

**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

Bianca Fujita dos Reis

**Análise cromossômica por *microarray* em pacientes com
deficiência intelectual associada à obesidade**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Professora Doutora Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília

2015

Bianca Fujita dos Reis

**Análise cromossômica por *microarray* em pacientes com
deficiência intelectual associada à obesidade**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 01 de dezembro de 2015.

Banca examinadora

Profª Drª Juliana Forte Mazzeu de Araújo
Universidade de Brasília

Profª Drª Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília

Drª Beatriz Ribeiro Versiani.
Hospital Universitário de Brasília

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Juliana Forte Mazzeu de Araújo, por todos os ensinamentos, toda paciência, todos os puxões de orelha e toda a atenção a mim dedicada durante estes anos de pesquisa. Não poderia ser mais grata pela oportunidade de realizar este grande trabalho ao seu lado.

À toda a equipe do laboratório de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da UnB, especialmente às Prof^{as} Dr^{as} Aline Pic-Taylor e Silviene Fabiana de Oliveira, por oferecer a estrutura e o apoio necessários para o sucesso deste trabalho; ao Raphael Bonadio e à Marcella Motta, sem os quais os experimentos não poderiam ter sido realizados.

Ao suporte de toda a equipe de Genética Médica da Faculdade de Medicina da UnB: Dr^a Íris Ferrari, com seu imenso conhecimento na área de Genética Médica, que me recebeu de braços abertos desde o primeiro contato; Dr^a Mara Córdoba, sempre disposta a tirar minhas dúvidas e contribuir para o meu crescimento acadêmico e profissional; Dr^a Beatriz Versiani, pelo constante incentivo e pela boa vontade e disponibilidade para discussão de casos.

Aos colegas do Núcleo de Genética do Hospital de Apoio de Brasília: à equipe médica, por fornecer os subsídios para executar esta pesquisa, encaminhando os pacientes; à Dr^a Maria Teresinha Cardoso de Oliveira, que me acolheu no NUGEN com muito carinho, uma pessoa para admirar e se espelhar; às amigas do laboratório de citogenética Luciana, Rachel, Gabriella e Sinara; aos meus queridos amigos Carol, Édelyn, Ursula e Victor, pelo apoio e por me aguentarem todos os dias, me fazendo rir mesmo quando tudo parecia estar dando errado.

Aos amigos Claudiner e Ruscaia, por me ouvirem reclamar, me acalmarem e me fazerem acreditar e, acima de tudo, acreditarem que tudo daria certo. Por toda a ajuda que vocês me deram durante a pesquisa e durante a etapa de elaboração da dissertação, pois sem vocês este trabalho não teria sido concluído. Tenho uma dívida eterna com vocês.

Aos pacientes e seus responsáveis, por aceitarem participar deste estudo, pois nossos esforços terão sempre em vista contribuir para melhorar a qualidade de vida de vocês.

Aos meus terapeutas, Dr. Jivago Velasco, Eurico Emidio e Erica Farias, pelo suporte psicológico durante essa jornada, por não me deixarem surtar, jogar tudo para o alto e ir para a China cuidar de pandas.

À minha família: meu pai, Rui, meu melhor amigo e meu super-herói, sempre ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões; minha mãe, Cecília, meu exemplo de mulher, de força, dedicação e altruísmo, espero que um dia eu seja metade da mulher que você é; meus irmãos Gabriel, Lucas e Guilherme, por todas as brincadeiras, todas as risadas e todos os momentos de companheirismo. Cuca, nunca esquecerei as noites que você virou ao meu lado só para me fazer companhia enquanto eu estudava. À minha mãedrastra, Rúbia, que nunca me deixou fraquejar e sempre incentivou e me estimulou quando eu precisava estudar, inclusive brigando com o meu pai para que ele me deixasse quieta. À Naná, por aguentar e organizar toda a bagunça que sempre deixei pela casa com minha centena de papéis e anotações. Amo vocês.

Às minhas “Amoras” – Ligia, Débora, Isabel, Mariana e Ianá –, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, rindo, chorando, brigando, mas sempre me aconselhando e segurando a minha mão quando eu precisei. Tenho muita sorte de ter vocês ao meu lado. Não conheço ninguém que tenha amigas tão fantásticas quanto eu, e nenhuma distância pode atrapalhar isso. Amo vocês.

Aos meus queridos meninos do “Pagode da Amarelinha” – Yuri, Flávio, Marmota, Dão, Pedro, PH e Sushi. Sem vocês certamente minha vida seria infinitamente sem graça. Ao Nick, amigo amado, sempre me apoiando incondicionalmente em todos os momentos, obrigada por estar sempre presente. Amo vocês.

À Camilla, talvez a pessoa que mais me conheça – melhor até do que eu mesma –, irmã que não tive, caminhando junto comigo há mais de 20 anos. Você sempre acreditou em mim, mesmo quando eu tive dúvidas e nunca me deixou sozinha. Te amo infinitamente.

Sim, amo muitas pessoas. Sou uma mulher de sorte por ter tantas pessoas maravilhosas ao meu lado. Cada um com seu jeito, com suas neuras, com o seu modo de ser, mas cada um com seu brilho incomparável, que só pessoas especiais possuem.

Por fim, ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB e às agências de fomento que permitiram que este projeto se concretizasse.

*“E aqueles que foram vistos dançando
foram julgados insanos por aqueles
que não podiam escutar a música”*

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

A obesidade tem se tornado um problema de saúde pública, alcançando taxas superiores a 25% da população. Resultante de uma interação entre fatores ambientais, tais como alimentação e atividades físicas, fatores sociais e fatores genéticos, a obesidade possui uma expressão fenotípica heterogênea e diversos mecanismos moleculares envolvidos. Baseada na etiologia genética, a obesidade pode ser categorizada de três formas distintas: 1) monogênica, na qual o gene causador do fenótipo é claramente identificado, 2) obesidade comum, refletindo a contribuição aditiva de genes distintos e 3) obesidade sindrômica, quando está relacionada a outras alterações, como malformações congênitas, distúrbios comportamentais e deficiência intelectual. O presente estudo tem como objetivo identificar alterações submicroscópicas em pacientes portadores de deficiência intelectual (DI) associada à obesidade, por meio da análise cromossômica de microarranjos (CMA). Foram analisados 68 pacientes, dos quais 3 (4,4%) foram identificados como portadores da Síndrome de Prader-Willi (PWS) pela técnica de MS-MLPA. Para a análise de microarranjos foram selecionados 20 pacientes, dos quais quatro apresentaram LOH, sendo que um deles no cromossomo 11, na região da síndrome de Bardet-Biedl, permitindo assim o diagnóstico da síndrome. Em um paciente foi detectada uma deleção de cerca de 7,9Mb no cromossomo 2, considerada patogênica. Dois pacientes tinham alterações que consideramos do tipo indeterminadas (VOUS), uma vez que não houve evidências para a correlação entre o quadro clínico e as alterações encontradas; e dezesseis com alterações previamente descritas nos bancos de dados e consideradas benignas. A baixa detecção de CNVs patogênicas e a alta incidência de LOH permitem concluir que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas características talvez sejam mais complexos, como mutações de ponto, por exemplo. Dessa forma, ferramentas como o sequenciamento do exoma ou genoma devem ser consideradas como principal técnica para o diagnóstico de pacientes portadores de DI associada à obesidade, sugerindo regiões e genes que possam elucidar a etiologia do quadro.

Palavras-chave: Deficiência intelectual associada à obesidade, MS-MLPA, SNP-array, CNV.

ABSTRACT

Obesity has become a public health problem, reaching higher rates in population (25%). It is a result of an interaction between environmental factors such as nutrition and physical activity, and social and genetic factors. It also presents a heterogeneous phenotypic expression and hence, diverse molecular mechanisms involved. Based on genetic etiology, obesity is classified in three types: 1) monogenic, when the gene is clearly identified 2) Common obesity, reflecting further contribution of distinct genes and 3) syndromic obesity, related to other changes, such as congenital malformations, behavioral disorders and intellectual disabilities. The aim of this study is to identify submicroscopic changes in patients with intellectual disability (ID) associated with obesity, using chromosomal microarray analysis (CMA). Among 68 patients analyzed, three (4.4%) had a molecular diagnosis of Prader-Willi Syndrome (PWS) by MS-MLPA technique. Microarray analysis was performed in 20 patients. Four patients has regions of loss of heterozygosity (LOH), one of them in Bardet-Biedl syndrome region on chromosome 11, which allows the syndrome diagnosis. Other patient presents a deletion of about 7.9Mb on chromosome 2 possibly pathogenic. Further, two other patients had imbalances considered as variants of unknown significance (VOUS), since no evidence for the correlation between clinical features and genetic changes are found. Finally, 16 patients present abnormalities previously described in databases and considered benign. The low detection of chromosomal imbalances and the high incidence of LOH reveals complex mechanisms involved in the development of these features and may be more complex, such as point mutations, for example. Therefore, tools such as exome or genome sequencing should be considered as a primary technique for diagnosis of patients with ID associated with obesity, suggesting some regions and genes that may clarify the etiology of the condition.

Keywords: Intellectual disability associated with obesity, MS-MLPA, SNP- array, CNV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Loci</i> associados a alguma característica relacionada à obesidade	19
Figura 2. Mapa da região 15q11-q13	29
Figura 3. CNVs envolvendo <i>loci</i> associados à deficiência intelectual	35
Figura 4. Resumo da reação de MS-MLPA para detecção e quantificação de sequências de nucleotídeos utilizando uma enzima de digestão sensível à metilação	42
Figura 5. Gráfico mostrando o padrão normal de número de cópias para cada sequência amplificada da amostra pela técnica de MLPA	43
Figura 6. Gráfico mostrando o padrão normal de metilação para cada sequência amplificada da amostra pela técnica de MLPA	43
Figura 7. Protocolo da plataforma Affymetrix® CytoScan™ 750k Array, com o tempo aproximado para a realização de cada etapa	45
Figura 8. Gráfico do paciente 1 representando a deleção encontrada, que se estende até o gene TUBGCP5 e o gene GABRB3	49
Figura 9. Gráfico do paciente 2 representando a deleção encontrada entre NIPA1 e GABRB3	50
Figura 10. Imagem gerada pelo <i>software</i> ChAS versão 3.1 (Affymetrix, EUA) do paciente 4, representando a região de perda de heterozigose encontrada	54
Figura 11. Representação gráfica da deleção da região cromossômica 2p24.3p23.3, encontrada no paciente 6	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais síndromes associadas à obesidade e deficiência intelectual	24
Tabela 2. Principais CNVs encontradas nos pacientes alterados	52
Tabela 3. Regiões de perda de heterozigose observadas no paciente 5 e seus respectivos tamanhos	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHO	<i>Albright Hereditary Osteodystrophy</i> (Osteodistrofia Hereditária de Albright)
AS	<i>Angelman Syndrome</i> (Síndrome de Angelman)
<i>BBS1-18</i>	Genes da Síndrome de Bardet-Biedl
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
BFLS	<i>Borjeson-Forssman-Lehmann Syndrome</i> (Síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ChAS	<i>Chromosome Analysis Suite</i>
CMA	<i>Chromosome Microarray Analysis</i> (Análise Cromossômica por Microarranjos)
CNV	<i>Copy Number Variation</i> (Variações do Número de Cópias)
DECIPHER	<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variant</i>
DI	Deficiência Intelectual
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FTO	<i>Fat Mass and Obesity Associated Gene</i>
GH	<i>Growth Hormone</i> (Hormônio do Crescimento)
GIANT	<i>Genetic Investigation of Anthropometric Traits</i>
GRS	<i>Risk-allele Score</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
<i>HapMap</i>	<i>Haplotype Map</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IC	<i>Imprinting Center</i> (Centro de <i>imprinting</i>)

IMC	Índice de Massa Corporal
<i>INSIG2</i>	<i>Insulin-induced gene 2</i>
Kb	quilo base (milhares de bases)
<i>LEP</i>	Gene Produtor da Leptina
<i>LEPR</i>	Gene Produtor do Receptor de Leptina
LOH	Loss of Heterozygosity (Perda de Heterozigose)
Mb	Mega bases (milhões de bases)
<i>MC4R</i>	Gene Produtor do Receptor de Melanocortina 4
<i>MKKS/BBS6</i>	<i>McKusick-Kaufman syndrome gene</i>
MS-MLPA	<i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAGE	<i>Population Architecture using Genomics and Epidemiology</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
<i>PCSK1</i>	Gene Produtor da Proproteína Convertase
<i>PHF6</i>	<i>PHD finger protein 6</i>
<i>POMC</i>	Gene Produtor da proopiomelanocortina
PWS	<i>Prader-Willi Syndrome</i> (Síndrome de Prader-Willi)
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>
SES/DF	Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de único nucleotídeo)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UPD	<i>Uniparental Disomy</i> (Dissomia Uniparental)
VOUS	<i>Variants of Unknown Significance</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBESIDADE MONOGÊNICA NÃO SINDRÔMICA	15
1.2 OBESIDADE COMUM OU POLIGÊNICA	18
1.3 OBESIDADE SINDRÔMICA	23
1.3.1 Obesidade Associada à Deficiência Intelectual	23
1.4. PRINCIPAIS SÍNDROMES RELACIONADAS À OBESIDADE	24
1.4.1 Síndrome de Bardet-Biedl	24
1.4.2 Osteodistrofia Hereditária de Albright	25
1.4.3 Síndrome de Borjeson-Forsman-Lehmann	26
1.4.4 Síndrome de Cohen	26
1.4.5 Síndrome de Prader-Willi	27
1.4.6 Outras Obesidades Sindrômicas	31
1.5 VARIAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNV)	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 CULTURA DE LINFÓCITOS E EXAME DE CARIÓTIPO	38
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	39
3.3 ANÁLISE DE MICROARRANJOS POR MLPA	40
3.4 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJOS (CMA)	44

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 RESULTADOS DOS EXAMES DE CARIÓTIPO	48
4.2 ALTERAÇÕES ENCONTRADAS POR MLPA	48
4.3 ALTERAÇÕES ENCONTRADAS PELA ANÁLISE CROMOSSÔMICA DE MICROARRANJOS (CMA)	51
4.3.1 Paciente 4	53
4.3.2 Paciente 5	56
4.3.3 Paciente 6	58
4.3.4 Paciente 7	60
4.4 DISCUSSÃO	61
5 CONCLUSÕES	64
6 REFERÊNCIAS	65
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	70
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	71

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a obesidade tem-se tornado um problema de saúde pública, alcançando, em alguns países, taxas superiores a 25% da população (1). Estima-se que em 2030 mais de 2,16 bilhões de pessoas estarão acima do peso e 1,12 bilhão serão obesas. Apesar das campanhas de conscientização e das pesquisas científicas na área, os esforços para reduzir as taxas de obesidade por meio de dietas, exercícios, medicamentos e até mesmo intervenções cirúrgicas não têm surtido efeito a longo prazo (2,3).

Estudos mostram que a estrutura genética da população, a baixa condição social, o estresse psicológico ou mesmo a dificuldade de acesso a assistência médica possuem um grande impacto no desenvolvimento e na prevalência da obesidade. O contexto cultural no qual as pessoas estão inseridas também parece ser um fator importante, uma vez que pode, por exemplo, influir no tipo e na qualidade da alimentação (4).

Resultante de uma interação entre fatores ambientais, tais como alimentação e atividades físicas, fatores sociais e fatores genéticos, a obesidade possui uma expressão fenotípica heterogênea e diversos mecanismos moleculares envolvidos. Entretanto, diversos estudos estimam que de 40% a 70% da variação do peso corporal pode ser determinada por fatores genéticos (2), o que pode ser corroborado pela alta herdabilidade do IMC (4).

Se a quantidade de energia gasta pelo corpo, tanto em forma de calor, quanto em forma de movimento, for menor do que a quantidade ingerida, essa energia é armazenada. A principal maneira de armazenamento é na forma de triglicerídeos, dentro do tecido adiposo. (5)

O balanço energético e o metabolismo de carboidratos envolvem elementos regulatórios como prostaglandinas, citocinas, angiotensinas, entre outros. Esse balanço pode ser regulado tanto pela ingestão calórica quanto pelo gasto energético. A leptina é um polipeptídeo produzido pelo tecido adiposo branco e informa o cérebro sobre às quantidades desse tecido, ativando, assim, uma via anorexigênica, inibindo o consumo de alimentos, ou uma via orexigênica, estimulando a alimentação (5).

Além disso, em roedores, a leptina pode regular a produção de energia estimulando a ativação simpática do tecido adiposo marrom. Esse tecido é caracterizado pela presença de um receptor adrenérgico específico e um elevado número de mitocôndrias. Na membrana interna das mitocôndrias, a proteína UCP1 permite a produção de calor a partir da oxidação de ácidos graxos. Assim, quando esse tecido é ativado, a energia é dissipada em forma de calor. Esse tecido pode ser encontrado em bebês humanos, mas tende a diminuir nos adultos. Outras proteínas, como UCP2 e UCP3 podem ser encontradas em vários tecidos, mas seu papel na termogênese ainda é incerto. (5)

É considerado obeso o indivíduo com um índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m², ou com percentil acima de 95 no caso de crianças, considerando-se mesmo sexo e idade, segundo a tabela do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (3).

Baseada na etiologia genética, a obesidade pode ser categorizada de três formas distintas: 1) monogênica, 2) obesidade poligênica ou comum e 3) obesidade sindrômica.

Nas formas monogênicas, o gene causador do fenótipo é claramente identificado enquanto na obesidade comum, de causa poligênica, a arquitetura dos *loci* envolvidos no fenótipo ainda está sendo caracterizada. Um fenótipo pode ser resultante da atividade de um único gene (herança mendeliana ou monogênica) ou de mais de um gene (herança poligênica), ambos os casos com influência do meio. As heranças poligênicas multifatoriais refletem a contribuição aditiva de genes distintos, conferindo diferentes graus de suscetibilidade (4).

1.1 OBESIDADE MONOGÊNICA NÃO SINDRÔMICA

A obesidade monogênica não sindrômica caracteriza-se por uma obesidade extrema que se inicia na infância e envolve alterações endócrinas (4). Atualmente estão descritas mais de 200 mutações envolvidas na obesidade monogênica em humanos, entretanto elas são encontradas em apenas 10 genes. Desses, oito genes já estão bem descritos: *LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *MC4R*, *BDNF*, *NTRK2* e *SIM1*, mas explicam apenas 10% desses casos.

A grande maioria das formas monogênicas não sindrômicas de obesidade é resultante de alterações nas funções do hipotálamo. O hipotálamo responde a diversos hormônios, controlando ações endócrinas, comportamentais e influenciando o balanço energético (4,6).

Resumidamente, as células adiposas secretam a leptina, um hormônio aparentemente envolvido na regulação do metabolismo de gordura e no consumo de energia (1,3). Altos níveis de leptina são registrados pelo receptor de leptina que, por sua vez, envia um sinal para os receptores de melanocortina 4. O hormônio estimulador de melanócito, α MSH, produto do gene *POMC*, induz um efeito de saciedade via *MC4R*. O fator neurotrófico derivado do cérebro, *BDNF*, também participa na regulação *downstream* de *MC4R*. Mutações em um único gene envolvido nessa via são, aparentemente, a causa monogênica da obesidade (7).

O gene *LEP* localizado na região 7q31.2 codifica a leptina, secretada pelo tecido adiposo branco, que desempenha papel fundamental na regulação do peso corporal. Essa proteína é capaz de inibir a ingestão de alimentos e regular o gasto energético, atuando na manutenção do tecido adiposo (4).

O receptor para a leptina é uma proteína codificada pelo gene *LEPR*, expresso predominantemente no hipotálamo e envolvido no metabolismo de gordura (4).

Mutações no gene da leptina ou em seu receptor resultam, em homozigose, em pacientes hiperfágicos, com um rápido ganho de peso nos primeiros dias de vida. Esses pacientes apresentam hipogonadismo, dificilmente alcançando a puberdade, insuficiência tireotrópica e deficiência nas células T, o que confere maior suscetibilidade a infecções (1,3).

Indivíduos com deficiência de leptina vêm sendo tratados com leptinas recombinantes e têm tido relevante sucesso, com perda de peso e uma rápida alteração na hiperfagia. Até o presente momento, essa é a única forma farmacologicamente tratável de obesidade monogênica (7).

Enquanto o gene *POMC* codifica α MSH, um peptídeo anorexigênico, um grupo distinto de neurônios sintetiza o peptídeo orexigênico NPY e a proteína relacionada à agouti, *AGRP*, que agem como inibidores dos receptores de *MC3* e *MC4*.

O produto de *POMC* depende da enzima endoproteolítica presente numa região específica do cérebro. Na glândula pituitária a enzima *PCSK1* produz o

hormônio adrenocorticotrófico e a β -lipotropina, enquanto a presença concomitante de *PCSK1* e *PCSK2* no hipotálamo controla a produção de α -, β - e γ -MSH, além de β -endorfinas (4).

Indivíduos com mutações no gene *POMC* apresentam, no período neonatal, deficiência do hormônio adrenocorticotrófico, possuindo uma pele clara e cabelos ruivos. A deficiência de *POMC* é associada à hiperinsulinemia, hiperfagia e rápido ganho de peso, devido a não ativação do receptor de melanocortina 4 (3,6). Mesmo indivíduos heterozigotos para a mutação apresentam alto risco de obesidade (6).

A proteína codificada pelo gene *MC4R* é um receptor de membrana, expresso sobretudo no sistema nervoso central, incluindo o hipotálamo. Ela também é parte da família de receptores de melanocortinas e interage com hormônios MSH e adrenocorticotrópicos, via proteínas G. O gene, composto por um único éxon, é localizado na região 18q21.3 e contribui na ingestão de alimentos e na regulação do gasto energético. Em obesos mórbidos, aqueles com IMC superior a 40kg/m², a deficiência desse gene representa a principal causa do fenótipo, sendo observada em 1% a 6% dos pacientes (4), que apresentam também hiperinsulinemia, elevada taxa de crescimento e alta densidade óssea (7).

Por fim, neurônios que expressam *SIM1* são responsáveis pela produção de múltiplos neuropeptídeos, incluindo ocitocinas, vasopressinas e somatostatinas. Não foram encontradas mutações de ponto em *SIM1*, mas deleções do gene são associadas a vários grupos apresentando obesidade infantil, atraso no desenvolvimento e grande crescimento linear. O atraso no desenvolvimento, observado em todos os pacientes com a deleção, reflete o envolvimento do gene na neurogênese (6).

A regulação entre a ingestão alimentar e o gasto energético também está diretamente relacionada à obesidade e as famílias de genes β -adrenorreceptores (*ADRB1*, *ADRB2* e *ADRB3*) e de proteínas desacopladoras (*UCP1*, *UCP2* e *UCP3*) associadas ao circuito de balanço energético são consideradas candidatas (3).

1.2 OBESIDADE COMUM OU POLIGÊNICA

A identificação da leptina e das vias relacionadas a ela foram recebidas com entusiasmo devido ao grande potencial terapêutico para o tratamento de todas as formas de obesidade. Entretanto, estudos mostraram que a maior parte dos indivíduos obesos não apresentava deficiência de leptina, e sim altos níveis, sendo inclusive resistente a ela (8).

Várias abordagens foram adotadas a fim de identificar *loci* candidatos na tentativa de desvendar os mecanismos da regulação do peso corporal, mas somente após a publicação do sequenciamento do genoma humano (*International Human Genome Sequencing Consortium*) e do Projeto Internacional *HapMap*, que criou um mapa de haplótipos humanos, foi possível a caracterização e descoberta de novas variantes genéticas associadas a doenças complexas (9).

Ao contrário da obesidade monogênica, na obesidade poligênica cada polimorfismo gera uma variante que confere suscetibilidade, necessitando da presença de outras variantes e de um meio obesogênico para o desenvolvimento do fenótipo (4).

Para analisar como a ocorrência de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), ou polimorfismo de único nucleotídeo, os principais marcadores de variações genéticas, e a interação entre eles influenciam o risco de doenças complexas comuns, uma das estratégias mais usadas atualmente são os estudos de associação que englobam todo o genoma, o GWAS (*Genome-Wide Association Studies*).

Nessa abordagem livre de hipótese, milhares de SNPs são analisados comparando a frequência em indivíduos obesos e não obesos ou ao longo de um espectro de IMC (ou outra medida) e tem levado à identificação de diversos *loci* associados a essas características (8).

Estudos de ligação têm produzido evidências, às vezes inconsistentes, para o envolvimento da leptina no desenvolvimento da obesidade comum, pelo menos nos fenótipos de início precoce. Um polimorfismo adjacente a sequências envolvidas na transcrição do gene da leptina, parece modular a resposta à restrição calórica em mulheres com obesidade grave. Meninas obesas, homozigotas para o alelo variante, tiveram uma redução de 25% nos níveis de leptina, apesar de uma massa corporal

similar. Relações semelhantes foram descritas entre uma variante na região não-codificante do éxon 1 e os níveis séricos de leptina em adultos obesos franceses.

Esses estudos sugerem que essas variações podem ser responsáveis por alterações nos níveis de leptina e assim poderiam modificar a capacidade do cérebro para detectar a quantidade de gordura armazenada no tecido adiposo branco. Contrastando com estudos sobre o gene da leptina, nenhuma associação foi confirmada entre obesidade e o gene do receptor de leptina em uma meta-análise. (5)

Para garantir um grande número de amostras e a replicabilidade dos estudos, diversos consórcios, como o *Genetic Investigation of Anthropometric Traits* (GIANT), foram criados (9). Até o momento foram identificados mais de 50 *loci* associados a pelo menos uma característica relacionada à obesidade, identificados em quase todos os cromossomos, como observado na Figura 1 (4).

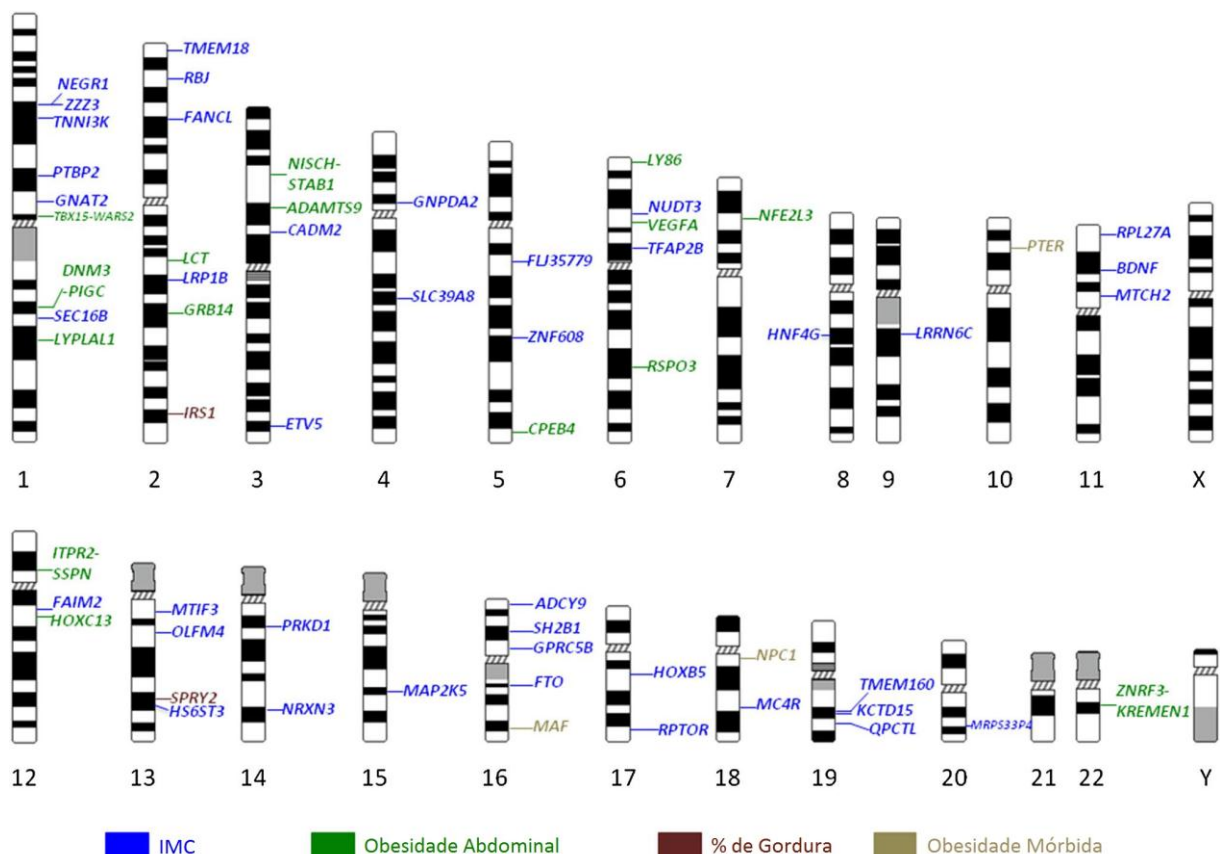


Figura 1. Loci associados a alguma característica relacionada à obesidade.

Fonte: Traduzida de Albuquerque e cols., 2015 (4).

O primeiro gene relacionado foi descrito em 2006. Foram analisados 694 indivíduos de 288 famílias, sendo que os homozigotos para um SNP comum próximo ao gene *INSIG2* apresentavam obesidade. Contudo, diversos estudos posteriores falharam na tentativa de replicar esse resultado (7,9).

Em 2007, Frayling e cols. realizaram um estudo para testar a correlação de variantes ao longo do genoma com a diabetes tipo 2. Eles descreveram que o polimorfismo rs9939609, localizado no primeiro íntron do gene *FTO* (*fat mass and obesity associated*), estava fortemente associado o diabetes tipo 2 e ao IMC (10). Análises posteriores descobriram que a associação com a diabetes se dava, na realidade, devido ao aumento do IMC.

Esse efeito foi replicado em diferentes grupos, e uma meta-análise demonstrou que indivíduos homozigotos para o alelo de risco, alelo A, possuíam uma chance aumentada em 1,67 vezes de se tornarem obesos, pesando em média três quilos a mais que os indivíduos homozigotos para o alelo protetor, alelo T (4,7).

Outros estudos encontraram diferentes polimorfismos nas regiões intrônicas do *FTO*, consistentes com obesidade infantil e adulta. Os efeitos fenotípicos tornam-se evidentes a partir dos 7 anos de idade. Aparentemente, variantes de *FTO* não estão associadas à ingestão energética ou atividade física em crianças; todavia, em adultos homozigotos, é observado um aumento na ingestão de alimentos e uma diminuição da saciedade (7).

Entre 190 crianças e adolescentes com pelo menos um alelo de risco, foram reportados episódios de compulsão alimentar mais frequentemente do que quando comparados àqueles homozigotos para o alelo não relacionado. Adicionalmente, crianças heterozigotas selecionam alimentos com maiores quantidades de gordura (7).

O gene parece ter efeitos distintos ao longo do desenvolvimento. Estudos mostram que indivíduos portadores de um alelo de risco apresentavam um IMC baixo na infância, aumentando substancialmente na juventude (4).

Já foram descritos mais de 60 polimorfismos, em diversas etnias, relacionadas à obesidade. Esses polimorfismos também estão relacionados com obesidade abdominal, circunferência da cintura, bem como com a relação cintura/quadril e a porcentagem de gordura corporal (7).

O *FTO* é um gene grande, com 9 éxons se expandindo ao longo de mais de 400 kilobases na região cromossômica 16q12.2; entretanto, os mecanismos

envolvendo *FTO* no desenvolvimento da obesidade ainda não estão bem elucidados. As variantes desse gene parecem levar a um aumento na ingestão calórica, modificando o controle de apetite no hipotálamo (4).

Sabe-se que ele é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso central e para o sistema cardiovascular, demonstrado pelo fenótipo de indivíduos com perda de função do gene, que apresentam um retardo no crescimento pós-natal, microcefalia, atraso grave no desenvolvimento neuropsicomotor e fácies dismórfica (7). Por outro lado, a deficiência de *FTO* no contexto da obesidade ainda não é bem conhecida e confirma a complexidade da genética envolvida na obesidade comum (4).

Diversos estudos demonstraram que vários *loci* envolvidos no aumento do IMC estavam localizados em regiões próximas aos genes das formas monogênicas, como *MC4R*, *POMC* e *BDNF*, sugerindo que essa via também poderia contribuir para a obesidade poligênica (8).

A região codificadora de *MC4R* apresenta, além das já citadas mutações envolvidas nas formas monogênicas, duas variantes poligênicas para a regulação do peso: o alelo I103, que codifica uma isoleucina, ao invés de uma valina, na posição 103; e o L251, que codifica uma leucina, no lugar de uma isoleucina, na posição 251 da proteína receptora. Ambos os alelos estão negativamente associados à obesidade.

Heterozigotos para o alelo I103, estimado em 2% a 9% dos indivíduos de diferentes populações, foi calculado, por meta-análise, um efeito de $-0,48 \text{ kg/m}^2$. Um efeito semelhante foi observado em portadores do alelo L251, no qual estudos de população evidenciaram uma redução no IMC desses indivíduos (7).

Após a criação do GIANT, um novo GWAS identificou um *locus*, contendo o polimorfismo rs17782313, próximo ao gene *MC4R*, cujas mutações são a causa mais comum de obesidade mórbida em crianças (4).

Assim, a relação do polimorfismo rs17782313 com a obesidade parece estar mediada pela expressão de *MC4R*, devido à sua posição próxima a esse gene. Para cada cópia do alelo foi estimado um aumento médio de $0,22 \text{ kg/m}^2$ e uma única cópia aumenta as chances de sobrepeso e obesidade em 8% e 12%, respectivamente (7).

A presença desse alelo não parece ter efeito em recém-nascidos e crianças, mas no período entre 7 e 11 anos de idade, o efeito observado foi o dobro do que em adultos.

Em adultos, uma única cópia do alelo resultou em indivíduos com maior estatura, em média 0,21 cm. Esse estudo foi replicado e confirmado posteriormente (7).

Já foram descritas mais de 90 mutações associadas à obesidade, envolvendo o gene *MC4R*, em diversas populações, incluindo europeus, asiáticos e afro-americanos (4,9).

Uma terceira fase de descobertas ocorreu em 2009, com uma meta-análise utilizando 15 GWAS para IMC em caucasianos, e replicado em uma amostra com 59.082 indivíduos. Foram confirmadas as associações de *FTO* e *MC4R*, e descritos mais seis genes: *MTCH2*, *GNPDA2*, *KCTD15*, *SH2B1*, *NEGR1* e *TMEM18*. Concomitantemente, um GWAS em uma população islandesa identificou mais sete novos *loci* próximos ou envolvendo os genes *BDNF*, *SEC16B*, *ETV5* e *FAIM2*, além de corroborar *FTO* e *MC4R*.

Duas outras fases de descobertas ocorreram em 2010 e 2013, e já foram descritos mais de 35 *loci* envolvidos exclusivamente com o IMC, explicando de 1% a 3% da sua variação.

Existe uma discrepância entre a explicação da variação do IMC, devido aos polimorfismos comuns encontrados e à herdabilidade estimada, em torno de 40% a 70% (4). Possíveis explicações envolvem a dificuldade de identificar variantes raras, a heterogeneidade genética entre as populações, as interações entre os genes, as interações entre os genes e o meio, além de possíveis fatores epigenéticos. Os efeitos das variantes comuns identificadas são pequenos, e a maior parte delas está localizada em regiões não codificadoras, incluindo regiões intrônicas e intergênicas, dificultando a elucidação dos seus mecanismos na fisiopatologia da obesidade (9).

Diversos GWAS identificaram um grande número de *loci* relacionados à obesidade, todavia é essencial a combinação deles em um escore de risco, ou *risk-allele score* (GRS). Isso fornece uma forma mais conveniente e funcional de associar as variações ao longo do genoma (4).

A maior parte dos GWAS é realizado em caucasianos, apesar da alta prevalência da obesidade em outras populações. Enquanto alguns *loci* afetam todos os grupos étnicos, outros parecem afetar somente determinados grupos específicos.

Estudos colaborativos vêm sendo realizados para replicar os resultados encontrados em outras populações, como afro-americanos, asiáticos e indígenas americanos. Recentemente um consórcio conhecido por *Population Architecture*

using Genomics and Epidemiology (PAGE) foi criado para minimizar esse problema, recrutando populações de diferentes etnias (9).

1.3 OBESIDADE SINDRÔMICA

A obesidade frequentemente está associada a outras alterações, incluindo malformações congênitas, dismorfias, distúrbios comportamentais e deficiência intelectual (6,11,12). Já foram descritas na literatura mais de 30 síndromes relacionadas à obesidade, entretanto a etiologia da maior parte dos casos permanece desconhecida (3,12).

1.3.1 Obesidade associada à deficiência intelectual

Apesar de já terem sido descritas diversas síndromes relacionadas à obesidade associada à deficiência intelectual (Tabela 1), a maior parte dos casos não se encaixa em nenhum padrão sindrômico conhecido, e são encontrados na literatura como casos isolados.

A Organização Mundial de Saúde define a deficiência intelectual (DI) ou deficiência mental (DM) como “uma redução na compreensão de informações novas e complexas e na capacidade de aplicar essas habilidades. Isso resulta em uma deficiência das funções sociais e se inicia antes da idade adulta, prolongando-se por toda vida” (13).

Outra definição, fornecida pela *American Association of Intellectual and Developmental Disability*, diz que “uma deficiência é caracterizada por uma limitação significativa tanto no desenvolvimento intelectual quanto no comportamento adaptativo, que abrange muitas habilidades sociais e práticas cotidianas. Essa deficiência origina-se antes dos 18 anos” (14).

Usualmente é utilizado um QI menor que 70 como ponto de corte (15) e afeta cerca de 2% a 3% da população em geral (16).

Tabela 1. Principais síndromes associadas à obesidade e deficiência intelectual

Síndrome	Fenótipo	DI	Obesidade	Padrão de herança	Loci/Gene
Bardet-Biedl	Hipogonadismo Retinopatia pigmentar Polidactilia	Leve	Generalizada	Autossômica recessiva	Diversos loci / BBS1 a BBS18
Osteodistrofia hereditária de Albright	Alterações esqueléticas Braquidactilia Calcificações ectópicas Face redonda	Leve a moderada	Generalizada e grave Iniciada na infância	Autossômica dominante com <i>imprinting</i>	20q13.2 / GNAS1
Borjeson-Forsman-Lehmann	Epilepsia Hipogonadismo Dismorfias faciais	Moderada a grave	Truncal (abdominal)	Ligada ao X recessiva	Xq26.3
Cohen	Facies característica Mãos e pés finos Alterações orais e oculares	Leve	Truncal Iniciada após os 5 anos	Autossômica recessiva	8q21q22 / COH1
Prader-Willi	Hipotonia neonatal Hiperfagia Hipogonadismo Baixa estatura	Leve a moderada	Generalizada e grave	Autossômica dominante com <i>imprinting</i>	15q11-13 Deleção paterna UPD mat Microdeleção em SNURF-SNRPN

Fonte: Adaptado de Clément, 2006 (1).

1.4 PRINCIPAIS SÍNDROMES RELACIONADAS À OBESIDADE

1.4.1 Síndrome de Bardet-Biedl

A síndrome de Bardet-Biedl (BBS) é uma desordem de origem autossômica recessiva, caracterizada por obesidade, deficiência intelectual, hipogonadismo, polidactilia pós-axial, retinite pigmentosa e problemas renais. Dezoito genes já foram relacionados à síndrome (17), além de uma forma trialélica, envolvendo um terceiro alelo mutado em um segundo *locus* (18). Estima-se que sua frequência seja de 1/125.000 a 1/175.000 (6).

O gene *BBS1* é expresso ubiquamente, incluindo o tecido fetal, a retina e o tecido adiposo, sendo a causa de um terço dos casos de BBS, e parece interagir diretamente com os receptores de leptina (19). O gene o gene *MKKS*, localizado no cromossomo 20, codifica uma chaperona, envolvida no processo de enovelamento de outras proteínas e representa de 5 a 7% dos casos de BBS. A identificação do gene *MKKS* (*BBS6*) permite supor que outros genes causais participem do complexo

de chaperonas, o que demonstra a grande heterogeneidade molecular da síndrome. Apesar de não terem relação direta com as chaperoninas, os genes *BBS1*, *BBS2* e *BBS4* podem ser substratos da proteína *MKKS* (18).

Outros genes BBS desempenham um papel especificamente nas células ciliadas, envolvidos no correto posicionamento dos órgãos durante o desenvolvimento embrionário. Mutações nesses genes resultam em anomalias estruturais dos órgãos, bem como alterações no epitélio pigmentar (1), o que permite classificar a BBS como uma ciliopatia (17).

A principal teoria para explicar a obesidade na BBS defende que a alteração nessas células ciliadas resulta em anomalias nos receptores de leptina, consistente com a hiperleptinemia observada nos pacientes portadores da síndrome (19).

Embora *BBS1* atue nos receptores de leptina, nem todas as vias envolvidas são igualmente afetadas. A ativação dos genes *NPY* e *AgRP* permanecem normais, enquanto *POMC* é reduzida. Esse achado é consistente com outro estudo, que mostra que uma alteração no transporte intraflagelar em neurônios *POMC* resulta em hiperfagia e obesidade. Outros estudos argumentam que a obesidade observada nas ciliopatias pode ser consequência de mecanismos mais complexos, relacionados a outras vias de sinalização, defeitos no desenvolvimento neural ou processos neurodegenerativos (19).

1.4.2 Osteodistrofia hereditária de Albright

Diferentemente da BBS, que envolve diversos genes em diferentes cromossomos, a Osteodistrofia hereditária de Albright (AHO) é uma síndrome monogênica que apresenta um padrão de herança autossômico dominante com *imprinting*. Nesses casos, uma mutação no gene *GNAS1*, localizado no cromossomo 20, leva a uma diminuição da subunidade alfa da proteína G, resultando em uma resistência a diversos hormônios, entre eles o paratormônio. Esse gene também sofre *imprinting* e, curiosamente, a obesidade só é encontrada em pacientes com mutações no alelo materno ativo, que também leva ao desenvolvimento de pseudoparatireodismo tipo 1A (6).

O quadro clínico caracteriza-se por baixa estatura, alterações no esqueleto e neurocognitivas, ossificação subcutânea e encurtamento dos ossos longos, particularmente do quarto e quinto metacarpo (6,20). Nesses pacientes a obesidade não está relacionada à hiperfagia, mas sim à redução no gasto energético, consequência da baixa atividade do nervo simpático (6).

1.4.3 Síndrome de Borjeson, Forssman e Lehmann

Com apenas 50 pacientes descritos até o presente (21), a síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann (BFLS) é caracterizada por uma mutação no gene *PHF6* mapeado na região q26-q27 do braço longo do cromossomo X (20,22). Acredita-se que esse gene desempenhe papel na regulação transcricional, no crescimento e na proliferação celular. Durante o estágio fetal, sua expressão é mais alta no cérebro, mas pode ser amplamente encontrada em outros tecidos em desenvolvimento. Em adultos, é expressa no timo, nos ovários, na tireoide, no baço, nos testículos e também nos adipócitos (21).

Pacientes portadores dessa síndrome apresentam DI grave, baixa estatura, grande acúmulo de gordura na região abdominal, pescoço curto, microcefalia, face redonda e “grotesca”, hipotonia, epilepsia e hipogonadismo. Mulheres portadoras da mutação, apesar de possuírem características semelhantes apresentam DI moderada, orelhas largas, atraso no desenvolvimento das características sexuais secundárias e uma variedade de anomalias radiográficas (20).

1.4.4 Síndrome de Cohen

Relativamente rara, a Síndrome de Cohen foi descrita em cerca de 200 pessoas no mundo todo e é decorrente de uma mutação no gene *COH1* no cromossomo 8 (q21-q22), com um padrão de herança autossômico recessivo (23). O gene *COH1* codifica uma proteína de membrana periférica envolvida na manutenção da integridade e do funcionamento do Complexo de Golgi (24).

Descrita em populações de diferentes etnias, o fenótipo apresenta uma grande heterogeneidade, incluindo alterações faciais, orais, oculares, obesidade, deficiência intelectual e hipotonia muscular (3,20,22).

Em 2011, Douzgou e Petersen (23) apresentaram um estudo relacionando essa heterogeneidade com as diferentes mutações encontradas, de acordo com a etnia. Na população finlandesa, o fenótipo é caracterizado por uma personalidade gentil, com um perfil neurocognitivo, comportamental e motor específico e constante, associado a alterações esqueléticas e um grave envolvimento do segmento posterior dos olhos. Gregos e mediterrâneos possuem um fenótipo neurocognitivo similar, entretanto, com uma alta ocorrência de autismo, características esqueléticas bem específicas e um grave fenótipo oftálmico, que frequentemente envolvem tanto o segmento posterior quanto o anterior do olho, além de desordens periodontais. Diferentemente das populações anteriores, os Amish apresentam um atraso no crescimento e um fenótipo similar aos gregos, mas com uma prevalência menor de autismo e pode ser caracterizado por frequentes complicações e infecções neonatais. O último grupo estudado foi uma população irlandesa nômade que passou muito tempo isolada, resultando em casamentos consanguíneos, e atualmente apresenta uma frequência de 1 caso para cada 2.000 nascimentos. Esses indivíduos possuem características autistas como os gregos, mas sem o desenvolvimento da fala e, como consequência de neutropenia, apresentam recorrentes infecções no trato respiratório.

1.4.5 Síndrome de Prader-Willi

Inicialmente descrita em 1956 por dois cientistas suíços (25), a Síndrome de Prader-Willi (PWS) é a mais comumente relacionada à obesidade (20) e possui uma frequência de 1/10.000 a 1/30.000 nascimentos, com aproximadamente 200 mil pacientes descritos mundialmente (26).

Ela é caracterizada por deficiência intelectual moderada, baixo peso neonatal, hipotonia e dificuldades de alimentação na infância, seguido por uma hiperfagia, que se manifesta por volta dos oito anos de idade e, conseqüentemente, um desenvolvimento gradual de obesidade mórbida, tornando-se permanente. Esses

pacientes apresentam hipogonadismo em ambos os sexos, que se manifesta como uma hipoplasia genital, causando atraso no desenvolvimento puberal e infertilidade na maior parte dos casos (26). Alterações na glândula pituitária e no hipotálamo resultam em baixos níveis do hormônio do crescimento (GH) e, conseqüentemente, em uma baixa estatura. Todavia, essas características clínicas variam conforme a idade e podem ser agrupadas da seguinte forma (25):

- Período pré-natal: Diminuição da atividade fetal, polidrâmnio e posição anormal das mãos e pés, visíveis na ultrassonografia do terceiro trimestre.
- Período neonatal: Grave hipotonia, dificuldade de alimentação devido à baixa capacidade de sucção, atraso no crescimento, choro fraco, hipoplasia genital e despigmentação dermal e ocular.
- Infância: Hiperfagia e obesidade, diminuição da massa muscular e acúmulo de gordura, redução no gasto energético, baixa estatura e problemas comportamentais, como roubar e esconder comida.
- Adolescência: Atraso na puberdade, podendo, em meninos, não ter ocorrido o posicionamento dos testículos na bolsa escrotal, obesidade mórbida e complicações decorrentes dela, como apneia do sono, *diabetes mellitus*, aterosclerose e hipertensão, osteoporose, escoliose, problemas comportamentais e epilepsia.

O diagnóstico clínico durante o período neonatal é complexo, visto que os sinais são comuns a outras desordens (27,28,29). Entretanto, com o desenvolvimento de novas técnicas moleculares a partir dos anos 90 (29) e após diversos estudos verificarem uma grave hipotonia em 100% dos pacientes portadores da síndrome, em 2001, Gunay-Aygun e cols. sugeriram uma alteração nos critérios diagnósticos estabelecidos por Holm em 1993 (30). Eles propuseram uma divisão conforme a idade do paciente, de forma que os critérios maiores sejam diferentes para cada fase do desenvolvimento. Assim, durante o período neonatal, a observação da hipotonia seria suficiente para realização de exames confirmatórios. Somado a isso, o maior conhecimento dos profissionais a respeito da síndrome permitiu, ao longo dos anos, uma diminuição na idade de diagnóstico (29).

A hipotonia é característica comum a outras desordens como doença de Pompe, problemas congênitos de glicosilação e desordens mitocondriais e o

diagnóstico precoce da síndrome auxilia não somente no manejo do paciente, mas também evita que outros testes mais complexos e invasivos sejam realizados para determinar a causa do quadro clínico (28,29).

Dados pré-natais também podem auxiliar no diagnóstico, como diminuição da atividade fetal, observada na maioria dos casos (31), polidrâmio e posicionamento anormal das mãos e dos pés, visíveis na ultrassonografia a partir do terceiro trimestre (25).

A região cromossômica 15q11-q13 contém um grupo de genes que sofre *imprinting*, e podem ser expressos somente pelo cromossomo materno ou somente pelo paterno. A Síndrome de Prader-Willi é causada por uma ausência de expressão de genes paternos nessa região, que pode ocorrer de três formas distintas (26):

- 1) Deleção de 5-6 Mb dessa região no cromossomo paterno (correspondendo a 65% a 75% dos casos).
- 2) Dissomia uniparental materna do cromossomo 15 [upd(15)mat] (encontrada em 20% a 30% dos pacientes).
- 3) Mutações no centro de *imprinting* (IC) que controla essa região genômica (1% a 3%).

Essa região pode ser dividida em quatro partes, determinadas por três pontos de quebra comuns (Figura 2).

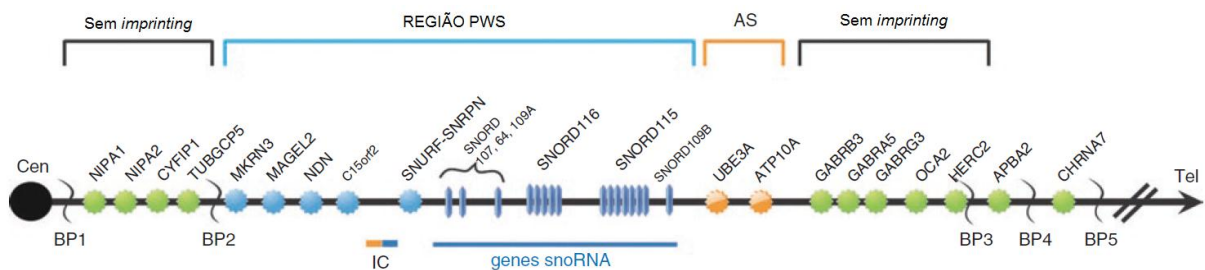


Figura 2. Mapa da região cromossômica 15q11-q13

Em verde os genes que não sofrem *imprinting*, em azul os genes com expressão paterna, região da síndrome de Prader-Willi (PWS). Em laranja os genes com expressão materna, região da síndrome de Angelman. IC- Centro de *Imprinting*.

Fonte: Traduzido de Cassidy e cols. (26).

A primeira região não sofre *imprinting* e contém quatro genes – *NIPA1*, *NIPA2*, *CYF1P1* e *GCP5* – expressos tanto pelo cromossomo materno quanto pelo paterno (26).

A segunda região, denominada na Figura 2 como “Região PWS”, é expressa somente pelo alelo paterno, contendo os genes *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2*, *SNURF-SNRPN*, a classe de genes *snoRNAs* C/D box, *SNORD116* e o gene *SNORD115*. O gene *C15orf2* é um gene expresso bialelicamente nos testículos, mas expresso somente paternalmente no cérebro. A porção central da região PWS, com os genes *SNURF-SNRPN*, é bicistrônica e codifica duas proteínas distintas, uma envolvida no *splicing* de mRNA e outra ainda sem função conhecida. Não obstante, esses genes regulam seis genes *snoRNAs* localizados telomericamente (26). Os genes *SNORD116* e *SNORD115* estão presentes em múltiplas cópias, enquanto o restante dos genes *snoRNA* possuem apenas uma. Contrariamente a outros *snoRNA* C/D box, geralmente envolvidos com a modificação dos RNA ribossomais, esse grupo parece estar envolvido na modificação de RNAs mensageiros, provavelmente modulando o *splicing* alternativo (32).

Os genes *UBE3A* e *ATP10A* fazem parte da porção relacionada à Síndrome de Angelman (AS). A deleção materna, bem como a [UPD(15)pat], é responsável por essa síndrome, mas somente o gene *UBE3A* está envolvido. O quadro clínico da síndrome inclui DI grave, marcha atáxica, risos imotivados e não inclui obesidade na maioria dos casos.

A exata função de cada um desses genes no delineamento do fenótipo observado na PWS ainda não foi elucidada e, contrariamente à AS, não foi possível relacionar todas as características encontradas a um único gene (26). Apesar disso, uma deleção atípica entre *SNURF-SNRPN* e *UBE3A*, encontrada no alelo paterno de dois pacientes, demonstra que a deficiência de *SNORD116* pode ser a causa de características típicas do fenótipo da PWS (32).

A obesidade pode ser relacionada à insaciabilidade ligada à disfunção hipotalâmica. Embora vários mecanismos tenham sido propostos para a hiperfagia – como anomalias na sinalização da grelina, hormônio que aumenta o apetite –, uma análise neuropatológica no cérebro de pacientes portadores da síndrome identificou alterações no hipotálamo que se correlacionam com as características clínicas observadas. Esses pacientes possuíam menos neurônios que expressam ocitocina no núcleo paraventricular, e essa redução parece ser a causa anatômica desse comportamento (19). Nesses pacientes é observada uma diminuição da atividade física, um decréscimo de massa muscular e, conseqüentemente, uma menor

necessidade calórica. Esses fatores, quando somados à ingestão de grandes quantidades de energia, resultam em uma obesidade central, basicamente localizada na região abdominal e nos quadris. Curiosamente, a porcentagem de gordura visceral é inferior à esperada para o grau de obesidade observado, mas a obesidade ainda é o principal fator de morbimortalidade nos pacientes adultos portadores da síndrome (26).

Não existem evidências que permitam diferenciar os fenótipos de acordo com a mutação presente, entretanto algumas diferenças estatísticas podem ser observadas na frequência e gravidade de algumas características entre as duas grandes formas de mutação, a deleção de 15q11-q13 e UPD. Pacientes portadores de UPD são menos propensos à hipopigmentação e às características faciais. Geralmente apresentam um QI verbal maior e problemas de comportamento mais brandos, mas têm uma tendência maior à psicose e ao autismo. Pacientes portadores da deleção tipo I (BP1-BP3) são descritos com mais compulsões e um comportamento adaptativo menor, bem como menor habilidade intelectual do que aqueles com a deleção tipo II (BP2-BP3) (26).

1.4.6 Outras obesidades sindrômicas

Conforme descrito acima, pacientes com deficiência mental associada à obesidade e a outras malformações congênitas apresentam uma grande heterogeneidade genética, sendo muitas vezes considerados como novas síndromes (15), não se encaixando em nenhuma anteriormente descrita. Isso sugere que muitos genes envolvidos no desenvolvimento neurológico parecem afetar o circuito de balanço energético (6,11).

Em 1991, Wilson e cols. (33) descreveram 14 pacientes, de três gerações sucessivas de uma família, apresentando um padrão de deficiência intelectual ligado ao X. Esses pacientes apresentavam obesidade, ginecomastia, hipogonadismo, dificuldades na fala, dedos afilados e pés pequenos. Foi encontrada uma recombinação na região Xp21.1-q22, excluindo *BFLS*. Observando outros membros da família, notou-se que nenhum homem com inteligência normal apresentava

ginecomastia ou obesidade e nenhuma das mulheres heterozigotas eram obesas ou possuíam dificuldades na fala.

Constantine e cols. (34) descreveram, em 2000, uma paciente de 22 anos apresentando anisomastia, obesidade, mamilos espaçados, clinodactilia bilateral e contraturas do terceiro, quarto e quinto dedos, canais auditivos curtos, palato arqueado e pequeno, boca pequena com dentes espaçados, pescoço curto, narinas antevertidas, hérnia umbilical e refluxo esofágico. Foi encontrada uma duplicação na região 16q13 e, apesar de apresentar quadro clínico semelhante a outros pacientes com alterações no cromossomo 16, a paciente possuía características únicas, como anisomastia tão grave que foi necessária intervenção cirúrgica.

A região 17p13 é reconhecidamente descrita como uma região propensa a variações no número de cópias e possui diversos genes candidatos à deficiência intelectual. Por exemplo, duplicações e deleções na região 17p13.3 apresentam fenótipos distintos, envolvendo deficiência intelectual e malformações cerebrais, respectivamente. Uma região próxima, em 17p13.1, envolvendo o gene *TP53* também está associada a diferentes fenótipos. Uma mutação no gene ou uma pequena deleção são responsáveis pela Síndrome de Li-Fraumeni, enquanto grandes deleções envolvendo o gene resultam em deficiência intelectual e características dismórficas, mas não apresentam suscetibilidade a tumores. Indivíduos com duplicações nessa região apresentam obesidade, adicionalmente à DI (35).

Em contraste, variações isoladas no cromossomo 19 são raras; entretanto, Wangenstein e cols. descreveram em 2013 uma paciente com obesidade e DI que apresentava uma deleção de novo de 750kb na região 19p13.2. Essa deleção envolvia diversos genes, incluindo o gene receptor de insulina (*INSR*) e resistina (*RETN*), relacionados com o metabolismo da glicose. Por ter uma cópia normal do receptor de insulina, ela não apresentava alterações no metabolismo da glicose, somente uma haploinsuficiência do receptor de insulina. Apesar de exibir baixos níveis de leptina, adipocina e citocinas, o sequenciamento do gene *LEP* não mostrou alterações, e os genes envolvidos na deleção não tinham relação óbvia com esses achados. Curiosamente, embora o pai da paciente não fosse portador da deleção, apresentava obesidade desde a adolescência, bem como outros parentes paternos (36).

Esses estudos mostram que as alterações cromossômicas são uma importante causa de obesidade associada a DI.

1.5 VARIAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNV)

O *HapMap* tornou-se uma fonte inestimável de informação para a comunidade científica e para o estudo e a pesquisa de doenças complexas. Contudo, nos últimos dez anos, após a primeira descrição de uma “variante de número de cópias em larga escala”, os hoje denominados CNVs (*Copy Number Variation*) preencheram uma fenda entre as já conhecidas alterações cromossômicas e mutações de ponto, unindo duas disciplinas historicamente distintas.

Em 2004, com o advento de novas técnicas de análise, Lafrate e cols. (37) e Sebat e cols. (38) descreveram essas alterações que foram posteriormente definidas como um segmento de DNA presente em um número de cópias variante quando comparado com um genoma de referência. Isso envolve duplicações, deleções ou inserções de 1 kb ou mais (39).

Lee e Scherer (40) sugerem que a delimitação original em 1 kb se devia mais às limitações da técnica utilizada do que, de fato, a uma explicação biológica ou uma limitação funcional do segmento.

A simples presença de CNVs não implica patogenicidade, uma vez que se sabe, atualmente, que elas são a principal causa da variabilidade genética entre os mamíferos (41), e compreendem 13% do genoma humano, sendo responsáveis pelo fenótipo celular e pela expressão gênica, por exemplo (42,43). Entretanto, CNVs podem envolver partes de genes, genes inteiros, vários genes em sequência ou elementos regulatórios, alterando o balanço biológico da diploidia e a dosagem gênica, resultando em alterações fenotípicas dependendo da região envolvida (40).

CNVs podem ser herdadas ou esporádicas, por uma mutação de novo, e podem originar-se de três formas distintas. Frequentemente, os genes são flanqueados por elementos *Alu*, *LINE* ou por blocos de repetições semelhantes, denominados repetições baixas de cópias ou *low-copy repeat* (LRC). Essa sequência em tandem facilita a recombinação não homóloga, gerando uma deleção ou duplicação nessa região. Em casos de repetições invertidas, a sequência de bases é copiada ao contrário, inativando o gene (40,43,44).

Um segundo mecanismo envolve a maquinaria de reparo do DNA. No caso de uma quebra, as porções terminais são modificadas e ligadas novamente. Por vezes, regiões são adicionadas ou deletadas durante o processo, resultando numa CNV.

Nesse caso não é necessária uma região repetitiva, diferentemente da forma descrita previamente.

Já no modelo de troca de forquilha de replicação, a nova fita pode se desprender e invadir uma segunda forquilha, continuando sua síntese de forma errônea. Esse processo é dependente de regiões de micro-homologia, com poucos pares de bases, e pode ocorrer em sequência, originando arranjos complexos, com sequências múltiplas e em série.

Como citado acima, a patogenicidade das CNVs pode ser resultante de alteração no balanço da dosagem gênica ou por uma disfunção do gene. CNVs intragênicas ou que envolvem um único gene podem ter efeitos semelhantes a mutações de ponto, apresentando características de uma herança mendeliana. De outra forma, CNVs maiores, compreendendo diversos genes, podem criar um grande espectro fenotípico, sendo denominadas “desordens genômicas” (40,43,44).

De fato, CNVs compreendem um número maior de nucleotídeos e são mais frequentemente encontrados do que os SNPs. Elas têm-se mostrado responsáveis pela evolução humana e pela diversidade genética entre os indivíduos, bem como pelo aumento da suscetibilidade a desordens, como as desordens genômicas (43).

De modo semelhante às características poligênicas, desordens genômicas ocorrem com uma frequência parecida, mas diferenças significativas podem ser observadas em populações distintas, corroborando a hipótese de que a arquitetura genômica pode ser um fator significativo para a predisposição (43).

CNVs patológicas tendem a ser maiores, abrangendo diversos genes ou regiões regulatórias; e, recentemente, pesquisadores têm reconhecido que CNVs maiores de 1,5 Mb podem ser facilmente relacionadas como a causa provável da patologia observada (45).

Já foram associadas CNVs a diversas síndromes e doenças complexas, como Síndrome de Smith-Magenis, Síndrome de Rett, autismo, esquizofrenia, doenças de Parkinson e Alzheimer, bem como deficiência intelectual, sendo que cerca de 9% a 13% dos casos de DI isolados ou associados a malformações congênitas são devidos a CNVs submicroscópicas não detectáveis ao cariótipo (Figura 3) (41).

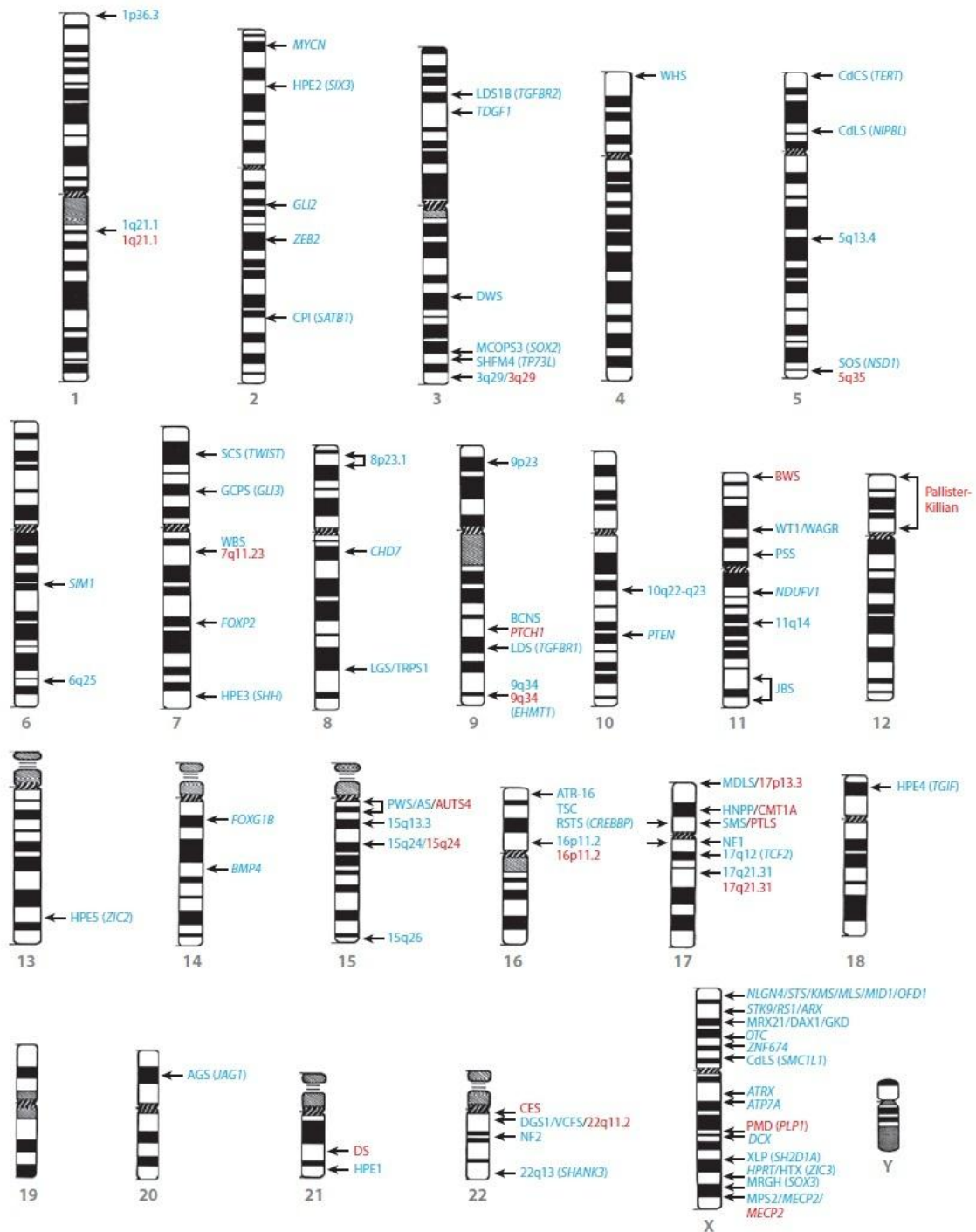


Figura 3. CNVs envolvendo loci associados à deficiência intelectual

Em azul são descritas deleções e em vermelho, duplicações.

Fonte: Retirado de Stankiewicz e Lupski, 2010 (41).

Diversos estudos já foram realizados a fim de buscar associações entre o fenótipo do paciente e os microarranjos encontrados, além de prover um diagnóstico para o paciente, permitindo um possível prognóstico e o adequado manejo do quadro.

Um estudo publicado em 2011, analisou 95 pacientes portadores de síndrome genética não definida e identificou 29 alterações ainda não descritas na literatura, entre elas, uma deleção em 1p36.3, uma deleção em 5q35, deleção em 7q22, duplicação em Xq28, entre outros. Os dois últimos pacientes apresentavam deficiência intelectual e obesidade (46).

Em 2011, Dasouki e colaboradores descreveram quatro pacientes com obesidade síndrômica apresentando alterações previamente relacionadas ao quadro. Por meio da técnica de CGH array, eles encontraram uma duplicação no braço longo do cromossomo 10, dois pacientes com uma deleção no braço curto do cromossomo 16 e outro com uma deleção no braço longo do X. Os portadores das deleções apresentavam, adicionalmente, atraso global do desenvolvimento.

Os autores ainda realizaram uma revisão da literatura e resumiram diversas CNVs descritas em vários cromossomos associadas à obesidade síndrômica, entre elas, deleção de 1p36, duplicação de 3p23, deleção de 6q23.3, duplicação de 16q13 e deleção de 22q11 (47).

Vuillaume e cols. também descreveram vários loci associados ao quadro. Em um estudo com 100 crianças portadoras de obesidade síndrômica, eles identificaram 60 CNVs em 42 crianças, incluindo a anteriormente descrita deleção de 1p36, além da deleção de 2p25, deleção de 3q13, ambas previamente associadas à obesidade e à deficiência intelectual, deleção de 16p11, deleção de 1q21.1, duplicação de 14q32.12q32.33, duplicação de 16p13.1, deleção de 7p21.3, entre outros.

Após a criação do banco "*Human Obesity Gene Map*", a descrição de novos genes causais permitiu um avanço nessa área e diversos estudos e relatos de caso vêm sendo publicados a fim de identificar regiões relacionada à obesidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

O presente trabalho tem como objetivo identificar alterações cromossômicas submicroscópicas em pacientes portadores de deficiência intelectual associada à obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar os pacientes portadores da síndrome de Prader-Willi por MS-MLPA.
2. Identificar alterações submicroscópicas, por meio de análise cromossômica por microarray nos pacientes não portadores da síndrome de Prader-Willi.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo faz parte do projeto interinstitucional intitulado “Investigação da Etiologia do Retardo Mental Sindrômico”, aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM 081/2009; 25/11/09) (Anexo A).

Foram selecionados, por meio de análise de prontuário, 68 pacientes de ambos os sexos portadores de deficiência intelectual associada à obesidade, sem diagnóstico de síndrome genética definida, atendidos nos Ambulatórios de Genética Clínica do Hospital de Apoio de Brasília e do Hospital Universitário de Brasília entre os anos de 2009 e 2015.

Os pacientes foram referenciados ao Serviço de Genética por outras especialidades da Rede da Secretaria de Saúde do Distrito Federal por suspeita de síndrome genética.

Por se tratar de pacientes civilmente incapazes, os responsáveis legais foram solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). Para efeitos de normalização, consideramos obeso o paciente adulto com IMC igual ou superior a 30 e crianças com IMC acima de 95º percentil, pela tabela do CDC.

Rotineiramente, foram coletados de 4 a 8 mililitros de sangue periférico em tubo heparinizado e em tubo contendo *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) como anticoagulante, para exame de cariótipo e extração de DNA, respectivamente.

3.1 CULTURA DE LINFÓCITOS E EXAME DE CARIÓTIPO

As amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes e armazenadas em tubo heparinizado foram utilizadas para cultura de linfócitos de sangue total para o exame de cariótipo.

Para a cultura de linfócitos aplicou-se em garrafa para cultura de células estéril (área de crescimento 25 cm²) 1ml de sangue total fresco, 9 ml de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contendo L-glutamina e 0,28g de penicilina, 2ml de soro fetal bovino e 400µl de fitohemaglutinina. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C para crescimento celular. Após aproximadamente 72

horas de incubação foram adicionados 100µl de Colchicina, com a função de induzir a parada na etapa de metáfase das divisões celulares presentes na cultura, mantendo-se o material em estufa a 37°C por mais 25 minutos. Terminado o período de crescimento e feita a parada das células na metáfase, o material foi transferido para tubos Falcon, centrifugado por 6 minutos a 2000 G e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi resuspenso, em vortex, em seguida foram aplicados 12ml de KCl a 37°C, homogeneizando sutilmente para promover a hipotonização das células. As amostras foram novamente incubadas a 37° C por 20 minutos e finalmente centrifugadas por 6 minutos a 2000 G e o sobrenadante foi descartado.

A fixação do material foi realizada com o Fixador de Carnoy I (3:1 Álcool Metílico/ Ácido Acético Glacial), após a ressuspensão em vortex, foram aplicados 10 mL de fixador e homogeneizando gentilmente. A amostra foi então centrifugada por 6 minutos a 2000 G e o sobrenadante, desprezado. Esse procedimento de fixação foi repetido quatro vezes. O sobrenadante resultante da fixação teve sua concentração ajustada, e em seguida foi gotejado em lâminas de vidro para uso em microscopia óptica.

As lâminas produzidas foram secadas em temperatura ambiente durante 5 dias, e submetidas ao Bandamento G, banhando as lâminas nas soluções de 40µl tripsina, 5ml de soro fetal bovino, 10ml de meio GI e 20ml de solução-tampão salina de Hank (tampão HBSS), respectivamente. Ao final do bandamento as lâminas foram coradas com Giemsa.

Os exames de cariótipo dos pacientes provenientes do ambulatório do HUB e da SES/DF foram analisados, respectivamente, pela Professora Doutora Iris Ferrari, do Laboratório de Genética da UnB e pelas biólogas Especialistas em Saúde do Laboratório de Citogenética do Núcleo de Genética da SES/DF que, posteriormente, tiveram seus resultados validados e os laudos emitidos pelas médicas geneticistas do Núcleo.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada conforme o método Puregene (www.puregene.com). Na etapa de lise celular foi adicionado 3 ml de sangue total a

9ml de solução de lise RBC (5mM MgCl₂ -1mM EDTA pH 8,0). O material foi invertido e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 10 minutos a 3400 G. Após descarte do sobrenadante, o tubo foi homogeneizado para ressuspensão do *pellet* e adicionados 3ml de solução de lise celular (SLC) (10mM Tris pH 7,5 – 1mM EDTA pH 8,0 – 1% SDS), obtendo-se uma suspensão homogênea.

A fim de separar as proteínas presentes no lisado celular, foi adicionado 1ml da solução de precipitação de proteína (NH₄Ac 7,5 M) e o tubo homogeneizado por 20 segundos e centrifugado por 10 minutos a 3400 G. Essa etapa faz com que as proteínas presentes no lisado se precipitem formando um *pellet* permitindo a remoção do sobrenadante contendo somente DNA.

Para a fase de precipitação do DNA, o sobrenadante, previamente transferido para outro tubo, foi misturado a 3ml de isopropanol 100%. Nessa etapa é possível observar o “novelo” de DNA. Após a formação do novelo, o material foi centrifugado novamente por 3 minutos a 3400 G e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 3ml de etanol 70%, invertendo o tubo para melhor homogeneização, centrifugado por 1 minuto a 3400 G e retirado o sobrenadante novamente. O tubo contendo DNA foi secado aberto à temperatura ambiente por 20 minutos em capela de fluxo laminar e, após secagem total, adicionado 200µl de TE (Tris-HCL 10mM - EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi armazenado em freezer de 2 a 8°C.

As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare Life Sciences, EUA) em concentração de ng/µl.

3.3 ANÁLISE DE MICRORREARRANJOS POR MLPA

A técnica de MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) consiste em uma variação da técnica de MLPA, na qual são utilizadas endonucleases sensíveis à metilação. Foi utilizado o kit ME028 (MRC-Holland) contendo 32 sondas diferentes específicas para a sequência, ou para as regiões próximas, da região 15q11, crítica para as síndromes de Prader-Willi e Angelman, sendo que, cinco dessas sondas são específicas para a sequência que

sofre *imprinting* e contém um sítio de ligação para enzima sensível à metilação, Hhal.

A técnica de MLPA, por meio da hibridação de sondas específicas e amplificação por PCR, permite a identificação do número de cópias de uma dada sequência de DNA. Essas sondas apresentam dois segmentos complementares às sequências alvo de DNA, um oligonucleotídeo curto e um oligonucleotídeo longo, contendo uma sequência *stuffer* de diferentes tamanhos para cada uma das regiões estudadas. É a partir dessas sequências *stuffer* que as sondas poderão, ao final do experimento, ser separadas e correlacionadas com as regiões cromossômicas investigadas.

Inicialmente as amostras foram diluídas em água e colocados 5µl em tubos de 0,2ml, alcançando uma concentração entre 50 e 250µl. Essas amostras foram então desnaturadas em um termociclador a 98°C por 5 minutos e posteriormente resfriadas a 25°C. Após o processo de desnaturação, as amostras foram hibridizadas utilizando um mix contendo 1,5 µl das sondas específicas para a região 15q11 e 1,5 µl de MLPA *Buffer*, e incubadas *overnight* a 60°C (entre 16 e 20 horas). No dia seguinte, foram preparados dois mix de ligação distintos, um contendo 8,25µl de H₂O, 1,5µl de Ligase *Buffer B*, e 0,25µl de enzima Ligase-65 e o segundo contendo 7,75µl de H₂O, 1,5 de Ligase *Buffer B*, 0,25µl de enzima Ligase-65 e 0,5µl de enzima Hhal.

Todas as amostras receberam um mix contendo 3µl de Ligase *Buffer A* e 10µl de H₂O. O volume total foi então dividido em dois tubos: o primeiro recebeu 10µl do mix sem a enzima, correndo conforme a reação padrão de MLPA e fornecendo informações sobre o número de cópias, e o segundo, 10µl do mix com a enzima. Essa enzima digere sequências que não apresentem o grupo metil, o que impede a sua posterior amplificação, permitindo a análise do padrão de metilação. O programa manteve as amostras a 48°C por 30 minutos, seguido de 5 minutos a 98°C e resfriamento a 20°C.

Após a ligação, as amostras foram amplificadas por PCR. À temperatura ambiente, foi adicionado 5µl de um mix composto de 3,75µl de H₂O, 1µl de SALSA PCR *primer mix* e 0,25µl de SALSA *polymerase*. A reação foi realizada em ciclos de 30 segundos a 95°C, seguido de 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C. Quando terminados 35 ciclos, as amostras foram incubadas a 72°C por 20 minutos e mantidas resfriadas a 15°C no termociclador. Os fragmentos formados e amplificados foram diluídos e misturados a 0,1µl de GS500 LIZ® (*Applied*

Biosystems, EUA) e 9µl de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*, EUA) e submetidos à eletroforese capilar no analisador genético ABI-3130. A análise dos resultados foi realizada utilizando o *software* “*Coffalyser*” (MRC-Holland). A figura 4 mostra um resumo do processo

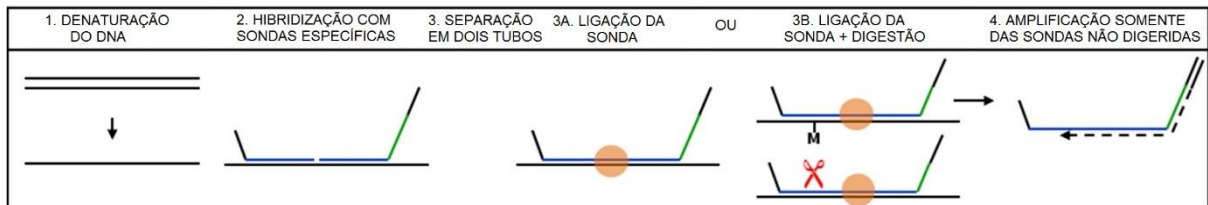


Figura 4. Resumo da reação de MS-MLPA para detecção e quantificação de seqüências de nucleotídeos utilizando uma enzima de digestão sensível à metilação

Fonte: Traduzido de MRC-Holland.

Os fragmentos sem o grupo metil foram completamente digeridos pela enzima HhaI, não sendo amplificados. Dessa forma foi possível analisar não somente variações do número de cópias como também o padrão de metilação das amostras.

Para todas as reações foram utilizados quatro controles, ou seja, pessoas não portadoras da síndrome, normais em número de cópias e no padrão de metilação.

A análise dos resultados foi feita calculando-se o valor da intensidade de amplificação da sonda específica à média das intensidades de amplificação de todas as sondas em relação à média de intensidade nas amostras controle.

Amostras com padrão normal geram gráficos como os das figuras 5 e 6.

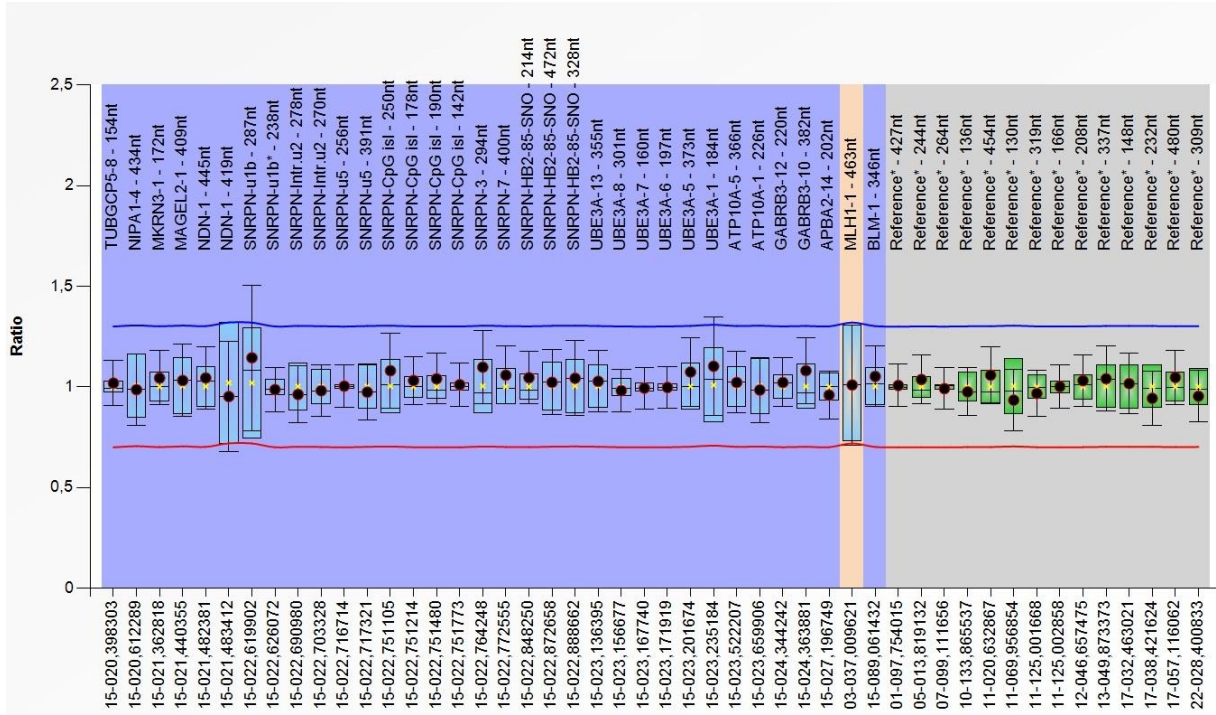


Figura 5. Gráfico mostrando o padrão normal de número de cópias para cada sequência amplificada da amostra pela técnica de MLPA

Pacientes controle foram utilizados como referência para a geração dos gráficos, onde cada ponto representa os valores normalizados de intensidade de fluorescência para cada sonda.

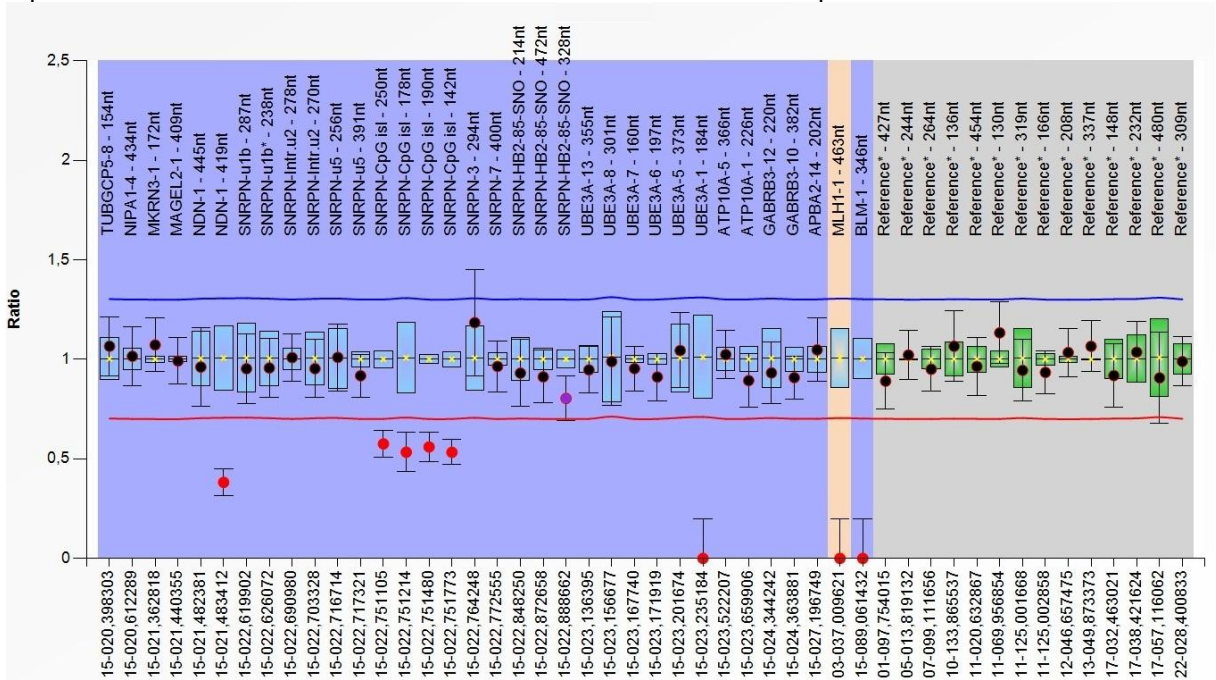


Figura 6. Gráfico mostrando o padrão normal de metilação para cada sequência amplificada da amostra pela técnica de MLPA

As sequências 463 e 346 aparecem sem nenhum sinal e são consideradas controles da reação de digestão, enquanto que as sequências 250, 178, 190 e 142 aparecem com uma redução de 50%.

É possível verificar pela Figura 5 que todas as sondas se encontram no intervalo próximo à 1, o que significa que elas possuem duas cópias de cada sequência.

Na Figura 6 observamos as sondas 463 e 346 completamente digeridas, o que permite concluir que o processo de digestão foi completo, uma vez que essas sondas se ligam a regiões conhecidamente não metiladas. Nos padrões normais de metilação, uma cópia materna metilada e uma cópia paterna não metilada, as sequências 250, 178, 190 e 142 aparecem com uma taxa de redução de 50%.

3.4 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJOS

Uma das técnicas de citogenética molecular mais utilizadas para a triagem de alterações cromossômicas submicroscópicas é a análise cromossômica por microarranjos (CMA), que permite detectar microdeleções ou microduplicações, simultaneamente, em milhares de sequências-alvo do genoma. Essa técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em alta densidade em um chip de DNA (*GeneChip*®), o que permite detectar alterações cromossômicas de 10 a 100 vezes menores do que é visível ao microscópio óptico, dependendo da plataforma utilizada.

Essas alterações foram investigadas utilizando a plataforma de 750K da Affymetrix®, em 21 pacientes sem alterações cromossômicas ao MLPA. Essa plataforma utiliza microarranjos de DNA contendo 550 mil sondas não polimórficas para CNVs, de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano, e cerca de 200 mil SNPs. Assim, ela permite analisar tanto o número de cópias alelo-específicas quanto os genótipos de SNPs, bem como confirmar, independentemente, as variações no número de cópias com informações alélicas desses SNPs. Dessa forma, é possível cobrir 100% dos genes constitucionais do ISCA, 83% dos genes do *OMIM*® e 80% dos mais de 36 mil genes do *RefSeq* (*NCBI Reference Sequence Database*).

Resumidamente, o processo consiste nas etapas descritas na Figura 7.

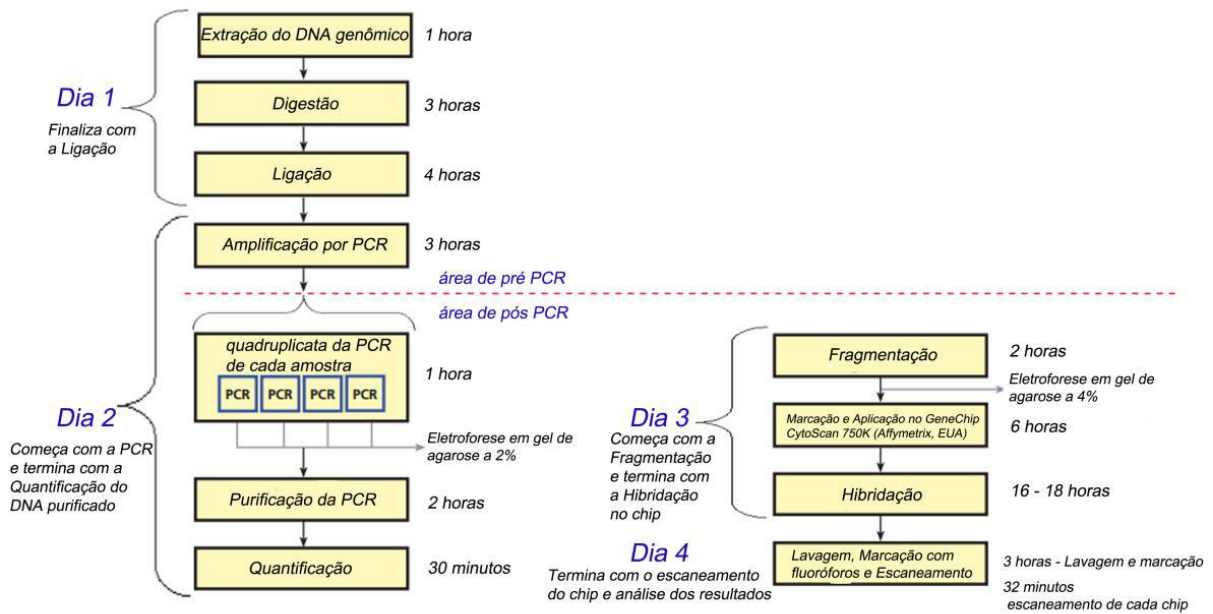


Figura 7. Protocolo da plataforma Affymetrix® CytoScan™ 750k Array, com o tempo aproximado para a realização de cada etapa

A extração do DNA genômico foi realizada conforme descrito anteriormente e normalizadas a uma concentração de 50ng/μl diluído em *Low EDTA TE buffer* (Affymetrix, EUA). Em seguida as amostras foram digeridas com a enzima *Nsp I* e os fragmentos ligados para posterior amplificação por PCR.

Para a digestão, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C e 20 minutos a 65°C, juntamente com um mix contendo 5μl de DNA, 11,55μl de água ultrapura, 2μl de tampão *Nsp I* (10x), 0,20μl de albumina bovina sérica (BSA) (100x) e 1μl da enzima *Nsp I* (10U/μl). Os fragmentos obtidos foram então ligados a adaptadores específicos, com uma mistura de 0,75μl de adaptador *Nsp I* (50μM), 2,50μl de tampão da *T4 DNA Ligase* (10x) e 2μl da enzima *T4 DNA Ligase* (400U/μl) e incubados por três horas a 16°C e 20 minutos a 70°C. Os produtos foram diluídos em 75μl e armazenadas a - 20°C.

No dia seguinte, as amostras foram submetidas à reação da PCR com a utilização de 39,5μl de água ultrapura, 10,0μl de tampão da TITANIUM™ *Taq DNA Polimerase* (10X), 20,0μl de reagente *GC-Melt*, 14,0μl de mistura de dNTP's (2,5mM cada), 4,5μl do iniciador PCR *Primer 002* (100μM) (Affymetrix, EUA) e 2,0μl da enzima TITANIUM™ *Taq DNA Polimerase* (50X) (Clontech, EUA). Todas as amostras foram feitas em quadruplicatas, a fim de aumentar a quantidade de DNA genômico, e colocadas em um termociclador com 1 ciclo de incubação a 94°C

(3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos).

Como ponto de controle, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, para visualização da digestão, ligação e amplificação dos produtos da PCR.

As quadruplicatas foram novamente unidas em um único tubo e os fragmentos de DNA capturados com o uso de esferas magnéticas. Após incubação e centrifugação, essas esferas foram selecionadas por força magnética, lavadas com tampão de purificação, eluídas em tampão de eluição e quantificadas. Nesse ponto, as amostras devem estar a uma concentração de DNA maior ou igual a 3µg/µl.

O próximo passo foi a fragmentação dos produtos da PCR. Para isso, um mix contendo 123,5µl de água ultrapura, 158,4µl de tampão de fragmentação 10x (*Affymetrix*, EUA) e 5,8µl do reagente de fragmentação (2,5U/µl) foi adicionado e as amostras incubadas por 35 minutos a 37°C e 15 minutos a 95°C.

Uma nova eletroforese foi realizada em gel de agarose 4%, em TBE 1X, para verificar a presença de um arraste entre 25 e 125pb.

Em seguida as amostras foram marcadas com biotina a partir de uma mistura de 51µl do DNA fragmentado e 19,5µl da mistura de marcação formada por 14,0µl de tampão *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (5X), 2,0µl de reagente de marcação de DNA 30mM (biotina) e 3,5µl da enzima *TdT* (30U/µl) e colocadas em um termociclador por quatro horas a 37°C seguido de 15 minutos a 95°C.

Para a próxima etapa de hibridação, 70,5µl do DNA biotilado foi misturado a 190µl da mistura de hibridação, composta dos tampões de hibridação parte 1 (165µl), parte 2 (15µl), parte 3 (7µl) e parte 4 (1µl), mais 2µl de OCR (*Oligo Control Reagent*, *Affymetrix*, EUA) e aquecido a 95°C por 10 minutos e resfriada a 49°C. Ainda com as amostras no termociclador, 200µl da mistura desnaturada foi depositada imediatamente em cada um dos *GeneChip*[®] com os oligonucleotídeos pré-arranjados. Os *GeneChip*[®] com o DNA foram incubados em forno de hibridação (modelo *Hybridization Oven 645*, *Affymetrix*, EUA) a 50°C, durante 16 a 18 horas, a 60 rpm.

A posterior lavagem a marcação dos *GeneChip*[®] foi realizada na estação automatizada *Fluidics Station 450* (*Affymetrix*, EUA), previamente abastecida com os tampões de lavagem e água ultrapura, bem como com os tampões de marcação, preparados com elementos essenciais para a formação da fluorescência durante a

leitura dos *GeneChip*[®]. Esses processos foram realizados na estação fluidica, automatizada sob controle do *software Affymetrix GeneChip[®] Command Console[™]* (AGCC), versão 4.1.2 (*Affymetrix*, EUA).

Esse programa também gerencia um scanner e permite a visualização das imagens dos *GeneChip*[®] em um programa específico (*Affymetrix GeneChip Viewer*). Nessa etapa é possível conferir os controles positivos do sistema, verificando se as condições de hidratação do microarranjo foram adequadas.

O programa detecta os diferentes níveis de fluorescência emitida por cada sonda no *GeneChip*[®] e os transforma em um arquivo de extensão *.CEL*. Um segundo *software*, *Chromosome Analysis Suite (ChAS)* (*Affymetrix*, EUA), converte e normaliza esses dados brutos, por meio da combinação das fluorescências obtidas com dados de fluorescência disponíveis no banco de dados *NetAffx[®] Genomic Annotation file NA33.1*, utilizando algoritmos específicos. Essa metodologia permite analisar os dados obtidos com banco de dados genômicos como *Datase of Genomic Variants (DGV)*, *OMIM[®]* e *RefSeq*.

O *ChAS* permite, além da visualização dos dados genômicos em forma de tabelas e gráficos, a criação e customização de parâmetros e regiões para uma análise específica, a aplicação de filtros a fim de remover informações sem relevância e a comparação de diferentes amostras.

Para as análises realizadas, foram utilizados como filtros: mínimo de 30 sondas (aproximadamente 120Kpb) para detectar duplicações cromossômicas e de 15 sondas (aproximadamente 60Kpb) para detectar deleções.

A avaliação da patogenicidade foi feita de acordo com as recomendações do *Consensus Statement for Chromosomal Microarrays* (48) e a classificação de Srebniak (49).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS DOS EXAMES DE CARIÓTIPO

O exame de cariótipo realizado em todos os 68 pacientes não revelou alterações cromossômicas numéricas ou estruturais.

4.2 ALTERAÇÕES ENCONTRADAS POR MLPA

Por meio da técnica de MLPA, foram analisados 68 pacientes, sendo que 65 (95,6%) apresentaram resultados normais, tanto com relação ao número de cópias quanto ao padrão de metilação, e três (4,4%) apresentaram deleção na região analisada. Não foram observadas alterações no padrão de metilação, que sugerissem uma dissomia uniparental, ou alterações nos centros de *imprinting*, fato que poderia ser esperado, visto que a incidência dessas alterações é menor e, juntas, correspondem a apenas cerca de 30% dos casos da Síndrome de Prader-Willi.

O paciente 1 apresentou uma deleção de todo o segmento 15q11q13 testado incluindo os genes *TUBGCP5* e *NIPA1* (Figura 8).

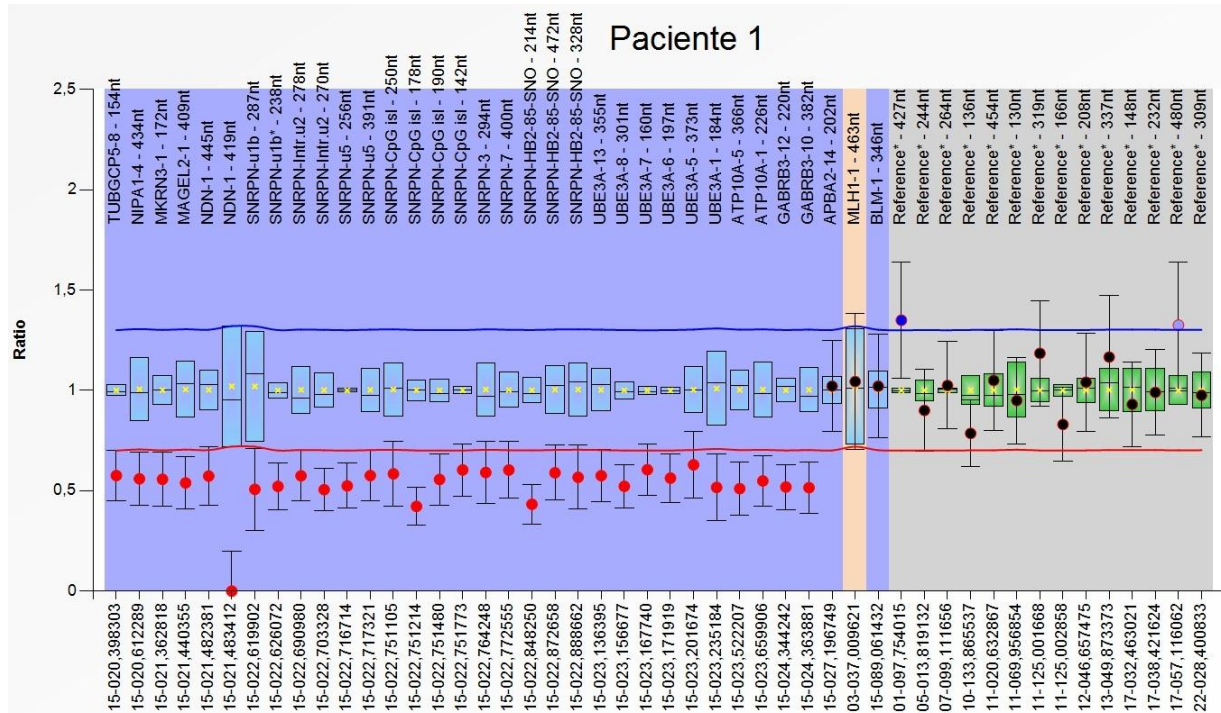


Figura 8. Gráfico do paciente 1 representando a deleção encontrada, que se estende até o gene *TUBGCP5* e o gene *GABRB3*.

A partir do gráfico gerado pelo *software Coffalyser (MRC Holland)* é possível verificar que o paciente apresenta uma deleção que inclui o gene *TUBGCP5* e se estende até *GABRB3* inclusive, próximo ao BP3. Os valores normalizados são representados por pontos que se localizam abaixo do intervalo normal, ou seja, a relação entre os sinais gerados pelas sondas desse paciente e os valores controle está próximo a 0,5, o que significa que esse paciente apresenta somente uma cópia desses genes. A sonda 419 não pôde ser avaliada porque a intensidade de fluorescência ficou abaixo do limite de detecção do *software*. Pela metodologia utilizada verificamos que a deleção envolve BP1, apesar de não ser possível determinar o ponto de início da deleção, entretanto o envolvimento dos genes da Síndrome de Prader-Willi permite a confirmação do diagnóstico.

Os pacientes 2 e 3 apresentaram uma deleção iniciando em *MKRN3* e terminando próximo ao BP3 (Figura 9). Essa deleção é considerada do tipo II, entre BP2 e BP3, onde *MKRN3* corresponde ao BP2.

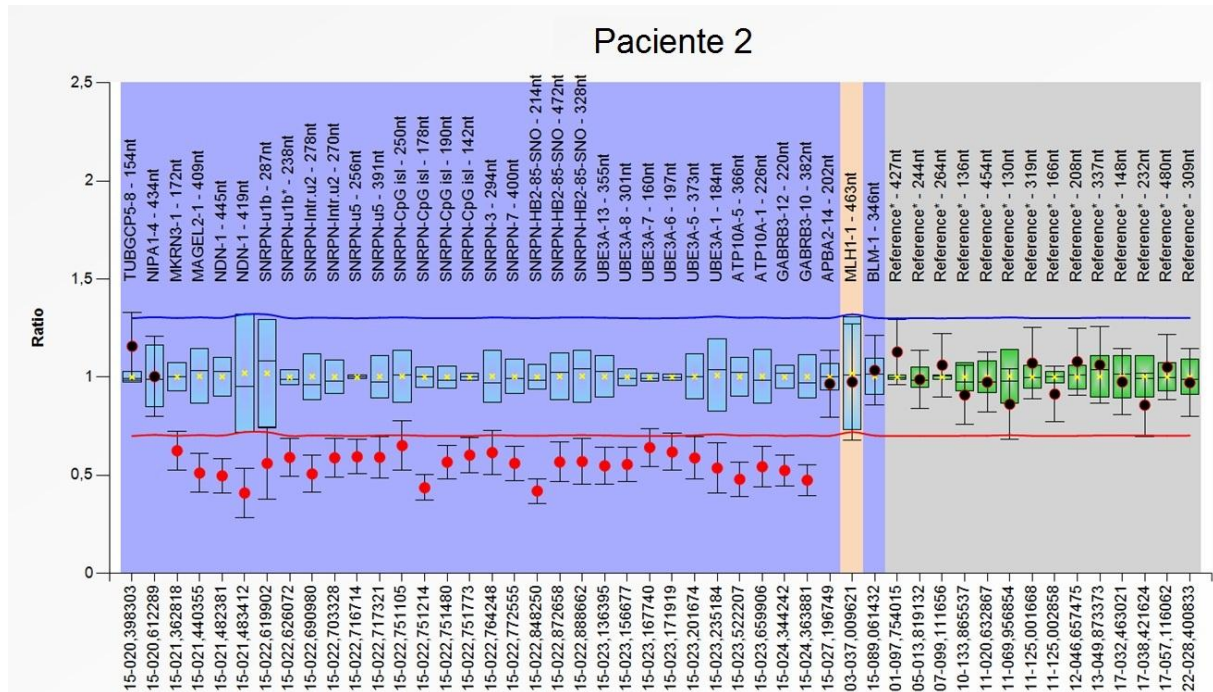


Figura 9. Gráfico do paciente 2 representando a deleção encontrada entre *NIPA1* e *GABRB3*.

Em todos os três pacientes, os gráficos das amostras digeridas, representando o padrão de metilação, foram normais. Isso permite concluir que a deleção observada se deu no cromossomo paterno, uma vez que a outra cópia apresentava os genes da região PWS (entre *MKRN3* e *SNRPN* I) ligados a um grupo metil.

De fato, deleções entre os pontos de quebra observados são mais frequentes do que deleções envolvendo os demais pontos, como BP4 e BP5, visto que BP1, BP2 e BP3 são flanqueados por regiões de sequências repetidas em tandem, facilitando essas alterações no número de cópias (26).

Dessa forma, a técnica de MLPA permitiu a confirmação do diagnóstico de Síndrome de Prader-Willi, bem como a determinação da alteração presente em 3 dos 68 pacientes investigados.

4.3 ALTERAÇÕES ENCONTRADAS PELA ANÁLISE CROMOSSÔMICA DE MICROARRANJOS (CMA)

Dos 65 pacientes com resultados normais, 20 foram submetidos à análise pela técnica de CMA. A fim de correlacionar as alterações cromossômicas encontradas com o fenótipo do paciente, foi adotada a classificação proposta por Srebniak e cols. (49). Para o autor, as CNVs podem ser divididas em benignas (variações encontradas no bando de dados DGV, que fornece informações sobre alterações em indivíduos hígidos), patogênicas (por exemplo, descritas no banco DECIPHER), potencialmente patogênicas (como alterações relacionadas a desordens de origem autossômica recessiva), VOUS (de significado incerto) e casuais (quando encontradas acidentalmente em um dos genitores).

Dos 20 pacientes analisados, 16 (80%) apresentaram somente CNVs previamente descritas no banco de dados DGV, sendo consideradas benignas.

Em um desses pacientes foi detectada uma consanguinidade próxima a 25%, indicativa de parentesco de primeiro grau (50), sugerindo que o quadro clínico seja de causa autossômica recessiva. Entretanto, esse dado não permite definir uma região causal específica. Não foram encontradas CNVs consideradas patogênicas nesse indivíduo e a consanguinidade não havia sido informada previamente.

Um paciente apresentou uma perda de heterozigose no cromossomo 11, que consideramos patogênica.

Uma paciente apresentou uma deleção de 7,9Mb no cromossomo 2 considerada patogênica.

Os outros dois pacientes apresentaram deleções e regiões de perda de heterozigose (10%) que foram classificadas como VOUS, uma vez que não houve evidências suficientes para determinar se as alterações eram ou não patogênicas e se estavam ou não relacionadas com quadro clínico (Tabela 2).

O restante dos pacientes não pode ser analisado por falta de recursos e disponibilidade de tempo, entretanto suas amostras serão

Tabela 2. Principais CNVs encontradas nos pacientes alterados

Paciente	Alteração	Região Cromossômica	Tamanho	Classificação
4	LOH	11q12.3	5,1Mb	Patogênica
5	LOH	1p32.1	30Mb	VOUS
6	Deleção	2p24.2	7,9Mb	Patogênica
	LOH	15q23	7,7Mb	VOUS
7	LOH	Xq11.1	5,3Mb	VOUS
	LOH	3p21.3	5,1Mb	VOUS

A não identificação de regiões causativas por meio da técnica de CMA, nem sempre significa que não haja nenhuma patogenicidade nas variações encontradas. Nesses casos é necessária a busca por informações adicionais na literatura sobre possíveis genes que possam estar envolvidos. Muitas vezes as alterações são menores, como mutações de ponto, exigindo testes como sequenciamento gênico a fim de confirmar a maioria das hipóteses.

4.3.1 Paciente 4

O paciente 4 foi atendido pela primeira vez no ambulatório de genética em 2011, com 9 anos e 4 meses à época. Criança do sexo masculino, primeiro filho de casal não consanguíneo, com dois irmãos, mais novos, hígidos, apresentava deficiência intelectual leve, obesidade central, macrocefalia, genitália masculina com micropênis, criptorquidia, membros proporcionais e pregas palmares normais. Aos quatro anos desenvolveu compulsão alimentar e, por isso, inicialmente foi sugerida a investigação para Síndrome de Prader-Willi e Síndrome do X-frágil. Entretanto, os exames de cariótipo MLPA e FISH (realizados em outro laboratório) tiveram resultado normal, descartando essas hipóteses.

O CMA desse paciente identificou uma perda de heterozigose de 5,1Mb no cromossomo 11, em uma região onde estão mapeados 139 genes (arr[hg19] 11q12.3q13.3(63,314,039-68,500,838) hmz).

Não foram identificados outros blocos de homozigose maiores que 5Mb e não há consanguinidade parental.

A perda de heterozigose (LOH) geralmente é resultante de uma dissomia uniparental e possui importantes implicações no campo das doenças genéticas. Primeiramente, ela perturba a herança dos padrões epigenéticos, podendo resultar em doenças de *imprinting*, como no caso das síndromes de Prader-Willi e Angelman. Ela pode ainda converter alelos deletérios transmitidos de um genitor heterozigoto para a condição de homozigose, causando uma doença recessiva ou pode resultar em uma trissomia incompleta, gerando um mosaicismo residual (51).

A região identificada envolve diversos genes, entre eles o *BBS1*, principal gene relacionado à Síndrome de Bardet-Biedl (Figura 10) (52,53).

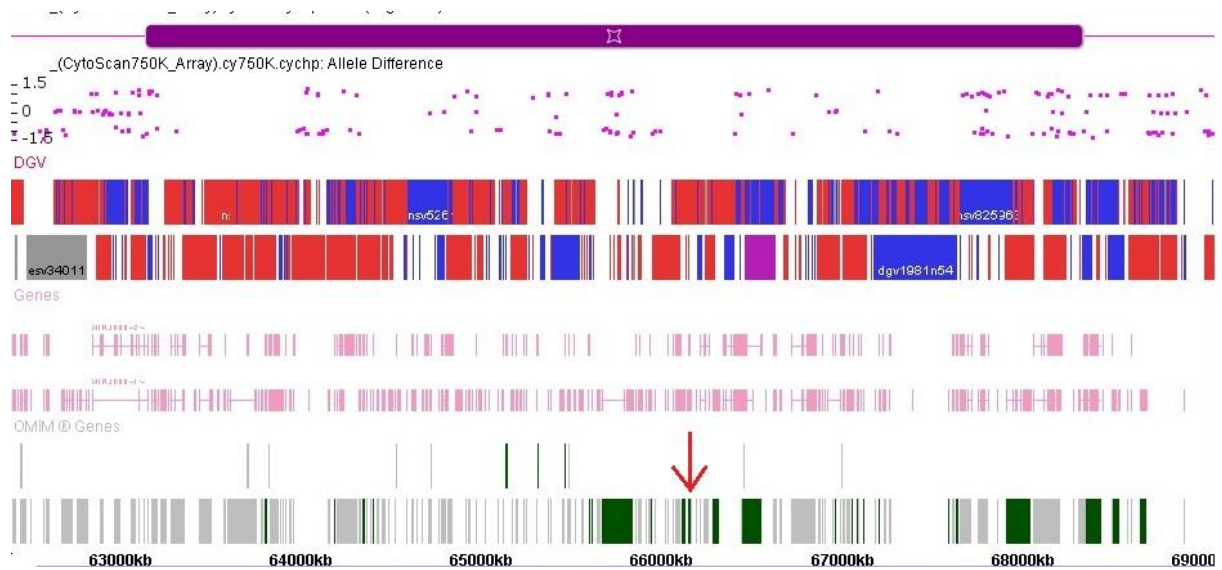


Figura 10. Imagem gerada pelo software ChAS versão 3.1 (Affymetrix, EUA) do paciente 4, representando a região de perda de heterozigose encontrada

A barra roxa representa LOH, as regiões em vermelho e azul correspondem às regiões de deleção e duplicação, respectivamente, já descritas no DGV como sendo benignas. As barras em verde representam genes associados à patologias já descritas no OMIM, entre eles o gene *BBS1*, indicado pela seta vermelha.

A Síndrome de Bardet-Biedl é heterogênea e apresenta um amplo espectro de características clínicas, envolvendo retinopatia, obesidade, polidactilia, dificuldade de aprendizagem, anomalias genitais e do trato urinário. Apesar de Beales e cols. (54) terem considerado a retinite pigmentosa e a polidactilia como critérios maiores para o diagnóstico clínico, outros estudos mostraram que pacientes portadores da mutação de *BBS1* apresentam um fenótipo moderado, o que explicaria a ausência dessas características no paciente em questão. Adicionalmente, o aparecimento de algumas dessas características pode ocorrer em outras etapas do desenvolvimento, fato que adiará o diagnóstico clínico (55).

Um estudo realizado com 37 pacientes portadores da síndrome, com mutações em diferentes genes, mostrou que os portadores da mutação *M390R* em *BBS1* apresentam uma maior acuidade visual do que os portadores de outras mutações. Uma hipótese diz que, ao invés de participar diretamente do complexo BBS, localizado no corpo basal das células ciliadas, *BBS1* teria participação na formação de uma proteína adaptativa. Dessa forma, ela não contribuiria para a dissolução do complexo, mas somente para um de seus componentes. Uma outra teoria defende a ideia de que as principais mutações encontradas em *BBS1* são do tipo *missense*, e não causaria perda de função total da proteína, ao contrário do

observado nas mutações dos outros genes que são, em sua maioria, *nonsense*, deleções ou *frameshift*.

Ainda não foi possível determinar uma clara correlação entre o genótipo e o fenótipo encontrado nas diferentes mutações dos genes BBS, entretanto é possível afirmar que mutações no gene *BBS1* resultam em um fenótipo moderado (53,55).

Para determinar a mutação exata do paciente serão necessários exames adicionais, mas pelo resultado obtido no CMA e pela revisão do quadro clínico do paciente e da literatura é fortemente sugestivo que ele seja portador da Síndrome de Bardet-Biedl.

4.3.2 Paciente 5

Paciente do sexo masculino, 12 anos de idade, filho de pais consanguíneos, declarados primos distantes, não frequenta escola e apresenta braquicefalia, déficit cognitivo, dificuldade na fala, obesidade centrípeta, compulsão alimentar, pescoço curto, orelha proeminente com hipoplasia de lóbulo, mãos sem alterações, encurtamento de 5º pododáctilo bilateral, frouxidão ligamentar e genitália masculina com testículos tópicos.

O CMA desse paciente mostrou uma taxa de consanguinidade de 3,8%, revelando diversas regiões de perda de heterozigose em diversos cromossomos, como 1, 7, 8, 13 e 22, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Regiões de perda de heterozigose observadas no paciente 5 e seus respectivos tamanhos

Região cromossômica	Tamanho (kb)
1p32.1	30,095
7p15.3	8,023
8p22	12,818
13q12.3	8,272
13q13.3	35,710

Contudo, a LOH do cromossomo 1 nos chamou a atenção. Trata-se de uma região de 30Mb, contendo 148 genes, entre eles *LEPR*. Os receptores de leptina se distribuem pela superfície dos neurônios do hipotálamo e são responsáveis pelo mecanismo de regulação da saciedade (1,3,4). Indivíduos homozigotos para a mutação do gene produzem transcritos anormais, alterando tanto os domínios intracelulares da proteína, quanto os extracelulares. Dessa forma, o receptor circula livremente, se ligando à leptina e, conseqüentemente, resultando em altos níveis séricos dessa proteína. O fenótipo desses pacientes inclui obesidade mórbida, se iniciando nos primeiros meses de vida, hiperfagia, comportamento agressivo, além

de alterações endócrinas, resultando, por exemplo, em hipogonadismo, e deficiência de células T.

Entretanto, ao correlacionar essas informações com o quadro do paciente, não é possível estabelecer uma relação direta, uma vez que o paciente apresenta genitália normal e nenhuma evidência de problemas imunológicos. Pela dificuldade na fala, foi considerada a hipótese de Síndrome de Cohen, entretanto essa síndrome apresenta, entre seus critérios maiores, microcefalia e hipotonia, não observados no paciente.

Considerando a consanguinidade existente entre os genitores, é possível que o fenótipo do paciente esteja relacionado a esse fator, entretanto não é possível afirmar que essas perdas de heterozigose sejam a causa concreta. Assim, classificamos essas alterações como VOUS.

Não foram encontradas CNVs de importância clínica na análise do paciente, sendo todas consideradas benignas ou provavelmente benignas.

4.3.3 Paciente 6

Paciente do sexo feminino, 21 anos, em acompanhamento pela genética desde os 16 por DI, obesidade e convulsões na infância. Apresenta agenesia do rim esquerdo, rim pélvico à direita, útero e ovários não visualizados pela ecografia, vagina normal, mamas bem desenvolvidas, orelhas pequenas, baixo implantadas, fenda palpebral curta, estreita, levemente oblíqua para baixo, filtro apagado, ressecamento das palmas das mãos e dos pés, braquidactilia de ambos os pés. Apesar de não ter sido possível coletar informações familiares, pela análise foi identificada uma consanguinidade de 0,9%.

Foi identificada uma deleção de 7,9Mb no cromossomo 2, em uma região onde estão mapeados 36 genes (arr[hg19] 2p24.2p23.3(16,863,019-24,777,612)hmz) (Figura 11).

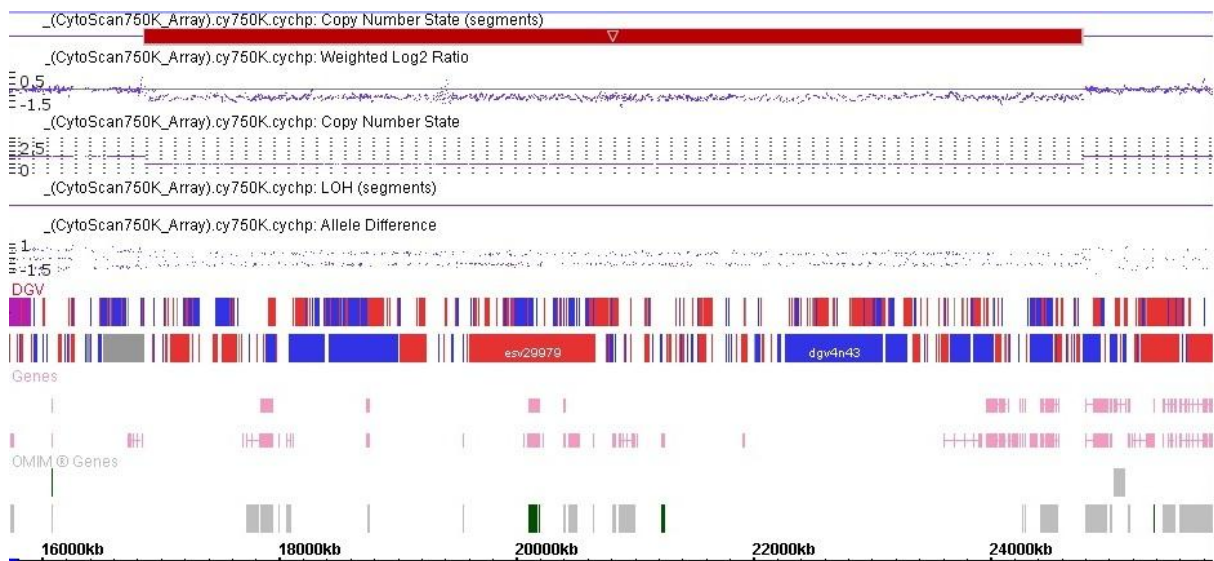


Figura 11. Representação gráfica da deleção da região cromossômica 2p24.3p23.3, encontrada no paciente 6

Visualizada no *software* ChAS versão 3.1 (Affymetrix, EUA).

A partir das considerações de Malan e Romana (45), CNVs a partir de 1,5Mb podem ser consideradas a causa provável da patologia observada, entretanto a região não apresenta genes que pareçam ter relação com quadro clínico da paciente. Adicionalmente, o banco DECIPHER descreve um paciente com CNV

semelhante e fenótipo incluindo malformação do coração e dos grandes vasos, microcefalia e retardo de crescimento intrauterino e pós-natal. Esse paciente apresenta de uma deleção de 5,03Mb, localizada dentro da região deletada da paciente 6, entretanto foi identificado que tal CNV havia sido herdada do pai não afetado saudável. Entretanto, por se tratar de uma deleção grande, ela deve ser a provável causa do fenótipo. Considerando esses fatos, classificamos a deleção como patogênica. Será necessário realizar o exame dos pais para confirmar se a alteração foi ou não herdada.

Além da deleção, foi observada uma LOH no cromossomo 15, se estendendo por 7,7Mb, na região 15q23q25.1. Nessa região está localizado o gene *BBS4*, um dos responsáveis pela Síndrome de Bardet-Biedl. Em um estudo realizado com 177 famílias de diversas etnias foi identificado que menos de 3% possuem a mutação nesse gene, sendo que ele parece ser mais frequente em árabes e curdos (56). Além disso, homocigotos para essa mutação apresentam um fenótipo mais caracterizado por alterações oftálmicas. Essas informações nos fazem acreditar que essa LOH seja possivelmente patogênica, mas sem evidências suficientes para afirmarmos, assim classificando-a também como VOUS.

A paciente não apresentou outras regiões relevantes de LOH e as demais CNVs encontradas foram consideradas benignas.

4.3.4 Paciente 7

Terceira filha de casal não consanguíneo, sexo feminino, 15 anos, encaminhada à genética por laringotraqueomalacia, diagnosticada com menos de 1 mês de vida. A paciente apresenta atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, principalmente com acometimento da fala, desde criança não possui lágrimas mas transpira normalmente, possui compulsão alimentar, obesidade com início entre três e quatro anos, atualmente frequenta escola em sala especial. Ao exame foi observada macrocefalia, baixa implantação de cabelos na fronte, fronte curta, fendas palpebrais curtas, orelhas normoimplantadas, proeminentes, pescoço alargado, cintura escapular estreita, mãos sem alterações, encurtamento de 5º dedos de ambos os pés.

Não foram encontradas CNVs de significado clínico pela técnica de CMA, entretanto foram observadas duas LOH, uma posicionada na região Xq11.1q12 e outra na região 3p21.31p21.1.

A perda encontrada no cromossomo X possui 5,3 Mb e engloba 18 genes, sendo que 12 estão previamente descritos no OMIM como patogênicos.

A LOH do cromossomo 3, possui 5,1Mb, contendo 161 genes sendo 145 já associados a patologias e descritos no OMIM.

Por não apresentarem aparente relação causal com o fenótipo não é possível considerar de imediato essas regiões como patogênicas, entretanto pela falta de consanguinidade entre os genitores e sem casos relacionados na família, elas não podem ser descartadas, sendo assim considerada VOUS.

4.4 DISCUSSÃO

A técnica de MS-MLPA tem-se mostrado uma ferramenta útil no diagnóstico de pacientes com Síndrome de Prader-Willi, com algumas vantagens em relação a outras técnicas. Ela detecta, simultaneamente, variações no número de cópias e no padrão de metilação da amostra; necessita de uma quantidade relativamente pequena de DNA, entre 50 e 250ng, além da grande vantagem de não precisar de amostras dos genitores, o que nem sempre é possível.

Analizamos 68 amostras de pacientes com obesidade associada à deficiência intelectual, sendo que 18 possuíam suspeita da síndrome. Três pacientes foram diagnosticados com deleções na região, confirmando a hipótese. Dessa forma, encontramos uma prevalência de 4,4% de pacientes portadores da Síndrome de Prader-Willi dentro do universo de indivíduos com obesidade e DI. Não foram encontradas informações semelhantes na literatura.

Apesar de não termos verificado nenhum paciente com alterações no padrão de metilação, a prevalência relatada dessa alteração é baixa, correspondendo a menos de 30% dos casos de Prader-Willi.

Se considerarmos apenas os pacientes com suspeita clínica da síndrome, a taxa de detecção da técnica corresponde a 16,6%. Assim, a técnica parece eficaz na confirmação da hipótese, mas não como uma ferramenta exploratória em pacientes com obesidade e DI. Também não foram encontradas na literatura informações semelhantes sobre a mesma técnica.

Nos últimos dez anos, com o advento de novas técnicas, como a análise cromossômica por microarranjos, novas e promissoras descobertas têm sido feitas no campo da genética. Unindo áreas distintas, como a citogenética e a genética molecular, essas técnicas permitiram a identificação de novas regiões e novos mecanismos de alterações presentes no genoma humano, até então desconhecidos. Cobrindo todo o genoma, a análise cromossômica por microarranjos possui um poder de detecção de 10 a 500 vezes maior quando comparado à cariotipagem tradicional (45).

Em nossas análises identificamos um paciente com uma CNV patogênica, apesar de não ter sido possível determinar uma relação causal direta. Por se tratar de uma deleção grande, 7,9Mb no caso, ela deve ser a provável causa do fenótipo.

A associação de SNPs às plataformas de microarranjos permitiu que mais de um milhão de SNPs pudessem ser identificados simultaneamente, fornecendo informações sobre sua densidade a cada 3kb ou menos (57). Os SNPs constituem uma das classes mais comuns de polimorfismos. Geralmente localizados em regiões intrônicas, seu papel ainda não está claro, mas parecem impactar na expressão gênica ou no *splicing* (58).

Atualmente, os chips mais comuns de SNP-arrays permitem a genotipagem de 10.000 a mais de 1 milhão de SNPs, por meio da identificação das quatro variantes possíveis (A, C, T e G) na sequência contendo o SNP (59). Os *softwares* analisam os dados gerados e detectam, inclusive, o número de cópias de cada sequência em torno de um SNP a partir do perfil de hibridação, identificando microdeleções ou microduplicações, dissomias uniparentais e grandes regiões de homozigose ou de perda de heterozigose (60).

Apesar de somente um paciente ter apresentado uma alteração do número de cópias, foram identificadas muitas regiões de perda de heterozigose nos indivíduos analisados. Atualmente, não existe um consenso acerca da definição e da classificação sobre regiões de homozigose, fato que dificulta sua interpretação e comparação entre os diferentes estudos (57).

Em um paciente foi identificada uma LOH que permitia o diagnóstico como Síndrome de Bardet-Biedl. Nesse caso, a técnica de SNP-array foi essencial para o diagnóstico molecular, uma vez que o paciente não apresentava os critérios maiores para o diagnóstico clínico da síndrome.

Estudos semelhantes produziram dados distintos dos observados no presente estudo. Em 2014, Vuillaume e cols. analisaram 100 crianças portadoras de obesidade síndrômica e identificaram que 22% delas apresentaram CNVs patogênicas ou possivelmente patogênicas, sendo 30 deleções e 29 duplicações. Cinco delas já tinham sido previamente descritas como relacionadas à obesidade, incluindo uma região próxima à deleção observada na paciente 6, entretanto nenhuma CNV identificada no estudo pôde ser relacionada às encontradas nas nossas análises. Adicionalmente, o autor não utilizou a classificação VOUS e também não identificou nenhuma região de perda de heterozigose, entretanto os motivos não foram informados no artigo.

Um outro estudo realizado em 2015 com 96 pacientes portadores de deficiência intelectual em uma população coreana detectou 42 CNVs em 33

pacientes, sendo que 15 pacientes possuíam 17 CNVs patogênicas do tipo *indel* e 13 pacientes CNVs do tipo VOUS. Somente um paciente apresentou uma LOH, considerada VOUS. Nenhum paciente possuía obesidade (61).

Regiões de perda de heterozigose podem ser resultado de deleções, dissomias uniparentais ou consanguinidade, bem como de processos evolutivos, como gargalo de garrafa. Essas regiões possuem grande importância clínica, uma vez que podem apresentar variantes com mutações deletérias, resultando em desordens autossômicas recessivas, ou até alterando o padrão de *imprinting* dos genes (62,63).

Utilizando algoritmos matemáticos, os *softwares* são capazes de calcular o grau de consanguinidade com base na taxa de LOH encontrada na amostra. Dessa forma, é possível determinar o grau de consanguinidade entre os genitores do paciente (64). Apesar de não ser uma informação que nossas análises buscam, são fatos que identificamos nos estudos feitos. Uma alta taxa de consanguinidade pode revelar relações incestuosas, nem sempre consensuais, o que leva a questões legais. Tarini e colaboradores (65) defendem a ideia de que, caso a relação se estabeleça entre indivíduos adultos legalmente competentes, o clínico não é obrigado a reportar tal fato. Da mesma forma, se um dos genitores foi vítima de abuso, a decisão de denunciar cabe a ela. Entretanto, se um dos envolvidos for menor de idade ou incapacitado legalmente, o clínico deve reportar às autoridades legais tal suspeita. No Brasil não há legislação a respeito.

Nosso estudo mostrou um número grande de pacientes com LOH. Adicionalmente, o número de deleções e duplicações foi baixo quando comparado a estudos com indivíduos com DI e outras malformações e/ou dismorfias. Dessa forma, é possível supor que outros mecanismos estejam envolvidos no desenvolvimento da obesidade associada à DI, tais como mutações de ponto. Considerando esses achados, talvez a CMA não seja o exame mais indicado para esses pacientes, devendo-se considerar um sequenciamento completo a fim de desvendar alterações não encontradas por essa técnica.

Não podemos descartar a possibilidade de que a alta prevalência de LOH e de CNVs consideradas VOUS talvez envolvam genes e regiões possivelmente patogênicas ainda não descritas nos bancos de dados.

Por fim, nossos estudos revelam que a obesidade associada à DI não pode ser relacionada a uma única região ou a um único gene e análises adicionais devem ser realizadas a fim de fornecer informações adicionais sobre a etiologia desse quadro.

5 CONCLUSÕES

- 1) A incidência de portadores da Síndrome de Prader-Willi entre pacientes com deficiência intelectual associada à obesidade foi de 4,4%. Não foi encontrada nenhuma informação semelhante na literatura.
- 2) A técnica de MS-MLPA mostrou-se uma ferramenta eficaz para o diagnóstico de indivíduos com suspeita de Síndrome de Prader-Willi.
- 4) Dos 20 pacientes analisados pela técnica de CMA, um foi diagnosticado como portador da Síndrome de Bardet-Biedl. A técnica foi essencial para o diagnóstico do paciente, visto que ele não apresentava os critérios maiores para o diagnóstico clínico da síndrome, e por isso essa hipótese não havia sido cogitada.
- 5) Foi observada uma alta incidência de VOUS nos pacientes com DI associada à obesidade, o que pode significar que mecanismos mais complexos ou genes ainda não descritos no OMIM podem estar envolvidos no desenvolvimento dessas características.
- 6) Em uma paciente foi encontrada uma grande deleção no cromossomo 2 considerada patogênica, no entanto não pudemos relacioná-la imediatamente com o fenótipo de obesidade.
- 7) A análise cromossômica por *microarray* revelou que alterações cromossômicas submicroscópicas não são a principal causa de obesidade associada a DI e outros métodos devem ser utilizados para o diagnóstico que visem a detecção de mutações de ponto.

6 REFERÊNCIAS

- [1] Clément K. Genetics of human obesity. *C R Biol.* 2006; 329(8):608-22.
- [2] Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas.* 2011 May;69(1):41-9.
- [3] Shawky RM, Sadik DI. Genetics of obesity. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2012;(13):11-7.
- [4] Albuquerque D, Stice E, Rodríguez-López R, Manco L, Nóbrega C. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Mol Genet Genomics.* 2015 Aug;290(4):1191-221.
- [5] Clément K, Ferré P. Genetics and the pathophysiology of obesity. *Pediatric Research* 2003;53(5):721-725.
- [6] Phan-Hug F, Beckmann JS, Jacquemont S. Genetic testing in patients with obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012 Apr; 26(2):133-43.
- [7] Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Mar;19(3):297-310.
- [8] Waalen J. The genetics of human obesity. *Transl Res.* 2014;164(4):293-301.
- [9] Apal Sammy YD, Mohamed Z. Obesity and genomics: role of technology in unraveling the complex genetic architecture of obesity. *Hum Genet.* 2015 Apr;134(4):361-74.
- [10] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007 May 11;316 (5826):889-94. Epub 2007 Apr 12.
- [11] D'Angelo, CS, Kohl I, Varela MC, et al. Obesity with associated developmental delay and/or learning disability in patients exhibiting additional features: Report of novel pathogenic copy number variants. *Am J Med Genet Part A.* 03/2013;161A(3):479-86.
- [12] Vuillaume ML, Naudion S, Banneau G, et al. New candidate loci identified by array-CGH in a cohort of 100 children presenting with syndromic obesity. *Am J Med Genet A.* 2014 Aug;164A(8):1965-75. Epub 2014 Apr 29.
- [13] World Health Organization. Definition: intellectual disability. Copenhagen (Denmark): Regional Office for Europe; c2015 – [citado em 30 out. 2015]. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/news/news/2010/15/childrens-right-to-family-life/definition-intellectual-disability>. [Tradução livre]

- [14] American Association on Intellectual and Developmental Disabilities. Definition of intellectual disability. [Internet]. Washington, D.C.: AAIDD; c2013. [citado em 30 out. 2015]. Disponível em: <http://aaidd.org/intellectual-disability/definition#.VkJm9vmrTIU>. [Tradução livre]
- [15] Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG. Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med*. 2013;64:441-50. Epub 2012 Sep 27.
- [16] De Vries BBA, Pfundt R, Leisink M, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2005 Oct;77(4):606-16.
- [17] Milani D., Cerutti M, Pezzani L, et al. Syndromic obesity: clinical implications of a correct diagnosis. *Ital J Pediatr*. 2014;40:33.
- [18] Mykytyn K., Nishimura DY, Searby CC, et al. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):435-8. Epub 2002 Jul 15.
- [19] Lee EB, Mattson MP. The neuropathology of obesity: insights from human disease. *Acta Neuropathol*. 2014 Jan; 127(1):3-28. Epub 2013 Oct 6.
- [20] Gunay-Aygun M, Cassidy SB, Nicholls RD. Prader-Willi and others syndromes associated with obesity and mental retardation. *Behav Genet*. July 1997;27(4):307-24.
- [21] Berland S, Alme K, Brendehaug A, et al. PHF6 deletions may cause Borjeson-Forssman-Lehmann Syndrome in females. *Mol Syndromol*. 2011 Sep;1(6): 294-300.
- [22] Allison DB, Packer-Munter W, Pietrobelli A, et al. Obesity and developmental disabilities: pathogenesis and treatment. *J Dev Phys Disabil*. 1998;10(3):215-55.
- [23] Douzgou S, Petersen MB. Clinical variability of genetics isolates of Cohen Syndrome. *Clin Genet*. 2011 Jun;79(6):501-6. Epub 2011 Apr 7.
- [24] Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, et al. Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J Biol Chem*. 2011 Oct 28;286(43):37665-75. Epub 2011 Aug 24.
- [25] Aycan Z., Baş VN. Prader-Willi syndrome and growth hormone deficiency. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2014;6(2):62-7.
- [26] Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, et al. Prader-Willi syndrome. *Genet Med*. 2012 Jan;14(1):10-26. Epub 2011 Sep 26.
- [27] Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, et al. The changing purpose of Prader-Willi syndrome diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* 2001;108:e92.
- [28] Tuysuz B, Kartal N, Erener-Ercan T, et al. Prevalence of Prader-Willi syndrome among infants with hypotonia. *J. Peds*. 2014 May;164(5):1064-7.

- [29] Lioni T, Reid SM, White SM, et al. A population-based profile of 160 australians with Prader-Willi syndrome: trends in diagnosis, birth prevalence and birth characteristics. *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2015;167A:371-8.
- [30] Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, et al. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993;91:398-402.
- [31] Trifirò G, Livieri C, Bosio L, et al. Neonatal hypotonia: don't forget the Prader-Willi syndrome. *Acta Pædiatr.* 2003;92:1085-9.
- [32] Buiting K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 20 Aug 2010;154C(3):365-76, 2010.
- [33] Wilson M, Mulley J, Gedeon A, et al. New X-linked syndrome of mental retardation, gynecomastia, and obesity is linked to DXS255. *Am J Med Genet.* 15 Sep 1991;40(4):406-13.
- [34] Stratakis CA, Lafferty A, Taymans SE, et al. Anisomastia associated with interstitial duplication of chromosome 16, mental retardation, obesity, dysmorphic facies, and digital anomalies: molecular mapping of a new syndrome by fluorescent *in situ* hybridization and microsatellites to 16q13 (*D16S419-D16S503*). *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 85(9):3396-401.
- [35] Kuroda Y, Ohashi I, Tominaga M, et al. De novo duplication of 17p13.1–p13.2 in a patient with intellectual disability and obesity. *Am J Med Genet.* 2014 Jun 25;164A(6):1550-4. Epub 2014 Mar 25.
- [36] Wangensteen T, Retterstøl L, Rødningen OK, et al. De Novo 19p13.2 microdeletion encompassing the insulin receptor and resistin genes in a patient with obesity and learning disability. *Am J Med Genet Part A.* 2013;161A:1480-6.
- [37] Iafrate AJ, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):949-51. Epub 2004 Aug 1.
- [38] Sebat J., Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004 Jul 23;305(5683):525-8.
- [39] Feuk L., Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006 Feb;7(2):85-97.
- [40] Lee C, Scherer SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med.* 2010 Mar 9; 12:e8.
- [41] Kim PM, Lam HY, Urban AE, et al. Analysis of copy number variants and segmental duplications in the human genome: evidence for a change in the process of formation in recent evolutionary history. *Genome Res.* 2008; 18:1865-74.
- [42] Conrad DF, Pinto D, Redon R, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 1 Apr 2010; 464:704-12.
- [43] Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010; 61:437-55.

- [44] Chen L, Zhou W, Zhang L, et al. Genome architecture and its roles in human copy number variation. *Genomics and Inform.* 2014 Dec;12(4):136-44.
- [45] Malan V, Romana S. Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle: la fin du caryotype en première intention. *Arch Pédiatr.* 2012;19(4):437-42.
- [46] Krepischi-Santos ACV, Vianna-Morgante AM, Jehee FS et al. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res* 2006;115:254–61.
- [47] Dasouki MJ, Youngs EL, Hovanes K. Structural chromosome abnormalities associated with obesity: report of four new subjects and review of literature. *Current Genomics* 2011;12:190-203.
- [48] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus Statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):749-64.
- [49] Srebniak MI, Diderich KE, Govaerts LC, Joosten M, Riedijk S, Galjaard RJ, Van Opstal D. Types of array findings detectable in cytogenetic diagnosis: a proposal for a generic classification. *Eur J Hum Genet.* 2014 Jul;22(7):856-8.
- [50] Kearney HM, Kearney JB, Conlin LK. Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med.* 2011 Dec;31(4):595-613.
- [51] Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet Part C* 2010;154C(3):329-34.
- [52] Beales PL, Badano JL, Ross AJ, et al. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet.* 2003;(72):1187–99.
- [53] Daniels AB, Sandberg MA, Chen J, et al. Genotype-phenotype correlations in Bardet-Biedl syndrome. *Arch Ophthalmol.* 2012;130(7):901-7.
- [54] Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, et al. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet.* 1999;(36)437-46
- [55] M'Hamdi O, Ouertani I, Chaabouni-Bouhaned H. Update on the genetics of Bardet-Biedl syndrome. *Mol Syndromol.* 2014;(5):51–6.
- [56] Katsanis N, Eichers ER, Ansley SJ, et al. *BBS4* is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. *Am J Hum Genet.* 2002;(71):22-9.
- [57] Pippucci T, Magi Asy, Gialluisi A, Romeo G. Detection of runs of homozygosity from whole exome sequencing data: state of the art and perspectives for clinical, population and epidemiological studies. *Hum Hered.* 2014;(77):63-72.

- [58] Wang J, Pang GS, Chong SS, Lee CG. SNP web resources and their potential applications in personalized medicine. *Curr Drug Metab.* 2012;(13):978-90.
- [59] Bernardini, L., Alesi, V., Loddo, S., Novelli, A., Bottillo, I., Battaglia, A., et al. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *Eur J Hum Genet.* 2010;(18): 178-85.
- [60] Bacolod MD, Schemmann GS, Giardina SF, et al. Emerging paradigms in cancer genetics: some important findings from high-density single nucleotide polymorphism array studies. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):723-7.
- [61] Shin S, Yu N, Choi JR et al. Routine chromosomal microarray analysis is necessary in Korean patients with unexplained developmental delay/mental retardation/autism spectrum disorder. *Ann Lab Med* 2015;35:510-8.
- [62] D'Amours G, Langlois M, Mathonnet G, et al. SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. *BMC Med Genomics.* 2014;7:70
- [63] Mezzavilla M, Vozzi D, Badii R, et al. Increased rate of deleterious variants in long runs of homozygosity of an inbred population from Qatar. *Hum Hered.* 2015;(79):14-9.
- [64] Wierenga K, Jiang Z, Yang AC, et al. A clinical evaluation tool for SNP arrays, especially for autosomal recessive conditions in offspring of consanguineous parents. *Genet Med.* 2013;15(5)354-60.
- [65] Tarini BA, Konczal L, Goldenberg AJ, et al. The perils of SNP microarray testing: uncovering unexpected consanguinity. *Pediatr Neurol.* 2013 July;49(1):50-3.

ANEXO A
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 081/2009.

Título: "Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico".

Pesquisador Responsável: Iris Ferrari.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 28/10/2009.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 25/11/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 Faculdade de Medicina-UnB

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

A pesquisa intitulada “Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico” pretende investigar a relação entre as alterações cromossômicas e o quadro clínico dos portadores.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância. Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4 a 8ml de sangue de uma das veias do antebraço do paciente e seus genitores para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue será realizado por pessoa qualificada, é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto. Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Professora Doutora Íris Ferrari é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB. Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor entendimento das causas do retardo mental.

Eu, _____, profissão _____, residente e domiciliado em _____, portador da Cédula de Identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____, nascido(a) em ___/___/____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade com a participação de meu (minha) filho(a) _____ no estudo “Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico”, e afirmo que obtive todas as informações que considero necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- () Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- () Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- () Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, _____ de _____ de 20__

Assinatura do participante

Dra. Íris Ferrari
Pesquisadora responsável
Telefone para contato: (61) 3307 2505