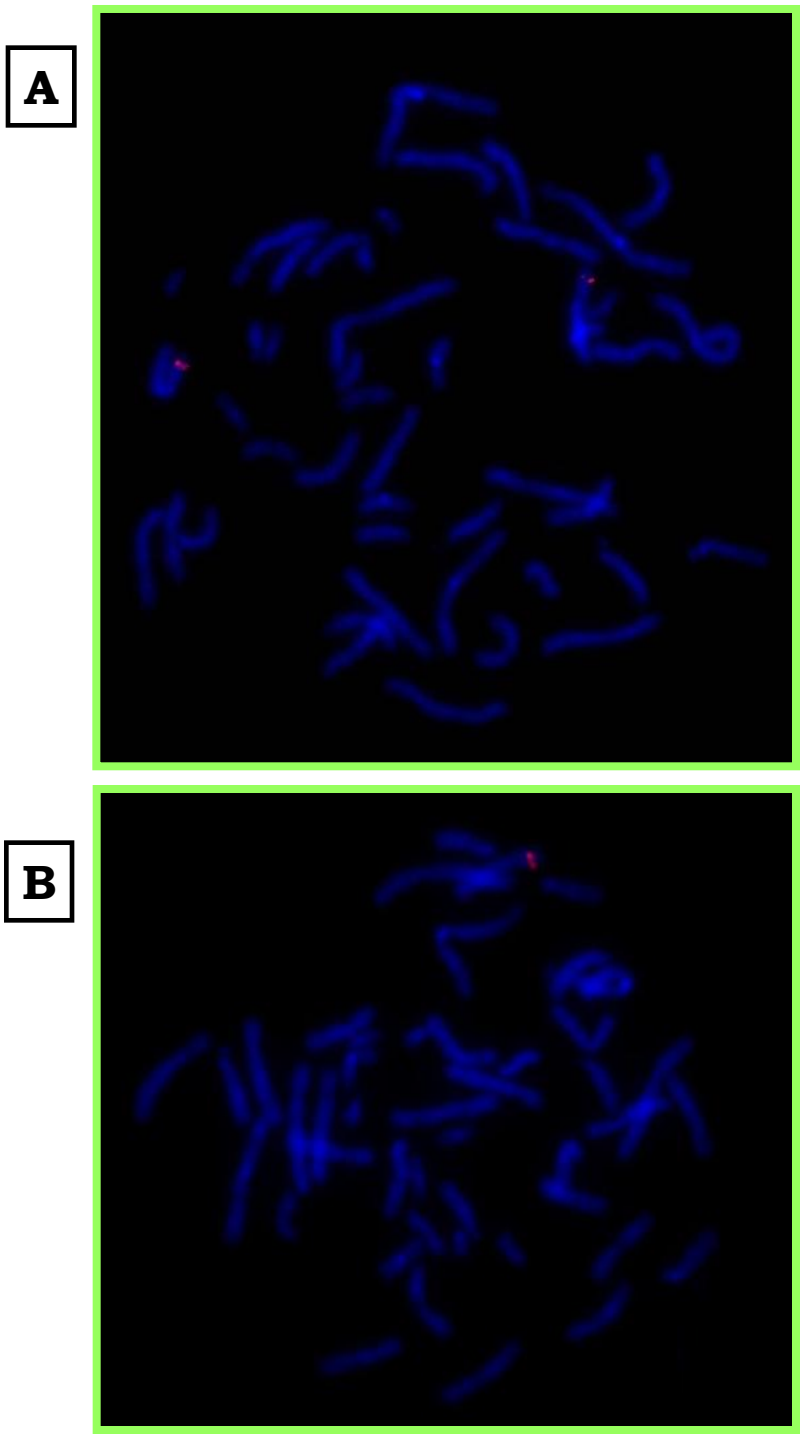

Figura 17: FISH da paciente OS96. (A) utilizando a sonda RP11-431J24, os dois cromossomos X estão marcados. (B) utilizando a sonda RP11- 421K1, apenas uma marcacao é observada evidenciando a ausência desta região em um dos cromossomos X.

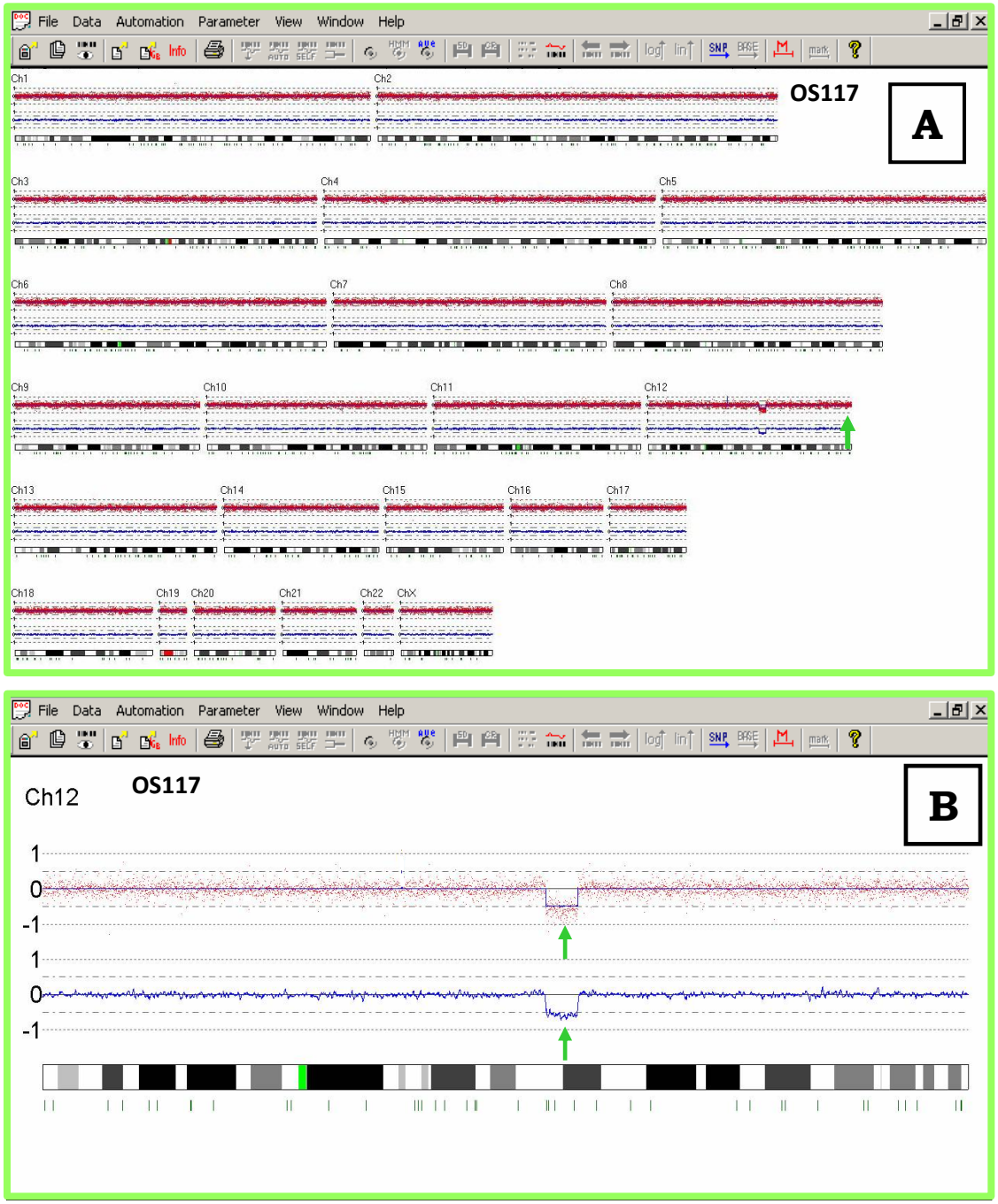

Figura 18: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" na paciente OS117, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, a seta indica alteração no cromossomo 12. (B) Tela de visualização do cromossomo 12, as setas indicam a deleção em 12q15–q21.1.

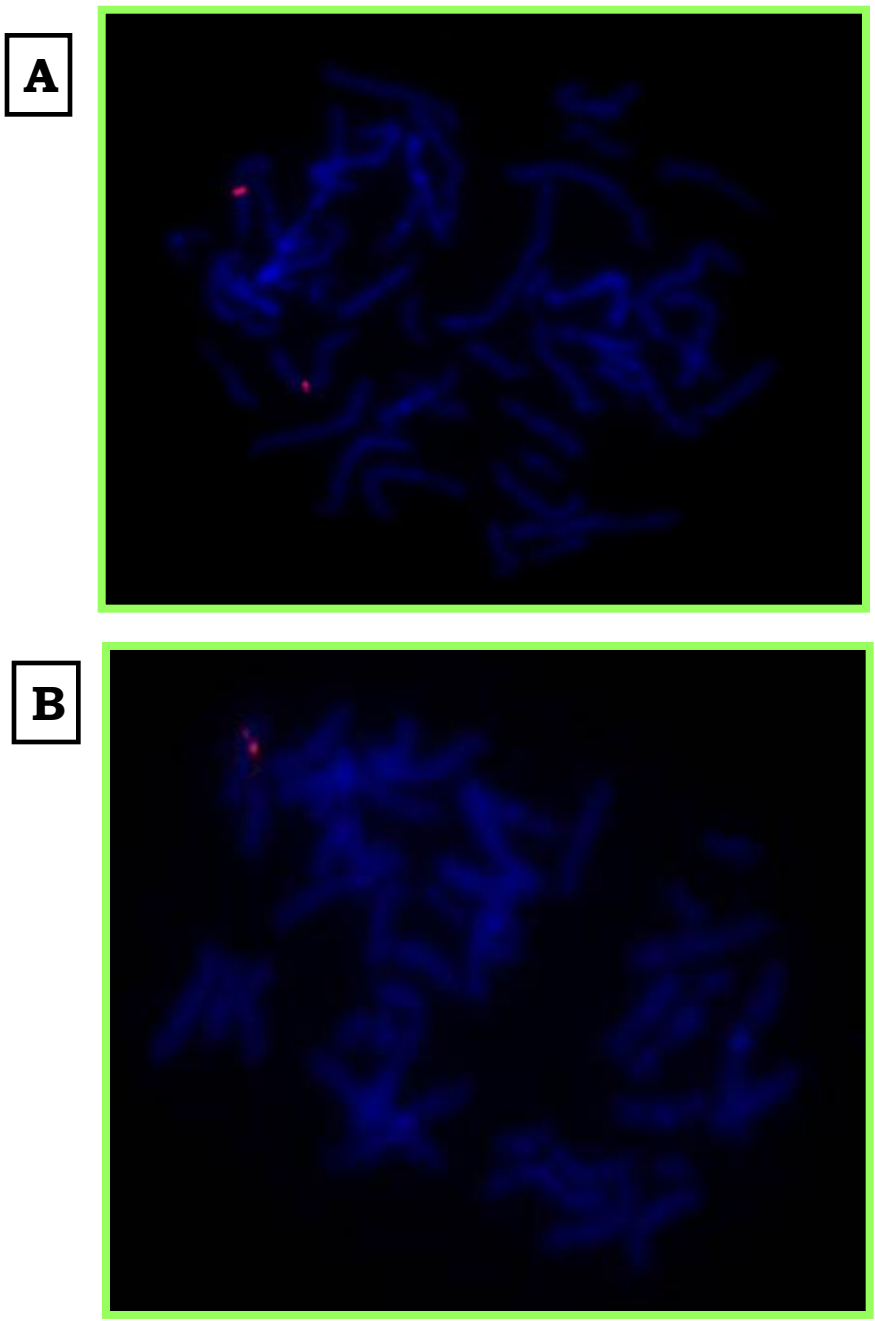

Figura 19: FISH da paciente OS117. (A) utilizando a sonda RP11- 444B24 , os dois cromossomos 12 estão marcados. (B) utilizando a sonda RP11- 11G4, apenas uma marcacao é observada evidenciando a ausência desta região em um dos cromossomos 12.

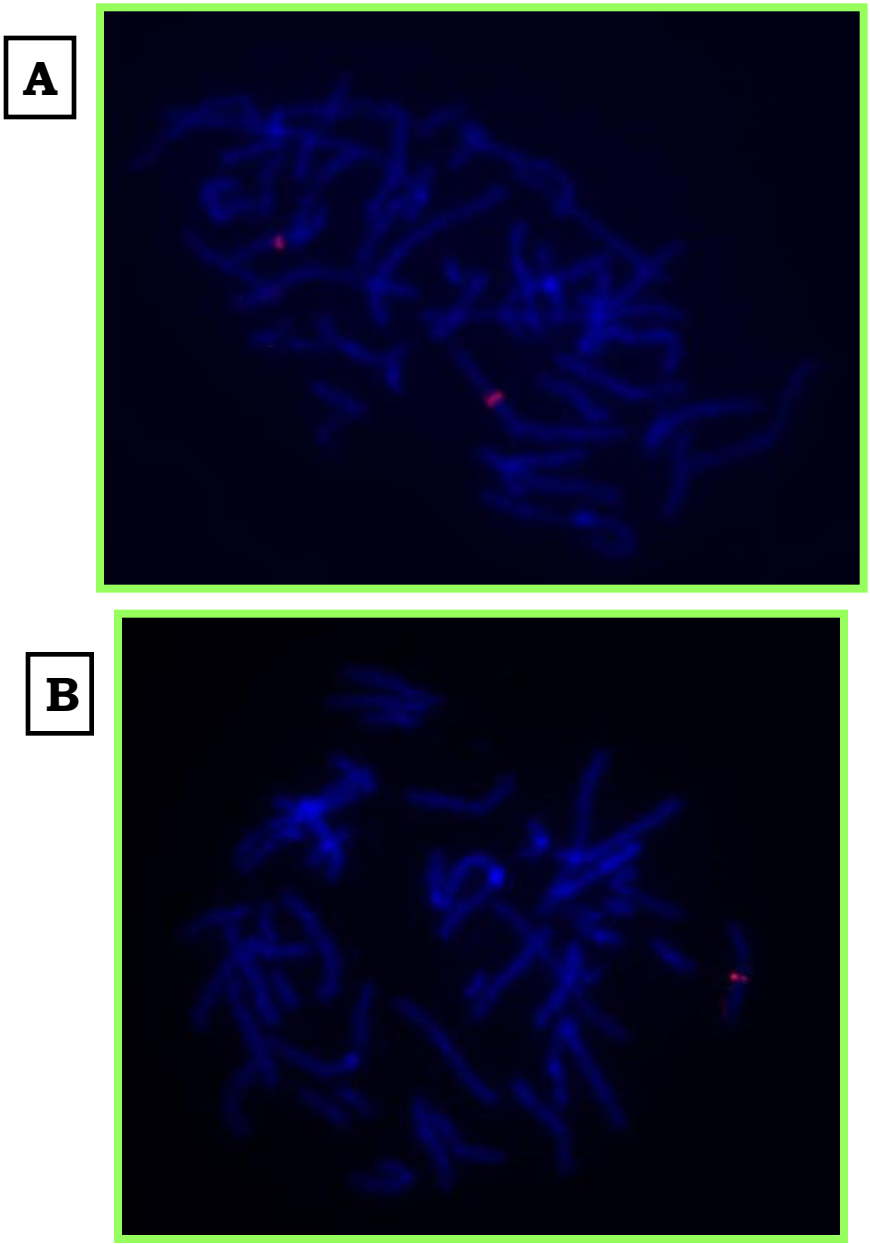

Figura 20: FISH da paciente OS118. (A) utilizando a sonda RP11- 444B24 , os dois cromossomos 12 estão marcados. (B) utilizando a sonda RP11- 11G4, apenas uma marcacao é observada evidenciando a ausência desta região em um dos cromossomos 12.

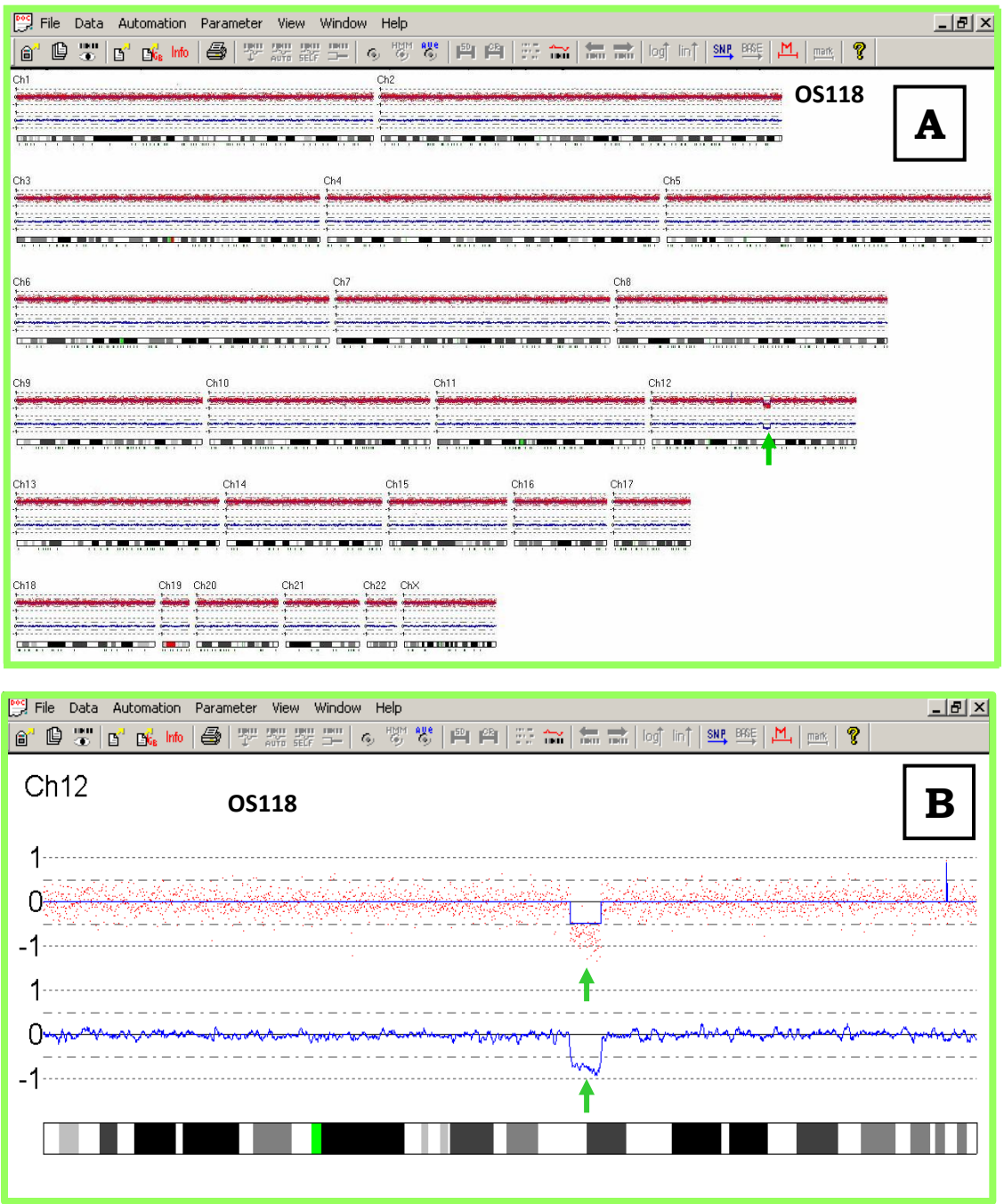

Figura 21: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" na paciente OS118, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, a seta indica alteração no cromossomo 12. (B) Tela de visualização do cromossomo 12, as setas indicam a deleção em 12q15–q21.1.

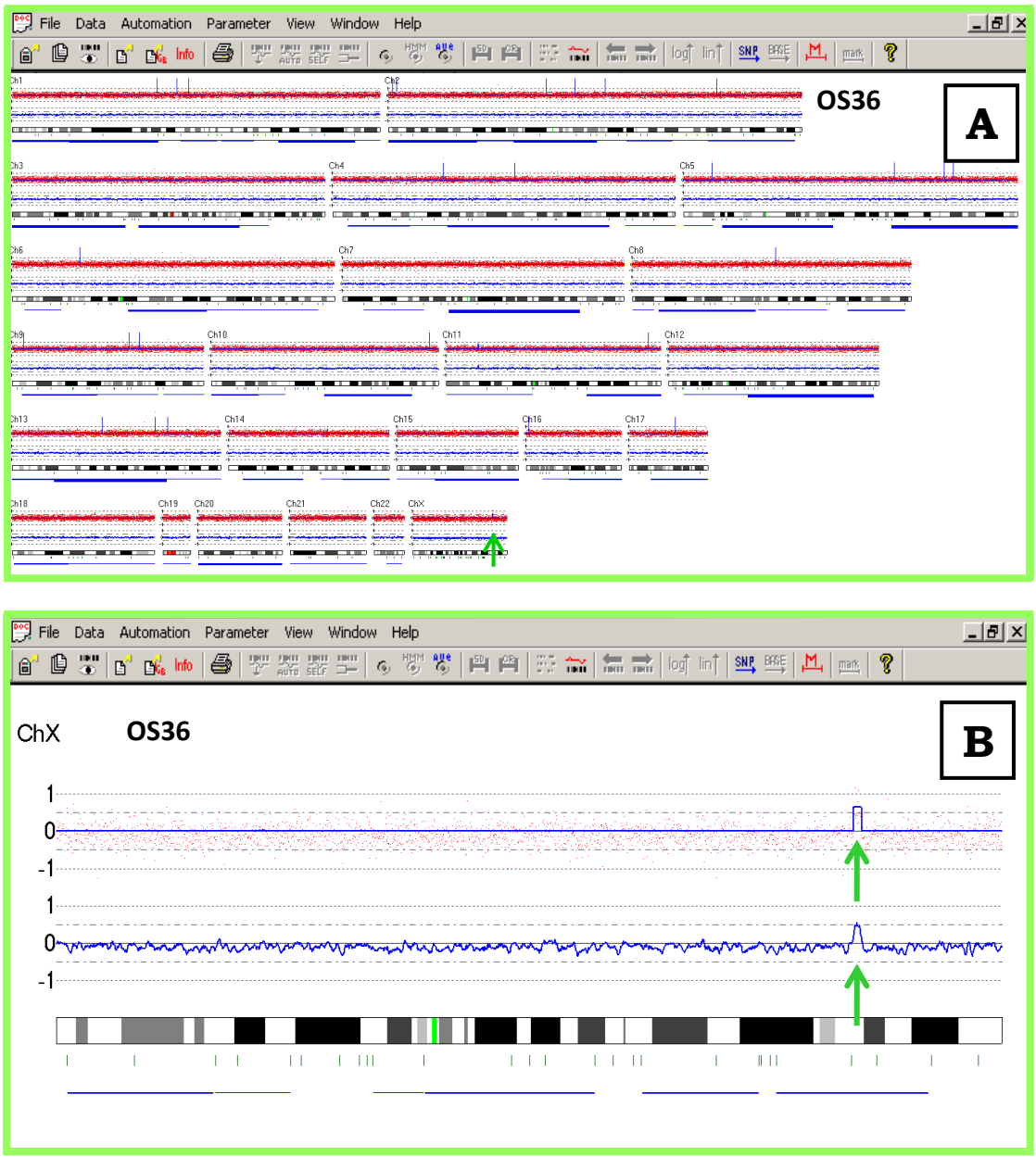

Figura 22: Analise do array "The GeneChip® Mapping 100K Set" no paciente OS36, utilizando o software especifico para análise de número de cópias. (A) Tela de visualização de todos os cromossomos, a seta indica alteração no cromossomo X. (B) Tela de visualização do cromossomo X, as setas indicam a duplicação em Xq28.

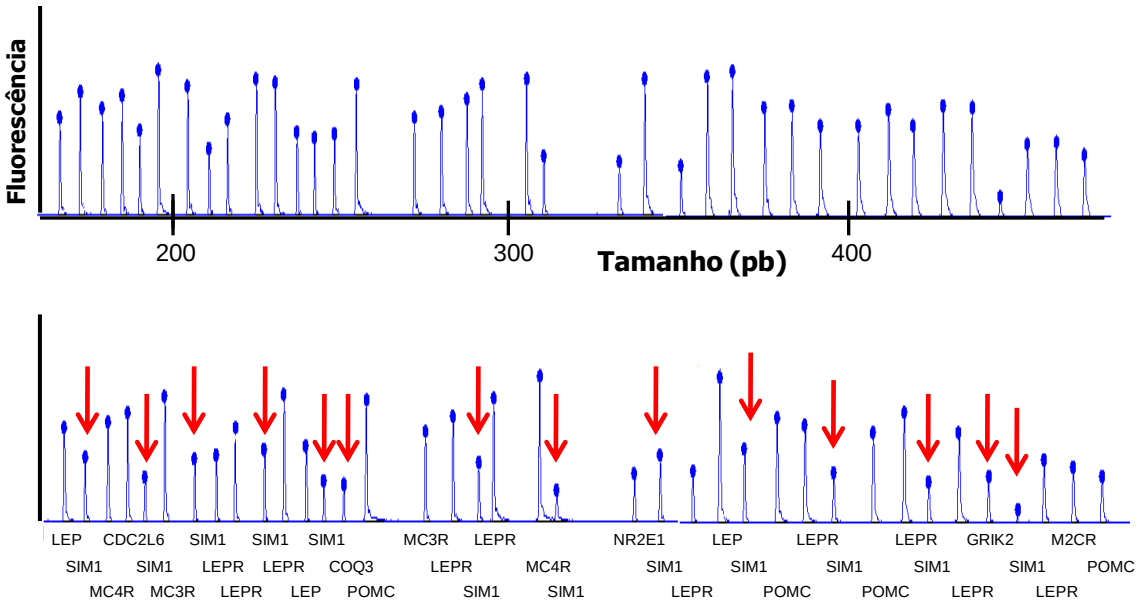

Figura 23: Análise de MLPA com o software Fragment Profiler utilizando o "P220 Obesity MLPA kit". (A) DNA controle (B) DNA do paciente OS18. Comparada à reação controle, o pico de área relativo do produto de amplificação das sondas da região *SIM1* está diminuido em ~ 35-50% no DNA genômico do paciente (setas).

Tabela 11: Testes realizados em cada paciente estudado.

Paciente	Sexo	MLPA Sub	MLPA MRX	MLPA MECP2	MLPA 3p25	MLPA 6q16	SNP Array
OS1	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS2	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS3	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS4	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS5	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS6	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS7	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS8	M	Normal	Normal	Normal	-	-	-
OS9	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS10	M	Normal	Normal	Normal	-	-	-
OS11	F	Normal	-	-	-	-	-
OS12	M	Normal	Normal	-			-
OS13	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS14	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS15	F	(del 1p)	-	-	-	-	-
OS16	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS17	F	Normal	-	-	-	-	-
OS18	M	Normal	Normal	Normal	Normal	del *SIM1*	del6(q16.1-q21)
OS19	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS20	F	Normal	-	-	-	-	-
OS21	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS22	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS23	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS24	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS25	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS26	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS27	M	Normal	Normal	-	-	-	Normal
OS28	M	Normal	Normal	-	-	-	-

Tabela 11: Continuação.

Paciente	Sexo	MLPA Sub	MLPA MRX	MLPA MECP2	MLPA 3p25	MLPA 6q16	SNP Array
OS29	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS30	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS31	F	Normal	-	-	-	-	-
OS32	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS33	F	Normal	-	-	-	Normal	-
OS34	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS35	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS36	M	Normal	Normal	-	-	-	dupX(q26.3)
OS37	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS38	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS39	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS40	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS41	F	Normal	-	-	-	-	-
OS42	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS43	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS44	M	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	-
OS45	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS46	M	Normal	Normal	-	-	Normal	-
OS47	F	Normal	-	-	-	-	-
OS48	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS49	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS50	M	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	-
OS51	F	Normal	-	-	-	-	-
OS52	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS53	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS54	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS55	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS56	M	Normal	Normal	-	-	-	-

Tabela 11: Continuação.

Paciente	Sexo	MLPA Sub	MLPA MRX	MLPA MECP2	MLPA 3p25	MLPA 6q16	SNP Array
OS57	M	Normal	Normal	-	-	-	dup14(q11.2)
OS58	M	Normal	Normal	-	-	-	Normal
OS59	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS60	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS61	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS62	M	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	-
OS63	F	(del2p)	-	-	-	-	del2(p25.3→pter)
OS64	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS65	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS66	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS67	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS68	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS69	M	Normal	Normal	Normal	-	-	-
OS70	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS71	M	Normal	Normal	Normal	-	-	-
OS72	F	Normal	-	-	-	-	-
OS73	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS74	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS75	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS76	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS77	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS78	F	Normal	-	-	-	-	-
OS79	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS80	M	(del3p, dup11q)	-	-	-	-	del3(p26.3→pter) , dup11(q22.3→qter)
OS81	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS82	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS83	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS84	F	Normal	-	-	-	-	-

Tabela 11: Continuação.

Paciente	Sexo	MLPA Sub	MLPA MRX	MLPA MECP2	MLPA 3p25	MLPA 6q16	SNP Array
OS85	M	Normal	Normal	Normal	-	-	-
OS86	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS87	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS88	F	Normal	-	-	-	-	-
OS89	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS90	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS91	F	Normal	-	-	-	-	-
OS92	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS93	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS94	F	Normal	-	-	-	-	-
OS95	M	Normal	Normal	Normal	-	-	-
OS96	F	Normal	-	-	-	-	delX(p22.13–p22.12)
OS97	F	Normal	-	-	-	-	-
OS98	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS99	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS100	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS101	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS102	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS103	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS104	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS105	F	Normal	-	-	-	-	-
OS106	F	Normal	-	-	-	-	-
OS107	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS108	F	del1p	-	-	-	-	-
OS109	F	Normal	-	-	-	-	-
OS110	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS111	F	Normal	-	-	-	-	-
OS112	M	Normal	Normal	-	-	-	-

Tabela 11: Continuação.

Paciente	Sexo	MLPA Sub	MLPA MRX	MLPA MECP2	MLPA 3p25	MLPA 6q16	SNP Array
OS113	F	Normal	-	-	-	-	-
OS114	M	Normal	Normal	Normal	-	-	-
OS115	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS116	M	Normal	Normal	Normal	-	Normal	-
OS117	F	Normal	-	-	-	-	del12(q15–q21.1)
OS118	F	Normal	-	-	-	-	del12(q15–q21.1)
OS119	F	Normal	-	-	-	-	-
OS120	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS121	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS122	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS123	F	Normal	-	-	-	-	-
OS124	F	Normal	-	-	-	-	-
OS125	F	Normal	-	-		-	-
OS126	F	Normal	-	-	-	-	-
OS127	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS128	F	Normal	-	-	Normal	Normal	-
OS129	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS130	F	Normal	-	-	-	Normal	-
OS131	F	Normal	-	-	-	-	-
OS132	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS133	M	Normal	Normal	-	-	-	Normal
OS134	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS135	M	Normal	Normal	-	-	-	-
OS136	M	Normal	Normal	-	-	-	Normal
OS137	F	Normal	-	-	-	Normal	-
OS138	F	Normal	-	-	-	-	Normal
OS139	F	Normal	-	-	-	Normal	-
OS140	M	Normal	Normal	-	Normal	Normal	-
OS141	F	Normal	-	-	-	-	-

OS15

OS18

OS57

OS63

OS80

OS108

OS117 e OS118

Figura 24: Fotos de pacientes que apresentaram alteracoes cromossômicas.

V – Discussão

Os pré-requisitos estabelecidos para a inclusão de pacientes no presente estudo foram: atraso do DNPM e/ou dificuldade de aprendizado, distúrbios de comportamento, obesidade e/ou hiperfagia. Para a análise com SNP-array foram selecionados pacientes que apresentavam também algum tipo de malformação como microcefalia, orelhas de baixa implantação, fosseta pré-auricular bilateral, braquicefalia, prognatismo, extremidades curtas, clinodactilia de 5º dedo das mãos, mamilos invertidos, implantação anormal dos artelhos, criptoorquidia.

A associação entre distúrbios de comportamento com obesidade e/ou hiperfagia (Fyffe *et al.,* 2008; Gropman *et al.,* 2007; Tarpey *et al.,* 2007) tem nos chamado a atenção porque a nossa experiência com síndromes genéticas relacionadas com obesidade também apontam na direção de uma origem genética comum para estas características. Por exemplo, na pesquisa de genes ou segmentos cromossômicos envolvidos com obesidade sindrômica desenvolvida em nosso laboratório, já tínhamos descrito a deleção 6q16.2, incluindo o gene *SIM1*, em um paciente com agressividade (Varela *et al.,* 2006), um paciente com síndrome da deleção 22q11.2 associada com agressividade (D'Angelo *et al.,* 2007), e três pacientes com síndrome de Smith-Magenis na qual ocorre um padrão específico de comportamento auto-agressivo. Além disso, comportamentos

de (auto) agressão são freqüentes em pacientes com a monossomia 1p36 e, estão em alguns casos associados com obesidade e hiperfagia.

Mais de vinte e cinco formas sindrômicas de obesidade já foram identificadas e a localização de genes e/ou segmentos cromossômicos envolvidos com obesidade sindrômica são uma potencial fonte de esclarecimento das causas das formas comuns de obesidade.

V.1 - Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Utilizamos como ferramenta principal neste estudo a técnica de MLPA para a investigação de alterações no número de cópias de segmentos cromossômicos (Tabela 11, pág 84).

A última década foi marcada pelo intensivo desenvolvimento e aplicação de ferramentas de "screening" genômico no estudo etiológico do retardo mental inespecífico (RMI). Recentemente desenvolvida, a técnica de MLPA além de apresentar ampla aplicabilidade e baixo custo, tem se mostrado promissora no diagnóstico de pacientes com alterações submicroscópicas (Schouten *et al.,* 2002; Rooms *et al.,* 2005).

Estudos revelaram que rearranjos subteloméricos crípticos são responsáveis por uma proporção considerável de casos de RM inespecífico, associado ou não a dismorfismos e/ou anomalias congênitas (Flint and Knight, 2003), portanto todos os pacientes foram analisados com o kit de MLPA para estudo das regiões subteloméricas. Dentre os pacientes estudados, 137 deles apresentaram resultado normal e 4 apresentaram alterações, o que corresponde a 3% da amostra estudada. Foi encontrada

uma deleção no braço curto do cromossomo 2, duas deleções no braço curto do cromossomo 1 e uma deleção no braço curto do cromossomo 3 e duplicação no braço longo do cromossomo 11. Um estudo em 624 pacientes com retardo mental inespecífico e/ou malformações congênitas pela mesma técnica, revelou 34 alterações, 5,4% da amostra, sendo 11 duplicações, 18 deleções e 5 translocações não equilibradas, resultando em deleção e duplicação (Ruiter *et al.*, 2007). O fato de a característica obesidade ter sido condicional para a inclusão do paciente em nossa amostra pode ser a explicação para a quantidade menor de alterações encontradas no nosso estudo em relação à literatura.

Os kits de MLPA para estudo de retardo mental ligado ao cromossomo X e do gene *MECP2* não foram eficazes na detecção de alterações em nossos pacientes com obesidade. Já os kits "PPARG" e "Obesity" foram confeccionados para o estudo da obesidade, porém nenhum de nossos pacientes testados apresentou alteração.

V.2 - *SNP Array*

No transcorrer de nosso projeto a técnica de SNP array com o kit "The GeneChip® Mapping 100K Set" da Affymetrix se tornou disponível. Foram então, escolhidos 19 pacientes que apresentavam além de atraso do DNPM e/ou dificuldade de aprendizado, distúrbios de comportamento, obesidade e/ou hiperfagia, outro sinal ao exame físico que sugerisse alteração cromossômica.

O estudo genômico por microarray tem sido eficaz na detecção de alterações genéticas em pacientes com retardo mental e malformações congênitas. Vários casos de "novas síndromes" foram encontrados, sugerindo que elas são mais comuns do que se pensava e coletivamente são susceptíveis de ser uma das principais causas de retardo mental. O emprego desta técnica revelou o potencial para fazer diagnósticos genéticos que não eram evidentes na apresentação clínica dos pacientes (Ming *et al.,* 2006). Um estudo realizado em 117 pacientes com retardo mental e malformações congênitas demonstrou a viabilidade de se substituir testes específicos, que consomem bastante tempo, pela análise por microarray, que teoricamente deve detectar todas as síndromes conhecidas que apresentam variação no numero de cópias, assim como novas síndromes (Bruno *et al.,* 2008).

Dentre os 19 pacientes estudados por array, 6 apresentaram alterações, o que corresponde a 31,5% da amostra estudada. Foram encontradas uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 6, duas deleções intersticiais no braço longo do cromossomo 12 (gêmeas), uma deleção intersticial no braço curto do cromossomo X, uma duplicação intersticial no braço longo do cromossomo 14 e uma duplicação intersticial no braço longo do cromossomo X. Apesar de mais trabalhosa e de ter um custo muito elevado, está técnica se revelou mais eficaz na detecção de variação no numero de cópias em pacientes com obesidade sindrômica.

Alterações levando a ganho e perda de pequenas partes do genoma podem ser detectadas por SNP array, assim como translocações não equilibradas e aneuplodias, porem alterações que não resultam em variação no numero de copias, como as translocações equilibradas não são reveladas por essa técnica. No estudo por SNP - array, milhares de sondas podem ser investigadas simultaneamente, promovendo uma cobertura parcial ou até total do genoma, enquanto que pelo MLPA o número de sondas se limita a menos de 60 por experimento, porém, até 96 amostras podem ser estudadas simultaneamente pelo custo menor do que apenas um teste de *array*.

Um estudo realizado por Krick *et al.,* (2007) analisou 58 pacientes com atraso de DNPM, pelas técnicas de array-CGH (Hibridação comparativa de genomas em *arrays*) e de MLPA. Quatorze alterações foram detectadas pela análise por *array* nos 58 pacientes, enquanto que o estudo por MLPA identificou oito alterações, sendo que duas delas diferentes das detectadas por *array*, pois eram muito pequenas. Portanto, a análise por MLPA, apesar de cobrir aproximadamente 2% das sondas estudadas pelo *array,* detectou 50% das alterações encontradas (8/16).

O estudo por MLPA leva pouco tempo e não é muito trabalhoso, qualidades que tornam esta técnica mais adequada para um “screening” inicial de um grande numero de pacientes, alem de já existirem muitos kits de MPLA disponíveis para variados tipos de estudos.

V.3 - Pacientes com síndrome de monossomia 1p36

As características clínicas presentes nas pacientes OS15 e OS108, atraso de DNPM, obesidade, hiperfagia, hipotonia, dificuldade de alimentação e distúrbios de comportamento, também estão presentes em outra paciente com síndrome de monossomia 1p36 estudada em nosso laboratório (D´Angelo *et al.,* 2006) e estão de acordo com o descrito na literatura.

O estudo dos pontos de quebra em pacientes com síndrome de monossomia 1p36 realizado em nosso laboratório revelou que os quatro pacientes com obesidade e hiperfagia e monossomia 1p36 apresentam deleções compreendidas entre 2.0-3.0 Mb do telômero de 1p. Portanto, sugerimos que a região distal de 2-3 Mb de 1p seja crítica para a manifestação de obesidade e hiperfagia (D'Angelo *et al.,* 2010). Indicamos três genes mapeados neste intervalo que estão implicados com o desenvolvimento e manutenção neural: *HES5, PRKCZ,* que está envolvido também com a via sinalizadora de insulina e o gene *PLCH2,* que tem função nos processos metabólicos de lipídios.

V.4 - Paciente OS63

A análise por array do paciente OS63 revelou que a deleção no cromossomo 2 (p25.3→pter) é de 3,1Mb.

Vários genes conhecidos estão localizados no segmento deletado (figura 25), entre eles, destacamos o gene da tireóide peroxidase (*TPO*). Este gene tem um papel central na glândula tireoidiana, pois a enzima catalisa duas importantes reações envolvidas na síntese do hormônio tireoidiano. A ausência de um dos alelos desse gene pode estar relacionada com a obesidade presente em nossa paciente. O gene da proopiomelanocortina (*POMC),* já conhecido por estar envolvido com o metabolismo energético e por correlacionar obesidade e hiperfagia em humanos com o segmento 2p, está localizado em 2p23.3, portanto não se encontra deletado em nosso paciente.

Figura 25: Ideograma do cromossomo 2 indicando a área deletada, com a ilustração dos genes deletados dessa região, retirada do Ensemble Genome Browser em 03/2010. O gene *TPO* está circulado.

A monossomia do braço curto do cromossomo 2 é rara e apenas alguns casos foram relatados anteriormente. Dee *et al.,* (2001) descreveram um paciente com cromossomo 2 em anel e microdeleção de 2p, que apresentava retardo mental, retardo de crescimento, microcefalia e dismorfismos leves. Czako *et al.,* (2004), descreveram um paciente com

deleção terminal de 2p e duplicação parcial de 17q, derivadas de uma translocação recíproca paterna, 46,XY,t(2;17), que apresentava trigonocefalia, palato fendido, criptoorquidia e hipotonia grave. Deleções subtelomericas em 2p foram relatadas em dois casos, uma paciente que apresentava fenótipo da síndrome de Angelman e o outro, um menino com atraso de DNPM e dismorfismos faciais (Ravnan, *et al.,* 2006). Gruchy *et al.,* (2007), descreveram uma paciente com duplicação invertida e deleção terminal em 2p, que apresentava RM grave, testa proeminente, hipertelorismo, orelhas de baixa implantação, escoliose e problemas cardiacos. Obesidade não foi citada em nenhum dos casos.

V.5 - Paciente OS80

A análise por array do paciente OS80 revelou que a deleção no cromossomo 3 (p26.3→pter) é de 1,27Mb.

A região terminal do cromossomo 3 possui vários genes (figura 26), sendo os mais notáveis *GHRL*, *OXTR*, GABA e *PPARG,* relacionados a obesidade, lipodistrofia, diabetes e problemas de comportamento (Bittel *et al.,* 2006).

A deleção distal 3p é relativamente rara, menos de 30 casos foram descritos. Malmgren *et al.,* (2007) descreveram três casos com deleção distal 3p, nos quais o tamanho da deleção foi estimado em aproximadamente 11Mb; as características fenotípicas presentes: microcefalia, micrognatismo, hipotonia, atraso de DNPM e fáceis característico, também estão presentes em nosso paciente e

provavelmente estão relacionadas com a deleção encontrada. Essas características também foram descritas para um paciente com deleção distal 3p de aproximadamente 4,5Mb (Cargile *et al.*, 2002). Entretanto, Hoo *et al.*,(2008) sugeriram que a deleção distal do braço curto do cromossomo 3 não está necessariamente associada a dismorfismos e atraso de DNPM. Um paciente com deleção terminal 3p e duplicação 21q, derivadas um translocação recíproca t(3;21) e aparentemente normal foi descrito por Gijsbers *et al.*, (2010). Os genes *CHL1* e *CNTN6*, localizados na região terminal do cromossomo 3, estão deletados no nosso paciente, são expressos no cérebro e podem ser responsáveis pelo retardo mental.

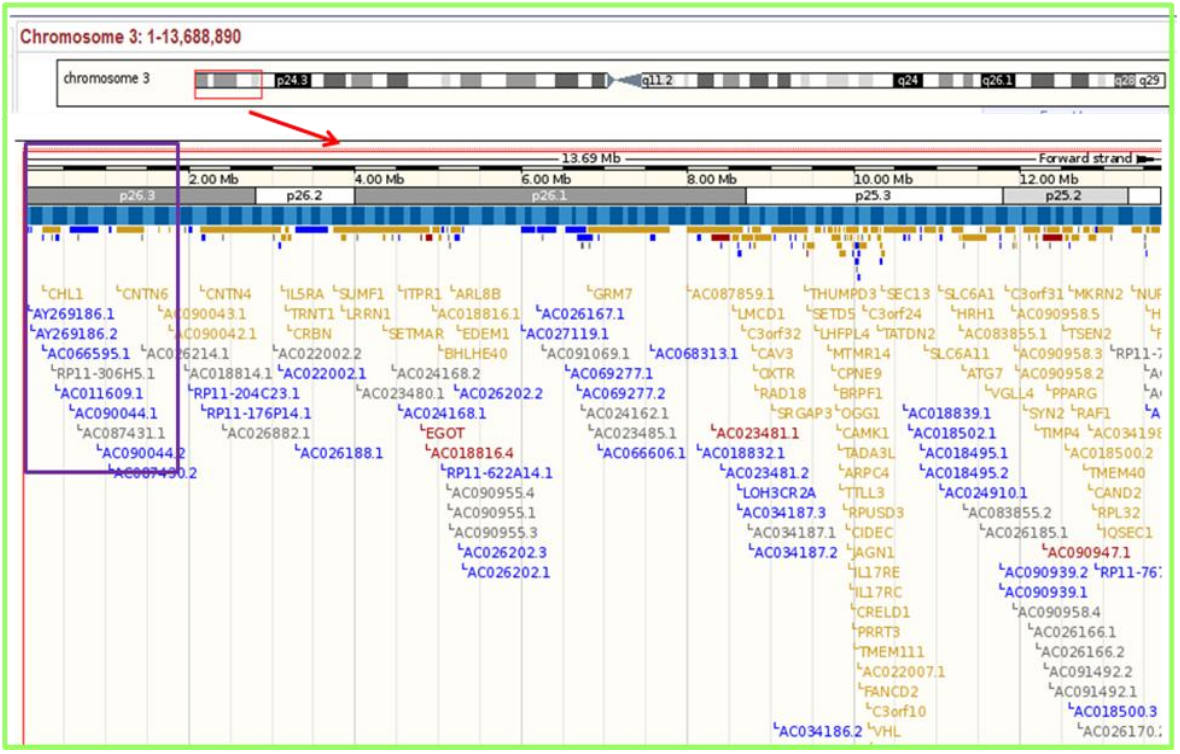

Figura 26: Ideograma do cromossomo 3 indicando a área deletada (delimitada em roxo), com a ilustração dos genes presentes na região terminal do cromossomo 3, retirada do Ensemble Genome Browser em 03/2010.

A duplicação no cromossomo 11 (q22.3→qter) é de 28,42Mb e compreende mais de 100 genes conhecidos (Figura 27), o que dificulta determinar os genes que contribuíram para determinar o fenótipo. Destacamos o gene *DRD2,* que apresenta pelo menos cinco associações positivas com fenótipos relacionados à obesidade (Walley *et al.*, 2006). Este gene é associado ao peso corporal e seu alelo A1 pode ser um marcador genético de uma condição psicológica em pessoas com alto risco de desenvolver distúrbios alimentares (Nisoli *et al.,* 2007). O gene *RAB39*, também deletado em nosso paciente, pertence a família de genes *RAB*, que codificam a proteína guanosina triphosphatase (GTPase), que está envolvida em um processo chamado tráfego de vesículas, que transporta materiais entre células e são da mesma família do gene *RAB23*, associado a obesidade na síndrome de Carpenter, que tem como principais características: craniossinostose, polidactilia, obesidade e problemas cardíacos. A descoberta de mutações no *RAB23* em pacientes com a Síndrome de Carpenter foi um achado inesperado e fornece um novo alvo para estudos da obesidade (Jenkins *et al.,* 2007). O gene *FDX1* participa na síntese de hormônios da tireóide. O gene *UBE4A* também esta localizado na região deletada e pertence à mesma família do gene *UBE3A*, responsável pela síndrome de Angelman, que possui retardo mental, atraso grave de DNPM, deficiência da fala, convulsões e microcefalia entre suas características.

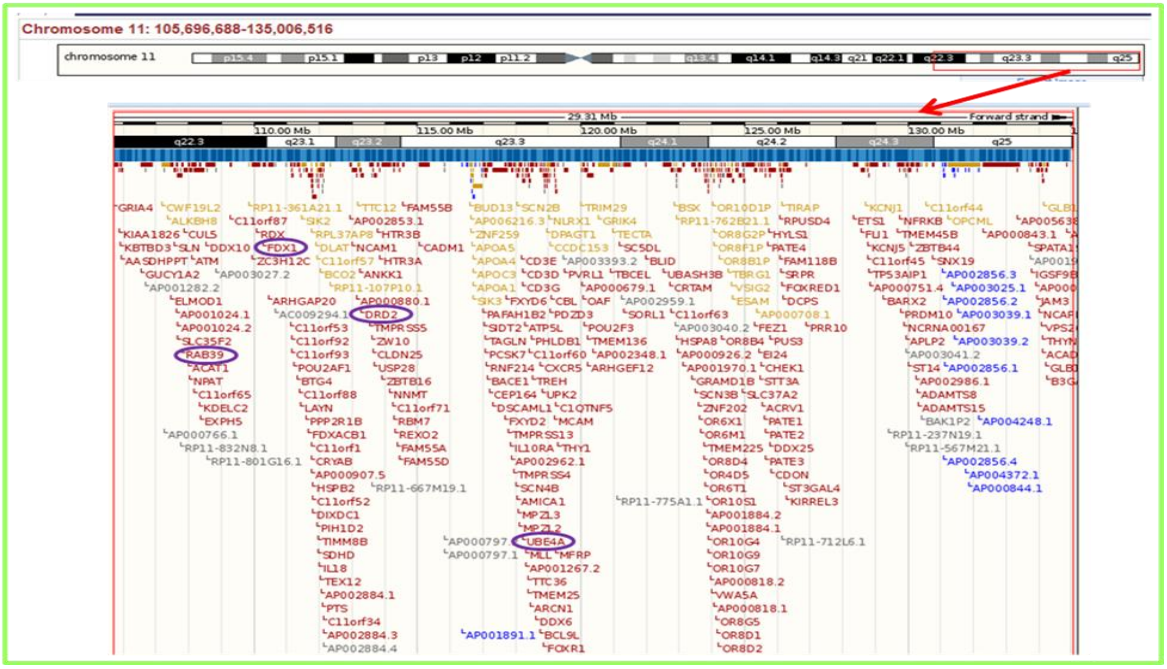

Figura 27: Ideograma do cromossomo 11 indicando a área duplicada, com a ilustração dos genes duplicados dessa região, retirada do Ensemble Genome Browser em 03/2010. Os genes *DRD2, RAB39, FDX1 e UBE4A* estão circulados.

Duplicações do braço longo do cromossomo 11 são muito raras e geralmente estão associadas a deleções de outros autossomos em decorrência de translocações recíprocas presentes em um dos genitores (Zhao *et al.*, 2003). A trissomia parcial 11q tem um fenótipo muito variável e as principais características descritas para esta trissomia são: retardo mental, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência de crescimento pré e pós- natal, hipotonia, microcefalia, assimetria craniofacial, dismorfismos faciais, hérnia diafragmática congênita, anomalias renais e cardíacas (Klaassens *et al.*, 2006).

V.6 - Paciente OS18

A análise por array do paciente OS18 levou ao diagnóstico de uma deleção intersticial no cromossomo 6 (q16.1-q21) de 13,2Mb. Na pesquisa de genes ou segmentos cromossômicos envolvidos com obesidade sindrômica desenvolvida em nosso laboratório, já tínhamos descrito um paciente com a deleção 6q16 (Varela *et al.*, 2006).

Aproximadamente 100 casos de deleção intersticial, de tamanhos variáveis, no braço longo do cromossomo 6 já foram descritos, sendo 8 deles com fenótipo sugestivo para a síndrome de Prader-Willi. Vários genes conhecidos estão situados na região deletada (Figura 28), inclusive o gene *SIM1*, que também está deletado nos outros pacientes descritos e que é expresso em uma região discreta do hipotálamo, envolvida com controle do consumo de alimentos (Whang *et al.*, 2008). Além do *SIM1*, outros genes mapeados neste intervalo incluem o *MCHR2* que codifica um receptor acoplado à proteína G, com papel importante no controle sobre o comportamento alimentar e o metabolismo energético.

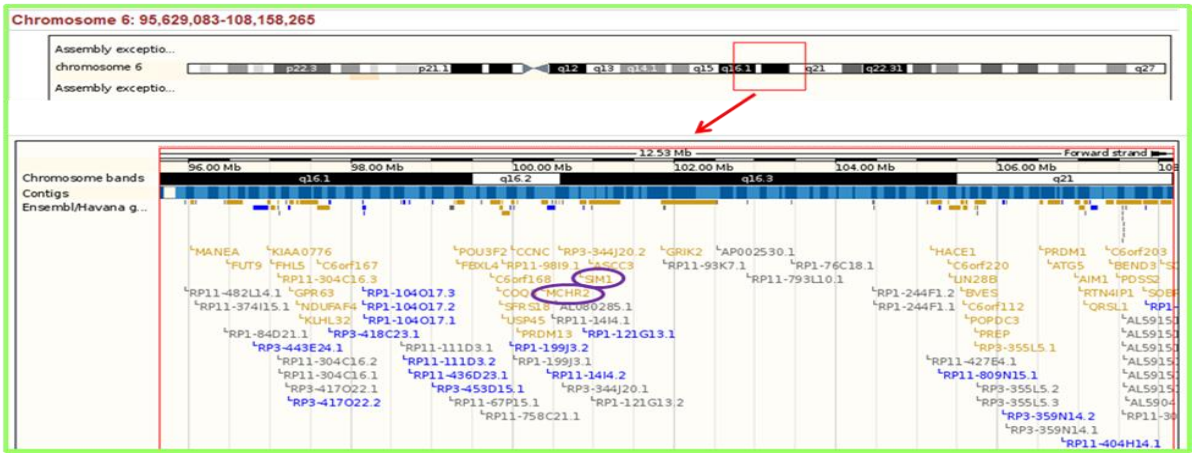

Figura 28: Ideograma do cromossomo 6 indicando a área deletada, com a ilustração dos genes deletados dessa região, retirada do Ensemble Genome Browser em 03/2010. Os genes *SIM1 e MCHR2* estão circulados.

As características clínicas presentes no paciente OS18: hipotonia, atraso de DNPM, dificuldade de aprendizagem, distúrbio de comportamento, problemas de articulação da fala, obesidade, braquicefalia, fronte estreita, orelhas pequenas, mãos pequenas, dedos curtos e afilados nas pontas e implantação anormal dos artelhos, também estão presentes no outro paciente com deleção 6q16 estudado em nosso laboratório e estão de acordo com o descrito na literatura.

Várias observações sugerem que a haploinsuficiência de *SIM1* contribui na obesidade presente em crianças que apresentaram deleção intersticial envolvendo 6q16.2. O nosso paciente reforça as evidencias de que a deleção do gene *SIM1* leva a obesidade.

V.7 - Paciente OS57

A análise por array do paciente OS57 levou ao diagnóstico de uma duplicação intersticial no cromossomo 14 (q11.2) de 1Mb.

Vários genes descritos estão presentes na região duplicada (Figura 29) e o que chama atenção é o gene *RAB2B*, que também pertence a família de genes *RAB*, mesma família do gene *RAB23*, associado a obesidade na síndrome de Carpenter.

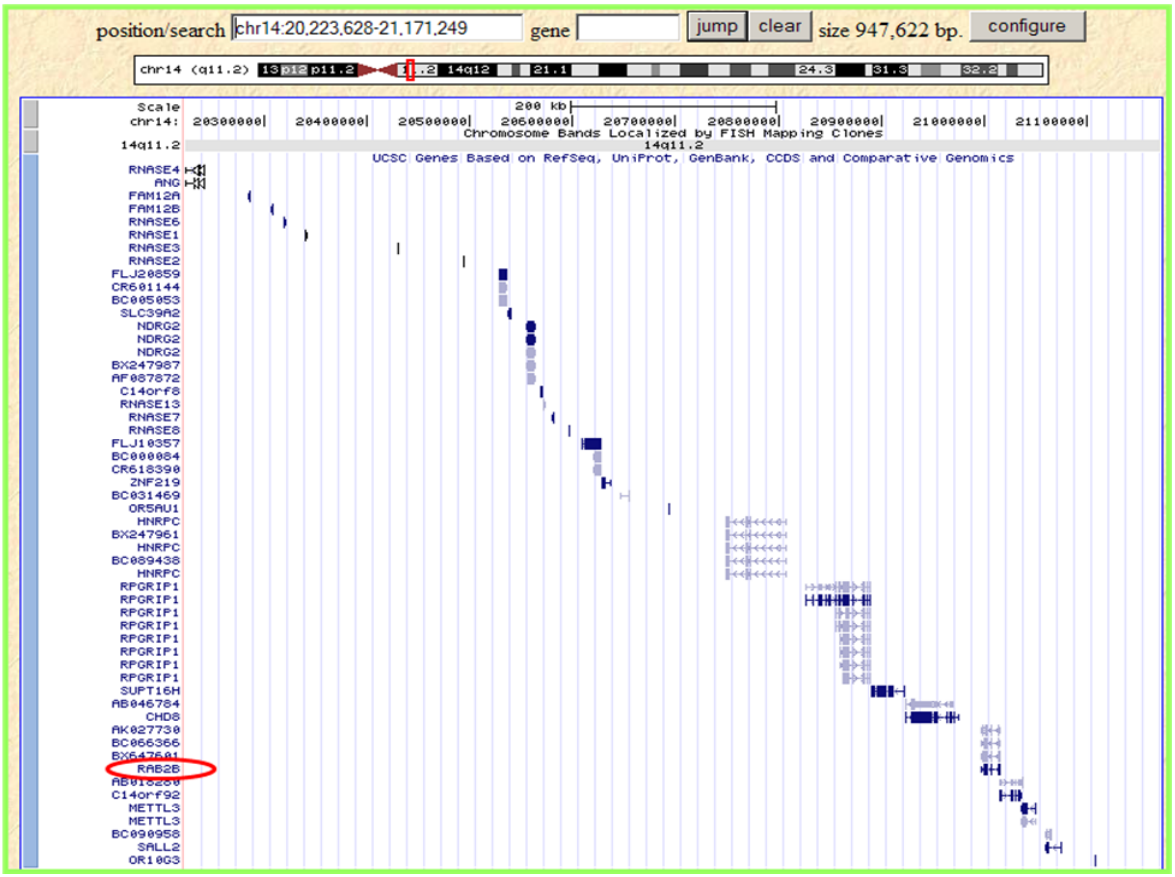

Figura 29: Ideograma do cromossomo 14 indicando a área duplicada, com a ilustração dos genes duplicados dessa região, retirada do *UCSC Genome Browser for Humans* em 03/2010. O gene *RAB2B* está circulado.

Monfort *et al.,* (2007), descreveram um paciente portador de uma duplicação em 14q11.2 de 5,38Mb que apresentava atraso de DNPM, dificuldade de aprendizagem e clinodactilia, características também apresentadas por nosso paciente.

V.8 - Paciente OS96

A análise por array do paciente OS96 levou ao diagnóstico de uma deleção intersticial no cromossomo X (p22.13–p22.12) de 2,6Mb.

Vários genes descritos estão presentes na região deletada (Figura 30), inclusive o gene *CDKL5*. Um estudo em 73 pacientes, sendo 57 do sexo feminino, demonstrou que mutações em *CDKL5* causam espasmos infantis, convulsões e retardo mental grave em pacientes do sexo feminino. Archer *et al.,* (2006) sugeriram que o espectro das crises convulsivas e mudanças no eletroencefalograma em pacientes com mutações *CDKL5* é mais ampla do que previamente descrito e que mutações em *CDKL5* são uma causa significativa de espasmos infantis e início das crises convulsivas em pacientes do sexo feminino, característica também presente em nossa paciente.

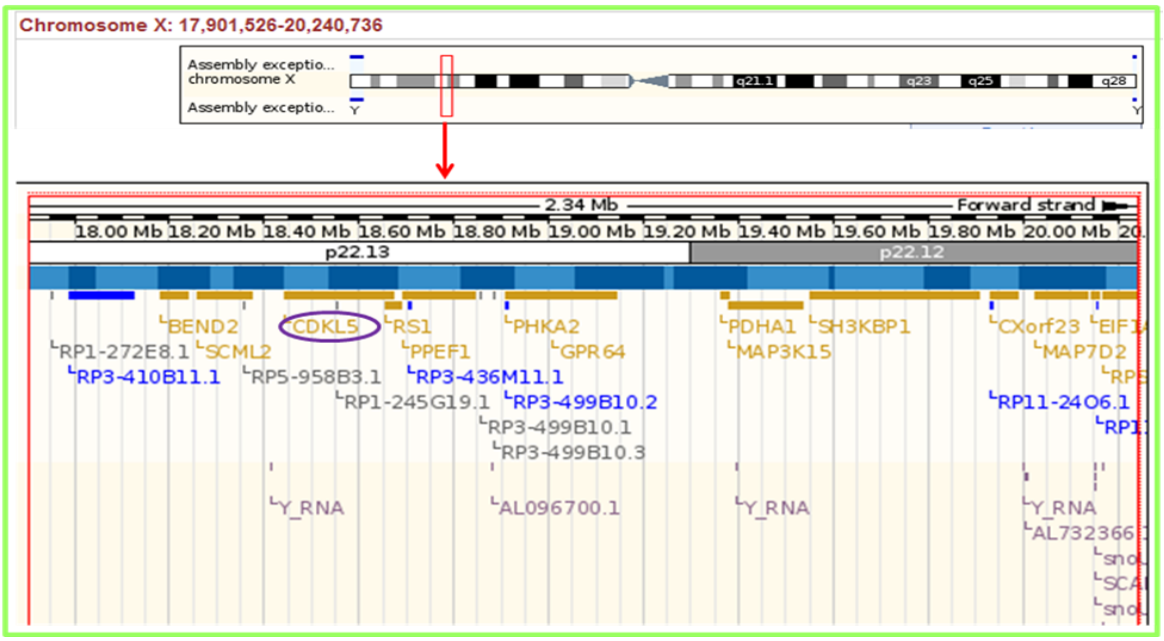

Figura 30: Ideograma do cromossomo X indicando a área deletada, com a ilustração dos genes deletados dessa região, retirada do *Ensemble Genome Browser* em 03/2010. O gene *CDKL5* está circulado.

Muitos pacientes com deleções diferentes em Xp já foram descritos, mas a grande maioria apresenta deleções terminais e apenas uma minoria deleções intersticiais. James *et al.,* (1998), relataram uma paciente com deleção em Xp22.1 e baixa estatura. Lachlan *et al.,* (2006),

descreveram uma paciente com deleção em Xp22.1 que apresentava baixa estatura e obesidade. Mei *et al.,* (2009) descreveram quatro pacientes com deleções em Xp22, que compreendiam o gene *CDKL5*, que apresentavam epilepsia precoce, com espasmos infantis e crises convulsivas. Vazna *et al.,* (2010), relataram uma paciente com uma deleção intersticial X(p22.1p22.3) e mutação no gene *FMR1*, responsável pela síndrome do cromossomo X-frágil, em seu outro cromossomo X, que apresentava RM e tremor prematuro (características da síndrome do cromossomo X-frágil), e também autismo atípico, problemas na fala, obesidade, estrabismo, ponte nasal estreita, orelhas proeminentes, lábio superior fino e mãos grossas.

V.9 - Pacientes OS117 e OS118

A análise por array das pacientes OS117 e OS118, irmãs gêmeas, levou ao diagnóstico de uma deleção intersticial no cromossomo12 (q15–q21.1) de 2,6Mb.

Vários genes descritos estão presentes na região deletada (Figura 31), inclusive o gene *RAB21*, que também pertence a família de genes *RAB*, reforçando as evidencias que a alteração no numero de cópias de genes dessa família devem estar envolvidas no controle do metabolismo de gordura. O gene *TPH2* é expressos no cérebro e pode ser responsável pelo retardo mental. Os genes PTPRB e PTPRR pertencentes a família de genes PTP, são conhecidos como moléculas de sinalização que regulam uma

variedade de processos celulares, incluindo o crescimento e diferenciação celular, o ciclo mitótico e a transformação oncogênica, portanto podem estar relacionados com a leucemia apresentada pela paciente OS117.

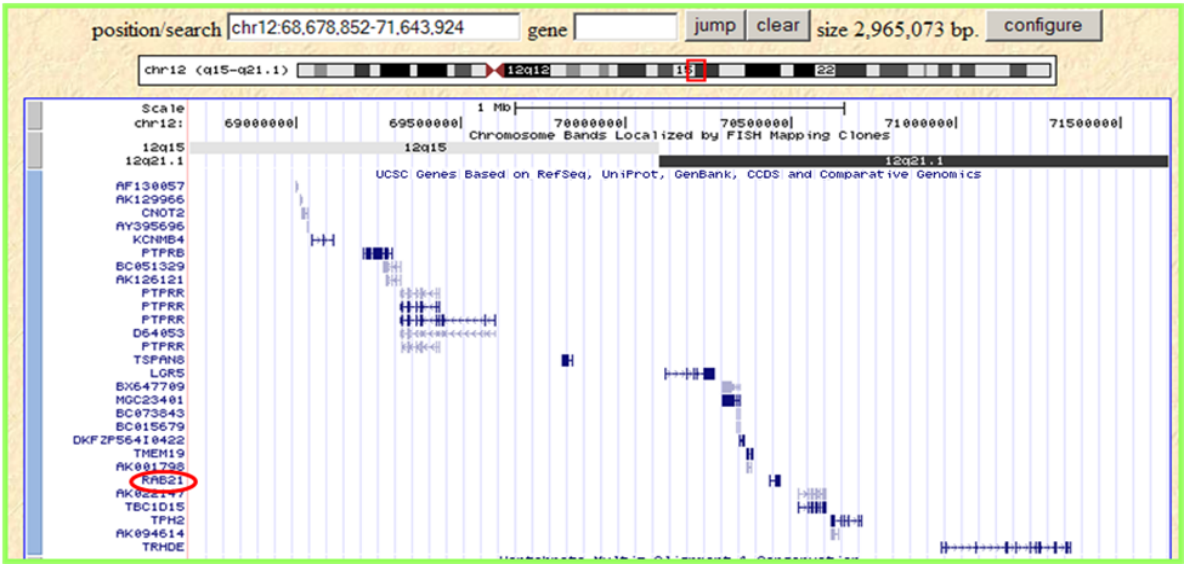

Figura 31: Ideograma do cromossomo 12 indicando a área deletada, com a ilustração dos genes deletados dessa região, retirada do *UCSC Genome Browser for Humans* em 03/2010. O gene *RAB21* está circulado.

Deleções do braço longo do cromossomo 12 são muito raras, com apenas 17 casos descritos na literatura (Meinecke and Meinecke,1987; Watson *et al.,* 1989; Tonoki *et al.,* 1998; Brady *et al.,* 1999; Sathya *et al.,* 1999; Rauen *et al.,* 2000, 2002; Rapley *et al.,* 2001; Petek *et al.,* 2003; Plotner *et al.,* 2003; Pe´rez-Sa´nchez *et al.,* 2003; Mikaye *et al.,* 2004; James *et al.,* 2005; Klein *et al.,* 2005; Schluth *et al.,* 2008 e Yamanishi *et al.,* 2008), sendo que três deles (Meinecke and Meinecke,1987; Watson *et al.,* 1989 e Schluth *et al.,* 2008), envolvem o segmento 12q15q21.2, também deletada em nossas pacientes. Os três pacientes descritos na literatura apresentaram atraso de DNPM e dismorfismos faciais, como

lábios finos e orelha de baixa implantação, assim com nossas pacientes, mas em nenhum deles foi descrita obesidade.

V.10 - Paciente OS36

A análise por array do paciente OS36 levou ao diagnóstico de uma duplicação intersticial no cromossomo X(q26,3) de 1,2Mb.

Apenas três genes estão descritos na região duplicada (Figura 32). O gene *FGF13* é membro da família FGF e está envolvido em uma variedade de processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, crescimento celular, morfogênese, reparação tecidual e crescimento de tumor. Este gene está localizado em uma região do cromossomo X, que é associado com a síndrome de Börjeson-Forssman-Lehmann (BFLS), tornando-se um gene candidato possível para os casos familias de BFLS e para outras formas sindrômicas de retardo mental inespecífico ligado ao X. O gene *ZIC3*, situado na região duplicada, codifica um fator de transcição de anel de zinco. Gebbia *et al.,* (1997) identificaram 5 mutações diferentes no gene *ZIC3*, em portadores de heterotaxia ligada ao X, membros de 5 famílias não relacionadas. Todos os homens afetados tinham combinações variáveis de malformações cardíacas complexas, alterações pulmonares, anomalias no baço e mal funcionamento gastrointestinal.

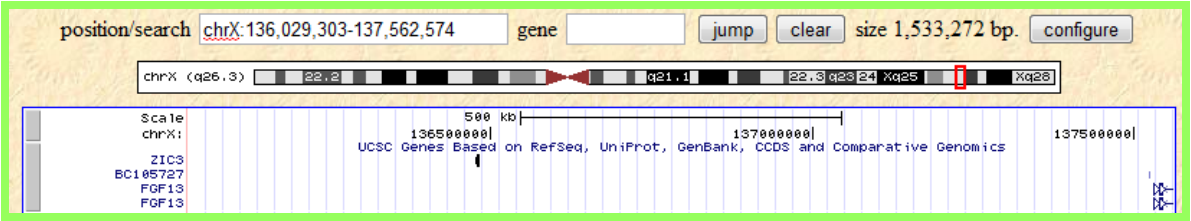

Figura 32: Ideograma do cromossomo X indicando a área duplicada, com a ilustração dos genes duplicados dessa região, retirada do *UCSC Genome Browser for Humans* em 03/2010.

Poucos casos de duplicação envolvendo a região descrita em nosso paciente foram relatados. Stankiewicz *et al.,* (2005), descreveram uma mãe e uma filha com duplicação of Xq26.2-q27.1, que apresentavam baixa estatura e problemas de fala. Gecz *et al.,* (1999), descreveram um paciente com uma duplicação X(q26q28) e características de BFLS, entre elas obesidade e RM, sendo que o ponto de quebra em Xq26 ocorria onde esta localizado o gene *FGF13.*

A Tabela 12 (pág 111) apresenta uma descrição sumarizada das funções dos possíveis genes relacionados a obesidade, localizados nos segmentos cromossômicos alterados encontrados nos nossos pacientes.

V.11 - Aconselhamento genético

Para determinar o risco de recorrência é necessário estudar os genitores dos pacientes.

Onze genitores foram analisados por MLPA, SNP-Array e/ou cariótipo e rearranjos cromossômicos não foram identificados. Na presença dos cromossomos parentais normais o risco de recorrência é considerado desprezível.

O pai do paciente OS80 não teve seu cariótipo estudado, o que seria muito importante pois a alteração encontrada nesse paciente geralmente está associada a translocações equilibradas recíprocas presentes em um dos genitores. O estudo do pai deste paciente pelas técnicas de MLPA e SNP-Array apresentou resultados normais, porem estas técnicas não detectam translocações equilibradas, o que mostra a importância do estudo do cariótipo, que detecta este tipo de rearranjo.

O diagnóstico de pacientes com obesidade sindrômica é um desafio, pois há sobreposição de fenótipos impossibilitando até agora o diagnóstico diferencial, a não ser o da síndrome de Prader-Willi clinicamente reconhecível, pelo menos, em sua segunda fase. O emprego de técnicas que detectam variações no número de cópias do genoma humano amplia a possibilidade de reconhecimento de novas síndromes e a descrição do espectro da variabilidade fenotípica de síndromes conhecidas. Estas síndromes são uma potencial fonte de esclarecimento das causas das formas comuns de obesidade.

Tabela 12: Descrição sumarizada das funções dos possíveis genes relacionados a obesidade, localizados nos segmentos cromossômicos alterados encontrados nos pacientes.

Gene	Localização	Função
DRD2	11q23.2	Este gene codifica o subtipo D2 dos receptores da dopamina. Esta acoplado à proteína G do receptor, inibe a atividade da adenilato ciclase. Seu alelo A1 pode ser um marcador genético de uma condição psicológica em pessoas com alto risco de desenvolver distúrbios alimentares
FDX1	11q22.3	Este gene transfere elétrons da adrenodoxina reductase para a cadeia de colesterol P450 do citocromo de clivagem e participa da síntese de hormônios da tireóide.
MCHR2	6q16.2	Este gene codifica um receptor acoplado à proteína G, com papel importante no controle sobre o comportamento alimentar e o metabolismo energético.
PLCH2	1p36.32	Membro da família de genes PLC, que codificam as enzimas fosfolipases, que tem diversas funções biológicas, incluindo os papéis na inflamação, crescimento celular e nos processos metabólicos de lipídios.
PRKCZ	1p36.33	Envolvido com a via sinalizadora de insulina e membro da família PKC de serina/treonina quinase que estão envolvidas em vários processos celulares como proliferação, diferenciação e secreção.
RAB21	12q21.1	Pertencem a família de genes *RAB*, que codificam a proteína guanosina triphosphatase (GTPase), que esta envolvida em um processo chamado tráfego de vesículas, que transporta materiais entre células e são da mesma família do gene *RAB23*, associado a obesidade na Síndrome de Carpenter.
RAB2B	14q11.2	
RAB39	11q22.3	
SIM1	6q16.3	Este gene codifica o fator de transcrição bHLH-PAS e é expresso em uma região discreta do hipotálamo, envolvida com controle do consumo de alimentos.
TPO	2p25.3	Este gene codifica a enzima tireóide peroxidase, que desempenha um papel importante na função da glândula tireóide, envolvida no controle do metabolismo.

VI – Conclusões

- O estudo das regiões subteloméricas em 141 pacientes que apresentavam obesidade e/ou hiperfagia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou dificuldades de aprendizado e distúrbios de comportamento, pela técnica de MLPA ("multiplex ligation-dependent probe amplification"), detectou 4 alterações, duas deleções no braço curto do cromossomo 1, uma deleção no braço curto do cromossomo 2 e uma deleção no braço curto do cromossomo 3 e duplicação no braço longo do cromossomo 11, o que corresponde a 3% da amostra estudada.
- Dezenove pacientes com retardo mental, obesidade e outro pequeno sinal ao exame físico que sugerisse alteração cromossômica, tais como: orelhas de baixa implantação, clinodactilia de 5º dedo das mãos, fosseta pré-auricular bilateral, mamilos invertidos, microcefalia e implantação anormal dos artelhos foram estudados pela técnica de SNP-array ("The GeneChip® Mapping 100K Set", Affymetrix), e 6 apresentaram alterações, o que corresponde a 31,5% da amostra estudada. Foram encontradas uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 6, duas deleções intersticiais no braço longo do cromossomo 12 (gêmeas), uma deleção intersticial no braço curto do cromossomo X, uma duplicação intersticial no braço longo do

cromossomo 14 e uma duplicação intersticial no braço longo do cromossomo X.

- O estudo das regiões relacionadas com RM ligado ao X em pacientes do sexo masculino com obesidade, retardamento mental e distúrbio de comportamento, pela técnica de MLPA, não foi eficaz, pois nenhuma alteração foi detectada.
- Apesar de mais trabalhosa e de ter um custo muito elevado, por enquanto em relação ao MLPA, a técnica de SNP- array se revelou mais eficaz na detecção de variação no numero de cópias em pacientes com obesidade e/ou hiperfagia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou dificuldades de aprendizado e distúrbios de comportamento.
- Dentre as dez alterações encontradas nos pacientes estudados estão duas síndromes relacionadas com obesidade já descritas, a monossomia 1p36 e a monossomia 6q16, que são diagnósticos diferencias da PWS.
- Nos segmentos alterados foram localizados vários genes relacionados à obesidade: *DRD2, MCHR2, PLCH2, PRKCZ, RAB21, RAB2B, RAB39, TPO* e *SIM1*.
- Três genes da família *RAB (21;2B;39)* foram localizados em segmentos cromossômicos alterados. O gene *RAB23* foi associado à obesidade na síndrome de Carpenter e provavelmente os três genes da família também estão envolvidos com a obesidade de nossos pacientes.

- O diagnóstico de pacientes com obesidade sindrômica é realmente um desafio, pois há sobreposição de fenótipos dificultando o diagnóstico diferencial.
- Onze genitores foram analisados por MLPA, SNP-Array e/ou cariótipo e rearranjos cromossômicos não foram identificados. Na presença dos cromossomos parentais normais o risco de recorrência é considerado desprezível.

VII - Resumo

Obesidade sindrômica é definida como a obesidade ocorrendo em conjunto com várias características clínicas distintas, associadas a retardo mental. A forma sindrômica mais freqüente é a síndrome de Prader-Willi (PWS) caracterizada por hipotonia, dificuldade de sucção no período neonatal, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM), hiperfagia, obesidade, baixa estatura na adolescência, mãos e pés pequenos, hipogonadismo, dificuldade de aprendizado e distúrbios de comportamento. Estudamos 141 pacientes com obesidade e/ou hiperfagia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e/ou dificuldades de aprendizado e distúrbios de comportamento, pela técnica de MLPA ("multiplex ligation-dependent probe amplification") assim como 19 pacientes que apresentavam além de atraso do DNPM e/ou dificuldade de aprendizado, distúrbios de comportamento, obesidade e/ou hiperfagia, outro sinal ao exame físico que sugerisse alteração cromossômica, pela técnica de SNP-array ("The GeneChip® Mapping 100K Set", Affymetrix), com o objetivo de identificar genes e/ou segmentos cromossômicos envolvidos com obesidade sindrômica. Essas técnicas detectam deleções e/ ou duplicações do genoma, seja analisando regiões específicas, como a de MLPA, seja cobrindo praticamente o genoma inteiro (SNP-array). Dez pacientes apresentaram alterações cromossômicas: duas deleções 1p36, uma deleção 2p25.3, uma deleção 3p26.3 e duplicação 11q22.3, uma deleção 6(q16.1-q21), duas deleções 12(q15–q21.1) (irmãs gêmeas), uma

deleção X(p22.13–p22.12), uma duplicação 14q11.2 e uma duplicação X(q26.3). Dentre as alterações encontradas estão duas síndromes relacionadas com obesidade já descritas, a monossomia 1p36 e a monossomia 6q16, que são diagnósticos diferencias da PWS. Nos segmentos alterados foram localizados vários genes relacionados a obesidade: *DRD2, MCHR2, PLCH2, PRKCZ, RAB21, RAB2B, RAB39, TPO* e *SIM1*.

Onze genitores foram analisados por MLPA, SNP-Array e/ou cariótipo e rearranjos cromossômicos não foram identificados. Na presença dos cromossomos parentais normais o risco de recorrência é considerado desprezível.

O diagnóstico de pacientes com obesidade sindrômica é um desafio, pois há sobreposição de fenótipos impossibilitando até agora o diagnóstico diferencial, a não ser o da síndrome de Prader-Willi clinicamente reconhecível, pelo menos, em sua segunda fase. O emprego de técnicas que detectam variações no número de cópias do genoma humano amplia a possibilidade de reconhecimento de novas síndromes e a descrição do espectro da variabilidade fenotípica de síndromes conhecidas. Estas síndromes são uma potencial fonte de esclarecimento das causas das formas comuns de obesidade.

VIII – Abstract

Syndromic obesity is defined as obesity occurring in association with several distinct clinical features and mental retardation (MR). Prader-Willi syndrome (PWS) is the most frequent syndromic form of obesity and is characterized by hypotonia, poor sucking in the neonatal period, developmental delay, hyperphagia, obesity, short stature in adolescence, small hands and feet, hypogonadism, learning disabilities and behavior disturbances. Herein, we studied 141 patients with obesity and/or hyperphagia, psychomotor developmental delay and/or learning disabilities and behavior disturbances with the technique of MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), and 19 patients by SNP-array technique ("The GeneChip ® Mapping 100K Set, Affymetrix) to identify copy number variations. By using both techniques we detected deletions or duplications of the genome in ten patients: two deletions at 1p36, two deletions at 12q15–q21.1 (twins), a deletion of chromosomes 2p25.3, 6q16.1-q21, and Xp22.13–p22.12, a duplication of chromosomes 14q11.2 and Xq26.3, and an unbalanced translocation between chromosomes 3p26.3 and 11q22.3. Monosomy 1p36 and monosomy 6q16 are well-known syndromes and had already been related with obesity. Both syndromes are considered as differential diagnosis of PWS. Several genes related to obesity are mapped in the altered chromosome segments: *DRD2, MCHR2, PLCH2, PRKCZ, RAB21, RAB2B, RAB39, TPO* and *SIM1.*

Eleven parents were studied by MLPA, SNP array, and / or karyotype analyses, and chromosomal rearrangements were not identified. Therefore, we consider these rearrangements to be causative of the patients´ phenotype.

The diagnosis of patients with syndromic obesity is a challenge due to the overlapping of the phenotypes, except for Prader-Willi syndrome that is a clinically recognizable syndrome, mainly in its second phase. The use of techniques that detect copy number variations of the human genome will increase the recognition of new syndromes and also the description of the spectrum of phenotypic variability of known syndromes. These syndromes are a potential source for the understanding of the etiology of the common forms of obesity.

IX.1 – Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

instituto de biociências

OF.CEP/IB/036/2004

São Paulo, 08 de julho de 2004.

Prezada Senhora

De ordem da Sra. Coordenadora, Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno, dirijo-me a V. Sa. para informar que o Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto, em reunião realizada no dia 06 de julho de 2004, **APROVOU** o Projeto de Pesquisa "Síndromes de Prader-Willi e Angelman: estudo dos mecanismos genéticos, diagnósticos diferenciais e de correlações com os fenótipos clínicos e comportamentais" (Protocolo nº 021/2004), de sua responsabilidade e sob a supervisão da Profa. Dra. Célia Priszkulnik Koiffmann.

Oportunamente será encaminhado, a V. Sa., cópia do Parecer deste Comitê.

Lembramos que deverão ser apresentados relatórios anual e final.

Atenciosamente.

Reynaldo Cezar Marson
Secretário do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos
IBUSP

CC. Profa. Dra. Célia Priszkulnik Koiffmann

Ilma. Sra.
MÔNICA CASTRO VARELA
Departamento de Biologia do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-900 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - http://www.ib.usp.br

IX.2 – Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido.

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)

ESTUDO: "Síndromes de Prader-Willi e Angelman: estudo dos mecanismos genéticos, diagnósticos diferenciais e de correlações com os fenótipos clínicos e comportamentais".

Seu filho está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos realizando. Se concordar com as informações abaixo, por favor, assine o documento, pois só então daremos início à pesquisa.

Eu....., portador do RG ....., concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) ....., seja voluntário do estudo *"**Síndromes de Prader-Willi e Angelman: estudo dos mecanismos genéticos, diagnósticos diferenciais e de correlações com os fenótipos clínicos e comportamentais**"*, esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir as possíveis causas da doença denominada ( ) síndrome de Prader-Willi / ( ) síndrome de Angelman e de seus diagnósticos diferenciais;

II) Será feita a coleta de 10ml de sangue do(a) meu(minha) filho(a) e 10ml do meu sangue para que seja realizado o estudo;

III) O material colhido está armazenado pelo tempo necessário para a identificação e caracterização do(s) gene(s) ou segmentos cromossômicos responsáveis pela doença genética na minha família;

IV) A participação neste projeto não tem a finalidade de chegar a um tratamento para os problemas clínicos do meu(minha) filho(a);

V) Não terei que fazer pagamentos pelos testes realizados para a pesquisa dos diagnósticos diferenciais;

VI) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

VII) A desistência de participar do projeto não irá interferir na realização de outros exames;

VIII) Os resultados obtidos na pesquisa serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o do meu filho sejam mencionados;

IX) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa

São Paulo,.....de ..... de 200.....

_____ _____

Assinatura do Responsável *Pesquisador Responsável pelo Projeto*

IX.3 - Anexo 3: Anamnese Genético-Clínica

UNIDADE DE ACONSELHAMENTO GENÉTICO

FICHA DE ANAMNESE GENÉTICA

NOME: ..... UAG nº:.....
IDADE:..... SEXO:..... COR: ..... EST.CIVIL:.....
ENDEREÇO: ..... FONE: .....
PROC.: ..... MÉDICO: .....
MOTIVO DA CONSULTA:.....
.....
H.C. RG nº:.....

ANTECEDENTES FAMILIAIS

PAI: ..... IDADE: .....
PROFISSÃO: ....ESCOLARIDADE: .....
NATURAL DE: .....
MÃE: ..... IDADE: .....
PROFISSÃO: ..... ESCOLARIDADE: .....
NATURAL DE: .....

CONSANGUINIDADE:
Irmãos do Propósito (nome, idade, est. civil, filhos normais e afetados):
.....
.....
.....
.....
.....

Casos Semelhantes na Família:
.....
.....
.....
.....
.....

Outros Problemas na Família:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Irmãos do Pai (nome, idade, est. civil e filhos normais e afetados):

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Irmãos da Mãe (nome, idade, est. civil e filhos normais e afetados):

.....
.....
.....
.....

OBSERVAÇÕES: .....
.....
.....
.....
.....

HEREDOGRAMA:

ANTECEDENTES GESTACIONAIS

Duração da Gravidez: ..... Data de Nascimento:...../...../.....
Febres ( ) Período: ..... Rubéola:..... Período:.....
Outras Infecções: ..... Período:.....
Radiografias toráxicas ou abdominais ( ) Período:.....
Outras exposições à radiação: .....
Perdas sanguíneas ( ) Período: .....Medicações ( ) Motivo:.....
Tipo: ..... Período:..... Anovulatórios ( ) Tipo: ..... Período: .....
Anticonvulsivo ( ) Tipo: ..... Período: ..... Sofre de gota ( )
Remédio: ..... Período: ..... Mãe Fumante ( ) Período Gestação: .....
Quantidade:..... Pai Fumante ( ) Quantidade:.....
Mãe Alcoólatra ( ) Período Gestação:..... Quantidade:.....
Pai Alcoólatra ( ) Quantidade:.....
Consumo de drogas mãe ( ) Período Gestação: .....
Quantidade: ..... Tipo: .....
Pai ( ) Quantidade:..... Tipo: .....
OBS.: .....
.....
.....

PARTO

Hospitalar ( ) Domiciliar ( ) Médico ( ) Parteira ( ) Curiosa ( ) Normal ( )
Apresentação Tipo: ..... Forceps ( ) Duração: .....
Cesariana ( ) Motivo: .....
.....
OBS.:
.....
.....
.....
.....

CONDIÇÕES DO RECÉM-NASCIDO

Peso: ..... Comprimento: ..... P.C.: ..... Choro ( )
Sucção: ..... Cianose ( ) Perm. na Matern.: .....
Icterícia ( ) Época: ..... Banho de Luz ( ) Transfusão ( )
OBS.:.....
.....

EVOLUÇÃO PEDIÁTRICA

Firmou a cabeça: ..... Sentou sem apoio: ..... Andou: .....
Frases: ..... Controle (esfincteriano): ..... Bexiga: .....
D ( ) N ( ) Entrou na escola (idade): .....
Doenças pertinentes : .....
.....
Lê: ..... Escreve: ..... Faz Contas: .....
OBS.: .....
.....

EXAME SOMATOSCÓPICO

Estatura: ..... Peso: ..... Envergadura: ..... Cabeça: PC .....
Dolicocefalia ( ) Braquicefalia ( ) Assimetria craniana ( ) Cranio dismórfico ( )
Alterações:.....
Abaulamento frontal ( ) Fronte alta ( ) Baixa ( ) Estreita ( ) Larga ( )
Implantação de cabelos na fronte: Baixa ( ) Alta ( ) Entradas temporais ( );
Implantação de cabelos na nuca: Baixa ( )
OBS.:
.....
.....

ORELHAS

Grandes ( ) Pequenas ( ) Medida: ..... Implantação baixa ( )
Posteriorizada ( ) Apêndices auriculares ( ) Em abano ( ) Grosseiras ( )
Lóbulo:.....
OBS.: .....
.....

REGIÃO OCULAR

Sinofre ( ) Ptose palpebral D ( ) E ( ) Epicanto: D ( ) E ( )
Telecanto: D ( ) E ( ) Anoftalmia: D ( ) E ( ) Microftalmia: D ( ) E ( )
Exoftalmia: D ( ) E ( ) Enoftalmia: E ( ) E ( ) Blefarofimose: D ( ) E ( )
Nistagmo ( ) Cataratas: D ( ) E ( ) Estrabismo: D ( ) E ( ) Coloboma: D ( ) E ( )
Distância Intercantal Interna: .....
Distância Intercantal Externa: .....
Inclinação: Mongólica ( ) Antimongólica ( )
OBS.: .....

NARIZ

Grande ( ) Pequeno ( ) Em Sela ( ) Narinas Antivertidas ( ) Em bico ( ) Bífido ( )
Hipoplasia alar ( )
OBS.: .....
.....
.....

REGIÃO BUCAL

Microstomia ( ) Macrostomia ( ) Micrognatismo ( ) Macrognatismo ( )
Prognatismo ( ) Retrognatismo ( ) Boca de carpa ( ) Lábio leporino ( )
Lábio superior: Grosso ( ) Fino ( ) Lábio inferior: Grosso ( ) Fino ( )
Macroglossia ( ) Língua escrotal ( ) Pálato: Alto ( ) Ogival ( ) Pálato fendido ( )
Dentes mal implantados ( ) Inclusos ( ) Maloclusão ( ) Filtro: Medida: .....
Curto ( ) Longo ( ) Alargado ( ) Bem desenhado ( ) liso ( ) hiperplasia gengival ( )
Início de dentição:.....
OBS.: .....
.....

PESCOÇO

Curto ( ) Grosso ( ) Alado ( )
OBS.: .....
.....

TÓRAX

PT: ..... Distância Intermamilar: .....
Esterno Curto ( ) Pectus: carinatum ( ) escavatum ( ) em barril ( )
Afastamento dos mamilos ( ) mamilos extras ( ) escápulas salientes ( ) escoliose ( )
lordose ( ) cifose ( )
OBS.: .....
.....

ABDOMEN

Protuso ( ) Hérnia umbilical ( ) Diastases do reto ( ) Região glútea:.....
OBS.: .....

GENITAIS

Normais ( ) Hipogenitalismo ( )
OBS.: .....
.....

MEMBROS SUPERIORES

MÃOS: Pequenas ( ) Grandes ( ) Medida: ..... Braquidactilia ( )
Aracnodactilia ( ) Polidactilia ( ) Tipo: ..... Clinodactilia ( )
Tipo: ..... Camptodactilia ( ) Tipo: ..... Sindactilia ( ) Tipo: .....
Baqueteamento ( ) Cubito valgo ( ) OBS.: .....
.....

MEMBROS INFERIORES

PÉS: Pequenos ( ) Grandes ( ) Medida: .....
Polidactilia ( ) Tipo: ..... Sindactilia ( ) Tipo: .....
Dist. maior halux 2º dedo ( ) Pé torto ( ) Tipo: .....
Pé Plano ( ) Joelho valgo ( ) Joelho varo ( )
OBS.: .....
.....

PELE E ANEXOS

Albinismo ( ) Vitiligo ( ) Hemangiomas e teleangectasias ( ) Nevos ( )
Alopécia ( ) Hirsutismo ( ) Deformidade das unhas ( ) Tipo: .....
Manchas ( ) Tipo: .....
OBS.: .....

CONDIÇÕES GERAIS

Fácies: ..... Fala: .....
Marcha: .....
Movimentos involuntários: .....
.....
Hipotonia ( ) Hipertonia ( )
INFORMANTE (Parentesco): .....
Reações emocionais: Tranquila ( ) Ansiosa ( )
Condições cognitivas: Congruente ( ) Incongruente ( )
Exames indicados: .....
Resultados: Cromatina X Cromatina Y
Cariótipo: simples ( ) bandeamento ( ) Dermatóglifos
Heredograma (confirmação) Fotografia Outros
Exames clínicos solicitados: .....
Exame de progenitores: .....
Características principais do paciente: .....
.....
.....
.....
.....
.....
Hipótese Diagnóstica: .....

NOME DO ENTREVISTADOR: .....

DATA: ...../...../.....

IX.4 – Anexo 4: 154 Syndromes with Reported Generalized Obesity - Winter Baraitser Dysmorphology Database (version 1.0.8, London Medical Databases, London, UK) (2006)

- Achard – Arachnodactyly – migrognathia
- Acrocallosal- agenesis corpus callosum, mental retardation, polydactyly
- Albright - pseudo- and pseudopseudohypopathyroidism
- Alström syndrome
- Aniridia - Wilms tumor/WAGR syndrome
- Aniridia plus
- Atkin (1985) - macrocephaly, mental retardation, Coffin-Lowry-like face
- Ayazi (1981) - choroideremia, obesity deafness
- Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome
- Barder-Biedl (Laurence-Moon-Bardet-Biedl) syndrome
- Beckwith-Wiedeman (EMG) syndrome
- Beemer (1988) - ptosis, telecanthus
- Biemond II - obesity, polydactyly, iris coloboma
- Blount disease
- Börjeson-Forssmann-Lehmann syndrome - microcephaly, obesity, mental retardation
- Börjeson-Forssmann-like syndrome
- Cabezas (2000) - X-linked mental retardation
- Camera syndrome (1993) - obesity
- Carbohydrate - deficient glycoprotein syndrome type Ia
- Carboxypeptidase E deficiency
- Carpenter syndrome - acrocephalopolysyndactyly type II
- Chromosome 13q34 - submicroscopic deletion
- Chromosome 14 - maternal disomy
- Chromosome 1p36 - submicroscopic deletion
- Chromosome 22qter - submicroscopic subtelomeric deletion
- Chromosome 2q37 - submicroscopic deletions, Albright-like features
- Chromosome 3p25-26 - duplication
- Chromosome 8p23 - submicroscopic deletion
- Chromosome 9q22.3 - microdeletion
- Chromosome 9q34 - submicroscopic deletion

- Chudley (1988) - mental retardation, short stature, obesity, hypogonadism
- Cohen syndrome
- Cole-Hughes (1991) - macrocephaly
- Coloboma - obesity, hypogonadism, mental retardation
- Congenital muscular dystrophy with cataracts and minor brain anormaly
- Costelo syndrome
- Cystinuria - hypotonia
- Deafness - metaphyseal dysplasia
- DeVitto (2005) - overgrowth, cranial hyperostosis, mental retardation
- Devriendt (1996) - alopecia, mental retardation, hypogonadism
- Donnai-Barrow - diaphragmatic hernia, exomphalos, absent corpus collosum
- Duba (1997) - chromosome instability disorder
- Edwards (1976) - pigmentary retinopathy, hypogogonadism, glucose intolerance
- Elejalde (1977) - acrocephalopolydactylous dysplasia
- Emphysema - genital anomalies, deafness, mental retardation
- Ferlini (1995) - hydrocefalus, Sprengel shoulder, skeletal anomalies
- Frias (1975) - growth deficiency, facial abnormalities, brachydactyly
- Fryns (1988) - mental retardation, macrocephaly, short stature, craniofacial abnormalities
- Fryns-Aftimos - webbed neck, seizures, pachygyria of frontal lobes
- Frynz-Delooz - nasal hypoplasia, sparse hair, obesity, labial hypoplasia, mental retardation
- Furlong(1987) - marfanoid syndrome with craniosynostosis
- Gabrielli (2000) - obesity, cleftlip/palate, growth hormone deficiency, mental retardation
- Glycogen storage disease type 1
- Goldstein(1988) - Sotos-like syndrome
- Growth hormone - releasing receptor mutations
- Gu(1996) - nonspecific X-Linked mental retardation
- Hall syndrome - craniostenosis and Turner phenotype
- Hernandez(1982) - mental retardation, bulbous nose, epilepsy
- Hockey(1986) - X-linked mental retardation, precocious puberty

- Hughes(1985) - dominant “acromegaloid” appearance
- Hypertrichosis, osteodysplasia, cardiomyopathy
- Hypochondroplasia (autosomal recessive)
- Hypothalamic syndrome
- Ichthyosis, hypogonadism, mental retardation (X-linked)
- Insulin resistance, acanthosis nigricans, hypothyroidism, obesity
- Ischiospinal dysostosis
- Jones(1973) - microcephaly, mental retardation, cubitus valgus
- Kabuki makeup syndrome
- Kajantie(2000) - facial asymmetry, obesity, dolicocephaly
- Kallmann syndrome
- Killian/Pallister mosaic syndrome
- Laurence-Moon (see also Bardet-Biedl) syndrome
- Leptin deficiency
- Leptin receptor mutation
- Livedo reticularis, stroke-like episode, cystic kidneys
- Lorenz(1990) - acrocephalosyndactyly, parieto-occipital “encephalocele”
- Maclean(2002) - microcephaly, growth hormone deficiency, retinopathy
- Macrocephaly, cutis marmorata telengiectatica congenital
- Macrocephaly, familial
- Macrocephaly, spastic paraplegia
- Macular degeneration - Sotos-like features
- Marshal-Smith syndrome
- Maternal diabetes syndrome
- MC4R mutations and obesity
- McPherson-Clemens - cleft lip and palate, congenital heart defect
- Mégarbané-Cormier-Daire - mental retardation, short stature, joint laxity
- Mental retardation, distal arthrogryposis
- Mental retardation, epileptic seizures, hypogonadism, microcephaly, obesity
- Mental retardation, obesity (X-linked)
- Microcephaly, cutis verticis gyrata, edema
- MMMM syndrome - megalocornea, macrocephaly, mental and motor retardation

- MOMES syndrome - mental retardation, obesity, prognathism
- MOMO syndrome - macrosomia, obesity, macrocephaly, ocular abnormalities
- Moreno(1974) - gigantism, advanced bone age, hoarse cry
- Morgagni-Stewart-Moret syndrome
- MORM syndrome - mental retardation, truncal obesity, retinal dystrophy, micropenis
- MRX29 - ARX-related
- Multiple circumferential skinfolds
- Myhre(1981) - growth deficiency, clefting, mental retardation
- Nesidioblastosis
- Neuhauser(1975) - megalocornea, mental retardation
- Nevo(1974) - overgrowth, hypotonia
- Nguyen(2003)syndrome - mild Smith-Lemli-Opitz following familial hypocholesterolemia
- Obesity, adrenal insufficiency, red hair
- Obesity and SIM1 mutation
- Obesity, tall stature, psychosis, seizures
- Overgroth syndrome, type Nishimura
- Pashayan(1973) - mental retardation, truncal obesity, webbed neck, blepharophimosis
- Pavone(1996) - hypertrichosis, obesity, brachydactyly, mental retardation
- Perlman syndrome - gigantism with trnal dysplasia/tumors
- Pfeiffer-Kapferer - sensorineural deafness, hypospadias, synostoses
- Piussa(1983) - brachydactyly, thumb ankylosis, mental retardation
- Prader-Willi syndrome
- Primrose(1982) - muscle wasting, mental retardation, cataracts, calcified pinnae
- Prolidase deficiency
- Ramsden(2000) - hypertrophied skinfolds
- Rozendaal(2003) - midface hypoplasia, obesity, mental retardation
- Russel-Eggitt - Leber's amaurosis, cardiomyiopathy
- Russmann(1985) - macrocephaly, tremor
- Schinzel(1974) - fractures, delayed dentition, rhizomelia (arms)

- Schinzel-Bernarsconi - short stature, brachydactyly, small ears
- Scholte(1991) - early balding, patella laxity, acromicria, hypogonadism, mental retardation
- Scleroteosis
- Scott(1969) - short stature, acanthosis nigricans
- Seemanova(1992) - insulin resistance syndrome
- Sengers(1985) - hydrocephaly, obesity, hypogenitalism (X-linked recessive)
- Shashi(2000 - X-linked mental retardation
- Sierpinski-Bart(1981) - mental retardation, tapetoretinal degeneration, arachnodactyly
- Simpson-Golabi-Behmel syndrome
- Simpson-Golabi-Behmel syndrome, severe infantile form
- Single central incisor, short stature
- Sinnerbrink and Ades(2004) - mental retardation, deafness, ocular abnormalities, short stature
- Smith-Magenis syndrome
- Sotos syndrome (cerebral gigantism)
- Stevenson(1982) - marfanoid syndrome
- Summit(1969) - acrocephalosyndactyly
- Tarhan(2004) - mental retardation, polysyndactyly, deafness, facial dysmorphism
- Teebi(1986) - hypogonadotropic hypogonadism, mental retardation, obesity
- Teebi(1989) - macrosomia, micropthtalmia, cleft palate
- Teebi(1989) - overgrowth syndrome
- Moreno(1974) - gigantism, advanced bone age, hoarse cry
- Temtamy(1974) - metaphyseal dysplasia, anetoderma, optic atrophy
- Tetraploid/diploid mosaicism
- Trichomegaly, chorioretinopathy
- Triploid/disploid mosaicism
- Ulnar-mammary (Palister) syndrome
- Urban(1979) - obesity, mental retardation, contractures, genital anomalies
- Vasquez(1979) - X-linked hypogonadism, gynecomastia, obesity, mental retardation

- Verloes(1990) - male pseudohermaphroditism, mullerian structures, mental retardation
- Verloes-Lesenfants - obesity, camtodactily, agenesis of corpus callosum
- Weaver syndrome
- Weiss(1932) - nerve deafness, mental retardation, obesity, hypogenitalism
- Wilson(1991) - X-linked mental retardation, gynecomastia, obesity
- X-linked mental retardation, obesity, microcephaly
- Yim(1982) - amelia, hydrocephalus, iris coloboma, cleft lip/palate

X.1 - Referências Eletrônicas

Ensembl Genome Browser:
http://www.ensembl.org

GenBank:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

GeneCards:
http://www.genecards.org/index.shtml

Obesity Genemap Database:
http://www.obesitygene.pbrc.edu

Online Mendelian Inheritance in Man:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

UCSC Genome Browser:
http://genome.ucsc.edu/index.html

X.2 - Referências Bibliográficas

ISCN (2009): An International system for human cytogenetics nomenclature (2009). **Cytogenet Genome Res**

Ahmad W, De Fusco M, ul Haque MF, Aridon P, Sarno T, Sohail M, ul Haque S, Ahmad M, Ballabio A, Franco B, Casari G. Linkage mapping of a new syndromic form of X-linked mental retardation, MRXS7, associated with obesity. **Eur J Hum Genet** 7: 828-32, 1999.

Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaud*et al.* Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. **Nat Genet** 17: 75-78, 1997.

Alharbi KK, Spanakis E, Tan K, Smith MJ, Aldahmesh MA, O'Dell SD, Sayer AA, Lawlor DA, Ebrahim S, Davey Smith G, O'Rahilly S, Farooqi S, Cooper C, Phillips DI, Day IN. Prevalence and functionality of paucimorphic and private MC4R mutations in a large, unselected European British population, scanned by meltMADGE. **Hum Mutat.** Mar;28(3):294-302, 2007.

Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. **Nature.** Oct 9;425(6958):628-33, 2003.

Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'Callaghan F, Huyton M, O'Regan M, Tolmie J, Sampson J, Clarke A, Osborne J. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. **J Med Genet.** 43(9):729-34, 2006.

Badano JL, Ansley SJ, Leitch CC, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N. Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. **Am J Hum Genet.** Mar;72(3):650-8, 2003a.

Badano JL, Kim JC, Hoskins BE, Lewis RA, Ansley SJ, Cutler DJ, Castellan C, Beales PL, Leroux MR, Katsanis N. Heterozygous

mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. **Hum Mol Genet.** Jul 15;12(14):1651-9, 2003b.

Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. **Am J Med Genet A.** Dec 15;143(24):3016-34, 2007.

Baumstark A, Lower KM, Sinkus A, Andriuskeviciute I, Jurkeniene L, Gécz J, Just W. Novel PHF6 mutation p.D333del causes Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome. **J Med Genet.** Apr;40(4):e50, 2003.

Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. **J Med Genet.** Jun;36(6):437-46, 1999.

Bienvenu T, des Portes V, Saint Martin A, McDonell N, Billuart P, Carrie A, Vinet M-C, Couvert P, Toniolo D, Ropers H-H, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns J-P, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. Non-specific X-linked semidominant mental retardation by mutations in a Rab GDP-dissociation inhibitor. **Hum Molec Genet** 7: 1311-1315, 1998.

Bittel DC, Kibiryeva N, Dasouki M, Knoll JHM, Butler MG. A 9-year-old male with a duplication of chromosome 3p25.3p26.2: Clinical report and gene expression analysis. **Am J Med Genet A.** Mar 15;140(6):573-9, 2006.

Boer H, Holland A, Whittington J, Butler J, Webb T, Clarke D. Psychotic illness in people with Prader-Willi syndrome due to chromosome 15 maternal uniparental disomy. **Lancet** 359: 135-137, 2002.

Borjeson M, Forssman H, Lehmann O. An X-linked, recessively inherited syndrome characterized by grave mental deficiency, epilepsy, and endocrine disorder. **Acta Med Scand.** Jan;171:13-21, 1962.

Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. **N Engl J Med** 322:1477–1482, 1990.

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.** Sep;2(5):400-10, 1994.

Brady AF, Elsawi MM, Jamieson CR, Marks K, Jefffery S, Patton MA. Clinical and molecular findings in a patient with a deletion of the long arm of chromosome 12. **J Med Genet** 36: 939–941, 1999.

Bruch H. Psychological aspects of overeating and obesity. **Psychosomatics.** 1964 Sep-Oct;5:269-74.

Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, Bankier A, Coman D, Delatycki M, Gardner MR, Hunter M, James PA, Kannu P, McGillivray G, Pachter N, Peters H, Rieubland C, Savarirayan R, Scheffer IE, Sheffield L, Tan T, White SM, Yeung A, Bowman Z, Ngo C, Choy K, Cacheux V, Wong L, Amor D, Slater HR. Detection of Cryptic Pathogenic Copy Number Variations and Constitutional Loss of Heterozygosity using High Resolution SNP Microarray Analysis in 117 Patients Referred for Cytogenetic Analysis and Impact on Clinical Practice. **J. Med. Genet**. Feb;46(2):123-31, 2009.

Cargile CB, Goh DL, Goodman BK, Chen XN, Korenberg JR, Semenza GL, Thomas GH. Molecular cytogenetic characterization of a subtle interstitial del(3)(p25.3p26.2) in a patient with deletion 3p syndrome. **Am J Med Genet.** 109(2):133-8, 2002.

Cassidy SB, Forsythe M, Heeger S, Nicholls RD, Schork N, Benn P, Schwartz S. Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. **Am J Med Genet.** 68: 433-440, 1997.

Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, Tayeh MK, Scheetz TE, Swiderski RE, Nishimura DY, Braun TA, Kim KY, Huang J, Elbedour K,Carmi R, Slusarski DC, Casavant TL, Stone EM, Sheffield VC. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). **Proc Natl Acad Sci USA.** Apr 18;103(16):6287-92, 2006.

Chung WK, Leibel RL. Molecular physiology of syndromic obesities in humans. **Trends Endocrinol Metab.** Aug;16(6):267-72, 2005.

Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature.** Mar 26;392(6674):398-401,1998.

Cohen MM Jr, Hall BD, Smith DW, Graham CB, Lampert KJ. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. **J Pediatr.** Aug;83(2):280-4, 1973.

Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. **BMJ.** May 6;320(7244):1240-3, 2000.

Cormier-Daire V, Molinari F, Rio M, Raoul O, de Blois M-C, Romana S, Vekemans M, Munnich A, Colleaux L. Cryptic terminal deletion of chromosome 9q34: a novel cause of syndromic obesity in childhood? **J Med Genet** 40: 300-303, 2003.

Crawford J, Lower KM, Hennekam RC, Van Esch H, Mégarbané A, Lynch SA, Turner G, Gécz J. Mutation screening in Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome: identification of a novel de novo PHF6 mutation in a female patient. J Med Genet. Mar;43(3):238-43, 2006.

Czako M, Riegel M, Morava E, Bajnoczky K, Kosztolanyi GO, "C" trigonocephaly-like syndrome in a patient with terminal deletion of 2 and partial duplication of 17q. **Am J Med Genet Part A** 131A:310–312, 2004.

D'Adamo P, Gulisano M, Oostra BA, Chelly J, Toniolo D. GDI is responsible for X-linked mental retardation. (Abstract) **Am J Hum Genet** 61 (suppl.): A11 only, 1997.

Dahlman I, Arner P. Obesity and polymorphisms in genes regulating human adipose tissue. **Int J Obes (Lond).** Nov;31(11):1629-41,2007.

D'Angelo CS, Da Paz JA, Kim CA, Bertola DR, Castro CI, 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. **Eur J Med Genet**, 49(6):451-60, 2006.

D'Angelo CS, Jehee FS, Koiffmann CP. An inherited atypical 1 Mb 22q11.2 deletion within the DGS/VCFS 3 Mb region in a child with obesity and aggressive behavior. **Am J Med Genet Part A** 143A:1928-1932, 2007.

D'Angelo CS, Kohl I, Varela MC, de Castro CI, Kim CA, Bertola DR, Lourenço CM, Koiffmann CP. Extending the phenotype of monosomy 1p36 syndrome and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia. **Am J Med Genet A.** Jan;152A(1):102-10, 2010.

Dee SL, Clark AT, Willat LR, Yates JR. A case of ring chromosome 2 with growth retardation, mild dysmorphism, and microdeletion of 2p detected using FISH. **J Med Genet** 38:E32, 2001.

Delrue MA, Michaud JL. Fat chance: genetic syndromes with obesity. **Clin Genet.** Aug;66(2):83-93, 2004.

Diego VP, Göring HH, Cole SA, Almasy L, Dyer TD, Blangero J, Duggirala R, Laston S, Wenger C, Cantu T, Dyke B, North K, Schurr T, Best LG, Devereux RB, Fabsitz RR, Howard BV, MacCluer JW. Fasting insulin and obesity-related phenotypes are linked to chromosome 2p: the Strong Heart Family Study. **Diabetes.** Jun;55(6):1874-8, 2006.

Drewnowski A, Popkin BM. The nutrition transition: new trends in the global diet. **Nutr Rev.** Feb;55(2):31-43, 1997. Review.

Elmquist, JK; Elias CF; Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron.** Vol. 22, 221–232, February, 1999.

Eugster, E. A.; Berry, S. A.; Hirsch, B. Mosaicism for deletion 1p36.33 in a patient with obesity and hiperfagia. **Am J Med Genet** 70: 409-412, 1997.

Faivre L, Cormier-Daire V, Lapierre JM, Colleaux L, Jacquemont S, Genevieve D, Saunier P, Munnich A, Turleau C, Romana S, Prieur M, De Blois MC, Vekemans M. Deletion of the SIM1 gene (6q16.2) in a patient with a Prader-Willi-like phenotype. **J Med Genet** 39:594–596, 2002.

Falk MJ, Feiler HS, Neilson DE, Maxwell K, Lee JV, Segall SK, Robin NH, Wilhelmsen KC, Träskelin AL, Kolehmainen J,Lehesjoki

AE, Wiznitzer M, Warman ML. Cohen syndrome in the Ohio Amish. **Am J Med Genet A.** Jul 1;128A(1):23-8, 2004.

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. **Nature.** Jan 9;385(6612):165-8, 1997.

Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ, Moore SJ, Badano JL, May-Simera H, Compton DS, Green JS,Lewis RA, van Haelst MM, Parfrey PS, Baillie DL, Beales PL, Katsanis N, Davidson WS, Leroux MR. Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. **Nat Genet.** Sep;36(9):989-93, 2004.

Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S, Challis BG, O'Rahilly S. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. **Diabetes.** Sep;55(9):2549-53, 2006.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab** 4:569–577, 2008.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. **Annu Rev Med.**56:443-58, 2005.

Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, Myhre AG, Retterstol L, Stanhope R, Edge JA, McKenzie S, Lessan N, Ghodsi M, De Rosa V, Perna F, Fontana S, Barroso I, Undlien DE, O'Rahilly S. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. **N Engl J Med.** Jan 18;356(3):237-47, 2007.

Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. **N Engl J Med.** Mar 20;348(12):1085-95, 2003.

Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. **J Clin Invest.** Jul;106(2):271-9, 2000.

Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. **J Clin Endocrinol Metab.** May;83(5):1407-13, 1998. Review.

Flint, J.; Knight, S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. **Current Opinion** 13: 310-316, 2003.

Frézal J. New X-linked syndrome of mental retardation, gynecomastia, and obesity is linked to DXS255. **Am J Med Genet.** Dec 1;44(6):854-5, 1992.

Fridman C, Varela MC, Kok F, Setian N, Koiffmann CP. Prader-Willi syndrome: Genetic tests and clinical findings. **Genetic Testing** 4: 387-392, 2000.

Frohlich A. Ein Fall von Tumor der Hypophysis cerebri ohne Akromegalie. **Wiener Klinische Rundschau** 15(833–836): 906–908, 1901.

Fyffe S, Neul J, Samaco R, Chao H, Ben-Shachar S, Moretti P, McGill B, Goulding E, Sullivan E, Tecott L. Deletion of Mecp2 in Sim1-Expressing Neurons Reveals a Critical Role for MeCP2 in Feeding Behavior, Aggression, and the Response to Stress. Neuron 59(6):947–958, 2008.

Gebbia M, Ferrero GB, Pilia G, Bassi MT, Aylsworth A, Penman-Splitt M, Bird LM, Bamforth JS, Burn J, Schlessinger D, Nelson DL, Casey B. X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. **Nat Genet.** Nov;17(3):305-8, 1997.

Gecz J, Baker E, Donnelly A, Ming JE, McDonald-McGinn DM, Spinner NB, Zackai EH, Sutherland GR, Mulley JC. Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF2): gene structure, expression and mapping to the Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome region in Xq26 delineated by a duplication breakpoint in a BFLS-like patient. **Hum Genet.** Jan;104(1):56-63, 1999.

Gedeon A, Mulley J, Turner G. Gene localisation for Wilson-Turner syndrome (WTS:MIM 309585) **Am J Med Genet** 64: 80-1, 1996.

Gedeon AK, Kozman HM, Robinson H, Pilia G, Schlessinger D, Turner G, Mulley JC. Refinement of the background genetic map of Xq26-q27 and gene localisation for Börjeson-Forssman-Lehmann Syndrome. **Am J Med Genet.** Jul 12;64(1):63-8, 1996.

Gijsbers AC, van Haeringen A, Bosch CA, Hansson K, Verschuren M, Bakker E, Breuning MH, Ruivenkamp CA. A Subtle Familial Translocation t(3;21)(p26.3;q22.3): An Apparently Healthy Boy with a 3p Deletion and 21q Duplication. **Cytogenet Genome Res.** Apr 30, 2010.

Gilhuis HJ, Ravenswaaij CMV, Hamel BJ, Gabreëls FJM. Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of literature. **Eur J Paediatr Neurol** 4: 39-43, 2000.

Gilhuis HJ, van Ravenswaaij CM, Hamel BJ, Gabreels FJ. Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: A new case and review of the literature. **Eur J Paediatr Neurol** 4:39–43, 2000.

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

Gropman AL, Elsea SC, Duncan WC Jr, Smith AC. New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). **Curr Opin Neurol** 20(2):125-134, 2007.

Gruchy N, Jacquemont ML, Lyonnet S, Labrune P, El Kamel I, Siffroi JP, Portnoï MF. Recurrent inverted duplication of 2p with terminal deletion in a patient with the classical phenotype of trisomy 2p23-pter. **Am J Med Genet A.** Oct 15;143A(20):2417-22, 2007.

Gunay-Aygun M, Heeger S, Schartz S, Cassidy SB. Delayed diagnosis in patients with Prader-Willi syndrome due to Maternal Uniparental Disomy 15. **Am J Med Genet** 71: 106-110, 1997.

Hamel BCJ, Kremer H, Wesby-van Swaay E, van den Helm B, Smits APT, Oostra BA, Ropers HH, Mariman ECM. A gene for nonspecific X-linked

mental retardation (MRX41) is located in the distal segment of Xq28. **Am. J. Med. Genet.** 64: 131-133, 1996.

Hebebrand J, Friedel S, Scha¨uble N, Geller F, Hinney A. Perspectives: molecular genetic research in human obesity. **Obes** Rev 4:139–146, 2003.

Hebebrand J, Hinney A. Environmental and genetic risk factors in obesity. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am** 18:83–94, 2009.

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.

Hennies HC, Rauch A, Seifert W, Schumi C, Moser E, Al-Taji E, Tariverdian G, Chrzanowska KH, Krajewska-Walasek M, Rajab A,Giugliani R, Neumann TE, Eckl KM, Karbasiyan M, Reis A, Horn D. Allelic heterogeneity in the COH1 gene explains clinical variability in Cohen syndrome. **Am J Hum Genet.** Jul;75(1):138-45, 2004.

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

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

Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. **Pediatrics** 91: 398-402, 1993.

Hoo JJ, Shrimpton AE. Distal 3p deletion is not necessarily associated with dysmorphic features or psychomotor delay**. Am J Med Genet A.** 146A(4):538, 2008.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD,Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. **Cell.** Jan 10;88(1):131-41, 1997.

James PA, Oei P, Ng D, Kannu P, Aftimos S. Another case of interstitial del(12) involving the proposed cardio-faciocutaneous candidate region. Am **J Med Genet** Part A 136A: 12–16, 2005.

James RS, Coppin B, Dalton P, Dennis NR, Mitchell C, Sharp AJ, Skuse DH, Thomas NS, Jacobs PA. A study of females with deletions of the short arm of the X chromosome. **Hum Genet** 102:507–516, 1998.

Jenkins D, Seelow D, Jehee FS, Perlyn CA, Alonso LG, Bueno DF, Donnai D, Josifova D, Mathijssen IM, Morton JE, Orstavik KH, Sweeney E, Wall SA, Marsh JL, Nurnberg P, Passos-Bueno MR, Wilkie AO. RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. **Am J Hum Genet.** 80(6):1162-70, 2007.

Just W, Mucke J. Towards a genotype-phenotype correlation in individuals with Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome. Presented at the European Human Genetics Conference, abstract P0631, Prague, Czech Republic, 2005.

Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. **Science.** Sep 21;293(5538):2256-9, 2001.

Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR. Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. **Nat Genet.** Sep;26(1):67-70, 2000.

Keppler-Noreuil, K. M.; Carrol, A. J.; Finley, W. H.; Rutledge, S. L. Chromosome 1p terminal deletion: report of new findings and confirmation of two characteristic phenotypes. **J. Med. Genet.** 32: 619-622, 1995.

Kivitie-Kallio S, Norio R. Cohen syndrome: essential features, natural history, and heterogeneity. **Am J Med Genet.** Aug 1;102(2):125-35, 2001.

Klaassens M, Scott DA, van Dooren M, Hochstenbach R, Eussen HJ, Cai WW, Galjaard RJ, Wouters C, Poot M, Laudy J, Lee B, Tibboel D, de

Klein A. Congenital diaphragmatic hernia associated with duplication of 11q23-qter. **Am J Med Genet A.** Jul 15;140(14):1580-6, 2006.

Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Romein T, Sistermans E, Nillessen W, van Bokhoven H, de Vries BB, Hamel BC. De novo MECP2 frameshift mutation in a boy with moderate mental retardation, obesity and gynaecomastia. **Clin Genet** 61: 359-62, 2002.

Klein OD, Cotter PD, Moore MW, Zanko A, Gilats M, Epstein CJ, Conte F, Rauen KA. Interstitial deletions of chromosome 6q: Genotype-phenotype correlation utilizing array CGH. **Clin Genet** 71:260–266, 2007.

Klein OD, Cotter PD, Schmidt AM, Bick DP, Tidyman WE, Albertson DG, Pinkel D, Rauen KA. Interstitial deletion of chromosome 12q: Genotype-phenotype correlation of two patients utilizing array comparative genomic hybridization. **Am J Med Genet** Part A 138A:349–354, 2005.

Kolehmainen J, Wilkinson R, Lehesjoki AE, Chandler K, Kivitie-Kallio S, Clayton-Smith J, Träskelin AL, Waris L, Saarinen A, Khan J, Gross-Tsur V, Traboulsi EI, Warburg M, Fryns JP, Norio R, Black GC, Manson FD. Delineation of Cohen syndrome following a large-scale genotype-phenotype screen. **Am J Hum Genet.** Jul;75(1):122-7, 2004.

Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Tanke HJ, Breuning MH, Szuhai K. Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. **Am J Med Genet A.** Mar 15;143(6):610-4, 2007.

Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nat Genet.** Jun;19(2):155-7, 1998.

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Grüters A. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. **J Clin Endocrinol Metab.** Oct;88(10):4633-40, 2003.

Lachlan KL, Youings S, Costa T, Jacobs PA, Thomas NS. A clinical and molecular study of 26 females with Xp deletions with special emphasis on inherited deletions. **Hum Genet.** Jan;118(5):640-51, 2006.

Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC, Lewis RA, Green JS,Parfrey PS, Leroux MR, Davidson WS, Beales PL, Guay-Woodford LM, Yoder BK, Stormo GD, Katsanis N, Dutcher SK.Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. **Cell.** May 14;117(4):541-52, 2004.

Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, Whitby R, Liang L, Cohen P, Bhasin S, Krauss RM, Veldhuis JD, Wagner AJ, DePaoli AM, McCann SM, Wong ML.Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Mar 30;101(13):4531-6, 2004.

Lower KM, Turner G, Kerr BA, Mathews KD, Shaw MA, Gedeon AK, Schelley S, Hoyme HE, White SM, Delatycki MB, Lampe AK, Clayton-Smith J, Stewart H, van Ravenswaay CM, de Vries BB, Cox B, Grompe M, Ross S, Thomas P, Mulley JC, Gécz J. Mutations in PHF6 are associated with Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome. **Nat Genet.** Dec;32(4):661-5, 2002.

Lower KM, Solders G, Bondeson ML, Nelson J, Brun A, Crawford J, Malm G, Börjeson M, Turner G, Partington M, Gécz J.1024C> T (R342X) is a recurrent PHF6 mutation also found in the original Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome family. **Eur J Hum Genet.** Oct;12(10):787-9, 2004.

Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, Tzschach A, Raynaud M, Rating D, Journel H, Chelly J, Goizet C, Lacombe D, Pedespan JM, Echenne B, Tariverdian G, O'Rourke D, King MD, Green A, van Kogelenberg M, Van Esch H, Gecz J, Hamel BC, van Bokhoven H, de Brouwer AP. Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. **Eur J Hum Genet.** Apr;17(4):444-53, 2009.

Malmgren H, Sahlén S, Wide K, Lundvall M, Blennow E. Distal 3p deletion syndrome: detailed molecular cytogenetic and clinical characterization of three small distal deletions and review. **J. Med. Genet.** 143A: 2143-2149, 2007.

Mathews KD, Buetow K, Turner G, Mulley J. Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome localization. **Am J Med Genet.** Dec;34(4):475, 1989.

Mei D, Marini C, Novara F, Bernardina BD, Granata T, Fontana E, Parrini E, Ferrari AR, Murgia A, Zuffardi O, Guerrini R. Xp22.3 genomic deletions involving the CDKL5 gene in girls with early onset epileptic encephalopathy. **Epilepsia.** Apr;51(4):647-54, 2010.

Meinecke P, Meinecke R. Multiple malformation syndrome including cleft lip and palateand cardiac abnormalities due to an interstitial deletion of chromosome 12q. **J Med Genet** 24:187, 1987.

Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Levy E, Mitchell GA, Himms-Hagen J, Fan CM.Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Hum Mol Genet** 10: 1465-1473, 2001.

Mikaye N, Tonoki H, Gallego M, Harada N, Shimokawa O, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Phenotype-genotype correlation in two patients with 12q proximal deletion. **J Hum Genet** 49:282–284, 2004.

Ming JE, Geiger E, James AC, Ciprero KL, Nimmakayalu M, Zhang Y, Huang A, Vaddi M, Rappaport E, Zackai EH, Shaikh TH. Rapid detection of submicroscopic chromosomal rearrangements inchildren with multiple congenital anomalies using high density oligonucleotide arrays. **Hum Mutat** 27(5):467-473, 2006.

Mochida GH, Rajab A, Eyaid W, Lu A, Al-Nouri D, Kosaki K, Noruzinia M, Sarda P, Ishihara J, Bodell A, Apse K, Walsh CA. Broader geographical spectrum of Cohen syndrome due to COH1 mutations. **J Med Genet.** Jun;41(6):e87, 2004.

Monfort S, Blesa D, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Cigudosa JC, Martínez F. Duplication of 14q11.2 associates with short stature and mild

mental retardation: a putative relation with quantitative trait loci. **Am J Med Genet A.** Feb 15;143(4):382-4, 2007.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB,O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature.** Jun 26;387(6636):903-8, 1997.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of leukocyte cultures of human peripheral blood. **Exp Cell Res 20:** 613-616, 1960.

Mykytyn K, Braun T, Carmi R, Haider NB, Searby CC, Shastri M, Beck G, Wright AF, Iannaccone A, Elbedour K, Riise R, Baldi A,Raas-Rothschild A, Gorman SW, Duhl DM, Jacobson SG, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC. Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. **Nat Genet.** Jun;28(2):188-91, 2001.

Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, Shastri M, Yen HJ, Beck JS, Braun T, Streb LM, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R,Lüleci G, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Jacobson SG, Heckenlively JR, Weleber RG, Stone EM, Sheffield VC. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. **Nat Genet.** Aug;31(4):435-8, 2002.

Ni XP, Butler AA, Cone RD, Humphreys MH. Central receptors mediating the cardiovascular actions of melanocyte stimulating hormones. **J Hypertens.** Nov;24(11):2239-46, 2006.

Nishimura DY, Searby CC, Carmi R, Elbedour K, Van Maldergem L, Fulton AB, Lam BL, Powell BR, Swiderski RE, Bugge KE,Haider NB, Kwitek-Black AE, Ying L, Duhl DM, Gorman SW, Heon E, Iannaccone A, Bonneau D, Biesecker LG, Jacobson SG,Stone EM, Sheffield VC. Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). **Hum Mol Genet.** Apr 1;10(8):865-74, 2001.

Nishimura DY, Swiderski RE, Searby CC, Berg EM, Ferguson AL, Hennekam R, Merin S, Weleber RG, Biesecker LG, Stone EM,Sheffield VC. Comparative genomics and gene expression analysis

identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene. **Am J Hum Genet.** Dec;77(6):1021-33, 2005.

Nisoli E, Brunani A, Borgomainerio E, Tonello C, Dioni L, Briscini L, Redaelli G, Molinari E, Cavagnini F, Carruba MO. D2 dopamine receptor (DRD2) gene Taq1A polymorphism and the eating-related psychological traits in eating disorders (anorexia nervosa and bulimia) and obesity. **Eat Weight Disord.** Jun;12(2):91-6, 2007.

Norio, R. The Finnish disease heritage I: Characteristics, causes, background. **Hum. Genet.** 112: 441-456, 2003.

Nussey SS, Soo SC, Gibson S, Gout I, White A, Bain M, Johnstone AP. Isolated congenital ACTH deficiency: a cleavage enzyme defect? **Clin Endocrinol (Oxf).** Sep;39(3):381-5, 1993.

O'Rahilly S, Farooqi IS, Yeo GS, Challis BG. Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. **Endocrinology.** Sep;144(9):3757-64, 2003.

Pe´rez-Sa´nchez C, Ayensa F, Lloveras E, Zamora L, Cirigkiano V, Pe´rez E, Plaja A. Prenatal diagnosis of an interstitial 12q chromosome deletion. **Ann Genet** 47:177–179, 2003.

Petek E, Windpassinger C, Mach M, Rauter L, Scherer SW, Wagner K, Kroisel PM. Molecular characterization of a 12q2-q24 deletion associated with congenital deafness: Confirmation and refinement of the DFNA25 locus. **Am J Med Genet** Part A 117A:122–126, 2003.

Plotner PL, Smith JL, Northrup H. Deletion 12q: A second patient with 12q24.31q24.32 deletion. **Am J Med Genet** Part A 118A:350–352, 2003.

Prader A, Labhart A, Willi H. Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. **Schweiz Med Wochenschr** 86: 1260-1261, 1956.

Rapley EA, Hargrave D, Persinguhe N, Barfoot R, Moore I, Radford M, Stratton MR, Rahman N, Pritchard-Jones K. Case of interstitial 12q deletion in association with Wilms tumor. **Am J Med Genet** 104:246–249, 2001.

Rauen KA, Albertson DG, Pinkel D, Cotter PD. Additional patient with del(12)(q21.2q22): Further evidence for a candidate region for cardio-facio-cutaneous syndrome? **Am J Med Genet** 110:51–56, 2002.

Rauen KA, Cotter PD, Bitts SM, Cox VA, Golabi M. Cardiofacio-cutaneous phenotype in an individual with an interstitial deletion of 12q: Identification of a candidate region for CFC syndrome. **Am J Med Genet** 93:219–222, 2000.

Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. **J Med Genet** 43:478–489, 2006.

Rejeb I, Ben Jemaa L, Chaabouni H. X linked mental retardation. **Tunis Med.** May;87(5):311-8, 2009.

Rio, M.; Molinari, F.; Heuertz, S.; Ozilou, C.; Gosset, P.; Raoul, O.; Cormier-Daire, V.; Amiel, J.; Lyonnet, S.; Le Merrer, M.; De Blois, M-C; Prieur, M.; Romana, S.; Vekemans, M.; Munnich, A.; Colleaux, L. Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. **J. Med. Genet** 39: 266-270, 2002.

Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. **Hum Mutat**. 2005 Jun;25(6):513-24.

Ruiter EM, Koolen DA, Kleefstra T, Nillesen WM, Pfundt R, de Leeuw N, Hamel BC, Brunner HG, Sistermans EA, de Vries BB. Pure subtelomeric microduplications as a cause of mental retardation. **Clin Genet.** Oct; 72(4):362-8, 2007.

Sanlaville D, Schluth-Bolard C, Turleau C. Distal Xq duplication and functional Xq disomy. **Orphanet J Rare Dis.** Feb 20;4:4, 2009.

Sathya P, Tomkins DJ, Freeman V, Paes B, Nowaczyk MJ. De novo deletion 12q: Report of a patient with 12q24.31q24.33 deletion. **Am J Med Genet** 84:116–119, 1999.

Schluth C, Gesny R, Borck G, Redon R, Abadie V, Kleinfinger P, Munnich A, Lyonnet S, Colleaux L. New case of interstitial deletion 12(q15-q21.2) in a girl with facial dysmorphism and mental retardation. **Am J Med Genet A.** Jan 1;146A(1):93-6, 2008.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res**. Jun 15;30(12):e57, 2002.

Seifert W, Holder-Espinasse M, Spranger S, Hoeltzenbein M, Rossier E, Dollfus H, Lacombe D, Verloes A, Chrzanowska KH,Maegawa GH, Chitayat D, Kotzot D, Huhle D, Meinecke P, Albrecht B, Mathijssen I, Leheup B, Raile K, Hennies HC, Horn D. Mutational spectrum of COH1 and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. **J Med Genet.** May;43(5):e22, 2006.

Shaffer, L. G.; Heilstedt, H. A. Terminal deletion of 1p36. **The Lancet suppl.** 358: 9, 2001.

Shapira, S. K.; Mc Caskill, C.; Northrup, H.; Greenberg, F.; Shaffer, L. G. Chromosome 1p36 deletions: The critical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. **Am J Hum Genet** 61: 642-650, 1997.

Slavotinek, A.; Shaffer, L. G.; Shapira, S. K. Monosomy 1p36: review article. **J Med Genet** 36: 657-663, 1999.

Smyk, M.; Obersztyn, E.; Nowakowska, B.; Nawara, M.; Cheung, S.W.; Mazurczak, T.; Stankiewicz, P.; Bocian, E. Different-sized duplications of Xq28, including MECP2, in three males with mental retardation, absent or delayed speech, and recurrent infections. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 147B(6):799-806, 2008.

Stankiewicz P, Thiele H, Schlicker M, Cseke-Friedrich A, Bartel-Friedrich S, Yatsenko SA, Lupski JR, Hansmann I. Duplication of Xq26.2-q27.1, including SOX3, in a mother and daughter with short stature and dyslalia. **Am J Med Genet A.** Sep 15;138(1):11-7, 2005.

Stein CK, Stred SE, Thomson LL, Smith FC,Hoo JJ. Interstitial 6q deletion and Prader-Willi-like phenotype. **Clin Genet** 49: 306–310, 1996.

Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, Leitch CC, Salem N, Chouery E, Corbani S, Jalk N, Vicaire S, Sarda P,Hamel C, Lacombe D, Holder M, Odent S, Holder S, Brooks AS, Elcioglu NH, Silva ED, Rossillion B, Sigaudy S, de Ravel TJ,Lewis RA, Leheup B, Verloes A, Amati-Bonneau P, Mégarbané A, Poch O, Bonneau D, Beales PL, Mandel JL, Katsanis N, Dollfus H. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. **Nat Genet.** May;38(5):521-4, 2006.

Stoetzel C, Muller J, Laurier V, Davis EE, Zaghloul NA, Vicaire S, Jacquelin C, Plewniak F, Leitch CC, Sarda P, Hamel C, de Ravel TJ, Lewis RA, Friederich E, Thibault C, Danse JM, Verloes A, Bonneau D, Katsanis N, Poch O, Mandel JL, Dollfus H. Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. **Am J Hum Genet.** Jan;80(1):1-11, 2007.

Tahvanainen E, Norio R, Karila E, Ranta S, Weissenbach J, Sistonen P, de la Chapelle A. Cohen syndrome gene assigned to the long arm of chromosome 8 by linkage analysis. **Nat Genet.** Jun;7(2):201-4, 1994.

Takeuchi S, Teshigawara K, Takahashi S. Molecular cloning and characterization of the chicken pro-opiomelanocortin (POMC) gene. **Biochim Biophys Acta.** Jul 8;1450(3):452-9, 1999.

Tarpey P, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Moon J, Luo Y, Holder S, Smithson SF, Hurst JA, Clayton-Smith J, Kerr B, Boyle J, Shaw M, Vandeleur L, Rodriguez J, Slaugh R, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Srivastava AK, Stevenson RE, Schwartz CE, Turner G, Gecz J, Futreal PA, Stratton MR, Partington M. Mutations in CUL4B, Which Encodes a Ubiquitin E3 Ligase Subunit, Cause an X-linked Mental Retardation Syndrome Associated with Aggressive Outbursts, Seizures, Relative Macrocephaly, Central Obesity, Hypogonadism, Pes Cavus, and Tremor. **Am J Hum Genet** 80(2):345-352, 2007.

Tonoki H, Saitoh S, Kobayashi K. Patient with del (12)(q12q13.12) manifesting abnormalities compatible with Noonan syndrome. Am J Med Genet 75:416–418, 1998.

Turleau C, Demay G, Cabanis MO, Lenoir G, de Grouchy J. 6q1 monosomy: A distinctive syndrome. **Clin Genet** 34:38–42, 1988.

Turner G, Gedeon A, Mulley J, Sutherland G, Rae J, Power K, Arthur I. Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome: clinical manifestations and gene localization to Xq26-27. **Am J Med Genet.** Dec;34(4):463-9, 1989.

Turner G, Lower KM, White SM, Delatycki M, Lampe AK, Wright M, Smith JC, Kerr B, Schelley S, Hoyme HE, De Vries BB, Kleefstra T, Grompe M, Cox B, Gecz J, Partington M. The clinical picture of the Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome in males and heterozygous females with PHF6 mutations. **Clin Genet.** Mar;65(3):226-32, 2004.

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. **Nat Genet.** Oct;20(2):113-4, 1998.

Vallee D, Chevrier E, Graham GE, Lazzaro MA, Lavigne PA, Hunter AG, Picketts DJ. A novel PHF6 mutation results in enhanced exon skipping and mild Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome. **J Med Genet.** 41:778–83, 2004.

Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. **Am J Hum Genet** 77: 442-53, 2005.

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** 67: 47-52, 2005.

Varela MC, Simões-Sato AY, Kim CA, Bertola DR, Castro CIE, Koiffmann CP. A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader-Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87

patients with syndromic obesity. **Eur J Med Genet** 49(4):298-305, 2006.

Vazna A, Musova Z, Vlckova M, Novotna D, Dvorakova L, Hrdlicka M, Havlovicova M, Sedlacek Z. FMR1 gene expansion, large deletion of Xp, and skewed X-inactivation in a girl with mental retardation and autism. **Am J Med Genet A.** May;152A(5):1273-7, 2010.

Villa A, Urioste M, Bofarull JM, Martinez-Frias ML. De novo interstitial deletion q16.2q21 on chromosome 6. **Am J Med Genet** 55:379–383, 1995.

Walley AJ, Blakemore AI, Froguel P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. **Hum Mol Genet** Oct 15;15 Spec No 2:R124-30, 2006.

Wang JC, Turner L, Lomax B, Eydoux P. A 5-Mb microdeletion at 6q16.1-q16.3 with SIM gene deletion and obesity. **Am J Med Genet A.** 146A(22):2975-8, 2008.

Wargowski, D.; Sekhon, G.; Laxova, R.; Thompson, K.; Kent, C. Terminal deletions of band 1p36: emergence of twuo overlapping phenotypes. **Am. J. Hum. Genet. Suppl.** 49: 278, 1991.

Watson MS, Mcallister-Barton L, Mahoney MJ, Breg WR.Deletion (12)(q15q21.2). J Med Genet 26:343–344, 1989.

Webb T, Whittington J, Clarke D, Boer H, Butler J, Holland A. A study of the influence of different genotypes on the physical and behavioral phenotypes of children and adults ascertained clinically as having PWS. **Clin Genet** 62: 273-281, 2002.

Wilson M, Mulley J, Gedeon A, Robinson H, Turner G. New X-linked syndrome of mental retardation, gynecomastia, and obesity is linked to DXS255. **Am J Med Genet.** Sep 15;40(4):406-13, 1991.

Wu, Y. Q.; Heilstedt, H. A.; Bedell, J. A.; May, K. M.; Starkey, D. E.; Mcpherson, J.; Shapira, S. K.; Shaffer, L. G. Molecular refinement of the 1p36 deletion syndrome. Reveals size diversity and a preponderance of maternally derived deletions. **Hum Mol Genet** 8: 313-321, 1999.

Yamanishi T, Nishio J, Miya S, Okamoto N, Takahashi A, Toribe Y, Mukai T, Kobayashi C. 12q interstitial deletion with bilateral cleft lip and palate: case report and literature review. **Cleft Palate Craniofac J.** May; 45(3): 325-8, 2008.

Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. **Nat Genet.** Oct;20(2):111-2, 1998.

Zhao HQ, Rope AF, Saal HM, Blough-Pfau RI, Hopkin RJ. Upper airway malformation associated with partial trisomy 11q. **Am J Med Genet A.** Jul 30;120A(3):331-7, 2003.