



**TESIS DOCTORAL**

# **PERFILES GENÉTICOS DE RIESGO A PADECER OBESIDAD MÓRBIDA**

**Marta González-Carpio Serrano**

**Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología**

**Año de lectura 2013**



TESIS DOCTORAL

**PERFILES GENÉTICOS DE RIESGO A PADECEDER OBESIDAD MÓRBIDA**

Marta González-Carpio Serrano

Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología.

Dra. RAQUEL RODRÍGUEZ LÓPEZ, F.E.A de la Unidad de Genética del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (CHUB), Infanta Cristina de Badajoz.

Dr. JOSÉ MANUEL FUENTES RODRÍGUEZ, Profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura. Catedrático de Escuela Universitaria.

CERTIFICAN: Que el trabajo de investigación titulado "**PERFILES GENÉTICOS DE RIESGO A PADECEDER OBESIDAD MÓRBIDA**" realizado por D<sup>a</sup> Marta González-Carpio Serrano, ha sido realizado bajo su supervisión en el Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, y que una vez revisada la memoria presentada, como Directores del trabajo, consideran que posee las condiciones requeridas para ser defendida como Tesis Doctoral.

Por todo ello, AUTORIZAN: Su presentación y defensa frente al tribunal designado al efecto de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 778/1998 de 30 de abril.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Badajoz a

Fdo. José Manuel Fuentes Rodríguez

Fdo. Raquel Rodríguez López

## INDICE:

I.	INTRODUCCIÓN.....	pg.4
II.	JUSTIFICACIÓN.....	pg.16
III.	OBJETIVOS.....	pg.19
IV.	RESULTADOS .....	pg.21

## MÉTODOS.

### Artículo 1.

Raquel Rodríguez López, Ana García Nogales, Marta Rubio Rodrigo, Marta González, Narcisa Guerrero, Claudio Peláez Veja. TELEMEDICINE APPLICATION FOR GENETIC COUNSELLING IN EXTREMADURA. Latin Am J Telehealth, Belo Horizonte. 2010; 2:48-61.....pg.21

## DESCRIPCIÓN DE LA SERIE.

### Artículo 2.

González-Carpio Serrano, Marta; Méndez, Pilar; Serrano, María Victoria; Torres Guadalupe; Sánchez-Giralt, Plácida; Herrera, Trinidad, García de Cáceres, María Teresa; Hernández-Sáez Rosario; Carbonell, Jose María, Sáenz Julia; González, Juan Ramón; Luengo, Luís Miguel; Núñez, Manuela; Rodríguez, Raquel. HETEROGENEITY OF THE GENETIC BASIS OF SEVERE OBESITY IN CHILDHOOD: CHARACTERIZATION OF A SERIES. Journal of obesity. ID del manuscrito (ms Number) 614564.vl. Enviado 13.02.2013.....pg.22

## OBESIDAD MONOGÉNICA SINDRÓMICA.

### Artículo 3

Rodríguez-López R, Pérez JM, Balsera AM, Rodríguez GG, Moreno TH, García de Cáceres M, Serrano MG, Feijo FC, Ruiz JR, Angueira FB, Pérez PM, Estévez MN, Gómez EG. THE MODIFIER EFFECT OF THE BDNF GENE IN THE PHENOTYPE OF THE WAGRO SYNDROME. Gene. 2013; 516: 285-290.....pg.23

## **OBESIDAD POLIGÉNICA.**

### **Artículos 4, 5 y 6.**

**Rodríguez-López R, González-Carpio M, Serrano MV, Torres G, García de Cáceres MT, Herrera T, Román A, Rubio M, Méndez P, Hernández R, Núñez M, Luengo LM. ASSOCIATION OF FTO POLYMORPHISMS AND MORBID OBESITY IN THE POPULATIÓN OF EXTREMADURA (SPAIN). Endocrinol Nutr. 2010; 57: 203-209.....pg.25**

**González JR, González – Carpio M, Hernández – Sáez R, Serrano Vargas V, Torres Hidalgo G, Rubio – Rodrigo M, García – Nogales A, Núñez Estévez M, Luengo Pérez LM, Rodríguez – López R. FTO RISK HAPLOTYPE AMONG EARLY ONSET AND SEVERE OBESITY CASES IN A POPULATION OF WESTERN SPAIN. Obesity. 2012; 20: 909-915.....pg.27**

**González JR, Estévez MN, Giralt PS, Cáceres A, Pérez LM, González-Carpio M, Ballester F, Sunyer J, Rodríguez-López R. GENETIC RISK PROFILES FOR A CHILHOOD WITH SEVERELY OVERWEIGHT. Pediatr Obes. 2013 Apr 29. doi: 10.1111/j.2047-6310.2013.00166.x. [Epub ahead of print].....pg.29**

**V. DISCUSIÓN .....pg.31**

**VI. CONCLUSIONES .....pg.48**

**VII. REFERENCIAS.....pg.51**

**VIII. ANEXOS.....pg.59**

## I. INTRODUCCIÓN

La obesidad puede definirse como el incremento del peso corporal, a expensas preferentemente del tejido adiposo, que resulta de la pérdida de equilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético, prolongado en el tiempo. Esta enfermedad es de la de mayor prevalencia entre países occidentales y, según los datos de la Encuesta Nacional de Salud, en España se ha duplicado en 14 años (de 1987 a 2001) (1. Gutiérrez-Fisac et al. 2005). La obesidad mórbida (OM) constituye un problema serio de salud pública, pues ocasiona una disminución de la esperanza de vida de entre 13 y 20 años, calculándose en nuestro país una prevalencia del 0,65% en la población de entre 25 y 65 años, en el año 2004 (2. Aranceta J. 2005).

El sobrepeso en edades tempranas, especialmente el que se instaura antes de los 10 años, constituye una potente predicción de sobrepeso en el adulto. Su valoración en el niño y adolescente es más difícil que en el adulto, debido a los cambios que se producen en la composición corporal durante el crecimiento. Existen tres períodos críticos para el desarrollo de la obesidad: tercer trimestre de la gestación y primer año de vida, entre los 5 y 7 años de vida y la adolescencia. Es éste último en el que más se debe insistir a las familias de la utilidad de las medidas preventivas para evitar esta patología (3. Bueno M. 2002). El diagnóstico de la obesidad infantil se realiza a partir de una anamnesis familiar, valorando las personas que habitan con el niño, en la que se debe investigar el peso de los progenitores y los antecedentes familiares de obesidad, sobrepeso y patologías crónicas relacionadas con estos trastornos. En la anamnesis personal se incide en el peso al nacimiento, la cronología en la introducción de los alimentos en el primer año de vida y la ausencia o presencia de lactancia materna. Se describe el inicio

de la obesidad y se realiza una encuesta exhaustiva de los hábitos nutricionales y la actividad física del paciente. La exploración física va encaminada a descartar causas de obesidad secundarias, que son las menos frecuentes, y la aseveración de que se trata de una obesidad exógena, conclusión extraída en el 95% de los pacientes pediátricos obesos. Se considera que tienen obesidad todos los niños cuyo índice de masa corporal esté por encima del percentil 97 o de las dos desviaciones típicas. En lo que concierne al diagnóstico de la obesidad mórbida infantil no existe opinión unánime al respecto, pero lo más aceptado es que se clasifiquen de esta manera los niños cuyos índices de masa corporal estén por encima de las 2,5 o 3 desviaciones típicas o por encima del percentil 95.

En la obesidad adulta el Índice de Masa Corporal (I.M.C) es la forma más utilizada para cuantificar el exceso de peso. Se obtiene mediante la fórmula I.M.C = Peso en  $\text{kg}/\text{m}^2$  de superficie corporal y permite su clasificación en IMC de 25 a 30  $\text{kg}/\text{m}^2$  como sobrepeso, de 30 a 40  $\text{kg}/\text{m}^2$  como obesidad, de 40 a 50  $\text{kg}/\text{m}^2$  como obesidad mórbida, de 50 a 60  $\text{kg}/\text{m}^2$  como superobesidad y superior a 60  $\text{kg}/\text{m}^2$  como super superobesidad.

La etiología y el tratamiento de la obesidad exigen el conocimiento de los mecanismos que controlan los procesos de ajuste entre el aporte de sustratos combustibles y las demandas de energía, con objeto de mantener una masa corporal estable. Se sugiere que el control del peso corporal y la composición dependen de un eje integrado por los componentes autorregulados: apetito, metabolismo, termogénesis y depósitos grasos.

La obesidad es un ejemplo perfecto de enfermedad compleja en la que interaccionan factores no genéticos y genéticos, ajustados a modelos difíciles de definir y calcular, y conociéndose también su relación con los diferentes tipos de obesidad observados. A pesar de los avances en el conocimiento de las bases genéticas de la patología, éstas no pueden explicar las crecientes tasas de obesidad. En algunos casos su incremento está

claramente asociado al consumo de dietas de alta densidad energéticas o ricas en grasas y el sedentarismo de las sociedades (4. Martínez JA et al. 2002).

Actualmente se reconoce en la génesis de la obesidad una heredabilidad manifiesta. Ya los trabajos realizados por Stunkard (1986) y Bouchard (1992) con gemelos homocigotos criados en diferentes ambientes, sugerían que la similitud observada entre ellos, la variación en la ganancia de peso y la distribución de la grasa recibió una marcada influencia de los factores genéticos (5. Foz M et al. 1999).

Además, la evidente variabilidad descrita entre individuos afectados por obesidad respecto a los factores que indujeron el incremento del peso, periodo vital y forma de instauración de la misma, así como diversas respuestas a las distintas estrategias terapéuticas empleadas, sugieren el importante papel de la susceptibilidad heredada en el proceso.

En general se atribuye de un 40 a un 70% de la determinación del peso corporal al fondo genético individual, siendo precisa la identificación y caracterización de los alelos de riesgo que constituyen el conjunto de tal predisposición. La interacción de tales alelos polimórficos, cuya frecuencia relativa entre la población general les hace coincidir en un mismo perfil genético, potencia los efectos moderados que cada uno de ellos genera per se, hasta tener la capacidad deletérea suficiente para iniciar y mantener el proceso patológico. La búsqueda de variantes genéticas de baja susceptibilidad a la obesidad, al igual que en el global de enfermedades complejas y poligénicas, puede abordarse mediante estudios de asociación. Estos pretenden poner de manifiesto la relación entre variantes genéticas polimórficas y la reparación de la patología en estudio, o de una de sus características concretas.

En esta patología es complicado minimizar la heterogeneidad y definir los fenotipos intermedios que aparecen entre los pacientes afectados de obesidad. Es esencial seleccionar correctamente las series de casos a analizar, al igual que la población control, para diseñar un estudio caso-control de alta eficacia y fiabilidad. A pesar del desarrollo biotecnológico y la accesibilidad a análisis genéticos masivos, así como las herramientas bioinformáticas cada vez más capaces y complejas, la búsqueda de variantes genéticas y, por tanto, de perfiles genéticos de susceptibilidad, en muchos casos no parte de una correcta selección de casos. No se tiene en cuenta la edad ni la gravedad de la aparición del sobrepeso, ni los antecedentes familiares, hechos traducidos en la evidente heredabilidad de la enfermedad.

El primer paso para diseñar la búsqueda de polimorfismos genéticos de riesgo para la obesidad pasa por seleccionar las rutas de interés y los genes candidatos a análisis genéticos. Para ello es esencial la descripción de las variantes identificadas, factores genéticos únicos causales, en síndromes hereditarios que incluyen el desarrollo de una obesidad temprana y severa, este conjunto de casos de alto riesgo constituyen del 2 al 4% del total referido, constituyendo formas infrecuentes de obesidad en las que el grave incremento de peso se atribuye a mutaciones en un solo gen.

Hasta el momento se han descrito unos treinta síndromes monogénicos con obesidad asociada a claros patrones de herencia mendeliana y frecuentemente relacionados a retraso mental, características dismórficas y/o anomalías congénitas del desarrollo (OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>); este grupo de enfermedades constituyen lo que conocemos como casos de obesidad sindrómica.

El Síndrome de Prader –Willi es el prototipo de este grupo de pacientes. Se caracteriza por hiperfagia, obesidad, hipotonía muscular, dificultades de aprendizaje e hipogonadismo. En el 75% de los pacientes diagnosticados con el Síndrome de Prader –

Willi se comprueba una delección cromosómica de la región 15q11-13q de origen paterno (6.Capps M et al. 2009). En estos pacientes existe una notable elevación de las tasas plasmáticas de leptina, así como una moderada deficiencia de la secreción de GH. Recientemente se han analizado los niveles de la ghrelina, cuyos valores están muy elevados con respecto a otros tipos de obesidad hereditaria no sindrómica, y por ello se especula con el posible papel de la hiperghrelinemia en la patogénesis de la hiperfagia característica de los niños afectados del síndrome.

La hiperfagia y la ansiedad manifiesta ante la restricción de comida en pacientes obesos que no muestran alteraciones del organismo y que refieren antecedentes familiares de la enfermedad con patrones de herencia mendelianos, debe hacernos sospechar una obesidad monogénica no sindrómica . El conjunto de genes identificados en los últimos años como agentes causales de tales síndromes, participan en la ruta de control de la saciedad y generan susceptibilidad a comportamientos adictivos. Sólo la existencia de mutaciones en alguno de ellos generan obesidad asociada a ciertos signos de déficit nerurotrófico (*TrkB*), el resto inducen de manera casi exclusiva a un desbalance energético. Los genes portadores de mutaciones con una gran variedad fenotípica y clínica son los que codifican para leptina, el receptor de leptina, la prohormona convertasa 1, la molécula pro-opiomelanocortina y el receptor 4 de melanocortina (7. Lesayoyá D et al. 2010). Es evidente que, exceptuando la interesante frecuencia que muestran las mutaciones del gen que codifica para el receptor *MC4*, el conjunto de los genes señalados explican un porcentaje mínimo, tan sólo del 5%, y están asociados a la obesidad mórbida de comienzo precoz en la infancia (8. Fariooqui IS. 2005; 9. González Jiménez E. 2011).

Por lo tanto, la forma más común de obesidad monogénica está causada por mutaciones en el gen *MC4R* (10. van den Berg L et al. 2011) con una prevalencia de entre 1.6 y

5.8% y una herencia autosómica dominante (11. Vaise C et al. 2000). Los portadores de mutaciones en el gen *MC4R* suelen padecer hiperfagia, hiperinsulinemia y un incremento de la masa corporal, por el contrario sus niveles de cortisol, gonadotropina y hormona tiroidea son normales (12. Farooqui IS et al. 2003). Al menos 95 mutaciones en el gen *MC4R* están asociadas con obesidad comprendiendo mutaciones nonssense, missense y frameshift (13. Buchibinder S et al. 2011), estas aparecen en el 2.5% de los sujetos no obesos y en el 30% de los pacientes obesos (14. Hsu LK et al. 2002), de tal manera que en un estudio en el que se realizaron bandas laparoscópicas a 300 individuos que padecían obesidad severa, 19 (6.3% del total) de ellos eran portadores de mutaciones en *MC4R* (15. Potoczna N et al. 2004), además todos los portadores de mutaciones en este gen padecían trastornos alimenticios frente al 18.1% de los no portadores (13. Buchibinder S et al. 2011). *MC4R* es una proteína de 332 aminoácidos codificada por un único exón, es un receptor de una proteína G con 7 dominios transmembrana que se expresa en el núcleo hipotalámico, regula la ingesta de alimentos y el peso corporal (16. Huszar D et al. 1997). La recepción de señales se realiza a través de la activación de la adenilato ciclase en respuesta a su antagonista, la hormona α-MSH (17. Fan W et al. 1997). La capacidad deletérea de *MC4R* se comprobó en dos individuos, adulto y niño, que no estaban relacionados, portadores heterocigotos de mutaciones que alteraban la secuencia de lectura y que habían desarrollado una obesidad severa (18. Yeo GS et al. 1998; 19. Vaisse C et al. 1998). El primer paciente descrito es un niño con historia de hiperfagia y búsqueda continua de alimento e inquietud cuando se le negaba la comida. Su receptor *MC4* presentaba una delección de 4 pares de bases en el codón 210, por lo que la proteína está truncada a nivel de la quinta región transmembrana (18. Yeo GS et al. 1998). El segundo paciente, un adulto con obesidad desarrollada desde la infancia con hiperfagia insaciable, presentaba una

inserción de 4 pares de bases en el nucleótido 732, con el resultado de un receptor no funcionante en el que faltan la sexta y la séptima región transmembrana (19. Vaisse C et al. 1998).

La leptina es secretada por el adipocito como respuesta a la alimentación para suprimir el apetito a través de una acción vía hipotalámica. Los niveles de leptina están regulados por diversas proteínas, una de las cuales es el receptor de leptina (*LEPR*) (20. Ranjith N et al. 2011). Los adipocitos de grasa visceral producen menos leptina que los adipocitos de grasa subcutánea, acción vía hipotalámica. Una vez en el hipotálamo llega al núcleo arcuato, al núcleo ventromedial, al núcleo dorsomedial, y posiblemente a otras áreas del cerebro relacionadas con el balance de energía, iniciando una cascada de señales específicas que inhiben muchos de los neuropéptidos orexigénicos. Ejerce así su efecto disminuyendo la ingesta alimentaria y el peso corporal, aumentando la oxidación grasa y el gasto energético, favoreciendo así el adelgazamiento. Las mutaciones en leptina o en su receptor son autosómicas recesivas, los portadores heterocigotos presentan un fenotipo normal (21. Farooqui IS et al. 2006). Ha sido probado que la obesidad que aparece en edad temprana puede estar causada por mutaciones en las diferentes isoformas del gen *LEPR* (22. Echwald SM et al. 1997). El fenotipo clínico asociado a la deficiencia congénita de los niveles de leptina o del receptor de leptina es similar al que presenta los ratones obesos con este mismo tipo de deficiencia, estos sujetos nacen con un peso dentro de los percentiles considerados como satisfactorios, pero en los primeros meses de vida desarrollan rápidamente una obesidad muy severa (23. Farooqui IS et al. 2002), padecen también un aumento en la ingesta de alimentos, hipogonadismo, hiperinsulinemia y defectos profundos en el eje hipotálamo-hipófisis, resultando también alterados el número de linfocitos T y sus funciones, lo que provoca inevitables

preguntas a cerca de la susceptibilidad de estos pacientes a enfermedades infecciosas (24. Farooqui IS et al. 1999; 25. Ozata M et al. 1999).

La pro-opiomelanocortina es la precursora de varias moléculas diferentes de melanocortinas entre las que se encuentran la ACTH, la betaendorfina y la hormona estimulante de los melanocitos. Se han encontrado mutaciones tanto en homocigosis como en heterocigosis, también se han identificado pacientes en los cuales existe una deficiencia total de POMC (26. Farooqui IS et al. 2006). Estos pacientes presentaban en etapas tempranas de su vida hipocortisolemia secundaria con deficiencia de ACTH, desarrollando una marcada obesidad asociada con hiperfagia (26. Farooqui IS et al. 2006).

En pacientes con obesidad manifiesta también se han localizado mutaciones en el gen de la prohormona convertasa 1 (*PC1*), con hipocortisolemia e hipogonadismo hipogonadotropo. La existencia de dos mutaciones en los casos parece explicar los bajos o inexistentes niveles de *PC1* que subyacen a la obesidad, causando el defecto del gen  $\alpha$ -*MSH*, regulador de *MC4R* (27. O'Rahilly S et al. 1995; 28. Jackson RS et al. 1999).

Ciertos casos muy peculiares de obesidad monogénica se han relacionado con mutaciones en el gen del receptor neurotrófico TrkB. Su patrón de herencia mendeliana aparece como dominante y el fenotipo de la obesidad severa va asociado a un retraso mental con alteración de la memoria, aprendizaje y nocicepción (29. Yeo GS et al. 2004). En estos pacientes se refiere claramente la existencia de hiperfagia, explicada por el papel esencial que juega este gen en la ruta de señalización del receptor de MC4 (30. Han JC et al. 2008). Se ha comprobado el impacto de la insuficiencia de la función de TrkB en la aparición de hiperfagia y obesidad en humanos, la cual evidenciaba niveles disminuidos de la proteína en suero de los pacientes.

Sin embargo, a pesar del importantísimo avance que han supuesto la identificación y caracterización de estos casos de obesidad no sindrómica monogénicas anteriormente expuestos, el porcentaje de casos de obesidad manifiesta que se explica por su conjunto es difícilmente superior al 6 o 7%. La necesidad de identificar pacientes e individuos cuya susceptibilidad heredada a padecer obesidad mórbida sea agente causal único para producirla, ha generado inversiones de gran magnitud para el estudio en profundidad de las bases poligénicas de la enfermedad.

Actualmente el mapa genético de la obesidad humana se va detallando y ampliando de forma acelerada. En la revisión de Rankinen et al del 2006 (31. Rankinen T et al. 2006) se han asociado a la aparición de obesidad más de 600 genes, marcadores y regiones cromosómicas. El número de loci de rasgo cualitativo (QTL) derivado de análisis masivos del genoma y asociados a fenotipos relacionados con la obesidad, asciende a 204 distribuidos en 38 regiones genómicas, replicadas en 4 estudios. Así mismo el número de genes candidatos de obesidad de análisis derivados de estudios de polimorfismos genéticos alcanza la cifra de 113. Todos los cromosomas humanos excepto el 9, 18, 21 e Y presentan un locus candidato a intervenir en la regulación del peso, y en la aparición de la obesidad (32. Perusse L et al. 2005).

Las regiones, genes y variantes genéticas identificadas son candidatas a análisis exhaustivos en pacientes y familias afectadas de obesidad manifiesta, entre los que suelen existir claros patrones de agregación familiar y graves obesidades de aparición temprana. La búsqueda de alelos de susceptibilidad a la enfermedad se centra en la descripción y análisis de los cambios genéticos que definen la variabilidad genética interindividual que los genes seleccionados presentan en nuestra población y se circunscribe a la valoración de los polimorfismos denominados SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

El SNP es la variante genética más común en el genoma, constituida por el cambio de una única base en la secuencia de ADN. Su carácter bialélico los hace ser menos informativos que los marcadores SSR (short sequence repeats), pero su frecuencia, distribución del genoma (1 SNP cada 1000 bases) y la comodidad de su análisis les han convertido en la mejor estrategia para identificar genes candidatos responsables de las distintas enfermedades. Tales estudios abordan mediante el análisis de un elevado número de variantes genéticas comunes, seleccionadas como candidatas a generar un incremento bajo o moderado del riesgo a padecer sobrepeso, elegidas por su situación en el gen candidato y/o las características del cambio. Se compara la prevalencia de cada cambio analizado en la población de pacientes respecto a un número similar o superior de individuos controles representativos del grupo poblacional del que se obtuvieron los casos. Para ello es imprescindible tipificar un número importante de polimorfismos genéticos y en un elevado número de casos y controles seleccionados de la manera más adecuada, con el objetivo de evitar la falta de poder estadístico de los resultados y sobre todo la obtención de falsos positivos y negativos en las asociaciones.

El conjunto de las variantes genéticas identificadas y sus combinaciones en cada individuo, podrían definir la existencia de diferentes perfiles de riesgo, describiendo parte de la etiopatogenia de la enfermedad unido al amplio conjunto de datos clínicos y biológicos, personales y familiares, relacionados con su proceso de evolución, mencionados anteriormente.

La epidemiología genética constituye en la actualidad una de las disciplinas fundamentales en el abordaje de la obesidad, siendo una de las herramientas más interesante el Genome Wide Association Study (GWAS, estudio de asociación sobre el genoma completo). A pesar de que la heterogeneidad y el coste-beneficio de los proyectos de GWAS son un tema de debate patente y generan una controversia entre los

expertos (33. Loannidis JP et al. 2007), la avalancha de publicaciones de prestigio basadas en sus resultados ha permitido la descripción de un importantísimo listado de factores genéticos de riesgo a enfermedades comunes, entre ellas la obesidad (34. Todd JA et al. 2006). Su utilidad crece al combinarse con los resultados de los estudios tradicionales de casos y controles.

El gen *FTO* (asociado con la masa grasa y la obesidad) se localiza en el locus 16q12.2, el cual ha mostrado un evidente ligamiento con la obesidad en diversos estudios, como los mencionados (35. Scout LJ et al. 2007; 36. Zeggini E et al. 2007; 37. Saunders CL et al. 2007; 38. Frayling TM et al. 2007; 39. Dina C et al . 2007; 40. Scutteri A et al. 2007). A pesar de que las revisiones bibliográficas señalan cierta controversia respecto a ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen *FTO*, sobre todo entre diferentes etnias, su variabilidad interindividual sigue considerándose de enorme interés. Se han corroborado los primeros resultados extraídos de los GWAS, utilizando diferentes estrategias de análisis, confirmándose ampliamente la relación de la variante rs9939609 con la existencia de sobrepeso grave y algunas de sus comorbilidades en diferentes poblaciones (41. Den Hoed M et al. 2009; 42. Hardy R et al. 2010; 43. Cecil JE et al. 2008; 44. Hakanen M et al. 2009). Las funciones del gen *FTO* parecen relacionarse, al igual que las de los genes responsables de la obesidad sindrómica y de la obesidad monogénica no sindrómica (18. Yeo GS et al. 1998; 19. Vaisse C et al. 1998; 28. Jackson RS et al. 1999) con el control hipotalámico de la saciedad, la hiperfagia y la ansiedad manifiesta ante la restricción de comida; también existen trabajos que han estudiado su relación con la susceptibilidad a comportamientos adictivos. Se ha demostrado su expresión en los núcleos cerebrales que ejercen el control de la alimentación, modificándose ante situaciones de ayuno. En los individuos portadores del alelo A se ha descrito, en los núcleos cerebrales donde se expresa la proteína que

codifica *FTO*, una mayor resistencia a la insulina, así como la preferencia por ingestas hipercalóricas (43. Cecil JE et al. 2008).

En los últimos años se ha desarrollado un gran interés por profundizar en el estudio de la obesidad poligénica, este tipo de estudios permiten identificar el máximo porcentaje de individuos que poseen perfiles genéticos concretos de susceptibilidad a padecer OM, convirtiendo así prioritario aplicar estrategias de prevención en atención primaria.

## II. JUSTIFICACIÓN.

La obesidad del adulto está relacionada con un incremento en el riesgo de muerte y enfermedad. Peeters en un estudio prospectivo de cohortes, establece que el sobrepeso y la obesidad producen una reducción significativa de la expectativa de vida. Asimismo, en los sujetos obesos, está incrementado el riesgo de muerte prematura (por debajo de 70 años) en un 115% en mujeres y en un 81% en varones.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el 2002 que unos 25 millones de muertes anuales están relacionadas con la obesidad a nivel mundial: 300.000 en EEUU y 220.000 en Europa. En un estudio realizado en 2004 en la Unión Europea, se estimó un mínimo de 280.000 muertes atribuibles al sobrepeso y la obesidad por año, representando el 7,7% de muertes totales. En España suponía un 8,5%. Alrededor del 70% de estas muertes lo fueron por causas cardiovasculares (195.000) y el 20% por cáncer (55.000).

La obesidad ocupa el segundo lugar en causa de muertes evitables, por ejemplo, comparando las muertes atribuibles a obesidad con las ocurridas en accidentes de tráfico, por cada muerte por accidente ocurren 8 o 9 relacionadas con obesidad mórbida. Además la relación siempre sospechada entre obesidad y cáncer ha sido esclarecida, entre otros por Calle que en 2003 publicó un estudio prospectivo llevado a cabo sobre una población de un millón aproximadamente de adultos americanos, seguidos durante 16 años, y concluye que el 14% de las muertes por cáncer en el hombre y el 20% en las mujeres podrían ser ocasionadas por obesidad. En el hombre los tumores más frecuentes serían estómago y próstata y en las mujeres mama, útero, cerviz y ovarios.

Por si todo esto fuera poco, el coste sanitario de la obesidad, ya en el año 2000, según estudios de Delphi realizado en España, supuso un gasto de 2.300 millones de euros (el

7% del gasto sanitario). En los últimos años estos datos han progresado de tal manera que, probablemente, el gasto sanitario debido a obesidad esté en el 10% del total del gasto sanitario total.

Por otro lado, en mayo de 2005, la OMS acordó que España desarrollase la denominada Estrategia NAOS (dirigida al grupo de obesidad infantil): Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad. Esta estrategia es elaborada por el Ministerio de Sanidad y Consumo y analiza multitud de factores y sectores que influyen en la obesidad. Apuesta por incentivar los hábitos alimenticios saludables y el abandono del sedentarismo para disminuir la prevalencia de esta patología y sus consecuencias, tanto sanitarias como sociales.

La mayoría de las actuaciones de la Estrategia NAOS son acuerdos y códigos de autorregulación, pero posee un documento en cuya elaboración han colaborado, junto con la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, más de ochenta asociaciones, organismos públicos y privados, sociedades científicas y diversos organismos, teniendo en cuenta que la obesidad, que afecta en nuestro país a uno de cada siete adultos, es un problema complejo y con un índice bajísimo de curación.

Este trabajo se enmarca en un ámbito sanitario con elevada, aunque aún no precisada, prevalencia de la enfermedad. Dado que los principales esfuerzos a nivel Internacional, Nacional y de algunas Comunidades pioneras se centran en la prevención como estrategia fundamental, consideramos nuestros objetivos alcanzados de máximo interés, puesto que se han analizado las bases moleculares de susceptibilidad a la aparición de la enfermedad en nuestra población. Nuestros resultados pueden permitir la selección de individuos de riesgo, candidatos a la aplicación de programas de prevención temprana de alta eficacia para la salud pública, además pueden tener una rápida repercusión en el manejo clínico de los pacientes obesos, así como en el diseño y ejecución de los

programas de prevención de la enfermedad desde los sistemas públicos de salud. Por tanto nuestros resultados sirven de ayuda tanto en el ámbito de la medicina pública como privada, para otros grupos de investigación, empresas del sector alimentario y farmacéuticas. Todos los datos obtenidos forman parte de una amplia base de datos de gran utilidad para corroborar, correlacionar, ampliar y completar el conocimiento del proceso de la obesidad, por parte de otros profesionales sanitarios de disciplinas comunes o relacionadas. El conocer los genotipos de los polimorfismos genéticos analizados puede ser de enorme importancia para otros estudios epidemiológicos, además intentamos profundizar en las bases psiquiátricas de este trastorno, proponiendo actuaciones específicas en un supuesto subgrupo de pacientes. El diseño del estudio engrana y potencia extraordinariamente los intereses y planes de actuación del principal programa nacional puesto en marcha para combatir la obesidad, la Estrategia NAOS.

### III. OBJETIVOS

1. Diseño y puesta en marcha de un protocolo de detección de casos de obesidad grave en población extremeña, cuya etiopatogenia pueda atribuirse principalmente a alteraciones y/o perfiles genéticos de riesgo.
2. Definir el modelo de heredabilidad de la OM a partir de los árboles genealógicos obtenidos tras establecer los antecedentes familiares de sobrepeso como criterio de selección de los pacientes.
3. Revisión del concepto de OM sindrómica e incidir en el abordaje de la obesidad asociada a retraso mental.
4. Interpretación de resultados obtenidos y diagnóstico de nuevos casos de OM monogénica sindrómica, con evaluación de nuestra serie completa de pacientes con alteraciones citogenéticas que pudieran contener genes de susceptibilidad a obesidad señalados en la literatura.
5. Estudio de posibles casos de OM monogénica no sindrómica. Potenciaremos la identificación de mutaciones de alto riesgo con la selección, a través del Servicio Extremeño de Telemedicina, de individuos afectados de OM en familias y núcleos poblacionales de relativo aislamiento geográfico y con evidente consanguinidad.

6. Identificación de SNPs y haplotipos de riesgo en un conjunto de 171 SNPs “llave”, localizados en 12 genes, proponemos la búsqueda de variantes genéticas funcionales causales de las asociaciones identificadas en individuos portadores.
7. Correlación de las características fenotípicas de los pacientes/familias con los perfiles genéticos identificados. Análisis de segregación familiar de haplotipos de interés.
8. Asegurar el aprovechamiento de los resultados obtenidos para optimizar el manejo clínico de los pacientes/familias, trasladando sus conclusiones al Proceso Asistencial de Obesidad vigente para el Área de Salud de Badajoz.
9. Institucionalización del Observatorio Extremeño de Obesidad (OBEX.O) e inclusión en el próximo Plan de Salud de la Comunidad Extremeña.

## IV. RESULTADOS

### ARTÍCULO 1

Raquel Rodríguez López, Ana García Nogales, Marta Rubio Rodrigo, Marta González, Narcisa Guerrero, Claudio Peláez Veja. TELEMEDICINE APPLICATION FOR GENETIC COUNSELLING IN EXTREMADURA. Latin Am J Telehealth, Belo Horizonte. 2010; 2:48-61.

Objetivo: El uso de la telemedicina emerge como una opción de gran potencial para la optimización del consejo genético dentro de los sistemas sanitarios, sin embargo se desconoce el detalle del acto médico, el papel de los sanitarios implicados. Método: 20 profesionales han participado en 126 teleconsultas de consejo genético a través de la red pública de telemedicina de Extremadura; hemos caracterizado el proceso, establecido la actividad y competencia del personal implicado y evaluado las diferencias observadas respecto a la misma actividad asistencial presencial. Resultados: los 17 profesionales encargados de la red de telemedicina destacaron la diversidad de los perfiles y actividades existentes en el proceso del consejo genético. Los 3 genetistas resaltaron las facilidades que ofrece el sistema para la coordinación del mismo, necesariamente multidisciplinar. Los consultantes coinciden en la comodidad, naturalidad, comprensión y eficiencia del servicio. Conclusiones: consideramos que la herramienta mejora el nivel de colaboración de los grupos familiares y la accesibilidad de núcleos poblacionales con cierto aislamiento.

Palabras clave: Asesoramiento Genético; Telemedicina; Consulta Remota; Sistemas de Salud; Salud Pública.

(Artículo completo adjunto en ANEXOS )

## ARTÍCULO 2

González-Carpio Serrano, Marta; Méndez, Pilar; Serrano, María Victoria; Torres Guadalupe; Sánchez-Giralt, Plácida; Herrera, Trinidad, García de Cáceres, María Teresa; Hernández-Sáez Rosario; Carbonell, Jose María, Sáenz Julia; González, Juan Ramón; Luengo, Luís Miguel; Núñez, Manuela; Rodríguez, Raquel.

HETEROGENEITY OF THE GENETIC BASIS OF SEVERE OBESITY IN CHILDHOOD: CHARACTERIZATION OF A SERIES. Journal of obesity. ID del manuscrito (ms Number) 614564.v1. Enviado 13.02.2013.

El exhaustivo estudio de pacientes que padecían obesidad mórbida, y el uso de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) aplicados a una gran serie de individuos con obesidad, han permitido la identificación de genes y de variantes genéticas de susceptibilidad a esta enfermedad. La descripción de esta serie completa de pacientes que padecían obesidad muestra la heterogeneidad de las alteraciones genéticas implicadas. Estas alteraciones se distribuyen entre la población con frecuencias inversamente proporcionales a su capacidad deletérea. Las diferentes combinaciones de alelos de bajo riesgo, como rs9939609 en el gen *FTO*, definen perfiles genéticos de riesgo hereditario a desarrollar obesidad. Así, proponemos que los casos de los niños que padecen obesidad severa deberían ser clasificados en base a una extensa descripción de su fenotipo y su historia familiar. Nuestro estudio genético permitió que en una gran parte de la serie de pacientes fuese identificado el agente causante del exceso de peso.

Palabras clave: Obesidad, Herencia, Infancia.

(Artículo completo adjunto en ANEXOS )

### ARTÍCULO 3

Rodríguez-López R, Pérez JM, Balsera AM, Rodríguez GG, Moreno TH, García de Cáceres M, Serrano MG, Feijo FC, Ruiz JR, Angueira FB, Pérez PM, Estévez MN, Gómez EG. THE MODIFIER EFFECT OF THE BDNF GENE IN THE PHENOTYPE OF THE WAGRO SYNDROME. *Gene*. 2013; 516: 285-290.

Los individuos que son portadores de delecciones de varios tamaños, causando haploinsuficiencia , en los genes contiguos *WT1* y *PAX6*, localizados en el locus 11p13 con una pérdida centromérica de 4Mb en el gen *BDNF*, son susceptibles de padecer Tumor de Wilms, aniridia, retraso mental, anomalías urogenitales y obesidad (Síndrome de WAGRO). La caracterización molecular de la gran delección 11p15.1p12 arr (18676926-36576388) x 1 dn en una niña de tres años y cuatro meses de edad afectada solamente de aniridia, no solo predijo la aparición de otras enfermedades graves asociadas a esta delección, sino que también permitió hipotetizar sobre un deterioro específico de su fenotipo, alteraciones de conductas mentales y el desarrollo de obesidad infantil, posiblemente relacionada con alteraciones metabólicas. El aspecto variable y/o la descripción de la haploinsuficiencia para la susceptibilidad a obesidad en el Síndrome de WARG dependen de una región crítica situada dentro de las 80Kb del exón 1 del gen *BDNF*. Se estudió la relación entre la variación genética en base a 4 SNPs del gen *BDNF* y el Índice de Masa Corporal (IMC). La variabilidad polimórfica se distribuyó de manera similar en 218 niños que sufrían obesidad no sindrómica severa, con familias de alto riesgo a padecer obesidad, se comparó con 198 controles. Al intentar corroborar el papel del gen *BDNF* como altamente susceptible a padecer obesidad sindrómica no se evidenció que la base molecular de este tipo de obesidad pueda atribuirse a variables poligénicas comunes. Su papel potencial como modulador del riesgo a provocar un fenotipo severo de obesidad aún no ha sido demostrado.

Algunas variantes genéticas en el factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*) han dado lugar a trastornos importantes en el balance energético, pero es esencial conocer la capacidad deletérea de estas variantes en humanos, ya que juegan un papel fundamental en el desarrollo y la plasticidad del Sistema Nervioso Central que regula la ingesta de alimentos. La existencia de polimorfismos de significado desconocido en pacientes portadores de haploinsuficiencia en el gen *BDNF* podría constituir un modelo adecuado para estudiar en profundidad sus efectos.

Palabra Clave: *BDNF*, WAGRO, Obesidad, SNP/CNV array.

(Artículo completo adjunto en ANEXOS )

## ARTÍCULO 4

Rodríguez-López R, González-Carpio M, Serrano MV, Torres G, García de Cáceres MT, Herrera T, Román A, Rubio M, Méndez P, Hernández R, Núñez M, Luengo LM.

ASSOCIATION OF FTO POLYMORPHISMS AND MORBID OBESITY IN THE POPULACIÓN OF EXTREMADURA (SPAIN). Endocrinol Nutr. 2010; 57: 203-209.

Objetivo: Seleccionar individuos cuya obesidad mórbida (OM) se pueda atribuir preferentemente al perfil genético individual. Tras descartar pacientes con posibles síndromes monogénicos y otras enfermedades asociadas con obesidad con obesidad, evaluar la relación de la variabilidad del gen *FTO* (asociado con la masa grasa y la obesidad), sobre la base de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con rs1861868 y rs9939609, con la predisposición heredada a padecer OM.

Pacientes y métodos: Tras evaluar a 270 pacientes con OM instaurada antes de los 14 años, seleccionamos a 194 por su fenotipo y la historia familiar referida; se incluyó a 289 individuos controles. Se genotiparon los cambios en el SNP rs1861868 y rs9939609 del gen *FTO*, y comparamos sus frecuencias genotípicas y haplotípicas en ambos grupos poblacionales.

Resultados: Se confirmó la asociación del alelo A del SNP rs9939609 con la obesidad grave instaurada en la infancia en la población española. Los individuos portadores del haplotipo rs1861868 G / rs9939609 A del gen *FTO* mostraron un incremento del riesgo (*odds ratio* de 3,03; intervalo de confianza del 95%: 1,74-5,27) a padecer obesidad mórbida en nuestra población.

Conclusión: Analizar las bases genéticas de la obesidad precisa una rigurosa selección de los casos. La asociación del SNP rs9939609 con la obesidad, ampliamente descrita en distintas poblaciones, se confirma en la población española. Identificamos el primer haplotipo de riesgo al analizar el SNP rs1861868 del bloque haplotípico contiguo al que

contiene el primero. Es preciso estudiar en profundidad la variabilidad interindividual del gen *FTO* para identificar la causa de su capacidad deletérea a la enfermedad.

Palabras clave: Obesidad, gen *FTO*, polimorfismos, riesgo.

(Artículo completo adjunto en ANEXOS )

## ARTÍCULO 5

González JR, González – Carpio M, Hernández – Sáez R, Serrano Vargas V, Torres Hidalgo G, Rubio – Rodrigo M, García – Nogales A, Núñez Estévez M, Luengo Pérez LM, Rodríguez – López R. FTO RISK HAPLOTYPE AMONG EARLY ONSET AND SEVERE OBESITY CASES IN A POPULATION OF WESTERN SPAIN. *Obesity*. 2012; 20: 909-915.

La obesidad en la infancia y en la edad adulta ha sido ampliamente asociada a la variabilidad genética del gen *FTO* en diferentes poblaciones. Este estudio tuvo como objetivo investigar la estructura de un bloque en desequilibrio de ligamiento de la región que flanquea al SNP rs9939609 candidato del gen *FTO* y determinar la mejor combinación de un solo nucleótido (SNP) que explica la mayor proporción de la variabilidad observada en los niños con obesidad severa incluyendo los sujetos obesos de familias de alto riesgo a padecer este enfermedad. El análisis estadístico identificó un bloque de desequilibrio de ligamiento definido por el haplotipo rs1477196G/rs1781744G/rs9939609A ( $p$ -valor  $3.1 \times 10^{-8}$ ). Los portadores de la combinación GGA mostraron un incremento del riesgo a obesidad (O.R 2.07; CI 95% 1.41-3.03,  $p=2.0 \times 10^{-4}$ ) respecto a aquellos individuos con el haplotipo de referencia ATT. El SNP rs9921255 también mostró una asociación estadísticamente significativa (O.R 1.77; CI 95% 1.15-2.74,  $p=8.3 \times 10^{-4}$  y O.R 5.78; CI 95% 1.22-27.49 para heterocigotos y homocigotos respectivamente), no segregando con el haplotipo de riesgo descrito previamente. El cálculo del riesgo atribuible a la combinación del haplotipo GGA y al alelo C del rs9921255 mostró un elevado efecto del gen *FTO* en el Índice de Masa Corporal. El riesgo atribuible al gen *FTO* alcanzó el 34%, el aumento de riesgo por alelo de riesgo fue de 1.71 ( $p=1.0 \times 10^{-6}$ ). Llegamos a la conclusión de que la descripción de esta combinación polimórfica en el gen *FTO* podría ser útil para la

identificación precoz de la susceptibilidad heredada a la ganancia de peso desde la infancia, con una sensibilidad mucho mayor que considerando el efecto de un solo marcador.

(Artículo completo adjunto en ANEXOS )

## ARTÍCULO 6

González JR, Estévez MN, Giralt PS, Cáceres A, Pérez LM, González-Carpio M, Ballester F, Sunyer J, Rodríguez-López R. GENETIC RISK PROFILES FOR A CHILDHOOD WITH SEVERELY OVERWEIGHT. *Pediatr Obes.* 2013 Apr 29. doi: 10.1111/j.2027-6310.2013.00166.x. [Epub ahead of print].

Objetivo: Crear una puntuación válida de riesgo genético para predecir cuatro perfiles de riesgo a padecer sobre peso infantil.

Diseño: Estudio caso-control incluyendo como muestras caso a un grupo de niños con alta predisposición familiar a la obesidad mórbida. También se utilizó una cohorte de nacimiento de la población general de la muestra de validación.

Sujetos: Para la muestra caso, 218 niños con altos perfiles de riesgo genético a padecer obesidad poligénica no sindrómica (edad: 1-10 años) de dos cohortes de la población general. La muestra de validación incluyó 635 niños de dos cohortes de nacimiento que pertenecen al proyecto INMA.

Medidas: Para la muestra caso 109 SNPs localizados en doce loci previamente asociados con el IMC. Para la muestra validación, los datos de todo el genoma (utilizando el genotipado HumanOmni1-Quad Beadchip, de Ilumina) y medidas del IMC a edades comprendidas entre los 3,5 y 5 años de edad.

Resultados: El GRS incluye seis SNPs. La distribución de la puntuación difiere entre los casos y controles ( $p = 9.2 \times 10^{-14}$ , U de Mann-Withney), mostrando una asociación lineal significativa con la obesidad (OR por alelo 1.69; IC 95% = 1.46 – 1.97;  $p = 4.3 \times 10^{-1}$  y AUC = 0.727; IC 95% 0.676 – 0.778). Los resultados fueron validados utilizando la cohorte INMA (OR por alelo = 1.23; IC 95% = 1,03 – 1,48 y AUC = 0,601; IC 95% = 0,522 – 0,680).

Conclusión: El uso de nuestra puntuación genética propuesta proporciona información útil para determinar los niños que son susceptibles a padecer obesidad. Esta información puede ayudar a diseñar protocolos de prevención individuales y de gestión clínica.

(Artículo completo adjunto en ANEXOS )

## V. DISCUSIÓN

Nuestra serie pone de manifiesto la heterogeneidad de las bases genéticas de la OM. El análisis en profundidad de casos de OM sindrómica permite identificar la existencia de estas patologías de bajísima prevalencia en la población general, así como establecer las pautas derivadas del consejo genético a la familia en cada caso. El análisis en profundidad de cada caso, previo a su inclusión o descarte del estudio, evidencia la necesidad de establecer criterios que permitan una clasificación de los pacientes sobre la base de la etiopatogenia predominante. Estudios como el que presentamos pueden ser de gran ayuda para tal objetivo, y señalan la importancia de la selección correcta de casos para el diseño de estudios genéticos de riesgo a enfermedades complejas (31. Rankinen T et al. 2006; 45. Perusse L et al. 2005), estableciendo como criterios de alto riesgo que el peso alcanzado por edad indicara OM antes de los 14 años y que la valoración del árbol genealógico mostrara una patente agregación familiar. Se insiste en la bajísima prevalencia de la obesidad monogénica, tanto sindrómica como no sindrómica, en la población general, que, sin embargo, no es despreciable en el contexto de una consulta de genética humana. Según criterios de alto riesgo respecto al peso alcanzado, edad y valoración del árbol genealógico hemos observado un alto índice de heredabilidad de la obesidad mórbida entre los individuos afectados considerados como posiblemente no monogénicos.

Se evaluaron 345 familias en total por el grupo de profesionales de la Unidad de genética del Hospital Infanta Cristina de Badajoz, procedentes de las consultas de Endocrinología del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (nutrición y dietética, y endocrinología pediátrica) y de los Centros de Salud de Valdepasillas, Montijo y puebla de Obando, también se hizo uso de la red pública de telemedicina de

Extremadura para la recogida de datos, puesto que es una herramienta que mejora la colaboración de los grupos familiares (inspira en los pacientes una mayor naturalidad, comprensión, confianza y comodidad) y la accesibilidad a núcleos poblacionales aislados geográficamente.

Después de aplicar el protocolo establecido, se identificaron 35 pacientes como obesidad sindrómica, 9 de los cuales mostraron alteraciones citogenéticas detectadas con técnicas de citogenética convencional: 48,XXYY, 46,X,psu idic(X)(p.11.1), del1q32.1-32.2, del3q25.3-26.2, del6q25.2-25.3, del10p14-15.1, del11p12p15.1, dup15q11-13 and dup17q11.11.1. También se identificaron 4 pacientes afectados del Síndrome de Prader-Willi, 6 pacientes mostraron alelos mutados en el gen *FMR1* (afectados del Síndrome de X frágil), dos de los cuales desarrollaron el fenotipo correspondiente al Síndrome Prader-Willi like. Del mismo modo se identificaron 4 casos de obesidad sindrómica monogénica con una alteración genética como agente causal único de la modificación molecular: 2 pacientes que padecían el síndrome Bardet-Biedl, un paciente era portador de la mutación C2202S en el exón 23 del gen *NDS1* (Síndrome de Sotos) y, finalmente, en 2 familias (con 3 individuos afectados) continúan en estudio como posibles afectados del Síndrome de Kallman. El protocolo de diagnóstico fue completado para 12 pacientes sin encontrar ninguna alteración citogenética, eran pacientes que padecían obesidad sindrómica pero no se encontró ningún síndrome que se ajustara a las características fenotípicas complejas que mostraban. En ciertos pacientes no diagnosticados podemos aplicar estrategias diagnósticas combinadas, como el uso de arrays de SNPs de alta densidad, que pueden ser de utilidad para identificar nuevos genes implicados en el exceso de peso, de tal manera hemos procedido con el caso de la paciente que padecía el Síndrome de WARGO, portadora de la delección del10q26.2qter.

77 pacientes fueron englobados dentro del grupo de obesidad monogénica, se trataba de adultos con obesidad manifiesta establecida antes de los 16 años ( $IMC > 40$ ) y menores de esa misma edad con peso superior a 3 desviaciones estándar, no presentaban retraso mental, características dismórficas ni tampoco y/o anomalías congénitas en el desarrollo. El árbol familiar de todos estos pacientes presentaba un claro patrón de herencia mendeliana. Después de obtener el consentimiento informado necesario para participar en el estudio, se procedió a la recopilación de las muestras de sangre periférica en EDTA de estos pacientes, indispensables para llevar a cabo la extracción de ADN.

Al realizar la secuenciación del gen *MC4R* detectamos en 3 familias diferentes dos mutaciones His76Arg y Gly32Glu, y el polimorfismo Val103Ile.

La variante His76Arg se identificó en una mujer adulta en heterocigosis; se ha descrito que dicho cambio de aminoácido puede conferir una susceptibilidad heredada a padecer obesidad manifiesta, con riesgos que oscilan entre 3.4 y 2.9 para una población infantil y adulta respectivamente, aunque realmente esta variantes no está descrita en bases de datos como Ensembl o NCBI, es el primer individuo en el que se identifica en población extremeña. Estudios funcionales no encuentran efectos en la respuesta de cAMP que incremente  $\alpha$ -MSH y la sobreexpresión de *MC4R* si lo comparamos con un individuo que no es portador de la variante detallada (46. Stuzman F et al. 2008). En la secuencia del gen *MC4R* de esta paciente tampoco se han encontrado otras alteraciones ni cambios polimórficos descritos en las bases de datos públicas mencionadas con anterioridad, que pudiesen ser la base molecular causal única del patrón familiar observado en su árbol.

La mutación, que no está descrita en las bases de datos públicas, Gly32Glu se identificó en heterocigosis en una mujer, en cambio si está descrito que la prevalencia de esta variante es de 0.67% comparado con una población control, la presencia de esta variante

no afecta de manera significativa al receptor *MC4*, de tal manera que estudios previos indican la insuficiente demostración de la correlación entre la presencia de esta mutación y la aparición de la obesidad (47. Ahituv N et al. 2007) (48. Calton MA et al. 2009). No se identificaron en la muestra de esta paciente otras alteraciones en el gen *MC4R* que pudiesen explicar como única causa el patrón familiar referido en este caso.

El polimorfismo Val103Ile se identificó en un paciente varón en heterocigosis. Está descrito en las bases de datos públicas (Ensembl y NCBI), con una frecuencia alélica de entre el 1 y 5%, teniendo en cuenta la variabilidad de esta frecuencia entre las distintas etnias. Existen varios artículos de interés exponiendo la posible funcionalidad del cambio, su probable efecto como polimorfismo de bajo riesgo en el desbalance energético y control de la ingesta se contrapone a su no relación con efectos antropométricos, riesgo metabólico ni cardiovascular. No se identificaron en la muestra de este paciente otras alteraciones en el gen *MC4R* que pudiesen explicar como única causa el patrón familiar referido en este caso. Los estudios funcionales realizados acerca de esta variante no indican que la presencia del polimorfismo Val103Ile esté relacionada con alteraciones en el gen *MC4R* (49. Xian Z et al. 2010) (50. Stuzman F et al. 2007) (51. Wang D et al. 2010).

Secuenciamos también el gen del receptor de Leptina (*LEPR*) e identificamos en una de las pacientes una inserción en heterocigosis del dinucleótido TA (g.145524\_14552 TA), localizada en la región intrónica 76 nucleótidos antes del codón START, esta inserción no está descrita en bases de datos públicas como Ensembl y NBCI, además es la primera paciente en la que se identifica en población extremeña. Hasta el momento no se han realizado estudios funcionales acerca de esta variante, tampoco se ha descrito ni validado su frecuencia alélica (52. Park KS et al. 2006). No se identificaron en la

muestra de esta paciente otras alteraciones en el gen *MC4R* que pudiesen explicar como única causa el patrón familiar estudiado en su árbol genealógico.

Después de examinar y estudiar con detenimiento los niveles de biomarcadores como HDL, LDL, colesterol total, triglicéridos y glucosa, cuyos resultados se obtuvieron de las analíticas remitidas desde la consulta de Endocrinología del hospital, comprobamos que estos cuatro pacientes no presentaban ninguna alteración en los niveles de estos biomarcadores, tampoco referían síndrome metabólico ni riesgo cardiovascular, aunque la paciente portadora de la variante en *LEPR* presentaba talla baja e hipotiroidismo hipotalámico.

Corroboramos en nuestros pacientes clasificados como obesidad monogénica la baja prevalencia de este tipo de obesidad, aunque con un elevado impacto familiar, de los resultados observados se deduce que en estos pacientes no se relaciona la existencia de mutaciones en una región codificante y/o zonas adyacentes, de los genes *MC4R* y *LEPR*. La etiología de la mayoría de estos casos de obesidad se define por características poligénicas y multifactoriales, no por la presencia de una base molecular causal único identificado en el gen estudiado.

La heterogeneidad entre los estudios de los resultados obtenidos, tanto de los GWAS como de los estudios de casos-controles para el análisis de la distribución de los polimorfismos candidatos, es un dato por tener en cuenta para construir definitivamente un perfil genético de riesgo a la enfermedad (53. Lindaren CM et al. 2009). Sin embargo, es evidente que variables como los fallos en el genotipado, la estratificación de poblaciones, la selección adecuada de la serie de individuos controles y, sobre todo, la diversidad fenotípica de los sujetos considerados como casos en los diferentes estudios puede sugerir falsos negativos.

La variabilidad interindividual del gen *FTO* es de gran interés en la búsqueda de alelos de susceptibilidad a padecer OM. Corroboramos la asociación del SNP rs9939609 con la patología, identificando en nuestra serie riesgos de 1.76 y 3.28 para los individuos con genotipo heterocigoto (T/A) y homocigoto para el cambio (A/A) respectivamente. Tales resultados corroboran lo publicado en la población del norte de Europa (43. Cecil JE. 2008), respecto a la relación del SNP rs9939609 con elevados IMC; los riesgos calculados en otros estudios para los mismos genotipos son inferiores, inferidos a partir de series más amplias, pero cuyos casos fueron seleccionados únicamente por desarrollar obesidad grave a cualquier edad, de tal manera que el análisis de la distribución de la diversidad haplotípica del gen *FTO* en nuestro estudio, incluyendo el SNP de interés, potencia la significación de los hallazgos obtenidos; OR: 3.03 (IC95% 1.74-5.27). El alelo de riesgo identificado muestra una frecuencia del 55% en nuestra serie de pacientes, pero alcanza solo el 16% en poblaciones asiáticas, siendo conocido y ampliamente aceptado que dicha raza muestra una de las prevalencias más bajas de OM, estudios epidemiológicos podrían revelar la implicación de las diferencias observadas en las distintas tasas de prevalencia de la OM en estas poblaciones. Se analizó la correlación entre algunos parámetros bioquímicos, incluyendo glucosa, HDL, LDL, colesterol total y triglicéridos, y la obesidad entre los pacientes homocigotos AA para el rs9939609 (AA), separados por sexo. Así se observaron unos niveles mayores de LDL, triglicéridos y colesterol total entre las mujeres que en los hombres, en cambio los niveles de HDL eran similares en los dos grupos. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con otros parámetros significativos (no se muestran estos datos).

Analizando con detenimiento los datos de genotipado del SNP 9939609 para el grupo de pacientes clasificados como obesidad sindrómica, que se encontraban en equilibrio

de Hary-Weinberg, se identificaron en este grupo riesgos de 2.40 y 1.86 para los individuos con genotipo heterocigoto (T/A) y homocigoto para el cambio (A/A) respectivamente, de tal manera que la presencia del alelo en heterocigosis aumenta el riesgo a padecer OM, pero no lo hace cuando aparece en homocigosis, la contradicción de estos resultados indica que el tamaño muestral en este grupo es pequeño y habría que aumentarlo para comprobar la veracidad de estos resultados obtenidos. Además las alteraciones bioquímicas de estos pacientes estaban asociadas a los diferentes síndromes de los que fueron diagnosticados.

De igual manera se procedió con el grupo de pacientes pertenecientes al grupo de obesidad no sindrómica monogénica, se identificaron en este grupo riesgos de 1.95 y 3.11 para los individuos con genotipo heterocigoto (T/A) y homocigoto para el cambio (A/A) respectivamente, vemos que la presencia del alelo en homocigosis señala un mayor riesgo a padecer OM. Curiosamente analizando detenidamente las características genotípicas con respecto al SNP 9939609 de los pacientes en los que se encontraron las variantes en los genes *MC4R* y *LEPR*, las cuales no se relacionaron con el patrón de herencia detectado en ellos, eran todos homocigotos para el alelo de riesgo. Además estos individuos no presentaban ninguna alteración bioquímica particular que no presentaran otros individuos obesos con otros genotipos distintos dentro del mismo grupo de obesidad.

Se ha sugerido ampliamente que el efecto observado del SNP rs9939609 (T/A) en cuanto a la aparición de la obesidad se relaciona con una respuesta inadecuada a la sensación de hambre e, incluso, a un trastorno de la sensación de saciedad (41. Den Hoed M et al. 2009).

Se genotiparon también los cambios rs1861868 (G/A) y rs9939609 (T/A), comparando sus frecuencias genotípicas y haplotípicas tanto en el grupo de pacientes como en el

grupo control. Los individuos portadores del haplotipo rs1861868G / rs9939609A del gen *FTO*, mostraron un incremento de 3,03 (intervalo de confianza del 95%, 1.74 – 5.27) a padecer obesidad mórbida en nuestra población. Además un análisis estadístico reveló que la combinación rs1861868G/ rs9939609A aparecía en el 9% de los controles frente al 19% de los pacientes y la combinación rs1861868A/ rs9939609A aparecía en el 27% de los controles frente a un 38% de los casos, de tal manera que ambos haplotipos mostraron un incremento del riesgo a padecer OM. La correlación genotipo-fenotipo reveló la disminución del porcentaje de neutrófilos en las combinaciones que incluían uno o ambos SNPs, con mayor una diferencia en los pacientes portadores al menos de un haplotipo rs1861868 A/rs9939609 T. Ajustado por la cifra de leucocitos, la diferencia se cifró en 0.07 veces menos (IC 95%, -0.13 a -0.01) que los individuos normales rs1861868G/rs9939609T. Posteriormente genotipamos 31 SNPs que flanquean la región de riesgo del intrón 1 del gen FTO que incluye las variantes de riesgo publicadas rs1861868 y rs9939609.

El haplotipo 1861868G/rs1477196A/rs9939609A mostró claras diferencias en su distribución entre casos y controles, OR: 2,94 (I.C 95% 1,16-7,69; p= 0,0228). Dicho haplotipo relacionado con el incremento de peso fue mucho más fuerte en mujeres, comprobamos que el 90% de los controles portadores fueron varones. Además esta combinación se asoció con la elevación de los niveles del índice glucémico, OR: 2,99 (I.C 95% 0,99-9,09) comparando los pacientes portadores del haplotipo identificado como de riesgo a obesidad frente a los individuos controles. También se asoció con elevación de niveles de colesterolemia, O.R: 3,05 (I.C 95% 1,01-9,23) comparando los pacientes portadores de dicho haplotipo frente a los individuos controles.

Por otro lado el análisis estadístico identificó un bloque de desequilibrio de ligamiento definido por el haplotipo rs1477196G/ rs17817449G/rs9939609A (p-valor  $3.1 \times 10^{-8}$ ).

Portadores de la combinación GGA mostraron un incremento del riesgo a obesidad (O.R 2.07 IC95% 1.41-3.04) respecto a aquellos individuos con el haplotipo de regencia ATT. El SNP rs9921255 también mostró una asociación estadísticamente significativa (O.R 1.77; IC95% 1.15-2.74 y O.R 5.78; CI95% 1.22- 27.49) para heterocigotos y homocigotos respectivamente, no segregando con el haplotipo de riesgo descrito previamente. Confirmamos, por lo tanto, la importante interacción publicada respecto a la variabilidad del intrón 1 del gen FTO en la susceptibilidad heredada a padecer obesidad acotando los límites de la región de interés. El riesgo atribuible al gen FTO alcanzó el 34% en individuos homocigotos para la combinación del haplotipo GGA y el alelo C del rs9921255, siendo mayoritario en mujeres. El perfil de riesgo señala individuos en los que aplicar estrategias para identificar las variantes causales de los riesgos observados.

Nuestra serie evidenció la importante heredabilidad de la obesidad y su relación con la aparición severa en la infancia. Esta característica maximizó el poder estadístico y redujo el tamaño muestral imprescindible para la variabilidad de nuestro estudio de asociación.

Nuestro estudio no encontró asociación entre el genotipo del gen *FTO* y las características específicas de la obesidad desarrollada, aunque la temprana edad de los pacientes puede enmascarar posibles alteraciones bioquímicas diferenciales. Sí reveló resultados preliminares respecto a la mayor capacidad deletérea del gen en la fisiología de la mujer, con un fenotipo basado en la ansiedad de ciertos pacientes, homocigotos para el haplotipo de mayor riesgo, cuya hiperfagia puede tener un efecto sedante para combatirla (54. Tanofsky- Kraff M et al. 2009).

La disfunción en el gen *FTO* podría aumentar la susceptibilidad de ciertos individuos a padecer un estado de ansiedad, no reactivo a ningún factor exógeno, mejorable mediante

hábitos como el uso persistente del chupete en la infancia. El inicio de la autonomía para la ingesta en el niño puede buscar, complementar e incluso sustituir tal efecto sedante por el que también genera la ingesta. La fisiología de la mujer podría ser más vulnerable a dicha situación.

En 218 de los pacientes hemos asumido una posible base poligénica de su obesidad, constituyendo una serie de enorme interés para la búsqueda de perfiles genéticos de riesgo mediante estudios de asociación. Llevamos a cabo la selección de SNPs “llave” en el gen *FTO* y 11 genes candidatos más: *SEC16B*, *BDNF*, *ETV5*, *SH2B1*, *GNPDA2*, *LYPLALI*, *MSRA*, *TFAP2*, *KCTD15*, *MTCH2* y *NEGR1*, a partir de los datos disponibles en [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org). El objetivo fue identificar los marcadores con mayor potencial para analizar la posible asociación de la región genómica de los genes seleccionados con el peso (Figura 1). Tuvimos en cuenta los datos disponibles de genotipos y frecuencias de las variables genéticas (SNPs) identificadas en población Europea del International Haplotype Mapping Project web site ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27\\_B36](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27_B36)). Del conjunto de variantes seleccionamos las que cumplían mejores criterios de SNPs “llave”, utilizando el software Haplovew (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haplovew/>). Consideramos únicamente aquellos SNPs cuyo alelo minoritario mostraba una frecuencia de al menos un 10%, y asociado o segregado con cualquier otro SNP del conjunto elegido con un valor máximo de  $r^2$  de 0.80. Teniendo en cuenta el tamaño muestral, la frecuencia de los SNPs elegidos, la distancia de la región a analizar y la financiación con que contábamos para esta parte del estudio, forzamos la selección de SNPs a un máximo de 151 SNPs “llave”. Dado los datos de la literatura, consideramos imprescindible incluir los SNPs rs17817449 y rs9939609.

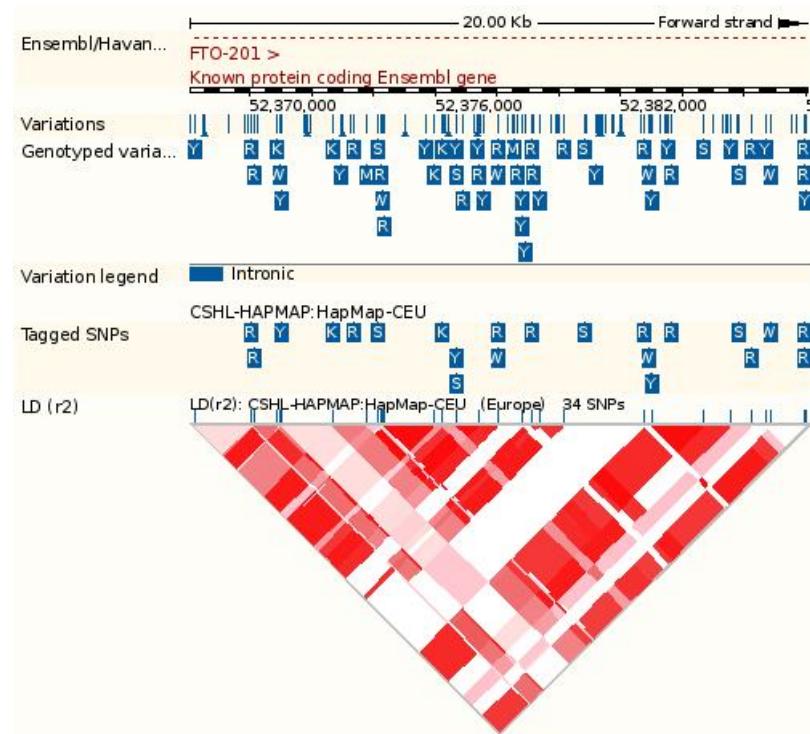


Figura 1: Representación de la distribución de bloques haplotípicos del gen FTO. El haplotipo es un conjunto de SNPs existentes de manera contigua en una sola cromátida. Se encuentran asociados en porcentajes identificados y/o calculados de individuos, heredándose en grupo, con índices conocidos. Los puntos en rojo indican alta asociación entre SNPs ( $r^2 > 0.80$ ) y en claro, incluso blanco, la no segregación conjunta ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Se genotiparon en este conjunto de individuos, el total de SNPs considerados de interés por su localización en los genes candidatos. El método empleado fue discriminación alélica mediante las sondas de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) TaqMan 7300 system (Figura 2) y la plataforma de genotipado Sequenom (Figura 3).

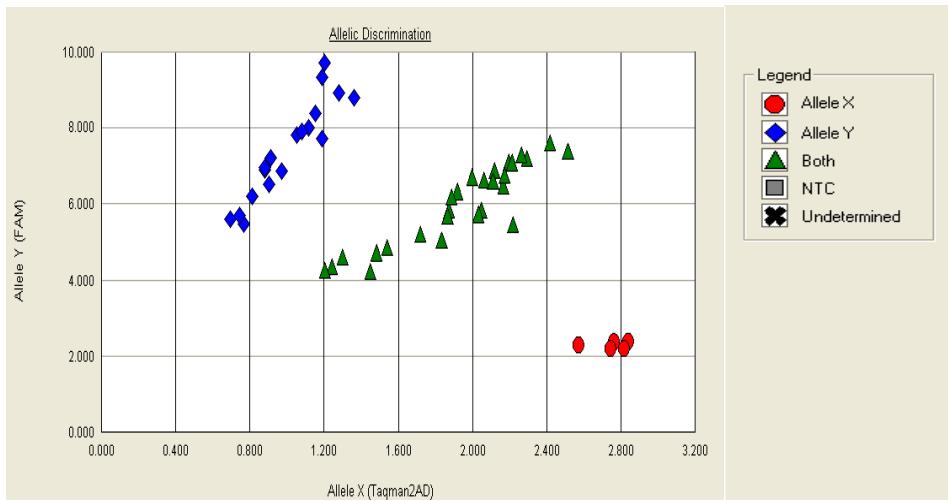


Figura 2: Genotipado de SNPs mediante técnicas discriminación alélica. Representación de los resultados obtenidos de un ensayo de discriminación alélica correspondiente al genotipado del SNP con rs9939609. Los puntos en rojo representan individuos homocigotos para el SNP, los triángulos verdes a individuos heterocigotos para el cambio y los rombos azules a individuos homocigotos normales.

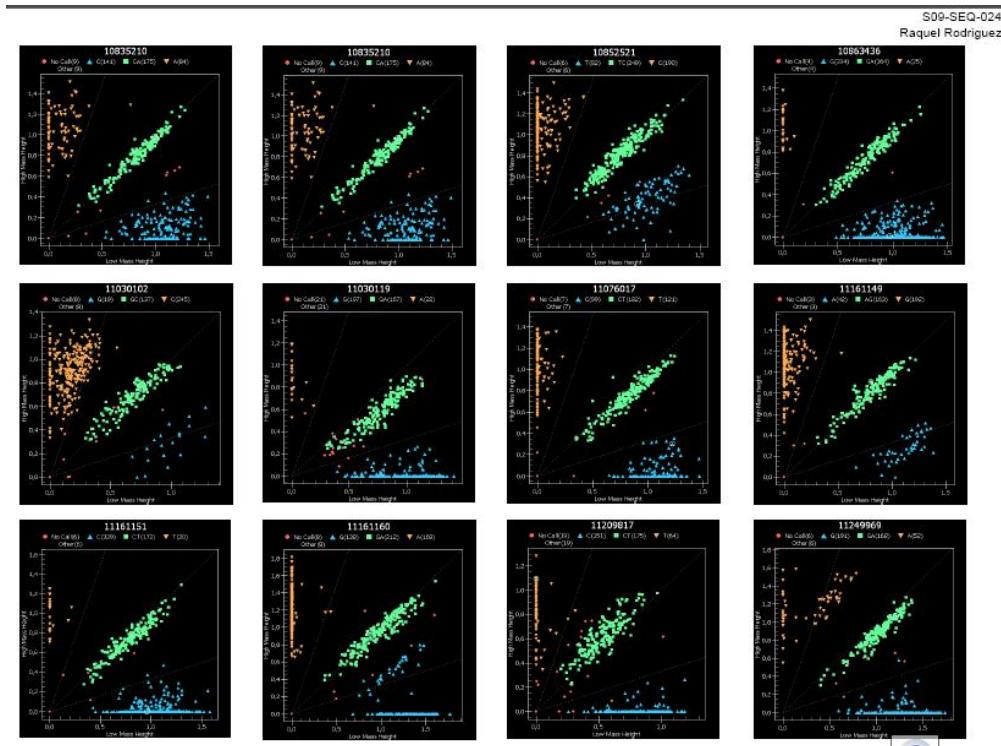


Figura 3: Genotipado de 12 SNPs para los 218 pacientes y 190 controles mediante la plataforma Sequenom, la cual ofrece una elevada fiabilidad a un coste muy inferior a la técnica Taqman para los 151 SNPs seleccionados en el estudio. Se observa la diferenciación de los individuos en tres grupos para cada SNP analizado, según su genotipo: homocigotos normales, mutados o heterocigotos.

Aplicamos la ley de Hardy-Weinberg y comparamos las frecuencias genotípicas y haplotípicas en ambos grupos poblacionales, usando el test de la Chi cuadrado. El análisis de asociación de SNPs se realizó mediante el test estadístico likelihood ratio, basado en modelos de regresión logística y considerando un modelo aditivo de herencia. Estimamos valores de Odds Ratio con un intervalo de confianza del 95%. Para el análisis estadístico de asociación de SNPs con la enfermedad empleamos el software SNPAssoc R package. La relación de haplotipos con la enfermedad se llevó a cabo con *haplo.stats* R package. Redefinimos la construcción de haplotipos para identificar la localización exacta de la región en estudio que pudiera contener una alteración genética funcional, construyendo haplotipos de 2 y 3 SNPs a lo largo de aquellos bloques de desequilibrio de ligamiento que hubiesen mostrado asociación con obesidad mórbida, con una significación estadística. Todos los haplotipos del gen con frecuencias menores al 2% se reunieron en una misma categoría. Aplicamos el método estadístico Benjamini-Hochberg para evitar falsas asociaciones.

Calculamos el desequilibrio de ligamiento de la región de interés de FTO, en valores de  $r^2$  y para cada SNP con el resto, en nuestra serie completa analizada. Calculamos el riesgo acumulativo de los perfiles de riesgo que acumulaban los distintos SNPs identificados como asociados a la enfermedad, de entre el total analizado. Estimamos el riesgo incrementado por alelo, según el Modelo de regresión logística. Correlacionamos las características clínicas, hematológicas y bioquímicas diferenciales entre pacientes con perfiles genéticos determinados.

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Hospital Infanta Cristina de Badajoz.

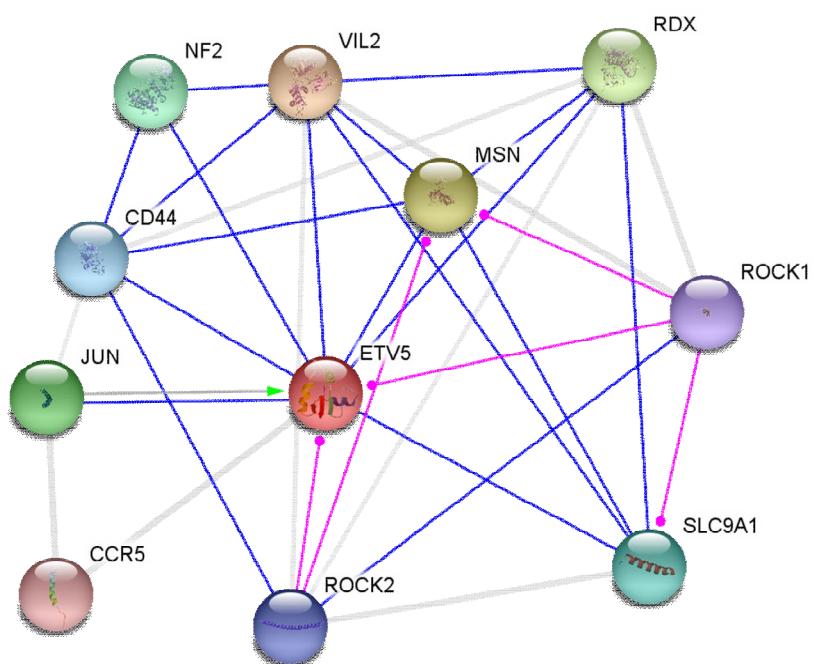
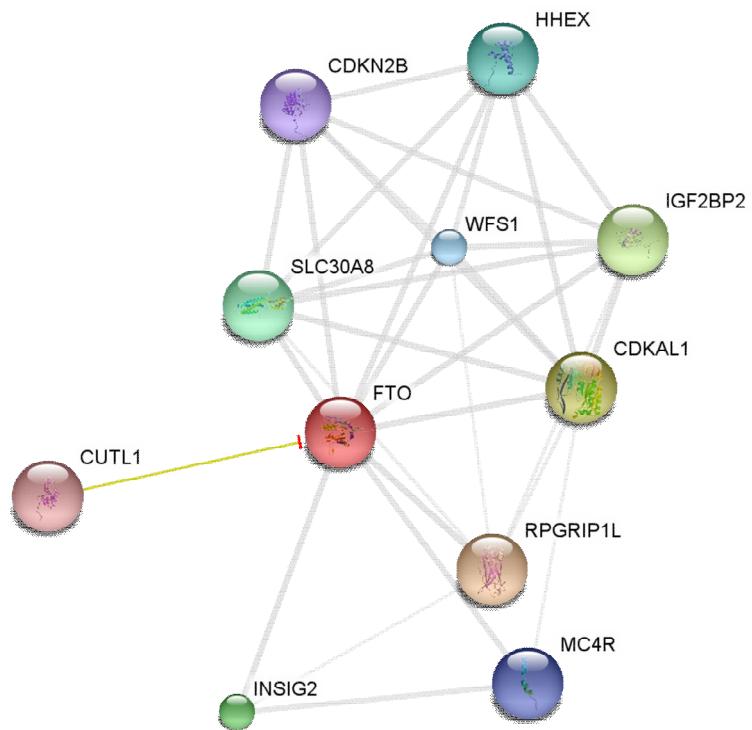
La elaboración de un proceso asistencial nos ha permitido definir los criterios de derivación de cada consultante a las distintas especialidades implicadas en la patología, coordinando la labor de los profesionales que participan en el mismo. Llevamos a cabo la construcción de bases de datos que describen la serie recopilada en nuestra población, síndromes identificados, detalle del espectro mutacional de los genes de alta susceptibilidad a obesidad no sindrómica analizados y las frecuencias alélicas de las variantes genéticas en estudio por su posible asociación con la susceptibilidad heredada a obesidad, así como datos de la distribución poblacional de sus combinaciones en nuestro ámbito.

Consideramos de extremo interés, los resultados obtenidos tras la finalización del genotipado de 151 SNPs candidatos en 11 genes igualmente candidatos. El análisis de los resultados del estudio caso-control ha definido perfiles de riesgo hereditario basado en el número de alelos de riesgo existentes para 6 SNPs que flanquean secuencias asociadas con la enfermedad previamente descritas, identificándose el primer “score” de riesgo heredado a padecer obesidad mórbida en población española. Hemos validado la utilidad de nuestro 'score' genético en una cohorte de recién nacidos (cohorte INMA).

Los resultados se replican en 49 niños obesos (BMI z-score > percentil 90) de un total de 653 niños. En nuestro estudio, el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta un 70% por cada alelo de riesgo (p-valor:  $1.77 \times 10^{-12}$ ), mientras que en la cohorte de recién nacidos este riesgo es del 19% (p-valor 0.042). Esto indica que nuestros resultados podrían aplicarse en programas de prevención primaria a esta patología.

Nuestras conclusiones aseguran la utilidad de las estrategias de Genome Wide Association Studies (GWAS) en la investigación de la etiopatogenia de una enfermedad poligénica y multifactorial como la obesidad. El diseño de nuestro estudio ha resultado

de gran utilidad para señalar otros genes candidatos, implicados en las rutas funcionales de los genes señalados en nuestro estudio (Figura 4).



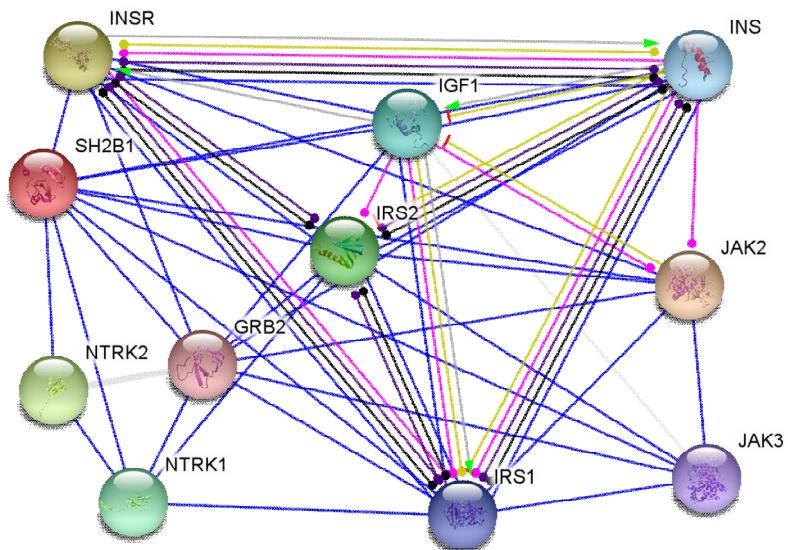


Figura 4: Rutas y nuevos genes candidatos a estudio de la heredabilidad de la obesidad, relacionados con los genes que conforman el perfil de riesgo a obesidad mórbida. Las líneas azules indican uniones físicas, las grises relaciones funcionales, las rosas modulación postranscripcional, las púrpuras catálisis y las amarillas expresión génica.

Los análisis de perfiles genéticos de riesgo aplicados a la población general ofrecerían la posibilidad de identificar un mayor porcentaje y definido porcentaje de personas sobre la que ejercer las máximas medidas de prevención primaria, única estrategia de futuro en el abordaje de la enfermedad.

Tan sólo el abordaje multidisciplinar y especializado permite desarrollar estrategias diagnósticas, de evaluación y manejo de la obesidad mórbida con tasas de prevención y curabilidad de eficacia superior a las que hoy conocemos a partir de los múltiples esfuerzos nacionales e internacionales que se despliegan para ello.

## VI. CONCLUSIONES

1. Nuestra serie pone de manifiesto la heterogenidad de las bases genéticas de la OM y la necesidad de abordar cada paciente de manera individualizada.
2. El análisis en profundidad de pacientes afectados de OM sindrómica permite identificar la existencia de estas patologías de bajísima prevalencia en la población general, pero con enorme impacto familiar y que redundan en costes económicos directos e indirectos muy elevados al Sistema Público de Salud.

El diagnóstico genético de estos casos permite establecer pautas de gran eficiencia para el manejo clínico de cada paciente, su seguimiento, predicción de morbilidades y protocolos de prevención primaria y secundaria. Resulta de gran utilidad poder aplicar las conclusiones obtenidas al resto de la familia en cada caso. Ciertos pacientes, en los que jamás se llegó a un diagnóstico, se han beneficiado de las estrategias diagnósticas combinadas utilizadas, cuya información señala genes implicados en el exceso de peso y sugiere la existencia de nuevos candidatos.

En este caso resulta evidente la importancia de incluir pacientes con alto riesgo a desarrollar patologías de bajísima curabilidad y elevada morbilidad, como es el caso de la OM, en programas de vigilancia multidisciplinar que sigan protocolos consensuados y coordinados.

Las técnicas de array permitirán la descripción exacta de la alteración genética en un porcentaje muy interesante de estos casos, identificando nuevas alteraciones de

susceptibilidad congénita a sufrir obesidad que incluso señalarán nuevos genes candidatos. Unidos a la ultrasecuenciación ya resultan una magnífica alternativa para el abordaje de la enfermedad, sugiriendo nuevas estrategias de diagnóstico, evaluación y manejo clínico de mayor eficiencia para la prevención y curabilidad de la OM.

3. Respecto a los casos de obesidad monogénica no sindrómica, vamos definiendo el espectro mutacional del gen *MC4R* en población extremeña. Esperamos conocer el porcentaje de casos de obesidad manifiesta que se relacionan con mutaciones en el gen *MC4R* en nuestra serie. Hemos identificado las primeras dos mutaciones en el gen *MC4R*, detectadas por primera vez en población española. El estudio de segregación familiar en ambos núcleos familiares aportará datos de gran interés y nos permitirá ampliar los datos recopilados, así como la búsqueda y estudio de nuevos individuos afectados.
4. En el estudio de obesidad poligénica no sindrómica, base molecular del mayor porcentaje de casos, pretendimos identificar variantes genéticas que, de manera individual o en combinación, definan perfiles heredados capaces de explicar un porcentaje del riesgo a padecer OM. La variabilidad interindividual del gen *FTO* se consideró de gran interés en la búsqueda de alelos de susceptibilidad a padecer OM.

Hemos recopilado una serie en la que hemos observado un alto índice de heredabilidad de la obesidad mórbida, con representación de fenotipos extremos y pertenecientes a familias que refieren una agregación evidente de casos de obesidad manifiesta. Ello ha podido facilitar el alcanzar los valores claramente significativos de las asociaciones detectadas, a pesar de contar con un tamaño muestral moderado.

Los resultados corroboran lo sugerido por los estudios masivos de GWAS, que señalaban en intrón 1 del gen *FTO* como de extremo interés para el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad. Corroboramos lo descrito por algunos autores respecto a la mayor sobrerepresentación de esta variante entre pacientes mujeres.

Consideramos de extremo interés, los resultados obtenidos tras la finalización del genotipado de 151 SNPs seleccionados en 11 genes candidatos. El análisis de los resultados del estudio caso-control ha definido perfiles de riesgo hereditario basado en el número de alelos de riesgo existentes para 6 SNPs que flanquean secuencias asociadas con la enfermedad previamente descrita, identificándose el primer "score" de riesgo heredado a padecer obesidad mórbida en población española. Hemos validado la utilidad de nuestro 'score' genético en una cohorte de recién nacidos (cohorte INMA). Los resultados se replican en 49 niños obesos (BMI z-score > percentil 90) de un total de 653 niños. En nuestro estudio, el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta un 70% por cada alelo de riesgo (p-valor:  $1.77 \times 10^{-12}$ ), mientras que en la cohorte de recién nacidos este riesgo es del 19% (p-valor 0.042). Esto indica que nuestros resultados podrían aplicarse en programas de prevención primaria a esta patología.

5. Nuestras conclusiones aseguran la utilidad de las estrategias de Genome Wide Asociation Studies (GWAS) en la investigación de la etiopatogenia de una enfermedad poligénica y multifactorial como la obesidad. El diseño de nuestro estudio ha resultado de gran utilidad para señalar otros genes candidatos, implicados en las rutas funcionales de los genes señalados en nuestro estudio.

## VII. REFERENCIAS

1. Gutiérrez-Fisac et al. Encuesta de Salud. Med Clin (Barc). 2005; 124:196-19.
2. Aranceta J en al. Estudio Dorica. 2005; 125:460-466.
3. Bueno M. Obesidad infantil. Tratado de Endocrinología pediátrica. Pombo M. 3<sup>a</sup> ed. Editorial McGraw-Hill interamericana de España. 2002; 1247-58.
4. Martínez JA, Moreno MJ, Marqués- López I, Martí A. Causas de la obesidad, Anales SiS San Navarra. 2002; 25: 17-27.
5. Foz M, Hormiguera X. Obesidad. Bases genéticas. G. cuatrecases. Ed Harcourt Brace. 1999; 85-92.
6. Cappa M, Maghinie M, Loche S, Bottazzo GF. Genetic imprinting: The Paradigm of Prader-Willi and Angelman Syndromes. Endocrine involment in Developmental Syndromes.2009; 4:20-28.
7. Lesayová D, Staník J, Gasperílová D, Klimes I. Clinical and genetics aspects of monogenic obesity. Vnitr Lek. 2010; 56: 1043-9.
8. Farooqui IS. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. Best Practice Res Clin Endocrin and Metab.2005; 19:359- 374.
9. González Jiménez E. Genes and obesity: a cause and effect relationship. Endocrinol Nutr.2011 Sep12 [Epub ahead of print]. English, Spanish.
10. van den Berg L, van Beekum O, Heutink P, Felius BA, van de Heijning MP, Strijbis S, van Spaendonk, Piancatelli D, Garner KM, El Aouad R, Sistermans E, Adan RA, Delemarre van de Waal HA. Melanocortin-4 receptor gene mutations in a Dutch cohort of obese children. Obesity.2011; 19: 604-11.

11. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercbeg S, et al. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest.* 2000; 106: 253-62.
12. Farooqui IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, et al. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin- 4 receptor gene *N Engl J Med.* 2003; 348: 1085-95.
13. Buchibinder S, Bartsch U, Muller M, Zorn M, Nawroth PP, Schilling T. *Genet Mol Res.* 2011; 10: 1042-9.
14. Hsu LK, Mulliken B, McDonagh B, Krupa DS, et al. Binge eating disorder in extreme obesity. *Int J Obes Relat metab.* 2002; 26: 543-46.
15. Potoczna N, Branson R, Kral JG, Piec G, et al. Gene variants and binge eating as predictors of comorbidity and outcome of treatment in severe obesity. *J Gastrointest Surg.* 2004; 8: 971-81.
16. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, et al. Targeted disruption of the melanocrotin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 1997; 88: 131-41.
17. Fan W, Boston BA, Kestorn RA, Hruby VJ et al. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature.* 1997; 385: 165-68.
18. Yeo GS, Farooqui IS, Aminian S, Hasall DJ, Satanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R is associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genet.* 1998; 20:111-12
19. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in MC4R associated with dominant form obesity. *Nature.* 1998; 385:165-168.

20. Ranjith N, Pegoraro RJ, Shanmugan R. Obestiy-associated genetic variants in young Asian Indians with metabolic syndrome and myocardial infarction. *Cardiovasc J Afr.* 2011; 22.
21. Farooqui IS., O'Rahilly Stephen. Genetics of obesity in humans. *Endocrine Reviews.* 2006; 27: 710-718.
22. Echwald SM, Sorensen TD, Sorensen TI, et al. Amino acid variants in the human leptin receptor: lack of association to juvenile onset obesity. *Biochem Biophys.Res Commun.* 1997; 233: 248-252.
23. Farooqui IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lecheler RI, De Paoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T Cell hyporesponsiveness and neuroendocrine metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin.* 2002; 110: 1093-1103.
24. Farooqui IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. 1999. *N Engl J Med;* 341: 879-84.
25. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin Deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 3686-3695.
26. Farooqui IS, Drops S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenstein S, Challis BG, O'Rahilly S. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes.* 2006; 55:2549-2553.

27. O'Rahilly S, Gray H, Humphreys PJ, Krook A, Polonsky KS, White A, Gibson S, Taylor K, Carr C. Impaired processing of prohormones associated with abnormalities of glucosa homeostasis and adrenal function. *N Engl J Med* 1995; 333:1386-1390.
28. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*. 1999; 16: 303-306.
29. Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqui IS. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci*. 2004; 7: 1187-9.
30. Han JC, Liu QR, Jones M, Levinn RL, Menzie CM, Jefferson-George KS, Adler-Wailes DC, Sanford EL, Lacbawan FL, UHL GR, Rennert OM, Yanoski JA. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WARG syndrome. *N Engl Med*. 2008; 359:981-27.
31. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel J, Argyropoulos G, Wats B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity Gene Map. The 2005 update. *Obesity*. 2006; 14:529-624.
32. Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, et al. The human obesity gene map. The 2004 update. *Obes Res*. 2005; 1:9-13

33. Loannidis JP, Patsopoulos NA, Evangelou E. Heterogeneity in meta-analyses of genome-wide association investigations. *Plos One*. 2007; 2:e841.
34. Todd J.A. Statistical false positive or true disease pathway? *Nat Genet* 2006; 38:731-7333.
35. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL et al. A genome-wide association study of type II diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007; 316:1341-1345.
36. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et-al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*. 2007; 316:1336-1341.
37. Saunders CL, Chiodini BD, Sham P, Lewis CM, Abkevich V, Adeyemo AA, et-al. Meta-analysis of genome-wide studies in BMI and obesity. *Obesity*. 2007; 15:2263-2275.
38. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et-al. A common variant in the FTO gene is associated to body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007; 316:889-894.

39. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, et-al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 2007; 39:724-726.
40. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, et-al. Genome-wide association scan shows genetics variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*. 2007; 3e115.
41. Den Hoed M, Westerterp-Plantenga MS, Bouwman FG, Mariman EC, Westerterp K.R. Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90:1426-1432.
42. Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, Loos R.J.F, et-al. Life course variations in the associations between FTO and MC4R variants and body size. *Hum Mol Genet*. 2010; 19:545-552.
43. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer C.A.N.An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med*. 2008; 359:2558-2566.
44. Hakanen M, Raitakari OT, Lehtimäki T, Peltonen N, Pahkala K, Sillanmäki L, et-al. FTO genotype is associated with body mass index after the age of seven years but not with energy intake or leisure-time physical activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:1281-1287.

45. Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyopoulos G, et-al. The human obesity gene map: The 2004 update. *Obes Res.* 2005; 13:381-490.
46. Stuzmann F, Tan K, Vatin V et al. Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes.* 2008; 57:2511-2518.
47. Ahituv N, Kavaslar N, Schackwitz W et al. Medical sequencing at the extremes of human body mass. *Am J Hum Genet.* 2007; 80:779-791.
48. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S et al. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptors mutations with severe adult obesity in a large North America case-control study. *Hum Mol Genet* 2009; 15: 1140-1147.
49. Xiang Z, Proneth B, Diran ML et al. Pharmacological characterization of 30 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonist, synthetic agonist, and the endogenous agouti-related protein antagonist. *Biochemistry.* 2010; 49:4583-4600.
50. Stuzman F, Vatin V, Cauchi S et al. Non synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: The two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 1837-1844.

51. Wang D, Ma J, Zhang S et al. Association of the MC4R V103I polymorphism with obesity: a Chinese case-control study and meta-analysis in 55,195 individuals. *Obesity (Silver Spring)*. 210; 18: 573-579.
52. Park KS, Shin HD, Park BL et al. Polymorphisms in the leptin receptor (*LEPR*)-putative association with obesity and T2DM. *J Hum Genet*. 2006; 69:76-85.
53. Lindgren CM, Heid IM, Randall JC, Lamina C, Steinthorsdottir V, Qi L, et-al. Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution. *PLoS Genet*. 2009; 5:e1000508.
54. Tanofsky-Kraff M, Han JC, Anandalingam K, Shomaker LB, Columbo KM, Wolkoff LE, et-al. The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90:1483-8.

## **VIII. ANEXOS**

# Telemedicine application for genetic counseling in Extremadura



Raquel Rodríguez López

Area Specialist. Genetics Unit. Immunology and Genetics Service. Infanta Cristina Hospital. University Hospital Compound of Badajoz (CHUB), Regional Government of Extremadura, Spain

Ana García Nogales

Nurse responsible for the Telemedicine Service. Telemedicine Service. Health Area in Badajoz. Extremadura Health Service, Regional Government of Extremadura, Spain

Marta Rubio Rodrigo

Hired researcher. Genetics Unit. Immunology and Genetics Service. Infanta Cristina Hospital. University Hospital Compound of Badajoz (CHUB), Regional Government of Extremadura, Spain

Marta González

Research fellow. Genetics Unit. Immunology and Genetics Service. Infanta Cristina Hospital. University Hospital Compound of Badajoz (CHUB). Regional Government of Extremadura. Spain

Narcisa Marín Guerrero

Nursing Assistant at the Telemedicine Service. Telemedicine Service. Badajoz Health Area. Extremadura Health Service, Regional Government of Extremadura, Spain

Claudio Peláez Veja

Responsible for the Telemedicine Service at Extremadura Health Service. Telemedicine Service. Extremadura Health Service, Regional Government of Extremadura, Spain

## Abstract

*Objective: The use of telemedicine appears as very good potential option for optimizing genetic counseling within healthcare systems, however the role of the healthcare providers involved in this process is still unknown. Method: 20 professionals had participated in 126 genetic counseling teleconsultations through the Extremadura public telemedicine network; the process has been characterized, the activity and the competence of the staff involved has been established, and the differences observed regarding the same face to face healthcare activity has been evaluated. Results: the 17 healthcare providers in charge of the telemedicine network pointed out the diversity of existing profiles and activities in the process of genetic counseling. The 3 geneticists noticed the good conditions provided by the system for its coordination, with a multidisciplinary nature. Users agreed that the service is easy to use, mainly for its understanding and efficiency. Conclusions: we consider that the tool improves the collaboration level of families and the accessibility of population groups with some degree of geographical isolation.*

**Key words:** Genetic Counseling; Telemedicine; Remote consultation; Healthcare Systems; Public Health.

## Resumen

### Aplicación de la telemedicina para la práctica del consejo genético en Extremadura

*Objetivo: El uso de la telemedicina emerge como una opción de gran potencial para la optimización del consejo genético dentro de los sistemas sanitarios, sin embargo se desconoce el detalle del acto médico, el papel de los sanitarios implicados. Método: 20 profesionales han participado en 126 teleconsultas de consejo genético a través de la red pública de telemedicina de Extremadura; hemos caracterizado el proceso, establecido la actividad y competencia del personal implicado y evaluado las diferencias observadas respecto a la misma actividad asistencial presencial. Resultados: los 17 profesionales encargados de la red de telemedicina destacaron la diversidad de los perfiles y actividades existentes en el proceso del consejo genético. Los 3 genetistas resaltaron las facilidades que ofrece el sistema para la coordinación del mismo, necesariamente multidisciplinar. Los consultantes coinciden en la comodidad, naturalidad, comprensión y eficiencia del servicio. Conclusiones: consideramos que la herramienta mejora el nivel de colaboración de los grupos familiares y la accesibilidad de núcleos poblacionales con cierto aislamiento geográfico.*

**Palabras clave:** Asesoramiento Genético; Telemedicina; Consulta Remota; Sistemas de Salud; Salud Pública.

Resumo

Aplicação da telemedicina para a prática do aconselhamento genético em Extremadura

**Objetivo:** O uso da telemedicina surge como uma opção de grande potencial para a otimização do aconselhamento genético dentro dos sistemas de saúde, entretanto o papel dos profissionais de saúde envolvidos não é conhecido detalhadamente. **Método:** 20 profissionais participaram em 126 teleconsultas de aconselhamento genético através da rede pública de telemedicina de Extremadura; caracterizamos o processo, estabelecemos a atividade e competência do pessoal envolvido e avaliamos as diferenças observadas em relação a mesma atividade assistencial presencial. **Resultados:** os 17 profissionais encarregados da rede de telemedicina destacaram a diversidade dos perfis e atividades existentes no processo de aconselhamento genético. Os 3 geneticistas apontaram as facilidades que o sistema oferece para sua coordenação, necessariamente multidisciplinar. Os consultantes concordam na comodidade, naturalidade, compreensão e eficiência do serviço. **Conclusões:** consideramos que a ferramenta melhora o nível de colaboração dos grupos familiares e a acessibilidade de núcleos populacionais com certo isolamento geográfico.

**Palavras-chave:** Aconselhamento Genético; Telemedicina; Consulta Remota; Sistemas de Saúde; Saúde Pública.

## INTRODUCTION

Videoconferencing appears as a very interesting alternative for ensuring equal access for patients and professionals to experienced and good quality exam units and genetic counseling, developed within public health systems.

In general, satisfaction levels of professionals and patients are high for the first group of specialties used<sup>1,2,3</sup>. However, the experience in genetics is very limited and very much restricted to specific programs such as prenatal diagnosis<sup>4</sup> or detection of hereditary cancer syndromes<sup>5</sup>. Telemedicine has appeared to be useful in a group of specialties that solve a given physician-patient inter-consultation or when the professional provides information regarding an image or a functional exam (without the presence of the patient). Nevertheless, genetic counseling is an example of a multidisciplinary activity in which the physician who sends the case, geneticists, related specialists, general practitioner and the consulting subject/family/population join information and knowledge in order to diagnose and design the best clinical management of the case. During the process, healthcare providers act as trainers of other professionals and consulting individuals, and the best possible results obtained from the ongoing genetic study depend on his/her success. The nursing team is essential for the development of the study and for the relationship with the family.<sup>6,7</sup> It is important to review the experiences published in order to incorporate their conclusions of the new exams<sup>8</sup>. It seems important to control the participation of staff who is not engaged in the conversation taking place during the videoconference.<sup>9</sup>

The goal of genetic counseling is to analyze hereditary disorders, informing people on the risks they face when suffering and transmitting some given diseases and, in some cases, to customize medical intervention according to the genetic background of each person.

Genetic exams mean progress for healthcare and an opportunity to develop preventive medicine. Its practice requires investment and the control of benefits and risks depends on the seriousness with which the convenience of applying genetic exams in each case is considered.<sup>10</sup> It is extremely important that the system ensures voluntary access, after receiving all the required information on the global process. Results generate data or genetic information of the subject analyzed, regarding inherited or congenital properties that are able to affect future generations and from which the result of non analyzed related subjects is inferred.<sup>11</sup>

The knowledge on genetic exams, the set of decisions that the new technologies used require, their nuances and possible implications are still not enough. It is extremely interesting to promote them, since genetic exams are gradually becoming a part of the daily routine in healthcare systems. Therefore, both healthcare providers and patients must be able to master its use and to control its risks.

Its importance coincides with the development of other technologies in healthcare systems, such as telemedicine. This is why it is advisable to determine its application within a responsible framework of activities, regulated with measures that ensure an environment of trust and credibility.

Extremadura has 41,634 km<sup>2</sup>, with a population of 1,071,000 inhabitants; its low demographic density (25.7 inhabitant/km<sup>2</sup>), its geographical distribution with prevalence of rural areas, the increasing ageing of its population and the long distances to hospitals make it difficult the access to more specialized health resources for a significant part of the population. In 2003, healthcare providers of the region decided to implement a homogenous telemedicine network, in an attempt to have a balance among the 8 healthcare areas that make up the healthcare map of the region. Cardiology, dermatology, vascular surgery and radiology are the specialties that have used this network more.

In 2010 the network is extended to its 14 hospitals and 30 Health Centers, even with the integration of health centers with specific access difficulties, such as Prisons and Centers for Assisted People.

Here we show our first experience using telemedicine for diagnosis and investigation of genetic diseases: development framework, identification and criteria for selecting candidates for genetic counseling and analysis, strategies applied to research.

## METHODS

The Telemedicine Network in Extremadura is implemented with the *Multi Protocol Label Switching* (MPLS) and MacroLan technology with symmetrical access lines ranging from 2 Mbps until 400 Mbps. Point to point and "I.P." connections are made (Figure 1). Its geographical distribution is shown in Figure 2.

When suspecting that a patient may be a candidate for a genetic study, doctors refer the case to the Unit located at the University Hospital Center in Badajoz, it is there where the appointment is made for the patient to have a consultation or a teleconsultation according to the place where he/she lives. Geneticists received the request from a clinical report and/or a referral document for evaluating high risk criteria, prepared for each screening program as the hereditary cancer syndromes detection program.

The group of professionals involved in the telemedicine network participated as the support staff for the implementation of the new service. Patients were seen through online or offline teleconsultations, with a working schedule of 6 hours per week. Geneticists did the evaluation, diagnosis and counseling of 111 clinical cases sent by oncologists, neurologists, endocrinologists, internists, ENT specialists and nephrologists. After receiving detailed information on the procedure, each participant signed a written consent. A protocol for case referrals was prepared

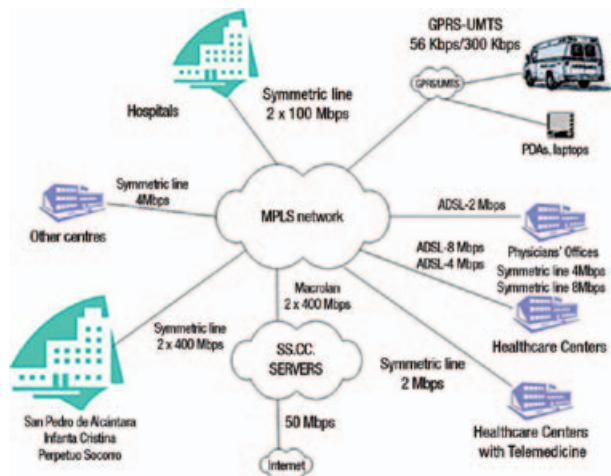


Figure 01 - Technical features of the Extremadura Telemedicine Network.

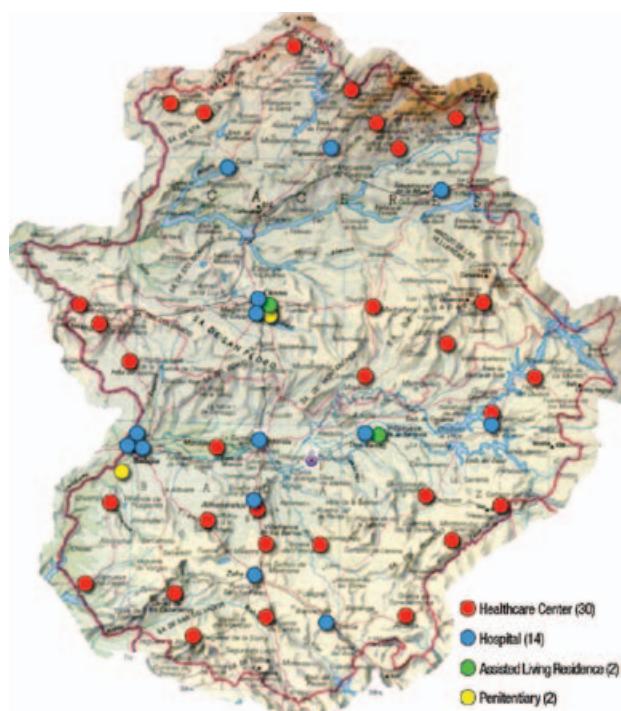


Figure 02 - Distribution of Telemedicine stations around Extremadura.

Table 1 - Activity of Genetic Counseling Consultation through Telemedicine in the above mentioned period.

Health Area	Center with TM	Population	Nº patients	Nº families	Prevailing Pathology
Badajoz	6	13	51	25	Family Ca Program
Don Benito-Vva	3	7	22	10	Neurology
Cáceres	1	2	2	2	Family Ca Program
Llerena-Zafra	4	5	29	11	Family Ca Program
Mérida	2	5	22	9	Morbid Obesity
TOTAL	16	32	126	57	

for evaluation from primary to specialized care at the Unit of genetics, appointments of patients according to criteria, collection and transportation of samples, issuing reports and selecting new candidates for the study. The team of geneticists contributed with its wide experience on face to face genetic counseling consultations and the group of healthcare providers with experience on telemedicine coordinated the new process based on what they knew on all 16 specialties that had used the telemedicine network in Extremadura since 2003. The through literature review and the close collaboration kept with the reference units for genetic counseling in other regions, contributed with the good quality of the process. The professionals in charge of the videoconference controlled the appointment system, the preferences of patients/family regarding the following appointment and their opinion on the advantages and problems of the procedure. Every first interview started with the reason or clinical suspicion that generated the referral of the case to the unit of genetics and it followed an agreed upon process which was adequate for the pathology being evaluated. The first interviews always finished with the informed consent, sample request, written information on the analyzed disease and a report issued as a summary of the justification, intervention and the conclusions taken from the medical act. Everybody gave details of their perception regarding the use of telemedicine for diagnosis and genetic counseling.

## RESULTS

Seventeen professionals with experience ranging from 2 to 7 years in telemedicine and 3 geneticists with 3, 6 and 12 years of experience each on face to face consultation took part. During a period of 9 months 126 appointments were made, of these 111 were 1<sup>st</sup> time consultations and 15 were successive visits, during 6 hours per week and together with the 6 or 8 hours dedicated to the same activity at the Unit for 4 years.

The average time of the appointment for genetic counseling through the telemedicine network was similar to the time used in the face to face consultation, estimated in 30 minutes. Patients/families provided the follow up of the drawing of the family tree in real time to obtain as much concentration as possible for the informer. Generally, it was noticed that the camera system helps to keep the attention and increases the effort that patients have to make to communicate and to make them to be understood.

Quite often, both consultants and healthcare providers had the feeling that genetic data are different from other type of medical information, due to its nature. This was added to the confusion caused for the fact that the goal of the appointment belonged to the scope of research. Healthcare providers made frequent comments on the delayed access to genetic tests, the difficult diagnosis of the so called rare diseases, asking about quality parameters, confidentiality and even the control over the samples in the case of underage patients. Only one family, sent for the diagnostic suspicion of fragile X syndrome in one of the sons, requested to carry on with face to face appointments, travelling 180 km after the second teleconsultation. The system ensured strict confidentiality on the delivery of the results in a personalized way to the person being analyzed or to his/her legal guardian. Similarly, each report issued was sent to the physician who referred the case to our unit, since all patients seen authorized us to do so. Two patients sent for the study with suspicion of heredo-degenerative ataxia and Huntington disease had to be reassessed in a face to face appointment by the Neurology Service of the Hospital Center, because of the doubt regarding the referral for genetic testing.

The common and unadvisable practice of communicating negative results to family members with genetic alterations, by phone or by regular mail, is avoided with the videoconferencing system that tries to stop individuals from travelling long distances just to receive a report with such information.

Telemedicine is an excellent tool to disseminate knowledge on the scientific base of the pathologies evaluated, being extremely useful for training healthcare providers working with the individuals affected, helping them to understand and assimilate their process in terms of the disease prognosis, as well as helping them to decide among the options available. As a result individuals were more confident to access the genetic unit and there was also a higher number of individuals who used the results obtained from their relatives analyzed, once they were informed by them on the possible benefits. It could also be noticed that the training on genetics of healthcare providers working in primary care is reflected in the way they encourage patients to use it. A special attention was given to the fact that videoconferences ensure the individual right to know the possible family members affected.

The system used ensured and improved equal access to information and to quality genetic services, avoiding possible mistakes when sending samples (even to different family members) unscathed.

ferent members of the same family) to hospital labs and universities in different regions of the country. The accessibility of the telemedicine network in Extremadura was essential to overcome the specific geographical features of the region, helping access from rural areas such as Peñalsordo (203 km away from the Hospital Center in Badajoz) to the reference unit for genetic diagnosis of the suspected pathology.

The lack of a common regional goal for offering these services with the same quality for all citizens was identified. In addition to the division of the existing genetic units there is also the diversity of its service portfolio, within a national scope significantly heterogeneous in terms of quality, without clear reference systems and with different laws among the regions that wait for a regulation from the Central Government.

The use of the regional telemedicine network made possible to take measures to avoid the unwanted social consequences of genetic testing. It allowed the group of healthcare providers and patients to come to an agreement on whether the expected benefits of the referral for genetic analysis offset its risks. Also special attention was given to its justification: identification of serious alterations, search of results with prognosis value and parallel design of health intervention for follow up, including reproductive options.

This was the central axis for designing the program for detection and counseling on hereditary cancer syndromes that, as it happens in prenatal diagnosis, early diagnosis of cystic fibrosis and non syndromic hereditary hearing impairment is critical to create the adequate medical environment to provide information before the genetic exams and counseling after them, before offering the screening services.

The economic dimension of the screening programs based on the traditional appointment system was not increased with the incorporation of videoconferences.

We corroborate that specialized genetic counseling has consolidated itself as a basic health requirement and it needs professionals with demonstrable specific training. However, it was clearly seen that non specialized physicians and other members of the healthcare team were extremely useful when providing patients with related specific information. Their role was essential to help individuals or families to understand and face the genetic disorders affecting them, contributing with appropriate explanations added to the ones given by the geneticists during the teleconsultation, although the time spent for explanations was considered enough.

We would like to point out that despite the convenience of having a common base on the law for genetic counseling, practices should be adapted and modified according to the social and cultural setting where we are working. Telemedicine shows this in a very special manner.

It is interesting to notice that, despite the fact that the health public system in which we developed this pilot test has universal coverage and is free of charge, tele-care application saved costs at the same time that avoided nuisance for users.

Through telemedicine a training cycle was started on the main topics and central axis of the ongoing research projects in our genetic unit. A participation protocol was prepared for those professionals interested in collaborating with this activity, defining the goals, methods and with the description of the results reached until today.

## DISCUSSION

We described our experience after using telemedicine applied to the genetic counseling sessions in the region of Extremadura, four years after the increase of staff and infrastructure to improve diagnosis and follow up of genetic based diseases in the region. Its social-geographical features and the excellence of the existing telemedicine network provide the proposed model with a huge potential for optimizing the final incorporation of medical genetics into the healthcare setting and to make both investments profitable.

The referral process of clinical cases subject to study from primary and specialized care to the genetic unit was consolidating itself, enabling a very natural and coordinate flow of appointments with an average waiting time of around 20 days. We did not notice any kind of decrease in the efficiency or acceptance of appointments through videoconference, in comparison to the traditional face to face method. In both cases patients and geneticists were previously informed, by the resident physician who first had the suspicion of genetic disease, on the clinical fact that justified the appointment and they attended expecting to get more information on the procedure (consulting individuals) and on the personal and family background (geneticists). It was very interesting to see the attention and concentration of the people involved in the process mainly due to the fact that they could all control the image of both cameras at all time. Satisfaction level of participants was very high, paying continuous attention on how to improve the process being tested. The first opinion was the need for allowing patients

as much autonomy and privacy as possible during teleconsultation, being closer to the support staff.

Special relevance was acquired by the geneticist on individuals/family, regarding the roles played on doctor-patient relationships on teleconsultations from other specialties. This is related to the fact that genetic counseling appointments are about educating, describing, interpreting and helping to make decisions, during a long videoconference where difficult topics are discussed. Patients and their families feel they are integrated into the process, being an active part and collaborating with its success.

The fundamental contribution of the use of telemedicine in our setting was the participation of non medical personal in the genetic counseling sessions, since they are closer to the individual/family analyzed. As a result of this, communication, information, sample control and reports of patients were improved. It was remarkable to see how confident and natural individuals were when facing genetic counseling sessions by videoconference. This was clearly due to the fact that they are in a place they know being supported by healthcare providers who are very close to them.

It is a unique opportunity to be able to offer individuals all the information obtained from their diagnosis and genetic counseling process, and to the physicians working at their own health center. Although they are the ones who know and follow patients and their families, they are often excluded from the conclusions reached with this kind of studies. Once again, nursing staff had a very active participation, providing reports, family trees and bibliographical reviews of the disease stored in the electronic records of each patient/family. The interest shown by this group of healthcare providers on the genetic studies done was not the same. We have already expressed the need for a multi-disciplinary team that will coordinate and involve all those interested in this topic in order to exchange experiences on this area.

We would like to point out the diversity of a diagnosis and genetic counseling session in a very large region, low percentage of cases analyzed and an important number of requests to assess for very different groups of pathologies. With the increasing complexity of the knowledge requested for the genetic bases of human diseases, there is a trend to be hyper-specialized in our field. This is why it is essential to allow geneticists to go deeper in the knowledge of groups of diseases, concentrating their attention on the developments for their diagnosis, the updating of related literature, interaction with specialized researching teams and international protocols for medical interventions which are able to mitigate their concerns.

Over the last four years the service portfolio of our Unit has been widely developed trying to provide more coverage to the more demanded specialties and pathologies. We think that practice through telemedicine will require a continuous evaluation of the genetic analysis offered and techniques used, paying special attention to its cost-effectiveness. We have seen the new possibilities the Unit offers and its capability to change methodologies and strategies of our healthcare, interventions and medical therapies. Centralization of technological resources, the ageing process of the population and the little autonomy of individuals suffering from most genetic diseases may drive the use of telemedicine. Thus, specific qualifications and standards for required quality must be established for those participating in genetic counseling.

Telemedicine networks can solve the obligation the public health systems have of ensuring equal access to genetic analysis to all individuals who need them. Units like ours are increasingly receiving more requests for exams and they are already expecting a near future with a wider use of susceptibility analysis for higher prevalence diseases, much cheaper techniques for diagnosing rare diseases and the development of high profitability fields such as pharmacogenetics. Telemedicine may have a very important role in the implementation of these possibilities offering the population who live far from urban centers the chance to detect these disorders; despite its benefits, it will be necessary to control its possible risks too.

We have shown the usefulness of videoconference systems used to mitigate the huge need for professional training on the development on health and the potential for medical genetics. Public health systems must provide all their citizens with enough trained professionals so that the benefits of genetics may be achieved and distributed equally among them.

The use of the Telemedicine Network in Extremadura had adequate procedures for obtaining informed consent and confidentiality protection. Although genetic data with clinical and/or family impact must have the maximum level of protection, it must be stated that genetic data are also of great interest for other family members. Similarly, it has to be clear the importance of the right of the patient to know or not to know, with the use of devices in the teleconsultation to respect this issue. In general, the medical act has to meet the need for information and counseling and it must ensure the correct communication of the outcomes.

The risks of having easy access to small population groups, geographically isolated and being able to favor its

stigmatization within the community were considered. It is essential to acknowledge and respect cultural sensitivities. On the other hand, these minority ethnic groups should not be excluded from genetic exams that may benefit them.

Telemedicine is an extremely important tool for driving the development of research projects in areas with scattered population and remote and isolated areas with heterogeneous access to reference health centers. Its success depends on the correct use and exchange of DNA samples of interest and associated data. It is essential the availability of genealogic data, origin of the population, personal and family clinical data.

Our geographical situation offers our team an exceptionally good potential for exchanging samples and data on the borderland region, being able to generate highly interesting results for European researching groups on genetics. For everything it has been said above, we think it is necessary to always respect the social-cultural features of the population, the international, national and, at times, the local standards and laws.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by the Government of Extremadura (PRI08OB007) and by the Health Institute Carlos III (07PI0594).

## REFERENCES

1. Gattas M, MacMillan J, Meinecke I, Loane M, Wootton R. Telemedicine and clinical genetics: establishing a successful service. *J Telemed Telecare*. 2001; 7:68-70.
2. Iredale R, Gray J, Murtagh G. Telegenetics: a pilot study of video-mediated genetic consultations in Wales. *Int J Med Marketing*. 2002; 2(2):130-5.
3. Hu P, Chau P. Physician acceptance of telemedicine technology: an empirical investigation. *Top Health Inform Manage*. 1999; 19(4):20-35.
4. Abrams DJ, Geier MR. A comparison of patient satisfaction with telehealth and on-site consultations: a pilot study for prenatal genetic counseling. *J Genet Couns*. 2006 Jun; 15(3):199-205.
5. Ziliacus E, Meiser B, Lobb E, Barlow-Stewart K, Tucker K. A balancing act--telehealth cancer genetics and practitioners' experiences of a triadic consultation. *J Genet Couns*. 2009; 18(6):598-605.
6. Savenstedt S, Bucht G, Norberg L, Sandman P. Nurse-doctor interaction in teleconsultations between a hospital and a geriatric nursing home. *J Telemed Telecare*. 2002; 8:11-8.
7. Torppa M, Timonen O, Keinanen-Kiukaanniemi S, Larivaara P, Leiman M. Patient-nurse-doctor interaction in general practice teleconsultations - a qualitative analysis. *J Telemed Telecare*. 2006; 12(6):306-10.
8. Tates K, Elbers I, Meeuwesen L, Bensing J. Doctor-parentchild relationships': a 'pas de trois'. *Patient Educ Couns*. 2002 Sep;48(1):5-14.
9. Bensing J, Dulmen SV, Tates K. Communication in context: new directions in communication research. *Patient Educ Couns*. 2003; 50:27-32.
10. Kessler S. Psychological aspects of genetic counseling IX: teaching and counseling. *J Genetic Couns*. 1997; 6(3):287-95.
11. Meiser B, Gaff C, Julian-Reynier C, Biesecker B, Esplen M J, Vodermaier A, et al. International perspectives on genetic counseling and testing for breast cancer risk. *Breast Dis*. 2007; 27:109-25.

# Aplicación de la telemedicina para la práctica del consejo genético en Extremadura



Raquel Rodríguez López	Especialista de Área. Unidad de Genética. Servicio de Inmunología y Genética. Hospital Infanta Cristina. Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (CHUB), Junta de Extremadura, España
Ana García Nogales	Enfermera responsable del Servicio de Telemedicina. Servicio de Telemedicina. Área de Salud de Badajoz. Servicio Extremeño de Salud, Junta de Extremadura, España
Marta Rubio Rodrigo	Investigador contratado. Unidad de Genética. Servicio de Inmunología y Genética. Hospital Infanta Cristina. Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (CHUB), Junta de Extremadura, España
Marta González-Carpio Serrano	Becario. Unidad de Genética. Servicio de Inmunología y Genética. Hospital Infanta Cristina. Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (CHUB), Junta de Extremadura, España
Narcisa Marín Guerrero	Auxiliar de enfermería del Servicio de Telemedicina. Servicio de Telemedicina. Área de Salud de Badajoz. Servicio Extremeño de Salud, Junta de Extremadura, España
Claudio Peláez Veja	Responsable del Servicio de Telemedicina del Servicio Extremeño de Salud. Servicio de Telemedicina. Servicio Extremeño de Salud, Junta de Extremadura, España

Resumen

Abstract

**Objetivo:** El uso de la telemedicina emerge como una opción de gran potencial para la optimización del consejo genético dentro de los sistemas sanitarios, sin embargo se desconoce el detalle del acto médico, el papel de los sanitarios implicados. **Método:** 20 profesionales han participado en 126 teleconsultas de consejo genético a través de la red pública de telemedicina de Extremadura; hemos caracterizado el proceso, establecido la actividad y competencia del personal implicado y evaluado las diferencias observadas respecto a la misma actividad asistencial presencial. **Resultados:** los 17 profesionales encargados de la red de telemedicina destacaron la diversidad de los perfiles y actividades existentes en el proceso del consejo genético. Los 3 genetistas resaltaron las facilidades que ofrece el sistema para la coordinación del mismo, necesariamente multidisciplinar. Los consultantes coinciden en la comodidad, naturalidad, comprensión y eficiencia del servicio. **Conclusiones:** consideramos que la herramienta mejora el nivel de colaboración de los grupos familiares y la accesibilidad de núcleos poblacionales con cierto aislamiento geográfico.

**Palabras clave:** Asesoramiento Genético; Telemedicina; Consulta Remota; Sistemas de Salud; Salud Pública.

## Telemedicine application for genetic counseling in Extremadura

**Objective:** The use of telemedicine appears as very good potential option for optimizing genetic counseling within healthcare systems, however the role of the healthcare providers involved in this process is still unknown. **Method:** 20 professionals had participated in 126 genetic counseling teleconsultations through the Extremadura public telemedicine network; the process has been characterized, the activity and the competence of the staff involved has been established, and the differences observed regarding the same face to face healthcare activity has been evaluated. **Results:** the 17 healthcare providers in charge of the telemedicine network pointed out the diversity of existing profiles and activities in the process of genetic counseling. The 3 geneticists noticed the good conditions provided by the system for its coordination, with a multidisciplinary nature. Users agreed that the service is easy to use, mainly for its understanding and efficiency. **Conclusions:** we consider that the tool improves the collaboration level of families and the accessibility of population groups with some degree of geographical isolation.

**Key words:** Genetic Counseling; Telemedicine; Remote consultation; Healthcare Systems; Public Health.

## Aplicação da telemedicina para a prática do aconselhamento genético em Extremadura

**Objetivo:** O uso da telemedicina surge como uma opção de grande potencial para a optimização do aconselhamento genético dentro dos sistemas de saúde, entretanto o papel dos profissionais de saúde envolvidos não é conhecido detalhadamente. **Método:** 20 profissionais participaram em 126 teleconsultas de aconselhamento genético através da rede pública de telemedicina de Extremadura; caracterizamos o processo, estabelecemos a atividade e competência do pessoal envolvido e avaliamos as diferenças observadas em relação a mesma atividade assistencial presencial. **Resultados:** os 17 profissionais encarregados da rede de telemedicina destacaram a diversidade dos perfis e atividades existentes no processo de aconselhamento genético. Os 3 geneticistas apontaram as facilidades que o sistema oferece para sua coordenação, necessariamente multi-disciplinar. Os consultantes concordam na comodidade, naturalidade, compreensão e eficiência do serviço. **Conclusões:** consideramos que a ferramenta melhora o nível de colaboração dos grupos familiares e a acessibilidade de núcleos populacionais com certo isolamento geográfico.

**Palavras-chave:** Aconselhamento Genético; Telemedicina; Consulta Remota; Sistemas de Saúde; Saúde Pública.

## INTRODUCCIÓN

La videoconferencia se erige como una alternativa de enorme interés para asegurar el acceso homogéneo de pacientes y profesionales a unidades de análisis y consejo genético de experiencia y calidad demostrables, desarrolladas en el ámbito de sistemas públicos de salud.

En general el grado de satisfacción de profesionales y pacientes es elevado para el conjunto de especialidades que se iniciaron como pioneras<sup>1,2,3</sup>, sin embargo la experiencia en la disciplina de la genética es muy limitada y circunscrita a programas concretos como los de diagnóstico prenatal<sup>4</sup> o detección de síndromes de cáncer hereditario<sup>5</sup>. Se ha reconocido la utilidad de la telemedicina en un conjunto de las especialidades que resuelven una interconsulta puntual médico-paciente, o en las que el profesional informa respecto a una imagen o prueba funcional (sin la presencia del paciente). Pero el consejo genético es un ejemplo de actividad multidisciplinar en el que el médico remitente del caso, genetistas, especialistas relacionados, médico de atención primaria e individuo/familia/población consultante aúnan información y conocimientos para diagnosticar y diseñar el mejor manejo clínico del caso. Los sanitarios intervenientes adoptan durante el proceso el papel de educadores del resto de profesionales y consultantes, dependiendo del éxito del mismo el obtener el máximo rendimiento del estudio genético en marcha. El equipo de enfermería es esencial para su desarrollo y relación con la familia.<sup>6,7</sup> Es importante revisar las experiencias publicadas para incorporar sus conclusiones a las nuevas pruebas<sup>8</sup>, pareciendo importante el controlar la intervención de personal ajeno a la conversación en marcha durante la videoconferencia.<sup>9</sup>

El objetivo del consejo genético es el análisis de los trastornos hereditarios, informando a las personas del riesgo que tienen de padecer y transmitir ciertas enfermeda-

des y, en ciertos casos, individualizar la intervención médica según el fondo genético de cada individuo. Las pruebas genéticas constituyen un avance para la asistencia sanitaria y la oportunidad para desarrollar la medicina preventiva. Su instauración precisa una inversión, y el control de los beneficios y riesgos depende de la rigurosidad con que se considere la conveniencia de la aplicación o no de los análisis genéticos en cada caso.<sup>10</sup> Es imprescindible que el sistema asegure el acceso voluntario, tras recibir toda la información precisa sobre el proceso global. Los resultados generan datos o información genética del individuo analizado, en relación a propiedades heredadas o congénitas capaces de afectar a posteriores generaciones y de los que se infiere el resultado de individuos relacionados no analizados.<sup>11</sup>

Se considera aún insuficiente el conocimiento sobre las pruebas genéticas, el conjunto de decisiones que las nuevas tecnologías empleadas requieren, sus matices y posibles consecuencias. Resulta de enorme interés su promoción, dado que las pruebas genéticas se integran progresivamente en la cotidianidad de los sistemas sanitarios, requiriéndose que tanto los profesionales sanitarios como los pacientes dominen su utilización y controlen sus riesgos.

Su impulso coincide con el desarrollo de otras tecnologías en el sistema sanitario, como el de la telemedicina, por lo que conviene delimitar su aplicación en un marco responsable de actividades, reguladas por medidas que aseguren un clima de confianza y credibilidad.

Extremadura tiene una extensión de 41.634 km<sup>2</sup>, con una población de 1.071.000 habitantes; la baja densidad demográfica (25,7 hab/km<sup>2</sup>), su dispersión geográfica con predominio de entornos rurales, el envejecimiento progresivo de la población y las distancias a los hospitales dificultan el acceso de un porcentaje importante de individuos a los recursos sanitarios más especializados. En el año

2003, los responsables sanitarios de la comunidad autónoma deciden instalar una red de telemedicina homogénea, tratando de guardar un equilibrio entre las 8 aéreas sanitarias que componen el mapa sanitario. Las especialidades de cardiología, dermatología, cirugía vascular y radiología son las que mayor uso han hecho de la misma. En el año 2010 la red se extiende a sus 14 Hospitales y 30 Centros de Salud, integrando incluso los centros sanitarios con dificultades específicas de acceso a los centros sanitarios, como Centros Penitenciarios y Residencias de Asistidos.

Exponemos nuestra primera experiencia del uso de la telemedicina para el diagnóstico e investigación de enfermedades genéticas: marco de desarrollo, identificación y criterios de indicación de individuos candidatos a consejo y análisis genético, estrategias aplicadas al campo de la investigación.

## METODOS

La Red de Telemedicina en Extremadura está implementada con tecnología *Multi Protocol Label Switching* (MPLS) y MacroLan con líneas simétricas de acceso desde 2 Mbps hasta 400 Mbps. Se realizan conexiones punto a punto y por "I.P." (Figura 1). Su distribución geográfica se detalla en la Figura 2.

Ante la sospecha de un paciente candidato a estudio genético, los médicos remitieron el caso a la Unidad, sita en el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (CHUB), desde la que se cita para consulta presencial o teleconsulta según su lugar de residencia. Los genetistas recibieron la solicitud mediante un informe clínico y/o documento de derivación para evaluación de criterios de alto riesgo, elaborado para cada programa de cribado como el de detección de síndromes de cáncer hereditario.

El conjunto de profesionales implicados en la red de telemedicina participó como apoyo para la puesta en marcha del nuevo servicio. Los pacientes fueron atendidos

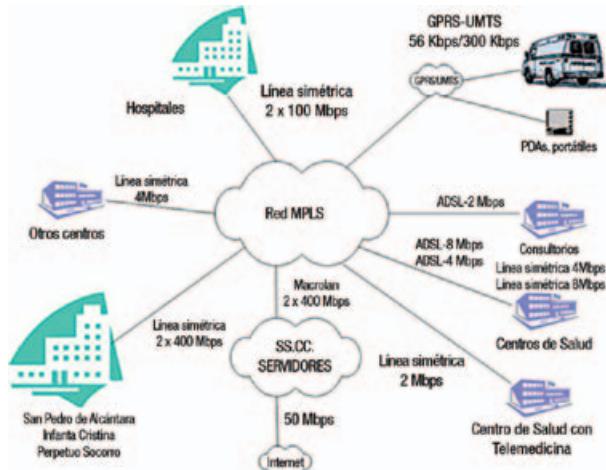


Figura 01 - Características técnicas de la Red de Telemedicina de Extremadura.



Figura 02 - Distribución de las estaciones de Telemedicina en la Comunidad Autónoma de Extremadura.

Tabla 1 - Actividad de la Consulta de Consejo Genético a través de Telemedicina en el periodo referido.

Área de salud	Centro con TM	Población	Nº pacientes	Nº familias	Patología predominante
Badajoz	6	13	51	25	Programa Ca Familiar
Don Benito-Vva	3	7	22	10	Neurología
Cáceres	1	2	2	2	Programa Ca Familiar
Llerena-Zafra	4	5	29	11	Programa Ca Familiar
Mérida	2	5	22	9	Obesidad Mórbida
TOTAL	16	32	126	57	

mediante teleconsulta online o síncrona, estableciéndose para ello una agenda de trabajo de 6 horas semanales. Los genetistas llevaron a cabo la evaluación, diagnóstico y consejo de 111 casos clínicos remitidos por oncólogos, neurólogos, endocrinólogos, internistas, otorrinolaringólogos y nefrólogos. Tras recibir información amplia acerca del procedimiento, cada participante firmó consentimiento escrito. Se diseñó un protocolo de derivación de casos para evaluación desde atención primaria y especializada a la Unidad de genética, citación de pacientes según criterios, recopilación y transporte de muestras, emisión de informes y selección de nuevos individuos candidatos a estudio. El equipo de genetistas aportó una amplia experiencia en consultas de consejo genético presencial y el conjunto de profesionales expertos en telemedicina coordinó el nuevo proceso en base a lo que conocían del total de 16 especialidades que usan la red de telemedicina de Extremadura desde el año 2003. La revisión extensa de la literatura y la estrecha colaboración mantenida con unidades de referencia para consejo genético de otras comunidades contribuyó a la buena calidad del proceso. Los profesionales responsables de la videoconferencia controlaron el sistema de citación, las preferencias del paciente/familia respecto a la siguiente consulta y su opinión en relación a las ventajas e inconvenientes del procedimiento. Cada primera entrevista se inició con el motivo o sospecha clínica que generó la derivación del caso a la unidad de genética y siguió un esquema consensuado y adecuado a la patología evaluada. Finalizó con la obtención del consentimiento informado, solicitud de muestra, información escrita sobre la enfermedad analizada y emisión de informe que resume la justificación, intervención y conclusiones extraídas del acto médico. Todos detallaron su percepción respecto al uso de la telemedicina para el diagnóstico y consejo genético.

## RESULTADOS

Participaron 17 profesionales expertos en telemedicina con dedicación de 2 a 7 años y 3 genetistas con rango de experiencia en consulta presencial de 3, 6 y 12 años respectivamente. Se citaron en 9 meses, 126 consultas de las cuales 111 fueron 1<sup>a</sup> consulta y 15 sucesivas, durante 6 horas semanales y en paralelo a las 6 u 8 horas que se dedicaban en la Unidad a la misma actividad presencial desde hacía 4 años.

El tiempo medio de duración de la consulta de consejo genético a través de la red de telemedicina resultó similar al

empleado en la consulta presencial, estimado en 30 minutos. Se facilitó el seguimiento del dibujo del árbol genealógico por el individuo/familia en tiempo real, para conseguir la máxima concentración del informador/es. En general se observó que el sistema de cámaras ayuda a mantener la atención y aumenta el esfuerzo de los pacientes por hacerse entender y comunicarse.

Resultó frecuente, tanto entre consultantes como sanitarios, la sensación de que los datos genéticos difieren por su naturaleza de otros tipos de información médica. La misma se sumaba en ocasiones a la confusión de que el objetivo de la consulta se enmarcaba en el ámbito de la investigación. Los consultantes realizaron frecuentes alusiones al retraso en el acceso a los testes genéticos, el difícil diagnóstico de las enfermedades denominadas raras, preguntando sobre parámetros de calidad, confidencialidad e incluso control sobre las muestras en caso de menores. Sólo una familia remitida por la sospecha diagnóstica de síndrome del cromosoma X frágil en uno de sus hijos varones, solicitó continuar con las consultas presenciales y viajar 180 kilómetros a partir de la segunda teleconsulta. El sistema aseguró la estricta confidencialidad de la entrega de resultados de manera personalizada al individuo analizado o tutor legal del mismo. De manera paralela se envió cada informe emitido al médico que remitió el caso a nuestra unidad, dado que todos los pacientes analizados así lo autorizaron. Dos pacientes remitidos para estudio por sospecha de ataxia heredodegenerativa y enfermedad de Huntington, tuvieron que ser reevaluados en consulta presencial por el Servicio de Neurología del Complejo Hospitalario, ante la duda respecto a la indicación de la prueba genética.

El sistema de videoconferencia evita comunicar telefónicamente o enviar por correo ordinario resultados negativos a miembros de familias portadoras de alteraciones genéticas, práctica habitual y desaconsejable que trata de evitar que el interesado viaje largas distancias sólo para recibir un informe de dichas características.

La telemedicina supuso una magnífica herramienta para difundir los conocimientos acerca de la base científica de las patologías evaluadas, siendo de enorme utilidad para la educación de sanitarios del entorno de los individuos afectados, a los que ayudaron a entender y asimilar su proceso en materia de pronóstico de enfermedad, así como decidir entre las opciones de elección personal. Ello derivó en la mayor confianza con que los individuos accedieron a la unidad de genética y en el incremento de individuos que hicieron uso de los resultados obtenidos a partir

de sus familiares analizados, una vez fueron informados por ellos de sus posibles beneficios. Comprobamos que la formación en genética del personal sanitario que ejerce en atención primaria redunda en el hecho de animar a los pacientes a que hagan uso de ella. Se vigiló especialmente que el uso de la videoconferencia asegurase el derecho individual a saber y a no saber de los posibles afectados.

El sistema empleado garantizó y mejoró el acceso igualitario a la información y a los servicios genéticos de calidad, evitando la dispersión del envío de muestras (incluso de distintos individuos de la misma familia) a laboratorios de hospitales y universidades en distintas comunidades autónomas. La accesibilidad de la red de telemedicina extremeña salvó que las peculiares características geográficas de la región dificultasen el acceso de zonas rurales como Peñalsordo (203 Km de distancia al CHUB) a la unidad de referencia para el diagnóstico genético de la patología sospechada.

Se detectó la ausencia de un objetivo regional común de prestación de estos servicios y de igual calidad a todos los ciudadanos. A la división de las unidades de genética existentes se suman la diversidad de sus carteras de servicios, enmarcada en un ámbito nacional con importante heterogeneidad de los regímenes de calidad, sin claros sistemas de referencia y con distintas normativas entre comunidades que esperan una regulación desde el estado.

El uso de la red regional de telemedicina posibilitó la toma de medidas para evitar que las pruebas genéticas tuvieran consecuencias sociales indeseables. Permitió al conjunto de profesionales de la medicina y los pacientes el acordar si los beneficios esperados de la indicación del análisis genético compensaban sus riesgos. También se prestó especial atención a su justificación: identificación de alteraciones graves, búsqueda de resultados con valor de pronóstico y diseño paralelo de intervenciones sanitarias para seguimiento, incluidas las opciones reproductivas. Ello supuso el eje central del diseño del programa de detección y asesoramiento de síndromes de cáncer hereditario en el que, como en el de diagnóstico prenatal, diagnóstico temprano de fibrosis quística e hipoacusias hereditarias no sindrómicas, resulta imprescindible crear el entorno médico adecuado para facilitar información previa a los análisis genéticos y asesoramiento posterior a los mismos, antes de ofrecer los servicios de cribado.

La dimensión económica de los programas de cribado que funcionaban a partir del sistema de consultas tradicional, no se vio magnificada por la incorporación de la videoconferencia.

Corroboramos que el asesoramiento genético especializado se consolida como un requisito sanitario básico y requiere profesionales con formación específica demostrable. Sin embargo, fue evidente la gran utilidad de que médicos no especializados y otros miembros de los equipos sanitarios facilitasen al paciente la información específica relacionada. Destacó su papel fundamental para ayudar a individuos o familias a entender y enfrentarse a las enfermedades genéticas que les afectaban, aportando explicaciones adecuadas que se sumaron a las dadas por los genetistas durante la teleconsulta, a pesar de haberse considerado entonces suficiente el tiempo dedicado.

Destacamos que, a pesar de la conveniencia de que exista una base común en la normativa para el asesoramiento genético, las prácticas deben adaptarse y modificarse en relación al marco social y cultural en el que se actúe. La telemedicina evidencia especialmente esta apreciación.

Es interesante reseñar que, a pesar de las características de cobertura universal y gratuitad del sistema público de salud en el que desarrollamos esta prueba piloto, la aplicación de teleasistencia ahorró costes y evitó molestias a los consultantes.

A través de la telemedicina iniciamos un ciclo formativo sobre los temas de principal interés y ejes centrales de los proyectos de investigación en marcha en nuestra unidad de genética. Elaboramos un protocolo de participación para profesionales interesados en colaborar en dicha actividad, definiendo los objetivos, métodos y descripción de resultados obtenidos a la fecha.

## DISCUSIÓN

Describimos nuestra experiencia tras el uso de la telemedicina aplicada a las consultas de consejo genético en la Comunidad autónoma de Extremadura, cuatro años después del incremento de personal e infraestructuras para potenciar el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades de base genética en la región. Sus características socio-geográficas y la excelencia de la red de telemedicina existente, dotan al modelo propuesto de un enorme potencial para optimizar la incorporación definitiva de la genética médica al ámbito sanitario y rentabilizar ambas inversiones.

El proceso de derivación de casos clínicos candidatos a estudio desde atención primaria y especializada a la unidad de genética fue consolidándose, permitiendo la citación fluida y coordinada con un tiempo medio de espera en torno a 20 días. No observamos disminución

alguna en la eficiencia ni en la aceptación de la consulta a través de videoconferencia, respecto al método presencial tradicional. En ambos casos tanto el paciente como el genetista fueron informados previamente, por el médico remitente que sospechó la enfermedad genética, del hecho clínico que justificó dicha consulta y acudieron esperando mayor información respecto al procedimiento (individuos consultantes), como a los antecedentes personales y familiares (el genetista). Resultaron llamativas la atención y concentración mantenidas por los entrevistados, atribuibles al hecho de controlar todos ellos la imagen de ambas cámaras en todo momento. En general el grado de satisfacción del conjunto de participantes fue muy elevado, prestando una atención continua a cómo mejorar el proceso en prueba. La primera apreciación fue la necesidad de permitir a los consultantes la máxima autonomía y privacidad durante la teleconsulta, permaneciendo cercano el personal de apoyo.

Destacó la relevancia que adquirió el genetista sobre el individuo/familia, respecto a los papeles adoptados en las relaciones médico-pacientes en las teleconsultas de otras especialidades. Se relaciona con el hecho de que las consultas de consejo genético educan, describen, interpretan y ayudan a tomar decisiones, en el transcurso de una videoconferencia de larga duración en la que se tocan temas complejos. El paciente y su familia se sienten integrados en el proceso y parte activa que colabora en el éxito del mismo.

La aportación fundamental del uso de la telemedicina en nuestro ámbito fue la incorporación del personal sanitario no médico y perteneciente al entorno inmediato del individuo/familia analizados, a la consulta de consejo genético. Esto redundó en la mejor comunicación, información, control de muestras e informes de los consultantes. Fue destacable el grado de confianza y naturalidad con que se enfrentan a la consulta de genética los individuos atendidos mediante videoconferencia, sin duda por la cercanía del personal sanitario que le es absolutamente conocido, al igual que el entorno físico.

Consideramos una oportunidad única el ofrecer a los individuos analizados el transmitir toda la información resultante del proceso de su diagnóstico y consejo genético, a los médicos que ejercen en sus respectivos centros de salud. A pesar de ser ellos los que conocen y observan la evolución de los pacientes y sus familias, suelen quedar al margen de las conclusiones de este tipo de estudios. De nuevo el personal de enfermería participó muy activamente, trasladándoles los informes, árboles genealógicos y revisiones bibliográficas de la enfermedad depositados

en la historia informatizada de cada paciente/familia. Observamos un interés desigual de este colectivo por los estudios genéticos en marcha. Hemos puesto de manifiesto la necesidad de un equipo multidisciplinar que coordine e implique a todos los interesados e intercambie las experiencias en este ámbito.

Queremos destacar la diversidad de una consulta de diagnóstico y consejo genético en una región de gran extensión, bajo porcentaje de casos candidatos analizados e importante número de solicitudes por evaluar para grupos de patologías muy distintas. Dada la progresiva complejidad del conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad en humanos, se tiende a la hiperespecialización en nuestra disciplina. Por ello en nuestro ámbito resulta esencial permitir a los genetistas profundizar en el conocimiento de grupos de enfermedades, centrándose en los avances para su diagnóstico, la actualización de la literatura relativa, interacción con equipos de investigación especializados y protocolos internacionales consensuados para intervenciones médicas capaces de paliarlos.

En los cuatro últimos años se ha desarrollado ampliamente la cartera de servicios de nuestra Unidad, tratando de dar la mayor cobertura a las especialidades y patologías demandadas. Suponemos que la práctica a través de la telemedicina requerirá la evaluación continua de los análisis genéticos ofertados y técnicas empleadas, atendiendo a su coste-beneficio-eficiencia. Hemos asistido a las nuevas posibilidades que la unidad ofrece y a su capacidad para cambiar las metodologías y estrategias de nuestra asistencia sanitaria, las intervenciones y terapias médicas. La centralización de recursos tecnológicos, el envejecimiento de la población y la poca autonomía de los individuos afectados de la mayoría de las enfermedades genéticas pueden impulsar el uso de la telemedicina, por lo que se deben establecer cualificaciones específicas y normas de calidad obligatorias para quienes intervengan en el asesoramiento genético.

Las redes de telemedicina pueden resolver la obligatoriedad que tienen los sistemas sanitarios públicos de garantizar la igualdad de acceso a los análisis genéticos a todos los individuos que los necesiten. Unidades como la nuestra reciben cada vez más peticiones de pruebas y ya trabajan augurando para un futuro cercano un uso muy extendido de análisis de susceptibilidad a enfermedades de mayor prevalencia, técnicas de mucho menor coste para el diagnóstico de enfermedades raras y el desarrollo de disciplinas de gran rentabilidad como la farmacogenética. La telemedicina podría impulsar enormemente estas tendencias, al ofrecer a los grupos de población más alejados la posibilidad de de-

tección de estos trastornos; a pesar de sus beneficios será preciso controlar también sus posibles riesgos.

Hemos puesto de manifiesto la utilidad del sistema de videoconferencia utilizado para paliar la enorme necesidad de formación profesional respecto al progreso en salud y al potencial que existe en el ámbito de la genética médica. Los sistemas públicos de salud deben proporcionar profesionales formados y en número suficiente para que los beneficios de la genética se concreten y distribuyan a todos los ciudadanos.

El uso de la Red de Telemedicina de Extremadura contó con procedimientos adecuados de obtención de consentimiento informado, acceso igualitario a las pruebas, asesoramiento adecuado y protección de la confidencialidad. A pesar de que los datos genéticos con impacto clínico y/o familiar deben contar con el máximo nivel de protección, se debe hacer referencia al interés que los datos genéticos pueden tener para otros miembros de la familia. Igualmente se debe recalcar la importancia del derecho del paciente a saber o a no saber, incorporándose a la teleconsulta mecanismos que lo respeten. El acto médico tiene en general que satisfacer la necesidad de información, asesoramiento y asegurar la correcta comunicación de los resultados obtenidos.

Nos planteamos los riesgos de acceder con facilidad a núcleos poblacionales pequeños y de relativo aislamiento geográfico, pudiendo favorecer su estigmatización dentro de la comunidad; es esencial el reconocer y respetar las sensibilidades culturales. Por otra parte, estos grupos étnicos minoritarios no se deben ver excluidos de análisis genéticos de los que se puedan beneficiar.

La telemedicina constituye una herramienta importán-tísima para impulsar el desarrollo de proyectos de investigación en zonas con población dispersa, poblaciones con relativo aislamiento y acceso heterogéneo a centros sanitarios de referencia. Su éxito depende del uso correcto e intercambio de muestras de DNA de interés y datos asociados. Es imprescindible la disponibilidad de datos genealógicos, procedencia de la población, datos clínicos personales y familiares.

Nuestra situación geográfica dota a nuestro equipo de un potencial privilegiado para el intercambio transfronterizo de muestras y datos, pudiendo general resultados de gran interés para los grupos de investigación europeos del ámbito de la genética. Para todos los supuestos anteriores consideramos necesario respetar siempre las características socioculturales de la población, normativa y legislación internacional, nacional y en ocasiones local.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Extremadura (PRI08OB007) y por el Instituto de Salud Carlos III (07PI0594).

## REFERENCIAS

1. Gattas M, MacMillan J, Meinecke I, Loane M, Wootton R. Telemedicine and clinical genetics: establishing a successful service. *J Telemed Telecare*. 2001; 7:68-70.
2. Iredale R, Gray J, Murtagh G. Telegenetics: a pilot study of video-mediated genetic consultations in Wales. *Int J Med Marketing*. 2002; 2(2):130-5.
3. Hu P, Chau P. Physician acceptance of telemedicine technology: an empirical investigation. *Top Health Inform Manage*. 1999; 19(4):20-35.
4. Abrams DJ, Geier MR. A comparison of patient satisfaction with telehealth and on-site consultations: a pilot study for prenatal genetic counseling. *J Genet Couns*. 2006 Jun; 15(3):199-205.
5. Ziliacus E, Meiser B, Lobb E, Barlow-Stewart K, Tucker K. A balancing act--telehealth cancer genetics and practitioners' experiences of a triadic consultation. *J Genet Couns*. 2009; 18(6):598-605.
6. Savenstedt S, Bucht G, Norberg L, Sandman P. Nurse-doctor interaction in teleconsultations between a hospital and a geriatric nursing home. *J Telemed Telecare*. 2002; 8:11-8.
7. Torppa M, Timonen O, Keinanen-Kiukaanniemi S, Larivaara P, Leiman M. Patient-nurse-doctor interaction in general practice teleconsultations - a qualitative analysis. *J Telemed Telecare*. 2006; 12(6):306-10.
8. Tates K, Elbers I, Meeuwesen L, Bensing J. Doctor-parentchild relationships': a 'pas de trois'. *Patient Educ Couns*. 2002 Sep;48(1):5-14.
9. Bensing J, Dulmen SV, Tates K. Communication in context: new directions in communication research. *Patient Educ Couns*. 2003; 50:27-32.
10. Kessler S. Psychological aspects of genetic counseling IX: teaching and counseling. *J Genetic Couns*. 1997; 6(3):287-95.
11. Meiser B, Gaff C, Julian-Reynier C, Biesecker B, Esplen M J, Vodermaier A, et al. International perspectives on genetic counseling and testing for breast cancer risk. *Breast Dis*. 2007; 27:109-25.

# HETEROGENEITY OF THE GENETIC BASIS OF SEVERE OBESITY IN CHILDHOOD: CHARACTERIZATION OF A SERIES

M. González-Carpio<sup>1,2\*</sup>, P. Méndez<sup>3</sup>, M.V. Serrano<sup>2</sup>, G. Torres<sup>2</sup>, P. Sánchez-Giralt<sup>2,4</sup>, T. Herrera<sup>1</sup>, M.T. García de Cáceres<sup>1</sup>, R. Hernández-Sáez<sup>2</sup>, J.M. Carbonell<sup>1</sup>, J. Sáenz<sup>1</sup>, J.R. González<sup>5</sup>, L.M. Luengo<sup>2, 4</sup>, M. Núñez<sup>2,3</sup> and R. Rodríguez-López<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Genetics Unit, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain

<sup>2</sup>The Extremadura Obesity Observatory (OBEX.O), Badajoz, Spain

<sup>3</sup>Pediatric Service, Materno Infantil Hospital, Badajoz, Spain

<sup>4</sup>Service of Endocrinology, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain

<sup>5</sup>Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain

Abbreviated version of the Title: Genetic Heterogeneity of Childhood Obesity

Key words: obesity, inherited, childhood.

\*Corresponding author: M. González-Carpio

Genetics Unit, Infanta Cristina Hospital, Carretera de Portugal s/n, CP 06080, Badajoz, Spain.

Phone number: 0034 924218097 - Fax number: 0034 924218062 - E-mail address:  
[martacserrano@hotmail.com](mailto:martacserrano@hotmail.com)

## Acknowledgments

This work was supported by the ISCIII, Madrid for financial support (07PI594, 10PI357) and Fundesalud, Junta de Extremadura (11PRI041).

## Conflict of interest

The authors declare there is no competing financial interest in relation to the work described.

## ABSTRACT

The detailed study of single patients suffering from a syndromic obesity, and genome-wide association study (GWAS) strategies applied to large series of overweight individuals, have allowed the identification of genes and variants of susceptibility to these diseases. Here, the description of an entire series shows the great heterogeneity of the genetic alterations involved. These alterations are distributed among the population with frequencies inversely proportional to their deleterious capacity. Different combinations of low-risk alleles, such as rs9939609 in the *FTO* gene, define genetic susceptibility profiles which can explain a major proportion of the inherited risk of developing obesity. We propose that cases of severely obese children should be classified on the basis of extensive phenotypic descriptions and family history. Our genetic study protocol allowed the causative agent of the overweight to be identified in a large fraction of the patients in the series.

This study is part of the FIS PI594-07 (2007) project granted by the Carlos III Institute of Health to study the genetic basis of morbid obesity, developed at the Infanta Cristina Hospital (Badajoz, Spain).

## INTRODUCTION

Severe obesity in childhood is a leading preventable cause of death worldwide, and is one of the most serious public health problems of the 21st century. Morbid obesity in children and adolescents is a medical condition in which excess body size is defined, not as an absolute number, but as a BMI above the 95th percentile.

An ever more clearly defined number of cases are known to be due primarily to genetics, to medical reasons, or to psychiatric illness, and can be separated from the rising rates of obesity associated with non-genetic factors including ever more sedentary lifestyles. The heterogeneity of human disorders leading to profound deregulation of body fat mass is steadily being untangled. To date, many cases of human obesity have been associated with a single gene alteration (monogenic obesity), all of them corresponding to one of 11 genes (1). The continuing dissection of this aetiopathogenic heterogeneity will aid genetic counseling, prognoses, and the development of specific therapies (2). The commonest form of monogenic obesity accounts for 5% of all cases of severe childhood obesity. It is due to an *MC4R* mutation, and presents striking acceleration of linear growth and increased bone development at an early age. The *MC4R* gene encodes the melanocortin receptor-4 protein involved in feeding behaviour and the regulation of metabolism. It is reported that *MC4R* mutations generate an autosomal-codominant form of syndromic obesity (3). Apart from this, there are between 20 and 30 Mendelian disorders in which patients are clinically obese, but are additionally distinguished by mental retardation, dysmorphic features, and organ-specific developmental abnormalities (4, 5). A proportion of cases correspond to syndromic obesity arising from discrete genetic defects causing chromosomal abnormalities. These disorders may be either autosomal or X-linked. The commonest is Prader-Willi syndrome (PWS) (6), in which seven genes on chromosome 15(q11-13) are deleted or unexpressed (chromosome 15q partial deletion) on the paternal chromosome. The incidence is between 1 in 25 000 to 10 000 live births. It frequently appears associated with an extreme and insatiable appetite because of the disruption of the normal functioning of the hypothalamus, which directly contributes to obesity (7).

Ever greater knowledge of clinical cases led to the successful hypothesis of high susceptibility genetic variants underlying the phenotype, with some genes having a clear role in human monogenic obesity. Also, the in-depth molecular analysis of syndromic cases has shed much light on the aetiopathogenesis of obesity. Nevertheless, the molecular genetic analysis of obesity has led to the identification of just a limited number of confirmed major genes, and the underlying mutations are extremely infrequent and of minor clinical importance only. Instead, most of the genetic predisposition to obesity must be polygenic, with some 10 or so low-to-moderate risk variants being found in a major proportion of obese subjects. However, these obesity-predisposing variants are also found in normal weight and even lean individuals. Studies of polygenic obesity are based on the analysis of frequent single nucleotide polymorphisms (SNPs) and copy-number variations (CNVs). Recent advances in the identification of human obesity genes and the genetic effects on the development of overweight have derived from genome-wide association mapping (8, 9). This necessarily entails detailed statistical analyses of case-control studies to identify associations of a gene variant that are more frequent in obese than in non-obese subjects. Among more than 100 genes which have been implicated in determining body weight (10), this strategy has identified polymorphic sites in the fat mass obesity associated *FTO* gene as the most consistently associated with obesity (11, 12). *FTO* mRNA is regulated by feeding, and down-regulated by fasting in the arcuate nucleus in mice and humans (13, 14), and animal model studies have shown that the inactivation of the *FTO* gene protects from the development of obesity (15, 16). Studies in humans have provided evidence that *FTO* is essential for the normal development of the central nervous system (17). Various association studies have confirmed the relationship between these polymorphic sites and the risk of developing overweight in childhood (12, 18).

Although there is still only minimal use in clinical practice of the SNP risk associations with prevalent diseases, we considered it useful to assess the impact on a population of the susceptibility described in a specific region of the *FTO* gene. We took for the study a representative series of patients affected by severe childhood obesity. They had presented to our service in the context of

consultations for diagnosis and genetic counseling. Our aim was to distinguish if possible the cases of syndromic obesity, and non-syndromic monogenic and polygenic obesity. The algorithm established was focused on identifying the existence of deleterious genetic variants related to inherited susceptibility of suffering overweight, and to find evidence for high-risk variants in high-impact familial cases, and low-to-moderate risk variants more widely distributed among the obese population.

## MATERIALS AND METHODS

The staff of the Extremadura Obesity Observatory (OBEX.O) assessed 354 families affected with morbid obesity at a pre-puberal age. All of them were evaluated as part of their genetic counseling consultation. The probandi included in the study were more than 3 standard deviations (SD) heavier than the mean, younger than 14 years of age, and either associated with a syndrome phenotype or with a reference to at least two other early severe obesity cases in first or second degree relatives. We classified the patients into groups according to the symptoms they presented and the description of the familial phenotypes, the aim being to identify the presence of any of the monogenic obesity syndromes often associated with mental retardation, dysmorphic features, and/or congenital developmental abnormalities (OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>). For each patient, a questionnaire was completed of personal data and the construction of a broad family tree, referring to comorbidities and previous pathologies. It was taken as essential to obtain a quality family history, and we addressed origin and possible consanguinity. A physical examination provided data on age of onset of overweight ( $>3$  SD), BMI, waist and hip measurements, and serum glucose, total cholesterol, lipoproteins (HDL and LDL), and triglycerides. After obtaining informed consent for participation in the study, we requested samples of peripheral blood collected in lithium heparin and EDTA of the individual or individuals selected from the family tree and the family history referred to, and from 300 unselected control individuals paired by sex. The study was approved by the Committee for Investigations Involving Human Subjects of the Infanta Cristina Hospital.

Genomic DNA was extracted from whole blood using a QIAamp DNA Blood Kit. Genetics tests were performed using cytogenetic techniques, a high resolution molecular study for Fragile X syndrome, and methylation analysis to screen for PWS according to the phenotype of the patient and the family. We performed complete sequencing of coding and regulatory regions of specific candidate and *MC4R* and *LEPR* genes of the non-syndromic obese patients with familial antecedents suggesting a recessive pattern of overgrowth and hyperphagia (3130 Sequencer, Applied Biosystems).

We took the entire non-syndromic obese patient group as a series on which to conduct an association case-control study to analyze the implication of *FTO* variability in the molecular bases of overweight among early onset, severe obesity cases in the population of western Spain.

PCR reactions and genotyping of rs9939609 were performed using an Applied Biosystems TaqMan 7300 system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). SNP primers and probes were provided by ABI Assays-on-Demand (ID C\_30090620\_10). Details of the conditions are available on request.

Departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested as detailed in the literature (19). An SNP association analysis was performed using a likelihood ratio test based on logistic regression models, considering codominant, dominant, recessive, and additive modes of inheritance. We estimated the crude OR and 95% confidence intervals (95% CI). The HGMD Professional database was consulted to evaluate the previous descriptions of the variants detected in other patients.

## RESULTS

We suspected 35 patients as being affected by syndromic obesity. After applying the established diagnostic protocol, 9 of them showed cytogenetic abnormalities – 48,XXYY; 46,X,psu idic(X)(p.11.1); del1q32.1-32.2; del3q25.3-26.2; del6q25.2-25.3; del10p14-15.1; del11p12p15.1;

dup15q11-13; and dup17q11.11.1 – revealed by conventional cytogenetic techniques. We identified 4 patients who were affected by Prader Willi syndrome, and 6 who presented mutated alleles in the *FMR1* gene (affected by Fragile X syndrome), two of whom had developed a Prader-Willi like phenotype. We also identified 4 cases of syndromic obesity with monogenic molecular abnormalities, of whom two patients presented Bardet-Biedl syndrome, and one a C2202S mutation in exon 23 of the *NDS1* gene (Sotos syndrome). In two families (3 affected individuals), we are continuing the study for Kallman syndrome. The diagnostic protocol was completed with no findings in 12 patients with syndromic obesity, who presented heterogeneous phenotypes.

We believed that 77 patients were candidates for complete sequencing of *MC4R* and *LEPR* because, besides having reached a weight greater than 3 SD above the mean at the age of 14, their height was also above the 90th percentile. They had mentioned signs of hyperphagia and satiety deficiency in the clinical questionnaire. Although not diabetic, they were under review in our Endocrinology service for signs of insulin resistance, and their family pedigree showed a pattern of autosomal recessive inheritance of obesity. These patients were therefore classified as of high genetic risk. We detected the variants Val102Ile, His76Arg, and Gly32Glu in *MC4R*, and a TA dinucleotide insertion in the *LEPR* gene (Figure 1). Their characteristics are summarized in Table 1.

The entire series was used to investigate risk genetic profiles of polygenic non-syndromic obesity, and the *FTO* non-coding polymorphic rs9939609 site in the intron was evaluated as a deleterious obesity-inducing change. Genotype frequencies for controls were in Hardy-Weinberg equilibrium. The observed genotype frequencies of the rs9939609 SNP in the *FTO* gene resulting from the case-control association analyses are summarized in Table 2.

We analyzed obesity-related biochemical parameters (glucose, HDL, LDL, total cholesterol, and triglycerides) of the rs9939609AA patients paired by sex. We observed an increase in the LDL, triglycerides, and total cholesterol parameters among girls carrying the A allele in homozygous form. We found no association, however, between the risk rs9939609 and HDL among the girls.

HDL levels were the same between boys and girls carrying the A allele in homozygous form. No statistically significant association was found for the other biochemical parameters (data not shown) (Figure 2) (20).

## DISCUSSION

Our series revealed the heterogeneity and complexity of the genetic basis of severe overweight. The most recently published meta-analysis established that between 50% and 70% of the variation in body mass index among individuals is attributable to genetic differences. These risk-conferring genetic factors are very different in nature. One group consists of seldom found causal agents that generate Mendelian inheritance patterns and most of the phenotypes of syndromic obesity. The remainder are variants corresponding to mild-to-moderate increments in risk, are most often spread throughout the general population, and form the commonest patterns of familial aggregation of disease.

Although the frequency of syndromes associated with severe obesity is estimated at only around 5%, the in-depth study of those cases allowed genes associated with high susceptibility to severe overweight to be identified, also indicating routes to other candidate genes. The exact molecular descriptions of the genetic alterations that those patients carry allow guidelines to be established for the genetic counseling of each family involved. The main objective is to apply combined diagnostic strategies to prevent and manage overweight.

A strategy focused on the most frequently encountered cases of obesity is to try to identify the commoner low-to-moderate risk alleles. The rs9939609 SNP, located on intron 1 of the *FTO* gene, was found to be the best marker of inherited susceptibility for these characteristics. Even though the risks reported as attached to it differ between studies and populations, there is no doubt as to its association with the pathology (12, 21).

The first step was to exclude from the series of patients suffering from childhood obesity

those for whom the condition was a known secondary symptom. These were: (i) endocrine disorders; (ii) tumour surgery or radiation applied to the hypothalamic-pituitary area; and (iii) pharmacological treatment, in particular with psychoactive drugs.

The second step consisted in the description of syndromes associated with poly-malformation obesity. A growing number of syndromes are being described that are transmitted with a Mendelian inheritance pattern and that present with severe obesity as one of their phenotypic traits. Although in absolute numbers they are rare, the greatest prevalence of such syndromes presenting in our service has corresponded to the Prader-Willi, Bardet-Biedl, and Fragile X syndromes. It is interesting to note the difficulty that may be posed by the diagnosis of cases of this last pathology, since the phenotype mimics that of Prader-Willi syndrome. Two patients with abnormal karyotypes classified as variants of Turner syndrome 46,X,psu idic (X)(p.11.1) and Klinefelter syndrome (48,XXYY) presented severe obesity with no family history of overweight. We also identified 6 patients with mental retardation and/or malformations whose deleterious cytogenetic alterations are causal of phenotypes that include obesity. Their excess weight corresponded to more than 3 SD for their age, although they belonged to families with no history of obesity. The demonstrated susceptibility associated with each of the cytogenetic alterations makes an accurate molecular analysis of the genes involved with SNP/CNV or CGH (comparative genomic hybridization) arrays essential. We included in our series a single case of a girl of 18 months without any changes in weight, considering that her status as a carrier of the del10q26.2qter deletion makes her a candidate for high-risk monitoring to avoid severe obesity. Pending the molecular characterization of this case, the alteration identified suggests that she must have a haplo-insufficiency of brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*), a regulator of proliferation, survival, and differentiation of neurons during development, of neuronal plasticity of the nervous system, memory, behaviour, and cognitive development. In addition, *BDNF* is involved in energy metabolism and eating behaviour. We consider her therefore to be a patient affected with WAGRO syndrome (OMIM #612469) at high risk of a development that includes obesity.

The genotype frequencies of rs9939609 for syndromic obesity were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. The rs9939609 frequencies differed between obese subject carriers of rs993609TA (2.40) and rs993609AA (1.86), so that there is a link between the presence of the SNP in heterozygous form and the risk of becoming overweight, but this is not the case when the SNP appears in homozygous form. This apparent contradiction in the results may be due to the small sample size –35 patients– in the syndromic obesity group in our study. The biochemical abnormalities in these patients were associated with the different syndromes diagnosed.

After the first cases of obesity in humans caused by mutations in the *MC4R* gene (18q22, OMIM # 155541) (22, 23) were identified from clinical studies of obesity and major hyperphagia, these mutations have now come to be considered the commonest causes of monogenic human obesity. The worldwide prevalence of obesity-associated *MC4R* mutations has been estimated at between 2% and 5% (24), with, more recently, in a large cohort of obese and non-obese controls, it being found that the prevalence of obesity caused by heterozygous mutations in *MC4R* is 2.6% (25). Sequencing analysis of the *MC4R* gene revealed, in three families, one His76Arg and one Gly32Glu mutation, and one Val103Ile polymorphism. A total of 77 patients were classified as presenting monogenic obesity, and were also considered as from high-risk families. The His76Arg mutation has not yet been described in the public databases Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) or NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), and has not been detected in the individuals analyzed of a non-obese European control population. This carrier was the first to have been identified in the Extremadura population. Functional studies found no effect on the cAMP response to increasing concentrations of α-MSH for this mutation as compared to the wild type *MC4R* (26). The patient, a woman, heterozygous for the H76R mutation, was homozygous for rs9939609A. The mutation Gly32Glu, which neither has been described in the public databases, was identified in heterozygous form in one woman, again the first individual in whom it has been found in the Extremadura population. However, the prevalence of this variant has been described, being 0.67% in severely obese patients compared with controls. Its presence does not significantly affect the *MC4* receptor,

and it has been noted (27, 28) that its correlation with the occurrence of obesity has yet to be sufficiently demonstrated. In this patient's sample, no other alterations in the *MC4R* gene were identified that could, as the only cause, explain this case's referred familial pattern. This patient was also homozygous for the 9939609A SNP.

The Val103Ile polymorphism was identified in a heterozygous male patient. It is described in the public databases (Ensembl and NCBI) with an allele frequency of between 1 and 5%, much of the variability of this frequency corresponding to different ethnic groups. Studies of the possible functionality of the change (29, 30, 31) find it, as a low risk polymorphism, to have a likely effect on energy imbalance and feeding behaviour, in contrast with its lack of relationship with anthropometric parameters, metabolic syndrome, or cardiovascular risk. In this patient's sample, no other alterations in the *MC4R* gene were identified that could, as the only cause, explain this case's referred familial pattern. Functional studies of this variant find no indication that its presence is related to alterations in the *MC4R* gene. This patient, a heterozygous carrier of the Val103Ile polymorphism, was homozygous for the 9939609A SNP.

We also sequenced the leptin receptor gene (*LEPR*), and identified in one female patient a heterozygous TA dinucleotide insertion (g.145524\_145525insTA) which has not previously been described in the public databases (Ensembl and NBCI), localized in the intronic region 76 nucleotides before the start codon. This patient is the first individual in whom this variant has been found in the Extremadura population. There have as yet been no functional studies of this variant, and neither has its allelic frequency been described or validated (32). In this patient's sample, no other alterations in the *MC4R* gene were identified that could, as the only cause, explain the familial pattern in her family tree. This patient also was homozygous for the 9939609A SNP.

Careful examination and study of the biomarker levels (HDL, LDL, total cholesterol, triglycerides, and glucose), data provided to us by the Hospital's Endocrinology service, showed them to be unaltered in these four patients, and neither were there signs of metabolic syndrome or

cardiovascular risk. The patient carrying the rare *LEPR* mutation, however, presented short stature and hypothalamic hypothyroidism. None of the four presented any particular biochemical alteration not also presented by other obese individuals with distinct genotypes.

In considering high-risk criteria with respect to weight, age, and pedigree, we observed a high level of heritability of morbid obesity among those affected individuals considered as possibly non-monogenic. The variability of the *FTO* gene is of great interest in finding morbid-obesity susceptibility alleles. The findings confirm the published association of the presence of alterations in *FTO* and the appearance of polygenic obesity. Our series showed the significant heritability of obesity and its relationship with severe childhood onset. This property of the series (severe obesity in childhood) maximized the statistical power and reduced the necessary sample size for the variability in our association study. The risk estimates in other studies for the same genotypes are lower, being inferred from larger series but whose cases were selected only as being severe obesity which developed at any age. The present study demonstrates the importance of detecting the association between the presence of gene variants and the polygenic, multifactorial aetiology of most cases of severe obesity. In the present study, we identified an overall risk of 3.37 (OR: 1.80-6.31) for homozygous individuals (A/A) in the non-syndromic obesity group (monogenic plus polygenic non-syndromic obesity), although the allelic frequencies of this polymorphism present a major variation among different ethnic groups. We analyzed the correlation of obesity with some biochemical parameters (glucose, HDL, LDL, total cholesterol, and triglycerides) among patients AA homozygous for rs9939609, separated by sex. The levels of LDL, triglycerides, and total cholesterol were higher in women than in men, but there were no statistically significant associations with the other parameters. These results confirm the literature descriptions of the influence of the 9939609 SNP, although, as explained above, their estimates of risk are lower than ours because their series include morbidly obese patients selected solely by the criterion of weight.

These patients presented no particular biochemical alteration not also presented by other obese individuals with distinct genotypes (homozygous or heterozygous for the rs9939609 SNP)

within the same group of obesity.

In sum therefore, we have been able to define genetic profiles that can explain a significant proportion of the heritable risk of developing obesity in the Extremadura population, with different genetic, phenotypic, and biochemical characteristics. These results also demonstrate that patients can be classified into three groups according to the type of obesity they suffer: syndromic obesity, non-syndromic monogenic obesity, and non-syndromic polygenic obesity. Specialists should clearly treat these three types of obesity differently. The findings also confirm that our selection of patients based on personal and familial phenotype characteristics was correct. Indeed, one of the conclusions to be drawn from the results is that there is a clear need to define criteria to serve as a diagnostic tool differentiating patients' obesity as monogenic or polygenic according to the phenotype of their obesity and their pattern of familial inheritance. It is also essential to review the concept of morbid obesity itself, and to approach the question of obesity associated with mental retardation. Today, the power of different statistical treatments allows one to expect that an individual's inherited genetic patterns will be identifiable, with the capacity of predicting the individual's various risks. Finally, the diagnostic combination of biochemical and genetic tests will help individualize clinical practice, with strategies based on such a specialized multidisciplinary approach achieving a far greater rate of prevention than we know today.

## REFERENCES

1. Bell CG, Finner S, Lindgren CM et al. Integrated genetics and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. International Type 2 Diabetes 19 consortium. PLoS ONE 2010, 5.
2. O'Rahilly S, Farooqui IS. Genetics of obesity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2006, 361:1095-105.
3. Hinney A, Betteck T, Farnow P et al. Prevalence, Spectrum and functional characterization of melanocortin 4-receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. J Clin Endocrinol Metab 2006, 91:1761-69.
4. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. Nat Rev Genet 2005, 6:221-34.
5. Farooqui IS. Monogenic human obesity. Front Horm Res 2008, 36:1-11.
6. Chung WK. An overview of monogenic syndromic obesities in humans. Pediatr Blood Cancer 2011, 58:122-8.
7. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. Genet Med 2012, 14:10-26.
8. Peng S, Zhu Y, Xu F, Ren X, Li X, Lai M. FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. BMC Med 2011, 9:71.
9. Herbert A, Gerry NP, Mcqueen MB et al. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. Science 2006, 312: 279-83.
10. Leibel RL: Energy in, energy out, and the effects of obesity-related genes. N Engl J Med 2008, 359: 2603-4.
11. 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, 316: 889-94.
12. González JR, González-Carpio M, Hernández-Sáez R et al. FTO risk haplotype among early onset and severe obesity cases in population of Western Spain. Obesity 2012, 20: 909-15.

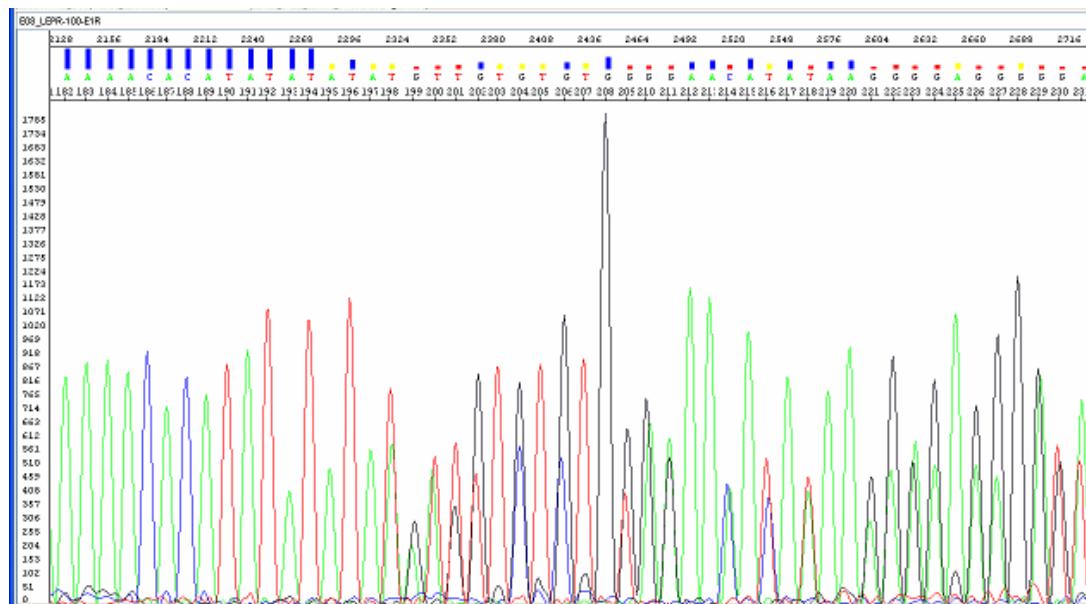
13. Gerken T, Girad CA, Tung TC et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007, 318:1469-72.
14. Stratigopoulos G, Padilla SL, LeDuc CA et al. Regulation of FTO/FTM gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, 294:1185-96.
15. Fischer J, Koch L, Emmerling C et al. Inactivation of the FTO gene protects from obesity. *Nature* 2009, 458:894-8.
16. Church C, Lee S, Bagg EA et al. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PloS Genet* 2009, 5.
17. Berulava T and Horsthemke B. The obesity-associated SNPs in intron of the FTO gene affect primary transcript levels. *Eur J Hum Genet* 2010, 1-3.
18. Boissel S, Reish O, Proulx et al. Loss of function mutation in the dioxygenase encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Human Genet* 2009, 85:106-11.
19. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005, 76:887-93.
20. Wing MR, Ziegler J, Langefeld CD et al. Analysis of FTO gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. *Hum Genet* 2009, 125: 615-26.
21. Rodríguez -López R, González-Carpio M, Serrano MV et al. Association of FTO gene polymorphisms and morbid obesity in the population of Extremadura (Spain). *Endocrinol Nutr* 2010, 57:203-9.
22. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 1998, 20: 113-4.
23. Yeo GS, Farooqui IS, Aminian S et al. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 1998, 20: 111-2.
24. Farooqui IS, Keogh JM, Yeo GS et al. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003, 348: 1085-95.

25. Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 1811-8.
26. Stuzmann F, Tan K, Vatin V et al. Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes* 2008, 57:2511-8.
27. Ahituv N, Kavaslar N, Schackwitz W et al. Medical sequencing at the extremes of human body mass. *Am J Hum Genet* 2007, 80:779-91.
28. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S et al. Association of functionally significant melanocortin-4 but not melanocortin-3 receptors mutations with severe adult obesity in a large North America case-control study. *Hum Mol Genet* 2009, 15: 1140-7.
29. Xiang Z, Proneth B, Diran ML et al. Pharmacological characterization of 30 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonist, synthetic agonist, and the endogenous agouti-related protein antagonist. *Biochemistry* 2010, 49:4583-600.
30. Stuzman F, Vatin V, Cauchi S et al. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: The two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet* 2007, 16: 1837-44.
31. Wang D, Ma J, Zhang S et al. Association of the MC4R V103I polymorphism with obesity: a Chinese case-control study and meta-analysis in 55,195 individuals. *Obesity (Silver Spring)* 210, 18: 573-9.
32. Park KS, Shin HD, Park BL et al. Polymorphisms in the leptin receptor (*LEPR*) - putative association with obesity and T2DM. *J Hum Genet* 2006, 69:76-85.

## FIGURES

**Figure 1**

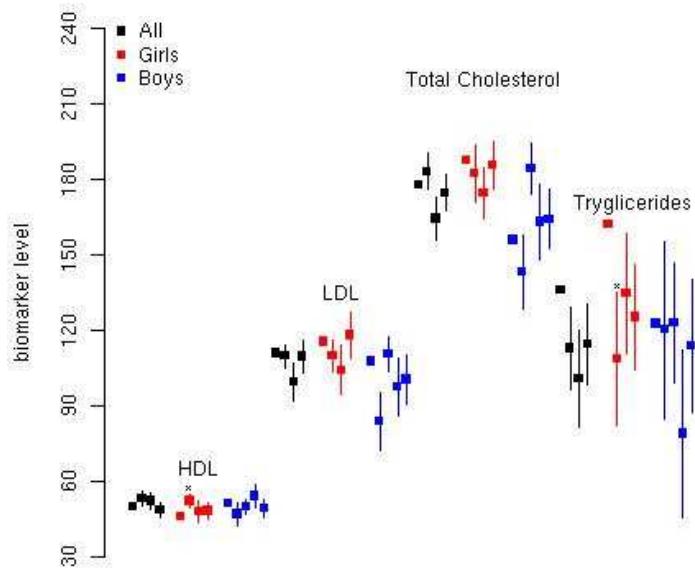
**TITLE:** IDENTIFIED g.145524\_145525insTA IN THE *LEPR* GENE.



**FOOTNOTE:** This image shows the change in heterozygosity of the TA dinucleotide insertion localized in the intronic region of the *LEPR* gene (identification by reverse strand automatic sequencing). The software program Seqscape allowed sequences obtained from the groups of patients analyzed in the series to be aligned and compared.

**Figure 2**

**TITLE:** ANALYSIS OF OBESITY-RELATED BIOCHEMICAL PARAMETERS ASSOCIATED WITH THE rs9939698A GENOTYPE.



**FOOTNOTE:** The analysis compares the levels of different Biomarkers (HDL, LDL, total cholesterol, and triglycerides) for rs9939609 SNP patients paired by sex. The rs9939609A risk allele was found to be associated in girls with LDL, total cholesterol, and triglycerides but not with HDL (20).

## TABLES

**Table 1**

**TITLE:** IDENTIFIED VARIANTS IN THE *MC4R* AND *LEPR* GENES.

GENE	ACCESSION NUMBER	CODON CHANGE HGMD	AMINO ACID CHANGE HGMD	PROTEIN HGVS	NUCLEOTIDE HGSV	CLASS	PHENOTYPE	REF.
MC4R	CM085524	CAT-CGT	His76Arg	H76R	227A>G	Missense. Unknown	Obesity autosomal dominant	26
MC4R	CM070989	GGA-GAA	Gly32Glu	G32E	95G>A	Missense. Unknown	Obesity autosomal dominant	27,28
MC4R	CM030481	GTC-ATC	Val103Ile	V103I	307G>A	SNP 2229616	Obesity autosomal dominant	29,30,3
LEPR	Not yet available	CAGACAA CT(-/ta)TAT Forward strand	Not yet available	Not yet available	Not yet available	Insertion	Unknown	Not published

**FOOTNOTE:** The table summarizes the characteristics of the changes identified in the *MC4R* and *LEPR* genes.

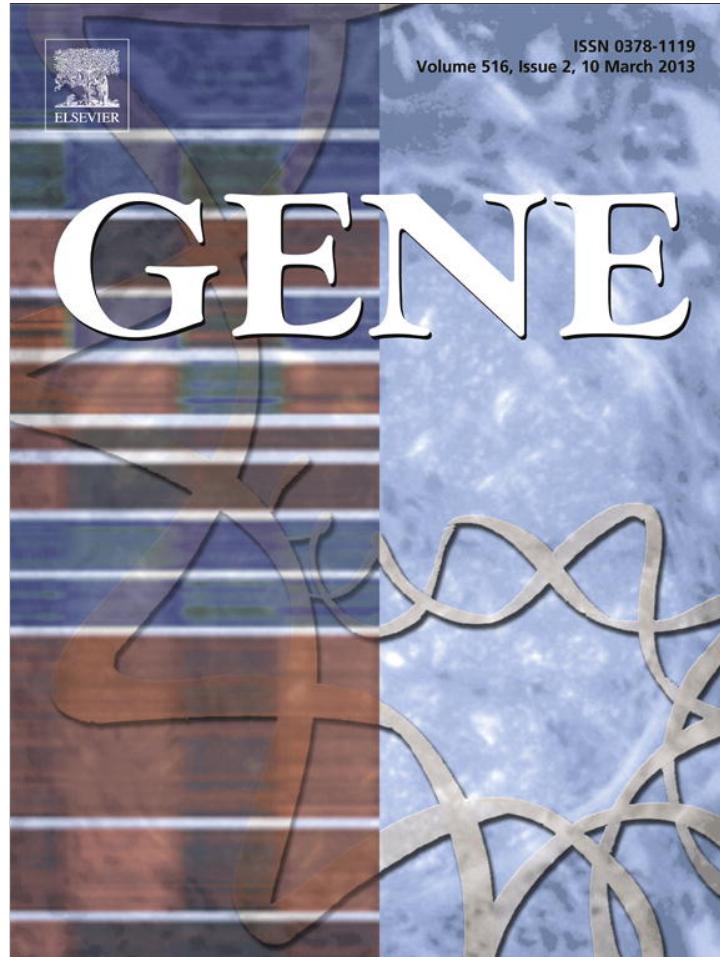
**Table 2**

**TITLE:** GENOTYPE DISTRIBUTIONS OF THE rs9939609 SNPs AMONG GROUPS OF PATIENTS ADJUSTED FOR PERSONAL AND FAMILIAL OBESITY PHENOTYPE.

rs9939609	TT	TA	OR	95% CI	AA	OR	95% CI
CONTROLS	87 (33%)	134 (51%)	-	-	42 (16%)	-	-
SOB	10(17.8%)	37(66%)	2.40	1.14-5.08	9(16%)	1.86	0.70-4.93
NSOB	24 (23%)	41 (39.5%)	1.11	0.63-1.96	39 (37.5%)	<u>3.37</u>	<u>1.80-6.31</u>
MNSOB	14 (18.1%)	42 (55.4%)	<u>1.95</u>	<u>1.00-3.78</u>	21 (27.2%)	<u>3.11</u>	<u>1.44-6.71</u>
PNSOB	38 (21%)	83 (46%)	1.42	0.89-2.27	60 (33%)	<u>3.27</u>	<u>1.89-5.66</u>

**FOOTNOTE:** The table presents the genotype distributions of the rs9939609 SNPs analyzed, adjusted for personal and familial obesity phenotype, and referred to a codominant inheritance pattern. The AA genotype was statistically significantly associated with the obesity phenotype among non-syndromic obese patients, including MNSOB and PNSOB (underlined). SOB: syndromic obesity; NSOB: non-syndromic obesity; MNSOB: monogenic non-syndromic obesity; PNSOB: polygenic non-syndromic obesity; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.

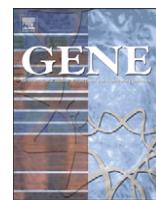


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## The modifier effect of the *BDNF* gene in the phenotype of the WAGRO syndrome

Raquel Rodríguez-López <sup>a\*</sup>, José M. Carbonell Pérez <sup>a</sup>, Aránzazu Margallo Balsara <sup>a</sup>, Guillermo Gervasini Rodríguez <sup>b</sup>, Trinidad Herrera Moreno <sup>a</sup>, Mayte García de Cáceres <sup>a</sup>, Marta González-Carpio Serrano <sup>a</sup>, Felipe Casanueva Freijo <sup>c</sup>, Juan Ramón González Ruiz <sup>d</sup>, Francisco Barros Angueira <sup>e</sup>, Pilar Méndez Pérez <sup>f</sup>, Manuela Núñez Estévez <sup>f</sup>, Enrique Galán Gómez <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Genetics Unit, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Medical School, University of Extremadura, Badajoz, Spain

<sup>c</sup> Department of Medicine, Santiago de Compostela University, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), CIBER de Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto Salud Carlos III, Santiago de Compostela, Spain

<sup>d</sup> Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Galician Public Foundation of Genomic Medicine, CIBERER, Genomics Medicine Group, Hospital Clínico, Santiago de Compostela, University of Santiago de Compostela, Galicia, Spain

<sup>f</sup> Unit of Genetic Paediatrics, Hospital Materno Infantil de Badajoz, Badajoz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 29 November 2012

Available online 21 December 2012

#### Keywords:

*BDNF*

WAGRO

Obesity

SNP/CNV array

### ABSTRACT

Individuals who are carriers of deletions of various sizes that cause haploinsufficiency in the contiguous *WT1* and *PAX6* genes, located on chromosome 11p13 approximately 4 Mb centromeric to the *BDNF* gene, are susceptible to Wilms tumor, aniridia, mental retardation, genitourinary anomalies and obesity (WAGRO syndrome). The molecular characterization of the wide deletion 11p15.1p12 arr (18676926–36576388) x1 dn in a child with 3 years and 4 months of age only affected by aniridia, predicts not only other serious associated diseases, but also allows us to hypothesize a specific phenotype of mental impairment, conduct alterations and childhood obesity, possibly added to the onset of metabolic alterations. The variable appearance and/or description of haploinsufficiency for obesity susceptibility in the WAGR syndrome mainly depends on the critical region located within 80 kb of exon 1 of *BDNF*. The relationship between genetic variation based on the genotype combinations of the 4 gene SNPs tagging the *BDNF* gene and the body mass index (BMI) was studied. The polymorphic variability was similarly distributed in 218 children suffering a severe and non-syndromic obesity from families at high risk for obesity, as compared with 198 controls. The corroborated role of the *BDNF* gene as highly susceptible to severe syndromic obesity has not already been evidenced in the molecular basis of overweight attributed to the common polygenic principles. Its potential role as risk modifier variant to provoke more severe phenotype has not yet been demonstrated. Some genetic variants of brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) have resulted in important disorders of energy balance, but it is essential to know exactly their deleterious human capacity because they play a fundamental role in the development and plasticity of the central nervous system in regulating food intake. The existence of polymorphic amino acid changes of unknown functional significance in patients carrying the haploinsufficiency of the *BDNF* gene could constitute an adequate model to study in depth their effects.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** *BDNF*, brain-derived neurotrophic factor gene; *Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor protein; BMI, body mass index; *CAT*, chloramphenicol acetyltransferase gene; *CD44*, CD44 antigen gene; *CD59*, CD59 antigen gene; *ChAS*, The Affymetrix® Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software; CNV, copy-number variations; *CSRP3*, cysteine and glycine-rich protein 3 gene; *dbSNP*, Single Nucleotide Polymorphism Database; *DECIPHER*, Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources; *DGV Align*, Alignment DataGridView ; *FANCF*, Fanconi anemia, complementation group F gene; *FSHB*, Follicle stimulating hormone, beta polypeptide gene; *GTG* banding, Giemsa banding; *GWAS*, Genome-wide Association Study; *ISCA*, The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium; *LIN7C*, Lin-7 homolog C gene; *LMO2*, LIM domain only 2 (rhombotin-like 1) gene; *MC4R*, Melanocortin 4 receptor gene; *OMIM*, Online Mendelian Inheritance in Man database; *P*, Percentile; *PAX6*, paired box 6 gene; *PCR*, the polymerase chain reaction; *PRRG4*, proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane) gene; *RAG1*, recombination activating gene 1; *RAG2*, recombination activating gene 2; *SIFT*, Simple Internet Filtration Tool; *SLC1A2*, solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2 gene; *SLC6A5*, solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 5 gene; *SNP*, single nucleotide polymorphism; *WAGRO*, Wilms tumor, aniridia, genitourinary, mental retardation, obesity; *WAGR*, Wilms tumor, aniridia, genitourinary, mental retardation; *WT1*, Wilms tumor 1 gene.

\* Corresponding author at: Genetics Unit, Infanta Cristina Hospital, Carretera de Portugal, 06080, Badajoz, Spain. Tel.: +34 924 21 80 97; fax: +34 924 21 80 62.

E-mail address: [raquel.rodriguez@ses.juntaextremadura.net](mailto:raquel.rodriguez@ses.juntaextremadura.net) (R. Rodríguez-López).

## 1. Introduction

WAGR syndrome is a contiguous gene syndrome due to deletion at chromosome 11p13 in a region containing the WT1 and PAX6 genes. Despite of its low frequency, numerous WAGR syndrome cases with overlapping interstitial deletions on the critical domain have been documented. A specific phenotype of WAGR including obesity (WAGRO) has been associated with haploinsufficiency of the BDNF gene. Other symptoms of WAGRO syndrome may also be pointed out, as excessive food intake (polyphagia/hyperphagia), early-onset overweight and high blood cholesterol levels. It is widely accepted that the variation in the clinical features of the patients depends on the size and molecular characteristics of the deletions (Fischbach et al., 2005). WT1 and PAX6 are widely accepted as responsible for the common oncogenic (WT1), ocular and genitourinary features (PAX6) of the syndrome, but it remains unclear which other genes in/or close to the WAGR locus may contribute to a more severe phenotype. Patients with PAX6 mutations have evidenced its role in aniridia, and series of individuals carrying deletions including that gene, have suggested its implication in human behavioral and neurodevelopment phenotypes (Malandrini et al., 2001; Tzoulaki et al., 2005; van Heyningen and Williamson, 2002; van Heyningen et al., 2007). If the deletions encompass the genes BDNF and LIN7C, added to the haploinsufficiency of the PAX6 and WT1 genes (including from the chromosome positions 27,472,546 to 32,413,663), the patients may exhibit variable degrees of developmental delay, attention deficit hyperactivity disorder, autism, and cognitive and memory dysfunctions. Those clinical signs usually appear added to an increased food intake and a severe overweight. The previous description of the phenotype from some WAGR series, allows for hypothesizing that the deletions which include the genes SLC1A2 and PRRG4 plus the BDNF gene (from the chromosome positions 26,645,141 to 32,832,681), generate a more altered mental development (Han et al., 2008; Shinawi et al., 2011). BDNF modulates synaptic plasticity and in relation to learning and memory, it mediates its long-term potentiation and may alter the intrinsic biological activity of the hippocampus neurons, leading to impairments function in humans (Egan et al., 2003). It is also expressed in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus where nutrition is regulated by leptin, and lies downstream of MC4R neuronal pathways.

It has been published that the frequent and nonconservative polymorphism in the human BDNF gene (dbSNP rs6265) alters the intrinsic biological activity of the hippocampal function. This single nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide 196 (G/A) produces an amino acid substitution (valine to methionine) at codon 66 (val/66met). Met/Met subjects exhibited lower memory score than other genotype groups. Also Val/Met subjects showed an abnormal pattern of increased bilateral hippocampus activation compared to baseline Val/Val subjects. In vivo measures of neuronal/synaptic activity in the human hippocampus formation corroborated that individuals with the Met allele, tended to have lower intracellular neuronal/synaptic activity (Egan et al., 2003).

We detailed the molecular genetic characterization of a girl who carries a deletion of 40 Mb in the 11p15.1p12 chromosomal region (from 18,676,926 to 36,576,388). She was affected with aniridia as the only clinical sign from birth day. High-density SNPs/CNVs microarray was used to delineate the deleted genes and to define how the area in haploinsufficiency could possibly contribute to the phenotype development. Sequencing of the BDNF gene of the remaining allele also offered data.

Due to the critical region for childhood-onset obesity in the WAGR syndrome which has been localized within the 80 kb region of exon 1 of BDNF, we analyzed the relationship between its genetic variation and the body mass index (BMI) in 218 Spanish patients affected by non-syndromic and severe obesity, and belonging to families with high risk antecedents for severe body overweight. Our goal was to design individual and more effective protocols, to suggest less damaging treatments for children with WAGRO syndrome, and to study the cause of this disease.

## 2. Patient and methods

A female child was born as the product of the first pregnancy of unrelated and asymptomatic parents; she was considered a candidate for cytogenetic studies because of bilateral and complete aniridia which was present since birth. The pregnancy and delivery were achieved at 34 weeks and 6 days of gestation [birth weight 2.050 g (P15) and length 41 cm (<P3)] by cesarean section for intrauterine growth retardation. Her head circumference was 31 cm (P20) and the maximum weight loss was at the third day of life and reached 7% weight recovery on the 14th day. Metabolic screening tests, brain and abdominal ultrasound, audiometric tests and other physical examination showed normal results. She suffered an asymptomatic hypocalcemia (minimum values of calcium of 0.97 ml/l) of two days duration, in the second week of life; responding to the biochemical alteration to calcium gluconate.

After obtaining informed consent, peripheral blood lymphocyte cultures of the proband and her parents were set up by standard techniques for karyotyping with high resolution GTG banding.

The deletion was detected using the Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7 M Array. Data was collected using Gene Chip Scanner 3000 Dx and CEL files were analyzed using Chromosome Analysis Suite software (ChAS v1.1). The annotation file used was hg18. Detected CNVs were compared with the Database of Genomic Variants (DGV) <http://projects.tcag.ca/variation> and with the International Standards For Cytogenomic Arrays Consortium (Public ISCA database) <https://www.iscaconsortium.org>. The Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans (DECIPHER; <https://decipher.sanger.ac.uk>) was used as main resource for evaluating the clinical significance of the detected alterations.

Bidirectional sequence analysis of genomic DNA including the two exons of the BDNF gene (ENSG00000176697, chromosome 11: 27,676,440–27,743,605, transcript length: 3829 bps and translation length: 247 residues) as well as intron-exon boundaries, was initially performed on the proband and 30 patients from the non-syndromic and severe childhood obesity series. Primer sequences used for amplification were designed with Primer 3 software (primer sequences available upon request). Sequencing was performed on an ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems) using Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Chemistry (Applied Biosystems), according to protocols recommended by the manufacturer. Base calling was performed with Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems). The sequences were analyzed with the Stadden package software and the Applied Biosystems SeqScape Software v2.5.

The rs6265 was genotyped on 198 control individuals from the same population as the cases were from, by the polymerase chain reaction (PCR) in a total volume of 10 ml containing: 50 ng of template DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM of dNTP (Pharmacia Biotech), 10 pmol of each oligonucleotide (Life Technologies) and 0.25 U of Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim). Amplification conditions consisted on an initial 4 min denaturation step at 94 °C, 32 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C and 30 s at 72 °C, followed by a final extension of 10 min at 74 °C. Primer sequences were 5'-AGGTGAGAAGAGTGATGACC-3' and 5'-CTGGACGTGTACA AGTCTGC-3'. The Val66Met SNP changes an Nla III restriction site. In the presence of the Met66 allele, digestion with Nla III produces five fragments of 80, 77, 62, 58 and 15 bp, whereas the Val66 allele produces 4 fragments of 157, 62, 58, and 15 bp.

The prediction of the potential impact of the SNP rs6265 on the structure and function of the protein was carried out using the Alamut Mutation Interpretation Software v2.0, which incorporates the online prediction tools: PolyPhen-2, SIFT and Align GVGD.

A genotyping study based on the interindividual genetic variability of the BDNF gene in 218 non-syndromic extreme obese children belonging to high risk obesity families, showed that 57% had three obese individuals among first, second, and third degree relatives. The mean age of

appearance of overweight, considered as greater than 3 SD, was at six years of age (range 1–16). The patients were compared with 198 unselected control individuals, who were chosen as representative of the same genetic background as the cases, and matched by sex; ages from 22 to 81 years.

European material CEU was downloaded from the International Haplotype Mapping Project web site ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27\\_B36](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27_B36)) and tag SNPs were assigned using the Haplovview software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haplovview/>). The considered minor allele frequency was 10%, and pair wise tagging with a minimum  $r^2$  of 0.80 was applied to capture the common variations. A set of the 4 tag SNPs rs11030102, rs10835210, rs16917237 and rs11830119 were selected within a 46, 5 kb region that encompasses the *BDNF* gene (from contig NT\_009237.18 chromosome position 27,681,596 to 27,728,102). They captured most of the common variations of the gene, as well as within its adjacent candidate region, among the listed on the SNP and HAPMAP databases. None of those common SNPs were predicted to generate amino acid substitutions and the suggested obesity-associated SNPs were intronic.

Data regarding common SNPs and linkage disequilibrium values in Caucasians were obtained from Genetic sequence database at Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) and HAPMAP ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for all the biallelic SNP markers were tested using a fast exact test as described in González et al. (2007). Genotyping analyses were carried out based on the commercially available iPLEX® Sequenom's primer extension methods and Mass ARRAY MALDI-TOF mass spectrometry-based platform. Detailed conditions are available upon request. SNP association analysis was performed using likelihood ratio test based on logistic regression models considering codominant, dominant, recessive and additive modes of inheritance. The crude OR and 95% confidence intervals (95% CI) were estimated.

### 3. Results

Karyotyping to patient affected with bilateral aniridia from birth-day and her parents revealed in the girl 46, XXdel11p15.1-12 dn. In the last review at 3 years and 4 months of age, the patient showed a larger left eye with unilateral cataract, glaucoma, horizontal palpebral fissures and mild bilateral horizontal nystagmus, atrophic macula and optic nerve. The girl showed noticeable delay, especially in speech, and the physician had a high index of suspicion to consider the diagnosis of mental retardation and general inability to do things on her own. Although there were not dysmorphic signs, a thin upper lip and an elongated philtrum could be appreciated. She did not control sphincters and presented a continuous slobbering with no signs of hyperphagia. Anthropometric parameters were still under the normal ones: weight 12.2 kg (P3), height 87.3 cm (<P3) and head circumference of 47.0 cm (P3).

Tumor markers in the blood and urine remained normal. Abdominal ultrasound and the rest of the clinical evaluation resulted with no other findings.

The proximal breakpoint was determined using the ChAS software (hg 18) at chromosome position 18,676,926 affecting the *TMEM86A* gene, and distal breakpoint at 36,576,388 within the *RAG2* gene (Fig. 1).

The size deletion was 40 Mb encompassing a total of 124 genes or open reading frames, including the genes: *CSRP3*, *SLC6A5*, *FANCF*, *BDNF*, *FSHB*, *PAX6*, *WT1*, *CD59*, *LMO2*, *CAT*, *CD44*, *RAG1* and *RAG2*, which had OMIM (OMIM ID: 601240) entrance (Table 1).

The *PAX6* haploinsufficiency explained the development of eye abnormalities observed, also attributed to region 100 kb distal to the 3' prime end of *PAX6*, which harbors regulatory elements for *PAX6* expression and contained enhancer elements. We narrowed the deleted region by assessing heterozygosity of the genotypes generated from the SNP array. Additionally, the coding regions and exon boundaries of *BDNF* were sequenced in the proband to rule out the possibility of compound

heterozygous functional variants. Only the rs6265 variant was identified, which produces the amino acid substitution GTG/ATG, V (Val)/M (Met) in the 66 codon position. The change appeared in the homozygous condition, due to the haploinsufficiency of *BDNF* gene in the patient. The allele frequency among control population for the allele A of the rs6265 was 21.1%; therefore the prevalence did not differ significantly in respect to 30 patients selected for suffering non-syndromic childhood and severe obesity. The genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium. Alamut software predicts a deleterious capability for this variant.

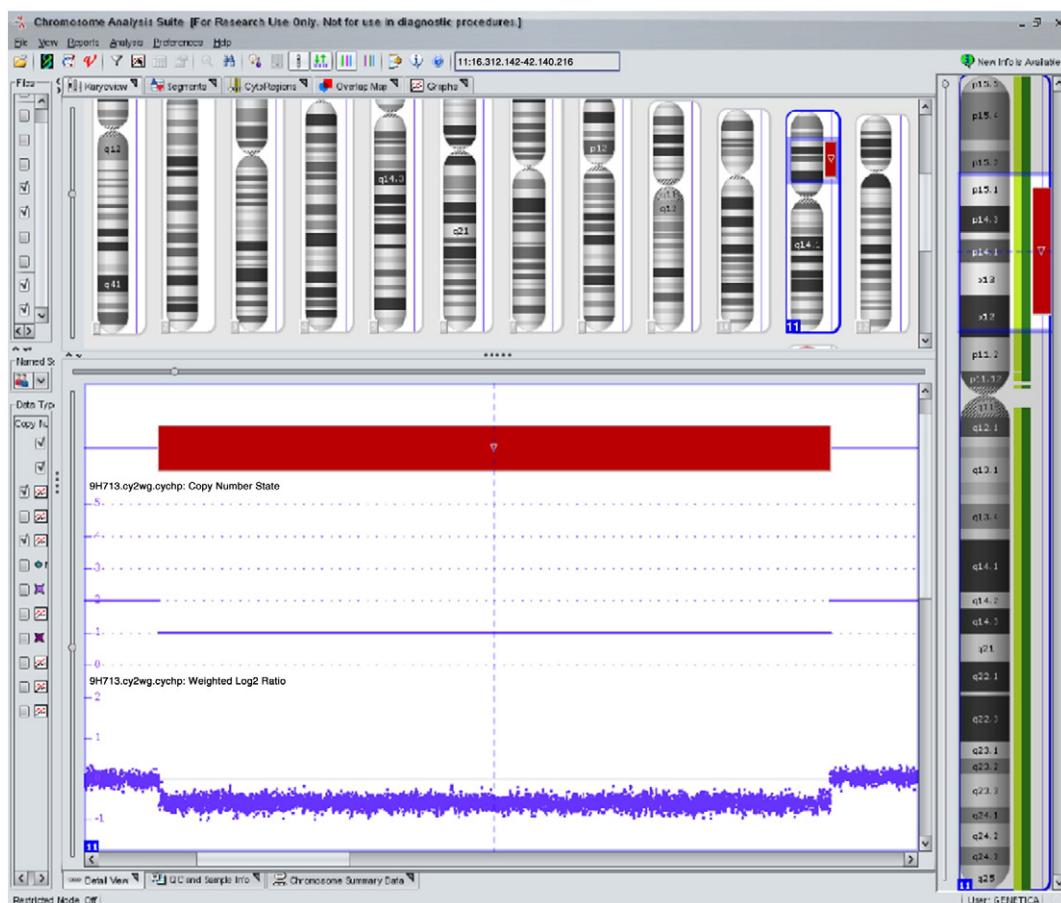
The observed and expected genotype frequencies of the 4 studied tag SNPs in the *BDNF* gene from the case–control association analyses were similar (they are summarized in Table 2). No difference was statistically significant for the four established comparisons in the selected SNPs. Considering all observed haplotypes and disequilibrium block structures, the results from the sliding window analysis did not point to any markers as possibly having any low to moderately implication in overweight risk. Their distribution among cases and controls in our series were similar (data not shown).

### 4. Discussion

The molecular characterization of a much larger deletion than those shown in the region responsible for the syndrome of WAGR in a girl aged six months, evaluates the deleterious capabilities of the global list of the genes acting under a haploinsufficiency, based on their functional role and inheritance patterns. Individualized monitoring strategies were focused on primary and secondary prevention of expected signs and symptoms. The predicted genotype–phenotype relationship was established from the published data of patients affected with WAGR or WAGRO syndrome, who were analyzed at older ages (Han et al., 2008; Shinawi et al., 2011; Xu et al., 2008). The physical 40 Mb de novo del11p15.1-12 identified in the girl, includes 13 OMIM morbid genes affected. It was tabulated to the 25 entries existing in the DECIPHER database (<https://decipher.sanger.ac.uk/syndrome/35>) whose detailed deletions ranging from 1 up to 26.5 Mb (search web page results for ‘chr11:18676926–36576388’). All of them were characterized as WAGR 11p13 deletion syndrome, due to their variable size but always including the genes *WT1* and *PAX6* that account for the common oncogenic (*WT1*), ocular and genitourinary features (*PAX6*) of the syndrome. The data base assumes that individuals affected by WAGR syndrome typically have low-normal birth weight. A substantial proportion of patients develop a marked obesity, being that susceptibility attributed to the deleted brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) (Han et al., 2008), which encodes a component of the leptin signaling pathway in energy homeostasis (Gray et al., 2006). The patient carried a much broader than the described deletions which included all the major genes involved in the WAGRO phenotype: *WT1*, *PAX6*, *BDNF* and *SLC1A2*.

The suppression of *PAX6* and its regulatory elements located 5' of the gene, as well as other upstream elements explained the congenital aniridia and cataract in the patient (Kim and Lauderdale, 2006; Kleinjan et al., 2006; Lauderdale et al., 2000). In the final clinical carried out at 18 months old, only eye malformations and optic atrophy were evident. Clinical follow-up has focused on the early diagnosis of a possible Wilms tumor, which is non-existent so far. It is accepted that the existence of a metabolic phenotype and neurobehavioral impairment related to the haploinsufficiency of the *BDNF* gene, including severe hyperphagia, altered cognitive function and memory, added to a characteristic hyperactive behavior.

The contribution of the deletion of the *SLC1A2* gene added to the lost *BDNF* seems to be more deleterious because it is also capable to develop autism and mental retardation (Xu et al., 2008). At 18 months of age, speech and language were still not evident thus showing a delayed developmental milestone. The baby had not deviated from the predicted percentiles during the 1st year and a half of life, although the



**Fig. 1.** Affymetrix whole-genome human SNP 2.7 analysis. Deletion region 46, XXdel11p12–15.1 dn in patient. The deletion is 40 MB and contains a number of other potential autism candidate genes. The distal breakpoint was determined using the ChAS software at chromosome position 18,676,926 affecting the TMEM86A gene and distal breakpoint at 36,576,388 within the RAG2 gene.

acceleration in weight gain has been described to start at the beginning of the second year of life (Shinawi et al., 2011). The WAGRO patients reach BMI around 4.3 SD above the age-related population-based mean, that is at 8 years of age. By 10 years of age, 100% of the patients with heterozygous *BDNF* deletions are obese (BMI > or = 95th percentile for age and sex) as compared with 20% of persons without *BDNF* deletions (Han et al., 2008).

In respect to the existence of the V66M variant in the remaining allele of the *BDNF* gene (dbSNP no. rs6265), we consider interesting to

assume an increased susceptibility of the patient to the development of these clinical symptoms derived from a deficient function of the Bdnf protein. For this assertion we rely on the software Alamut, which attributed a harmful capacity for such a variant, although 7.5% of the control subjects were homozygous AA for this polymorphism. The case of another patient with a haploinsufficiency of *BDNF* gene and carrying the rs6265 in the allele on an intact chromosome has also been published. Functional tests showed the carrier individual had a monoallelic expression of the gene and had reduced levels of serum

**Table 1**  
Annotations of the deleted genes included in the OMIM morbid map.

Annotation	Gene	Min/max chrom. location	Size (kbp)	OMIM morbid ID
Cardiomyopathy familial hypertrophic (612124)	<i>CSRP3</i>	19,160,153/19,180,106	19.953	612124
Hyperekplexia (149400)	<i>SLC6A5</i>	20,577,521/20,633,186	55.665	149400
Fanconi anemia	<i>FANCF</i>	22,600,654/22,603,963	3.309	107269
Central hypoventilation syndrome congenital (209880)	<i>BDNF</i>	27,633,019/27,677,790	44.771	209880
Folliclestimulating hormone deficiency isolated (229070)	<i>FSHB</i>	30,209,138/30,213,400	4.262	229070
Cataract with late onset corneal dystrophy (604219)	<i>PAX6</i>	31,762,916/31,789,455	26.539	604219
Frasier syndrome (136680)	<i>WT1</i>	32,365,900/32,413,663	47.763	136680
CD59 deficiency (612300)	<i>CD59</i>	33,681,133/33,714,601	33.468	612300
Leukemia	<i>LMO2</i>	33,836,700/33,847,947	11.247	604159
Acatalasemia	<i>CAT</i>	34,417,053/34,450,182	33.129	180385
Blood group	<i>CD44</i>	35,116,992/35,210,524	93.532	107271
Severe combined immunodeficiency B cell negative (601457)	<i>RAG1</i>	36,546,138/36,557,884	11.746	601457
Combined cellular and humoral immune defects with granulomas (233650)	<i>RAG2</i>	36,570,070/36,576,388	6.318	233650

Table 1 shows the relationship of genes located in the region deleted in our patient and have input into the molecular OMIM basis of clinical and/or conditions defined. The annotation file used was hg18.

**Table 2**Case-control association analyses in the *BDNF* gene, adjusted by sex in a codominant model.

rs SNP	Controls (%)	Cases (%)	OR	Lower-upper	p-value codominant	HWE(control)	HWE(cases)	Missing (%)
<i>rs11030102</i>								
C/C	111(62.4)	127(60.8)	1.00		0.3150	0.6466	0.4294	1.5
C/G	61(34.3)	69(33.0)	1.02	0.66–1.58				
G/G	6(3.4)	13(6.2)	2.14	0.77–5.92				
<i>rs10835210</i>								
C/C	68(38.0)	68(32.9)	1.00		0.4162	0.1630	0.1222	1.8
A/C	77(43.0)	91(44.0)	1.21	0.76–1.92				
A/A	34(19.0)	48(23.2)	1.45	0.83–2.55				
<i>rs16917237</i>								
G/G	100(57.1)	129(67.2)	1.00		0.05835	0.6851	1.0000	6.6
G/T	63(36.0)	57(29.7)	0.68	0.44–1.07				
T/T	12(6.9)	6(3.1)	0.37	0.13–1.03				
<i>rs11030119</i>								
G/G	85(49.7)	107(53.2)	1.00		0.4600	0.0829	0.7212	5.3
A/G	78(45.6)	81(40.3)	0.81	0.53–1.24				
A/A	8(4.7)	13(6.5)	1.30	0.51–3.33				

Table 2 shows the genotype information of SNPs covering the *BDNF* gene. For each SNP, the two alleles, major allele frequency (MAF), Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test, and percentage of missing genotypes are described. The *p*-value for the HWE test was done on the controls and cases. No statistically significant differences were observed in our series.

*BDNF* protein if compared with control subjects (Gray et al., 2006), although recent GWAS strategies did not corroborate that severance (Terracciano et al., 2011).

Identified Val66Met polymorphism has been analyzed in relation to various pathologies in large series of individuals of different ancestries. It is associated with poorer episodic memory, abnormal activation of the hippocampus and eating disorders (Monteggia et al., 2004). Other positive associations with Parkinson's disease have also been detailed (Lin et al., 2011; Liu et al., 2012).

The existence of mutations or haploinsufficiency that causes monoallelic expression of *BDNF* has been widely associated with the development of the phenotypes with obesity and hyperphagia, based on a diminished secretion of the protein. It was expected that serum concentrations of *BDNF* in the patient were to be approximately 50% lower than physiologically normal metabolic conditions. Blood glucose uses to be normal, but checking the possible existence of fasting hyperinsulinemia has been considered as suitable (Gray et al., 2006; Han et al., 2008). Some infrequent and unknown functional genetic variants, in particular the *BDNF* polymorphism p.Val66Met, have also been related to low-moderate susceptibility to body overweight and other complex eating disorders.

Strict monitoring of these patients is a safe tool to increase the clinical utility of the card for the syndrome genes WAGR (Clericuzio et al., 2011) and to define in detail the WAGRO syndrome. In the Decipher database WAGR 11p13 deletion syndrome is described (<https://decipher.sanger.ac.uk/syndrome/35>) as associated to deletion variable in size (from 1 to 26.5 Mb) and always including the genes *WT1* and *PAX6*. Obesity is not included in the main features of the four described phenotypes, although it is reflected that a substantial proportion of cases develop marked obesity, mediated by brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*).

We have derived the patient to pediatric specialists to design clinical examination to look for brain abnormalities by magnetic resonance (Bamiou et al., 2007), so as to establish an individually tailored management and in order to select the optimal treatment for the control of hyperphagia, hyperactivity and nociceptive deterioration. Modulation of synaptic plasticity may be a primary prevention and therapeutic approach for the treatment of obesity in this patient. It is essential to take into account that using strict food restriction management, binge eating, hyperphagia and overweight can be activated (Cordeira et al., 2010).

The valuation of *BDNF* as a capable gene involved in developing obesity associated to a syndromic phenotype may not be considered as the unique causal molecular base. The existence of low to moderate risk genetic attributable to interindividual variability cannot be excluded. The diverse strategies used to clarify the impact of polymorphic variants associated with amino acid change need precise, extensive and complete functional studies to obtain conclusive results with clinical applicability. The SNP rs6265 was evaluated in depth using well designed *in vivo/in vitro* strategies, which concluded that this specific genetic polymorphism is a deleterious factor in altered human hippocampus function. The Met allele was considered capable of contributing to generate other human illnesses, and carrier patients might suffer greater functional impairment (Egan et al., 2003).

Genotype distributions of the 4 selected tag SNPs which reveal the whole disequilibrium block diversity of the *BDNF* gene, were investigated to identify common susceptibility in genetic profiles to severe obesity from childhood at the *BDNF* susceptibility locus. There is no prior description of low to moderate risk polymorphic causative variants though the sequence is strongly maintained across species in this region. No association was evidenced in our series either.

## 5. Conclusions

1. We aim to demonstrate the importance of taking into account the clinical implication of the *BDNF* gene in the WAGR syndrome, generated by the loss of genetic material added to the possible existence of other genetic functional variants in its genomic region.
2. Individually tailored management and treatment for the control of hyperphagia and obesity may be considered essential to reduce disabilities as origins of major morbidities.
3. The molecular analysis of the exact deleted genomic region around the location of *WT1* and *PAX6* genes (associated to WAGRO syndrome), and sequencing of the remaining intact allele in those patients, are needed to assess the risks of developing more severe phenotypes associated with mental retardation.

## Acknowledgments

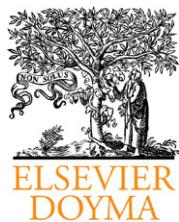
We would like to acknowledge the family that participated in this research, NODO Cegen; María Torres Español, and Elly van der Maesen de Sombrell who provided us help with the language.

**Disclosure**

All the authors recognize and disclose to have no conflict of interest to declare. Financial support: ISCIII (PI07/594 and PI10/357) and Fundesalud, Junta de Extremadura, (08PRI008).

**References**

- Bamiou, D.E., et al., 2007. Auditory interhemispheric transfer deficits, hearing difficulties, and brain magnetic resonance imaging abnormalities in children with congenital aniridia due to *PAX6* mutations. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161, 463–469.
- Clericuzio, C., Hingorani, M., Crolla, J.A., van Heyningen, V., Verloes, A., 2011. Clinical utility gene card for: WAGR syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 4.
- Cordeira, J.W., Frank, L., Sena-Esteves, M., Pothos, E.N., Rios, M., 2010. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. *J. Neurosci.* 30, 2533–2541.
- Egan, M.F., et al., 2003. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257–269.
- Fischbach, B.V., Trout, K.L., Lewis, J., Luis, C.A., Sika, M., 2005. WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics* 116, 984–988.
- González, J.R., et al., 2007. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23, 644–645.
- Gray, J., et al., 2006. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) gene. *Diabetes* 55, 3366–3371.
- Han, J.C., et al., 2008. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N. Engl. J. Med.* 359, 918–927.
- Kim, J., Lauderdale, J.D., 2006. Analysis of Pax6 expression using a BAC transgene reveals the presence of a paired-less isoform of Pax6 in the eye and olfactory bulb. *Dev. Biol.* 15, 486–505.
- Kleinjan, D.A., et al., 2006. Long-range downstream enhancers are essential for *Pax6* expression. *Dev. Biol.* 15, 563–581.
- Lauderdale, J.D., Wilensky, J.S., Oliver, E.R., Walton, D.S., Glaser, T., 2000. 3' deletions cause aniridia by preventing *PAX6* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13755–13759.
- Lin, C.H., Wu, R.M., Tai, C.H., Chen, M.L., Hu, F.C., 2011. Lrrk2 S1647T and *BDNF* V66M interact with environmental factors to increase risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 17, 84–88.
- Liu, J., Zhou, Y., Wang, C., Wang, T., Zheng, Z., Chan, P., 2012. Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) genetic polymorphism greatly increases risk of leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 140–143.
- Malandrini, A., et al., 2001. *PAX6* mutation in a family with aniridia, congenital ptosis, and mental retardation. *Clin. Genet.* 60, 151–154.
- Monteggia, L.M., et al., 2004. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10827–10832.
- Shinawi, M., et al., 2011. 11p14.1 microdeletions associated with ADHD, autism, developmental delay, and obesity. *Am. J. Med. Genet. A* 6, 1272–1280.
- Terracciano, A., et al., 2011. Genetics of serum BDNF: meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study. *World J. Biol. Psychiatry* (Epub ahead of print).
- Tzoulaki, I., White, I.M., Hanson, I.M., 2005. *PAX6* mutations: genotype phenotype correlations. *BMC Genet.* 6, 27.
- van Heyningen, V., Williamson, K.A., 2002. *PAX6* in sensory development. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1161–1167.
- van Heyningen, V., Hoovers, J.M., de Kraker, J., Crolla, J.A., 2007. Raised risk of Wilms tumour in patients with aniridia and submicroscopic *WT1* deletion. *J. Med. Genet.* 44, 787–790.
- Xu, S., Han, J.C., Morales, A., Menzie, C.M., Williams, K., Fan, Y.S., 2008. Characterization of 11p14-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes contributing to mental retardation and autism. *Cytogenet. Genome Res.* 122, 181–187.



## ORIGINAL

### Asociación de polimorfismos en el gen *FTO* con la obesidad mórbida en la población extremeña

Raquel Rodríguez-López<sup>a,\*</sup>, Marta González-Carpio<sup>a</sup>, M. Victoria Serrano<sup>b</sup>, Guadalupe Torres<sup>b</sup>, M. Teresa García de Cáceres<sup>a</sup>, Trinidad Herrera<sup>a</sup>, Ángel Román<sup>c</sup>, Marta Rubio<sup>a</sup>, Pilar Méndez<sup>d</sup>, Rosario Hernández-Sáez<sup>e</sup>, Manuela Núñez<sup>d</sup> y Luis M. Luengo<sup>f</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Genética, Servicio de Inmunología y Genética, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, España

<sup>b</sup>Atención Primaria Adultos, Centro de Salud de Valdepasillas, Área de Salud de Badajoz, Badajoz, España

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura (UEX), Badajoz, España

<sup>d</sup>Unidad de Endocrinología Pediátrica, Servicio de Pediatría, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, España

<sup>e</sup>Atención Primaria Pediátrica, Centro de Salud de Montijo, Área de Salud de Badajoz, Badajoz, España

<sup>f</sup>Consulta de Nutrición, Servicio de Endocrinología, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, España

Recibido el 21 de diciembre de 2009; aceptado el 9 de marzo de 2010

Disponible en Internet el 24 de abril de 2010

#### PALABRAS CLAVE

Obesidad;  
Gen *FTO*;  
Polimorfismos;  
Riesgo

#### Resumen

**Objetivo:** Seleccionar individuos cuya obesidad mórbida (OM) se pueda atribuir preferentemente al perfil genético individual. Tras descartar pacientes con posibles síndromes monogénicos y otras enfermedades con obesidad asociada, evaluar la asociación de la variabilidad del gen *FTO* (asociado con la masa grasa y la obesidad), sobre la base de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con rs1861868 y rs9939609, con la predisposición heredada a padecer OM.

**Pacientes y métodos:** Tras evaluar a 270 pacientes con OM instaurada antes de los 14 años, seleccionamos a 194 por su fenotipo y la historia familiar referida; se incluyó a 289 individuos controles. Se genotiparon los cambios en el SNP rs1861868 y rs9939609 del gen *FTO*, y compararon sus frecuencias genotípicas y haplotípicas en ambos grupos poblacionales.

**Resultados:** Se confirmó la asociación del alelo A del SNP rs9939609 con la obesidad grave instaurada en la infancia en la población española. Los individuos portadores del haplotipo rs1861868 G/rs9939609 A del gen *FTO* mostraron un incremento del riesgo (*odds ratio* de 3,03; intervalo de confianza del 95%: 1,74–5,27) a padecer obesidad mórbida en nuestra población.

**Conclusión:** Analizar las bases genéticas de la obesidad precisa una rigurosa selección de los casos. La asociación del SNP rs9939609 con la obesidad, ampliamente descrita en distintas poblaciones, se confirma en la población española. Identificamos el primer

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [raquel.rodriguez@ses.juntaextremadura.net](mailto:raquel.rodriguez@ses.juntaextremadura.net) (R. Rodríguez-López).

**KEYWORDS**  
Obesity;  
FTO gene;  
Polymorphisms;  
Risk

haplotipo de riesgo al analizar el SNP rs1861868 del bloque haplotípico contiguo al que contiene el primero. Es preciso estudiar en profundidad la variabilidad interindividual del gen *FTO* para identificar la causa de su capacidad deletérea a la enfermedad.  
© 2009 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

**Association of FTO gene polymorphisms and morbid obesity in the population of Extremadura (Spain)**

**Abstract**

**Objective:** To select individuals whose morbid obesity can be attributed mainly to their individual genetic profile. After excluding patients with potential monogenic syndromes or diseases associated with obesity, we evaluated the association of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs1861868 and rs9939609 of the fat-mass and obesity-associated *FTO* gene with an inherited predisposition to morbid obesity.

**Patients and methods:** We evaluated 270 patients with morbid obesity and onset before the age of 14 years and selected 194 due to their phenotypes and family history; 289 control individuals were included. The rs1861868 and rs9939609 variants, located in the *FTO* gene, were genotyped. Genotype and haplotype frequencies were compared between cases and controls.

**Results:** The A allele of rs9939609 was associated with severe obesity starting in childhood among the Spanish population. The rs1861868 G/rs9939609 A haplotype of the *FTO* gene was also significantly associated with severe obesity in our population, with an odds ratio of 3.03 (95% confidence interval, 1.74–5.27).

**Conclusion:** Analysis of the genetic basis of obesity requires rigorous selection of cases. In this study, the association of the rs9939609 SNP with obesity widely described in distinct populations was confirmed among overweight Spanish children. Genotyping rs1861868 allowed us to identify the first risk haplotype in the *FTO* gene, which is located in the adjacent haplotype block containing rs9939609. In-depth study of the variability of the *FTO* gene is essential to define its deleterious capacity.

© 2009 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La epidemiología genética constituye en la actualidad una de las disciplinas fundamentales en el abordaje de la obesidad. La complejidad y la diversidad del diseño de sus análisis favorecen la identificación de nuevos loci que puedan contener genes con variantes de susceptibilidad. La obesidad es un ejemplo perfecto de enfermedad en la que interactúan factores no genéticos y genéticos, ajustados a modelos de riesgo difíciles de definir y calcular<sup>1</sup>. Los distintos aspectos de su etiología han creado la necesidad de diferenciar con rigurosidad las alteraciones fisiológicas capaces de desequilibrar los mecanismos de ajuste entre el aporte de sustratos combustibles y las demandas de energía, los cuales tienen por objeto mantener una masa corporal estable. A pesar del importantísimo avance que han supuesto la identificación y la caracterización de los síndromes monogénicos de obesidad mórbida (OM) no sindrómica, el porcentaje de casos de obesidad manifiesta que se explica por su conjunto es difícilmente superior al 5%<sup>2</sup>. A partir del interés por aplicar estrategias de prevención primaria, surge la prioridad de identificar el máximo porcentaje de individuos cuya susceptibilidad heredada a padecer OM sea el agente causal principal para producirla. Para esto se desarrollan inversiones de gran magnitud para el estudio en profundidad de las bases poligénicas de la enfermedad.

Una de las herramientas más interesantes es el *genome wide association study* (GWAS, ‘estudio de asociación sobre el genoma completo’). A pesar de que la heterogeneidad y el coste-beneficio de los proyectos de GWAS son un tema en debate y generan una controversia patente entre los expertos<sup>3</sup>, la avalancha de publicaciones de prestigio basadas en sus resultados ha permitido la descripción de un importantísimo listado de factores genéticos de riesgo a enfermedades comunes, entre ellas la obesidad<sup>4</sup>. Su utilidad crece al combinarse con los resultados de los estudios tradicionales de casos y controles, que tratan de replicar y definir con exactitud los riesgos de las variantes sugeridas, así como de sus combinaciones, en los genes candidatos identificados.

El gen *FTO* (asociado con la masa grasa y la obesidad) se localiza en el locus 16q12.2, el cual ha mostrado un evidente ligamiento con la obesidad en diversos estudios, como los mencionados<sup>5–10</sup>. A pesar de que las revisiones bibliográficas señalan cierta controversia respecto a ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen *FTO*, sobre todo entre diferentes etnias, su variabilidad interindividual sigue considerándose de enorme interés. Se han corroborado los primeros resultados extraídos de los GWAS, utilizando diferentes estrategias de análisis, confirmándose ampliamente la relación de la variante rs9939609 con la existencia de sobrepeso grave y algunas de sus comorbilidades en poblaciones europeas<sup>11–14</sup>.

Las funciones del gen *FTO* parecen relacionarse, al igual que las de los genes responsables de los síndromes de obesidad monogénica no sindrómica<sup>15-17</sup>, con el control hipotalámico de la saciedad, la hiperfagia y la ansiedad manifiesta ante la restricción de comida; también existen trabajos que han estudiado su relación con la susceptibilidad a comportamientos adictivos. Se ha demostrado su expresión en los núcleos cerebrales que ejercen el control de la alimentación, modificándose ante situaciones de ayuno. En los individuos portadores del alelo A se ha descrito, en los núcleos cerebrales donde se expresa la proteína que codifica *FTO*, una mayor resistencia a la insulina, así como la preferencia por ingestas hipercalóricas<sup>13</sup>.

Consideramos la variante genética rs9939609, candidata a estudio en la población española y a un análisis exhaustivo en pacientes afectados de obesidad manifiesta desde la infancia. Entre éstos suelen existir claros patrones de agregación familiar, con otros casos de obesidad grave de aparición temprana. Dadas las características y la localización del polimorfismo seleccionado, así como la no asociación con el riesgo a desarrollar obesidad que se ha descrito en poblaciones no caucásicas<sup>18,19</sup>, se precisó una mejor descripción, valoración y análisis de otros cambios genéticos que definen la variabilidad interindividual del gen *FTO*. También es posible que la existencia de una variante genética de ancestro caucásico, aún no identificada, sea el agente causal del efecto observado para el rs9939609, en desequilibrio de ligamiento con éste.

Por esto, propusimos la construcción de haplotipos que lo contuvieran, analizando otros SNP que aportaran información de bloques de desequilibrio de ligamiento contiguos. Seleccionamos el SNP con rs1861868 por estar localizado en una zona de la secuencia del gen *FTO*, con la que se segregó en desequilibrio de ligamiento, situada previamente a la región donde se encuentra el rs9939609, de características similares. Estudiamos la distribución de los cambios seleccionados (rs1861868 y rs9939609), así como la de sus combinaciones, en ambos grupos de nuestra serie. Se sugirió que podrían contribuir a la existencia de diferentes perfiles de riesgo heredado y transmisible para el incremento de peso grave.

Fue preciso describir el impacto de las bases genéticas en la etiopatogenia de la enfermedad, así como su modulación por otros factores derivados de hábitos, estilo de vida, estatus socioeconómico y cultural. El conjunto de antecedentes personales y familiares de obesidad recopilados en cada caso nos permitió la aproximación de la posible correlación genotipo-fenotipo en los individuos portadores de las combinaciones de riesgo identificadas.

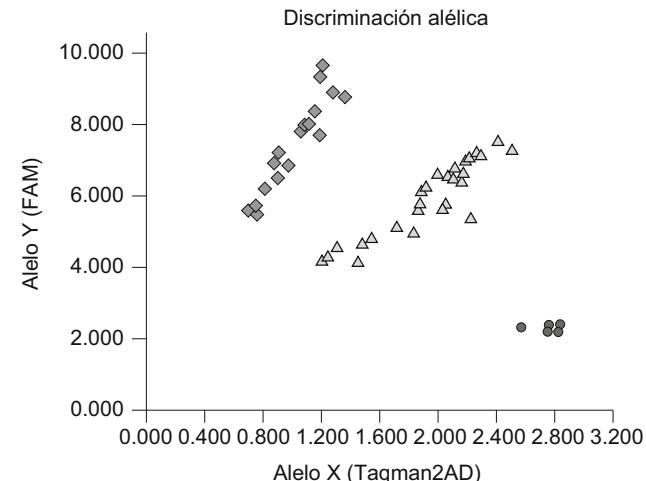
## Pacientes y métodos

Durante el bienio 2007–2009 se evaluó a 270 pacientes por parte del grupo de profesionales de la Unidad de Genética del Hospital Infanta Cristina de Badajoz, procedentes de las consultas de Endocrinología del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (Nutrición y Dietética, y Endocrinología Pediátrica) y de los centros de salud de Valdepasillos, Montijo y Puebla de Obando. Se trataba de adultos con antecedentes de OM establecida antes de los 16 años (índice de masa corporal [IMC] > 40 kg/m<sup>2</sup>) y menores de esa edad

con peso superior a 3 desviaciones estándares (DE). Recopilamos a 289 individuos controles de nuestro ámbito, pareados por sexo y no relacionados con los casos.

Completabamos un cuestionario de datos personales y familiares, refiriendo comorbilidades y enfermedades previas. Se realizó la construcción de un árbol genealógico amplio. Atendimos al origen y a la posible consanguinidad en cada familia. Realizamos una exploración física, prestando especial atención al fenotipo del paciente y su familia. Ante cualquier sospecha diagnóstica de un posible caso de obesidad monogénica, sindrómica o no sindrómica, así como de enfermedades con obesidad asociada, se procedió a derivar a consulta de Genética Clínica, Endocrinología Pediátrica, Endocrinología o Nutrición, según se considerase en cada caso. Se recopilaron en el conjunto de pacientes los datos de edad de aparición del sobrepeso (>3 DE), el IMC, la medida de la cintura y la cadera y las concentraciones séricas de glucosa, el colesterol total, el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad y los triglicéridos.

Previo consentimiento informado se obtuvo una muestra de sangre periférica (10 ml) anticoagulada con EDTA de los individuos seleccionados a partir del árbol genealógico por haber alcanzado el mayor peso a la edad más temprana. Se extrajo el ADN mediante los reactivos incluidos en el QIAamp DNA Blood Kit. El genotipado se realizó mediante las sondas de discriminación alélica Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays de Applied Biosystems, con los códigos de identificación C\_11717119\_10 y C\_30090620\_10 para los SNP con rs1861868 y rs9939609, respectivamente (7300 AB) (fig. 1). Se analizó a un total de 194 pacientes y a 289 individuos controles. Aplicamos la ley de Hardy-Weinberg y comparamos las frecuencias genotípicas y haplotípicas en ambos grupos poblacionales. Descripción, valoración y selección del conjunto de SNP del gen *FTO* detalladas en las bases de datos National Center for Biotechnology



**Figura 1** Representación de los resultados obtenidos de un ensayo de discriminación alélica correspondiente al genotipado del polimorfismo de un solo nucleótido con rs9939609 (G/A). Los puntos en rojo representan a individuos homocigotos para el polimorfismo de un solo nucleótido (AA), los triángulos verdes a individuos heterocigotos para el cambio (GA) y los rombos azules a individuos homocigotos normales (GG).

Information y Ensembl, así como la diversidad haplotípica descrita en HapMap. Realizamos la predicción bioinformática de la posible capacidad funcional del SNP rs9939609 a partir de la secuencia del SNP y su región flanqueante descrita en Ensembl. La predicción de los sitios de regulación en estas regiones se hizo usando el programa MatInspector sobre la base de datos de TRANSFAC de sitios de unión de factores de transcripción, que compara la secuencia de interés con una matriz de homología de sitios de unión comprobados para cada factor de transcripción.

Para los análisis de las frecuencias alélicas, genotípicas y de haplotipos utilizamos el programa SNPStats. Corroboramos la estadística descriptiva y determinados estudios de asociación de los SNP analizados con variables fenotípicas mediante el programa SPSS v.11.5.

## Resultados

La serie incluyó a un 40% de pacientes ( $n=194$ ) frente a un 60% de individuos controles ( $n=289$ ). La distribución por sexos no mostró diferencias significativas (tabla 1). La edad media de los pacientes en la fecha en que fueron incluidos en el estudio fue de 24 años (límites de 6-54 años), siendo 6 años la media de edad en que refirieron haber alcanzado un peso superior a 3 DE. La edad media de los individuos controles se situó en 42 años (límites de 29-81 años).

Tras la evaluación de los 270 pacientes que consultaron por obesidad manifiesta por parte del equipo sanitario multidisciplinario, se atribuyeron criterios a 227 para una valoración exhaustiva por posible origen genético. Cincuenta y tres pacientes fueron evaluados por sospecha de otras enfermedades asociadas con un grave incremento de peso, obesidad monogénica sindrómica o monogénica no sindrómica. El resto fueron considerados candidatos para inclusión en estudios de casos y controles para la búsqueda de perfiles genéticos de susceptibilidad heredada.

Se incluyó a 194 casos en el estudio de asociación diseñado para el genotipado de los SNP rs1861868 y

rs9939609 del gen *FTO*, frente a 289 individuos controles representativos de nuestra población.

Tras genotipar y analizar la distribución de las variantes en ambas series, así como la prevalencia de sus combinaciones, observamos que el SNP rs1861868 (con frecuencias alélicas descritas en caucásicos: G;0.521/A;0.479) mostró una distribución alélica similar entre pacientes y controles. Los análisis estadísticos sugirieron que la variante no llevaba riesgo a la enfermedad (tabla 2).

En cambio, el SNP con rs9939609 (frecuencias alélicas en caucásicos: T;0.580/A;0.410) mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes. Para individuos portadores heterocigotos T/A y homocigotos A/A, definimos una *odds ratio* (OR) de 1,76 (intervalo de confianza [IC] del 95%: 1,08-2,86) y una OR de 3,28 (IC del 95%: 1,83-5,87), respectivamente (tabla 2). Este polimorfismo segregó en desequilibrio de ligamiento con un conjunto de SNP que se localizan a lo largo de la secuencia del gen *FTO*, de la cual ofrece información. Dado que se sitúa en una zona intrónica, no codificante, el efecto observado se atribuyó en principio a la región completa (fig. 2).

A pesar de su localización y sus características, los resultados de la predicción bioinformática de la posible capacidad funcional del rs9939609 sugirieron un posible efecto *per se*. El alineamiento de la secuencia del gen a ese nivel del intrón mostró una importantísima conservación entre especies (el 100% de conservación con el gorila, el 99% con el mono rhesus y el 91% con el caballo). La variante A del SNP generó un sitio de unión al factor de transcripción SRY, mientras que la variante G mantuvo este sitio de unión y creó *de novo* un sitio de unión al factor de transcripción Ets1. Estos hallazgos sugirieron que este polimorfismo podría modificar la regulación transcripcional del gen *FTO*.

El análisis de la diversidad haplotípica de ambos cambios reveló que la combinación rs1861868 A/rs9939609 A se identificó en el 27,3% de los controles frente a un 37,9% de los casos, y que la combinación rs1861868 G/rs9939609 A aparecía en el 9,5% de los controles frente al 18,6% de los pacientes. El estudio de la distribución de las combinaciones extendió la información obtenida al bloque haplotípico previo y contiguo al SNP de riesgo rs9939609 (fig. 3).

El haplotipo rs1861868 A/rs9939609 A resultó conferir un OR de 2,14 (IC del 95%: 1,38-3,32) frente a la combinación G/T. Las diferencias en la distribución del haplotipo rs1861868 G/rs9939609 A identificaron un incremento del riesgo a padecer OM (OR de 3,03) para los individuos portadores al menos en heterocigosis (IC del 95%: 1,74-5,27) (tabla 3).

Los perfiles de riesgo identificados en nuestro estudio se hallaron, solos o en combinación, en el 56,5% de los 194 pacientes frente al 36,8% con el que aparecieron en el grupo control.

**Tabla 1** Distribución por sexos de los casos y controles incluidos en el estudio. La comparación de sus frecuencias no mostró diferencias significativas

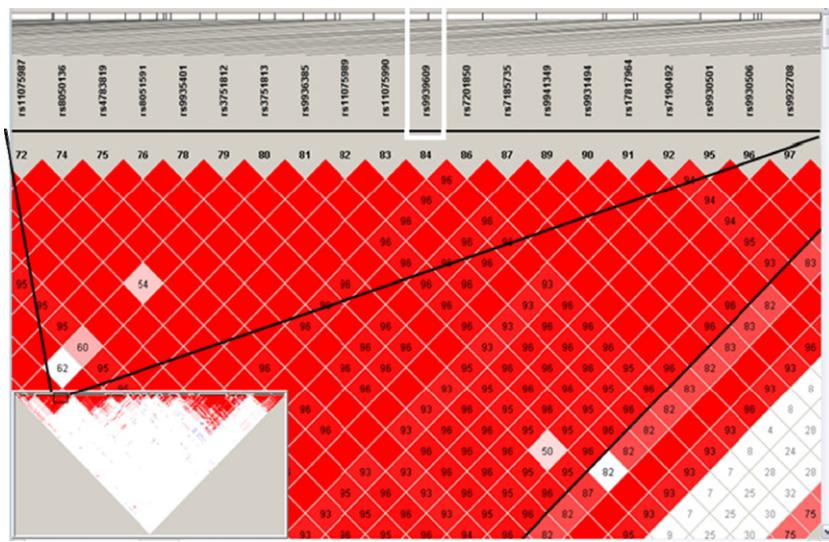
Sexo	Varones, n (%)	Mujeres, n (%)
Individuos	222 (46)	258 (54)
Casos	75 (39)	119 (61)
Controles	131 (46)	155 (54)

**Tabla 2** Cálculo de riesgos para los genotipos de los polimorfismos analizados

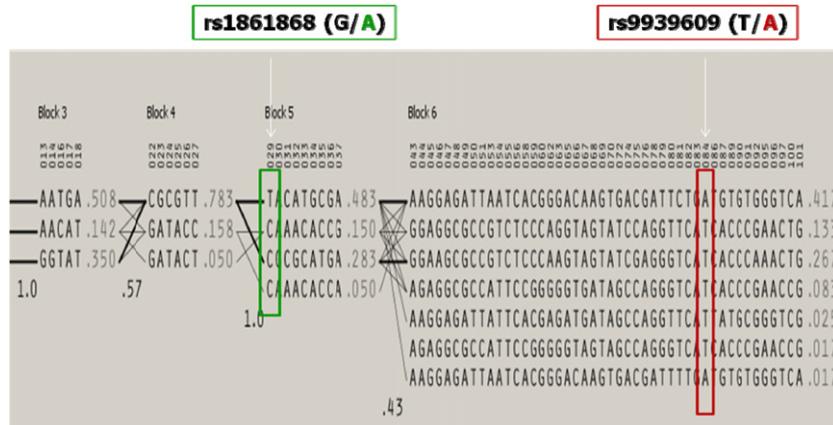
Polimorfismo	Gen	Bloque	OR	IC del 95%	OR	IC del 95%
rs1861868 (G/A)	<i>FTO</i>	5	1,14 (GA)	0,64-2,04	1,04 (AA)	0,55-1,98
rs9939609 (T/A)	<i>FTO</i>	7	1,76 (TA)	1,08-2,86	3,28 (AA)	1,83-5,87

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*; SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.

El SNP rs9939609 (caucásicos: T;0.580/A;0.410) mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes heterocigotos y homocigotos (OR de 1,76 y 3,28, respectivamente).



**Figura 2** Representación de la distribución de bloques haplotípicos del gen *FTO*. El haplotipo es un conjunto de polymorfismos de un solo nucleótido existentes de manera contigua en una sola cromátida. Se encuentran asociados en porcentajes identificados y/o calculados de individuos, heredándose en grupos con índices conocidos.



**Figura 3** . Cálculos de la frecuencia de la diversidad haplotípica existente en la población europea en los bloques de desequilibrio de ligamiento, donde se sitúan los dos polymorfismos de un solo nucleótido analizados del gen *FTO*. Para el rs1861868, G corresponde a C y A corresponde a T.

**Tabla 3** Cálculo de riesgos para los haplotipos descritos

rs1861868 (G/A)	rs9939609 (T/A)	Controles, %	Casos, %	OR	IC del 95%
G	T	33	21	—	—
A	T	31	22	1,12	0,70–1,79
G	A	9	19	3,03	1,74–5,27
A	A	27	38	2,14	1,38–3,32

IC: intervalo de confianza; OR: odds ratio.

El análisis de diversidad haplotípica reveló que la combinación rs1861868 G/rs9939609 A aparecía en el 9% de los controles frente al 19% de los pacientes y que la combinación rs1861868 A/rs9939609 A aparecía en el 27% entre controles frente al 38% de los casos. Ambos haplotipos mostraron un incremento del riesgo a padecer obesidad mórbida (OR de 3,03 y 2,14, respectivamente).

No detectamos ninguna asociación de los genotipos de los SNP analizados con el conjunto de las variables y los parámetros bioquímicos disponibles, tampoco con los

haplotipos descritos. El análisis de correlaciones sí mostró una mayor sobrerepresentación del alelo A en el rs9939609 entre pacientes controles mujeres ( $p=0,011$ ).

Observamos que un 4,7% de los individuos afectados de obesidad (8 individuos) eran homocigotos para el haplotipo de mayor riesgo (rs1861868GG/rs9939609AA), siendo el porcentaje entre individuos controles del 3,3% (10 individuos). Esta comparación no alcanzó la significación estadística, pero resultó llamativo que el 88% de los casos homocigotos GG/AA ( $n=7$ ) fueran mujeres, frente al 20% entre los controles ( $n=2$ ). Los 8 pacientes mostraron una media de edad de 4 años para la instauración de la obesidad grave (peso superior a 3 DE), 5 de ellos relacionaron su obesidad con una actitud ansiosa y compulsiva ante la comida, habiendo precisado dos individuos tratamiento por psiquiatría infantil. Resultó sorprendente que, ante la pregunta de si usaron chupete y cuánto tiempo, las familias de 4 de los pacientes reconocieron un apego llamativo por el chupete, alargando su uso tras el primer año de vida y manteniendo uno de ellos durante años la succión del pulgar para conciliar el sueño. La revisión de los árboles genealógicos mostró en 5 de los 8 casos un patrón evidente de agregación familiar, observándose en todos ellos la existencia de al menos otro caso de OM entre los parientes de primer grado del caso índice, de 1–2 familiares afectados de segundo grado y al menos otros 2 entre los de tercer grado.

## Discusión

Nuestra serie pone de manifiesto la heterogeneidad de las bases genéticas de la OM. El análisis en profundidad de cada caso, previo a su inclusión o descarte del estudio, evidencia la necesidad de establecer criterios que permitan una clasificación de los pacientes sobre la base de la etiopatogenia predominante. Estudios como el que presentamos pueden ser de gran ayuda para tal objetivo, y señalan la importancia de la selección correcta de casos para el diseño de estudios genéticos de riesgo a enfermedades complejas<sup>20,21</sup>. Pretendimos identificar variantes genéticas que, de manera individual o en combinación, definieran perfiles heredados capaces de explicar un porcentaje del riesgo a padecer OM.

Estableciendo como criterios de alto riesgo que el peso alcanzado por edad indicara OM antes de los 14 años y que la valoración del árbol genealógico mostrara una patente agregación familiar, observamos un alto índice de heredabilidad de la enfermedad entre los individuos incluidos en la serie analizada. Se insiste en la bajísima prevalencia de la obesidad monogénica, tanto sindrómica como no sindrómica, en la población general, que, sin embargo, no es despreciable en el contexto de una consulta de genética humana.

La heterogeneidad entre los estudios de los resultados obtenidos, tanto de los GWAS como de los estudios de casos y controles para el análisis de la distribución de los polimorfismos candidatos, es un dato por tener en cuenta para construir definitivamente un perfil genético de riesgo a una enfermedad<sup>22</sup>. Sin embargo, es evidente que variables como los fallos en el genotipado, la estratificación de poblaciones, la selección adecuada de la serie de individuos controles y, sobre todo, la diversidad fenotípica de los sujetos considerados como casos en los diferentes estudios pueden sugerir falsos negativos.

La variabilidad interindividual del gen *FTO* es de gran interés en la búsqueda de alelos de susceptibilidad a padecer

OM. Corroboramos la asociación del SNP rs9939609 con la enfermedad, identificando en nuestra serie riesgos para los individuos con genotipo heterocigoto (T/A) y homocigoto para el cambio (A/A) (OR de 1,76 y OR de 3,28, respectivamente). Tales resultados corroboran lo publicado en la población del norte de Europa<sup>13</sup>, respecto a la relación del SNP rs9939609 con elevados IMC; los riesgos calculados en otros estudios para los mismos genotipos son inferiores, inferidos a partir de series más amplias, pero cuyos casos fueron seleccionados únicamente por desarrollar obesidad grave a cualquier edad.

El alelo de riesgo definido apareció con una frecuencia alélica del 55% entre los individuos controles de la población extremeña, frente al 46% descrito en los controles del norte de Europa o al 16% en la población asiática; estudios epidemiológicos podrían revelar la implicación de las diferencias observadas en las distintas tasas de prevalencia de la OM en estas poblaciones.

El análisis de la distribución de la diversidad haplotípica del gen *FTO* potencia la significación de los hallazgos obtenidos en el análisis univariante. La variabilidad interindividual, sobre la base de los SNP seleccionados, identifica el primer haplotipo de riesgo en la población extremeña; la combinación rs1861868G/rs9939609A muestra un incremento del riesgo (OR de 3,03; IC del 95%: 1,74–5,27) a padecer OM en los individuos portadores, al menos en un alelo.

Aparte del genotipado de tales polimorfismos genéticos se debe disponer de un amplio conjunto de datos clínicos y biológicos, personales y familiares relacionados con su proceso. Nuestro estudio no encontró asociación entre el genotipo del gen *FTO* y las características específicas de la obesidad desarrollada, aunque la temprana edad de los pacientes puede enmascarar posibles alteraciones bioquímicas diferenciales. Sí reveló resultados preliminares respecto a la mayor capacidad deletérea del gen en la fisiología de la mujer, con un fenotipo basado en la ansiedad de ciertos pacientes, homocigotos para el haplotipo de mayor riesgo, cuya hiperfagia puede tener un efecto sedante para combatirla<sup>23</sup>. Se ha sugerido ampliamente que el efecto observado del SNP rs9939609 en cuanto a la aparición de la obesidad se relaciona con una respuesta inadecuada a la sensación de hambre e, incluso, a un trastorno de la sensación de saciedad<sup>11</sup>. La disfunción en el gen *FTO* podría aumentar la susceptibilidad de ciertos individuos a padecer un estado de ansiedad, no reactivo a ningún factor exógeno, mejorable mediante hábitos como el uso persistente del chupete en la infancia. El inicio de la autonomía para la ingesta en el niño puede buscar, complementar e incluso sustituir tal efecto sedante por el que también genera la ingesta. La fisiología de la mujer podría ser más vulnerable a dicha situación.

La genética clínica puede ser esencial para establecer las pautas y los protocolos derivados del consejo genético a las familias con casos de alto riesgo y agregación familiar de obesidad manifiesta. Teniendo en cuenta el coste global de la enfermedad, la baja proporción de curaciones y los decepcionantes resultados de las estrategias desarrolladas en el ámbito de la prevención por los sistemas sanitarios, proponemos el diseño de nuestro estudio como un abordaje por tener en cuenta para el control y el manejo multidisciplinario y especializado de la enfermedad. Los análisis de perfiles genéticos de riesgo aplicados a la población general

ofrecerían la posibilidad de identificar un porcentaje importante de personas sobre las que ejercer las máximas medidas de prevención primaria, única estrategia de futuro en el abordaje de la enfermedad. El diagnóstico a través de estudios genéticos que se apoyen en las estrategias nutricionales y de tratamientos conductuales tradicionales permitiría, además, individualizar la práctica clínica en cada caso<sup>24</sup>.

A pesar del desarrollo biotecnológico y la accesibilidad a análisis genéticos masivos, así como las herramientas bioinformáticas cada vez más capaces y complejas, la búsqueda de variantes genéticas y, por tanto, de perfiles genéticos de susceptibilidad no parte de una correcta selección de casos. No se tiene en cuenta la edad ni la gravedad de la aparición del sobrepeso, ni los antecedentes familiares, hechos traducidos en la evidente heredabilidad de la enfermedad que ya se acepta superior a la de procesos como los neoplásicos.

Sugerimos la necesidad de un mayor aprovechamiento de los resultados significativos y corroborados de variantes genéticas de riesgo, los cuales se han estimado en un 2% del total publicado en las revistas de mayor impacto. Propnemos el seguimiento de los individuos portadores de los haplotipos de riesgo identificado en *FTO*, tratando de integrar las conclusiones obtenidas en una estrategia de abordaje multidisciplinario de la enfermedad.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Extremadura (PRI08OB007) y por el Instituto de Salud Carlos III (07PI0594).

## Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Farooqui IS. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. Best Practice Res Clin Endocrinol Metab. 2005;19: 359–74.
2. Farooqui IS, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. Endocr Rev. 2006;27:710–8.
3. Loannidis JP, Patsopoulos NA, Evangelou E. Heterogeneity in meta-analyses of genome-wide association investigations. Plos One. 2007;2:e841.
4. Todd JA. Statistical false positive or true disease pathway? Nat Genet. 2006;38:731–3.
5. Scott LJ, Mohlke KL, Bonycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type II diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. Science. 2007;316:1341–5.
6. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. Science. 2007;316:1336–41.
7. Saunders CL, Chiodini BD, Sham P, Lewis CM, Abkevich V, Adeyemo AA, et al. Meta-analysis of genome-wide studies in BMI and obesity. Obesity. 2007;15:2263–75.
8. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the *FTO* gene is associated to body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. Science. 2007;316:889–94.
9. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. Nat Genet. 2007;39:724–6.
10. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, et al. Genome-wide association scan shows genetics variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. PLoS Genet. 2007;3:e115.
11. Den Hoed M, Westerterp-Plantenga MS, Bouwman FG, Mariman EC, Westerterp KR. Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in *FTO*. Am J Clin Nutr. 2009;90:1426–32.
12. Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, Loos RJF, et al. Life course variations in the associations between *FTO* and MC4R variants and body size. Hum Mol Genet. 2010;19: 545–52.
13. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CAN. An obesity-associated *FTO* gene variant and increased energy intake in children. N Engl J Med. 2008;359:2558–66.
14. Hakanen M, Raitakari OT, Lehtimäki T, Peltonen N, Pahkala K, Sillanmäki L, et al. *FTO* genotype is associated with body mass index after the age of seven years but not with energy intake or leisure-time physical activity. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:1281–7.
15. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human porhormone convertase 1 gene. Nat Genet. 1997;16:303–6.
16. Yeo GS, Farooqui IS, Aminian S, Hasall DJ, Satanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R is associated with dominantly inherited human obesity. Nature Genet. 1998;20: 111–112.
17. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in MC4R associated with dominant form obesity. Nature. 1998;385:165–8.
18. Tabara Y, Osawa H, Guo H, Kawamoto R, Onuma H, Shimizu I, et al. Prognostic significance of *FTO* genotype in the development of obesity in Japanese: The J-SIPP study. Int J Obes (Lond). 2009;33:1243–8.
19. Hennig BJ, Fulford AJ, Sirugo G, Rayco-Solon P, Hattersley AT, Frayling TM, et al. *FTO* gene variation and measures of body mass in an African population. BMC Med Genet. 2009;10:21.
20. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel J, Argyropoulos G, Wats B, et al. The human obesity gene map: The 2005 update. Obesity. 2006;14:529–624.
21. Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, et al. The human obesity gene map: The 2004 update. Obes Res. 2005;381–490.
22. Lindgren CM, Heid IM, Randall JC, Lamina C, Steinhorsdottir V, Qi L, et al. Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution. PLoS Genet. 2009;5:e1000508.
23. Tanofsky-Kraff M, Han JC, Anandalingam K, Shomaker LB, Columbo KM, Wolkoff LF, et al. The *FTO* gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. Am J Clin Nutr. 2009;90:1483–8.
24. Legry V, Cottet D, Ferrières J, Arveiler D, Andrieux N, Bingham A, et al. Effect of an *FTO* polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. Metabolism. 2009;58:971–5.

# FTO Risk Haplotype Among Early Onset and Severe Obesity Cases in a Population of Western Spain

Juan R. González<sup>1</sup>, Marta González-Carpio<sup>2</sup>, Rosario Hernández-Sáez<sup>3</sup>, Victoria Serrano Vargas<sup>3</sup>, Guadalupe Torres Hidalgo<sup>3</sup>, Marta Rubio-Rodrigo<sup>2</sup>, Ana García-Nogales<sup>4</sup>, Manuela Núñez Estévez<sup>3</sup>, Luis M. Luengo Pérez<sup>3</sup> and Raquel Rodríguez-López<sup>2</sup>

Childhood and adult obesity have been widely associated with *FTO* genetic variability in different populations. This study aimed to investigate the linkage disequilibrium (LD) block structure of a region surrounding the candidate rs9939609 SNP and determine the best single nucleotide polymorphism (SNP) combination that explains the higher proportion of variability observed in children with severe obesity, including obese subjects from families with a very high occurrence of obesity. A sliding window approach pointed to a block containing the rs1477196/rs17817449/rs9939609 haplotype ( $P$  value  $3.1 \times 10^{-8}$ ). Carriers of the GGA combination had an increased risk of obesity (odds ratio (OR) 2.07, 95% confidence interval (CI) 1.41–3.04,  $P = 2.0 \times 10^{-4}$ ) with respect to those individuals with the reference ATT haplotype. A further SNP, rs9921255, also showed association with obesity ( $P = 8.3 \times 10^{-4}$ , OR 1.77; 95% CI 1.15–2.74 and OR 5.78; 95% CI 1.22–27.49 for heterozygotes and homozygotes, respectively) and did not segregate with the previously described risk haplotype. The calculation of risk score based on the GGA haplotype combined with the rs9921255 variant showed a much greater effect of the *FTO* gene on high BMI. This score yields an attributable risk of 34% for severe obesity, and the increased risk per risk allele was 1.71 ( $P = 1.0 \times 10^{-6}$ ). We conclude that the description of this polymorphic combination in the *FTO* gene could be useful for the early identification of inherited susceptibility to weight-gain since childhood, with a higher sensitivity than considering the effect of a single marker.

*Obesity* (2011) doi:10.1038/oby.2011.325

The strongest risk factor for childhood and adolescent obesity is parental obesity, and studies show that the strong predictive value of parental BMI results mainly from genetic rather than environmental factors (1,2). Therefore, the study of obese subjects from families with a high occurrence of obesity might reflect a stronger heritable component and prove helpful to increase the potential for detecting genetic associations. Several genome-wide association studies in European populations have identified that genetic variants located in the fat mass and obesity associated (*FTO*) gene are associated with increased risk of developing obesity (3). In an attempt to finely map the region where the initial signals were described, >100 common single nucleotide polymorphisms (SNPs) across the associated region where the *FTO* gene lies have been genotyped in populations of different ancestry. The principal signal is found for rs9939609, an SNP which lies in a cluster of highly correlated variants located in a linkage disequilibrium (LD) block of about 47 kb

that encompasses parts of the first two introns and exon 2 of the *FTO* gene (4–6).

The aim of this work was to investigate the LD block structure of a 448.4-kb region surrounding the candidate rs9939609 SNP and perform haplotype analyses in order to identify the best SNP combination that could explain the susceptibility to severe early onset obesity.

## METHODS AND PROCEDURES

### Patients and controls

We selected *probandi* who reached a weight greater than (mean + 3 s.d.) before 14 years of age and who referred at least two other morbid obesity cases among first- or second-degree relatives. We consider the existence of grade 3 overweight (commonly called morbid obesity) to be a BMI  $\geq 40$  kg/m $^2$ ; in children this corresponds to a BMI greater than the 95th percentile for age- and sex-matched control subjects from our population data.

After their completion of an informed consent form, 202 patients were selected for study of their genetic risk profiles of polygenic/nonsyndromic

<sup>1</sup>Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Genetics Unit, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain; <sup>3</sup>The Extremadura Obesity Observatory (OBEX.O), Badajoz, Spain; <sup>4</sup>Regional Telemedicine Service, Public Health System of Extremadura, Badajoz, Spain. Correspondence: Raquel Rodríguez-López (raquel.rodriguez@ses.juntaextremadura.net)

Received 23 November 2010; accepted 16 September 2011; advance online publication 12 October 2011. doi:10.1038/oby.2011.325

obesity, and 184 control individuals from the general population were chosen as representative of the same genetic background as the cases and matched by sex.

#### Selection of tagging SNPs and genotyping

SNP selection within the *FTO* gene was carried out from detailed data in <http://www.ensembl.org> to identify potential genetic markers covering the region between contig positions 7259593 and 7747999 of NT\_010498.15 (Mar.2006 NCBI36/hg18 Assembly). European data of CEU trios were downloaded from the International Haplotype Mapping Project website ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27\\_B36](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27_B36)), and tag SNPs were assigned using the Haplovew software package (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haplovew/>). The minor allele frequency considered was 10%, and pairwise tagging with a minimum  $r^2$  of 0.80 was applied to capture the common variations. To evaluate the common genetic variation of this region efficiently, a precise set of 31 tag SNPs was selected (Table 1), including the rs17817449 and the rs9939609 SNPs.

Genomic DNA was extracted using a QIAamp DNA Blood Kit method. PCRs and genotyping were completed using an Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) TaqMan 7300 system.

#### Statistical methods

Departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for all the biallelic SNP markers was tested using a fast exact test as described in ref. 7. Controls were selected matched by sex. Due to random variability when sampling, slight differences were observed in the prevalence of males and females between cases and controls. Therefore, single association analyses were carried out using logistic regression models adjusted for sex. These analyses were performed using the *SNPassoc* R package (8). Haplotype association with disease was assessed using the *haplo.stats* R package (9). To refine the haplotype construction and to identify a potential causative core region, we used an unbiased sliding window approach to construct successive and adjacent 2- and 3-SNP haplotypes across those blocks that were statistically significantly associated with the disease. A permutation procedure was used to estimate the significance of the best result (based on 1000 permutations). A false discovery rate (FDR) approach was used based on the Benjamini–Hochberg method, which considers correlations among SNPs (10). LD plots were created by computing the  $r^2$  statistic. A genetic score was computed by adding the number of alleles of interest across selected SNPs. A logistic regression model was used to estimate the risk per unit allele increase.

#### RESULTS

Of the 202 families selected, 57% had three obese individuals among first-, second-, and third-degree relatives. The mean age of appearance of overweight, considered as greater than (mean + 3 s.d.), was about 6 years (range 1–16) (Supplementary Table S1).

We first looked at the LD of the region and found three haplotype blocks of 69.8, 53.5, and 124.2 kb, respectively. In our population, the first block contains the variant rs9939609, the SNP most frequently reported to be the core variant associated with obesity.

Genotype frequencies for the controls were in Hardy–Weinberg equilibrium (Supplementary Table S2). The observed genotype frequencies of the 31 SNPs studied in *FTO* from the case–control association analyses are summarized in Table 1. Within the first block, the strongest association was with allele G of rs17817449 (odds ratio (OR) = 2.01; 95% CI 1.23–3.28 for one copy, and OR = 2.86; 95% CI 1.56–5.24 for

two copies, with respect to the normal homozygous genotype). The results of the association found for rs17817449 corroborate agree with findings for allele A of rs9939609 (OR = 1.87; 95% CI 1.09–3.20 for one copy and OR = 1.92; 95% CI 1.02–3.60 for two copies, with respect to the normal homozygous genotype). This SNP is located downstream very near to rs17817449, and both are included in a LD area ending at rs10852521. However, the univariate analysis of the upstream rs17817449 genotyped variants showed a similar distribution of genotypes between patients and controls. Interestingly, we also identified a new risk allele in the *FTO* gene associated with nucleotide C at position rs9921255 (Table 1). It is located right on the edge of the third block of LD that was defined by the haplotype study and also showed significant association with severe obesity ( $P = 8.3 \times 4.10$ , OR = 1.77; 95% CI 1.15–2.74 for one copy and OR = 5.78; 95% CI 1.22–27.49 for two copies, with respect to the normal homozygote; Figure 1).

When we performed the haplotype analysis by using the sliding window approach, we found that the best marker combination contained rs1477196, rs17817449, and rs9939609 SNPs ( $P = 1.5 \times 10^{-7}$ ), all located within intron 1 of the gene (Figure 1). The overall  $P$  value of  $\chi^2$  for association with case status for this haplotype was  $3.1 \times 10^{-8}$  (Table 2). The risk of the common GGA haplotype (with a 43% frequency) was 2.07 (95% CI 1.41–3.04,  $P = 2.0 \times 10^{-4}$ ) (Table 2). The decline of the high LD in the block containing rs1477196, rs17817449, and rs9939609 variants was estimated at positions rs1477199 and rs17219084 (8.3 and 35 kb on the upstream and downstream side of rs9939609, respectively). The association result did not change after adjusting for sex status (Supplementary Table S2). However, stratified analyses showed that the haplotype risk was only found in girls ( $P = 4.8 \times 10^{-7}$ ) carrying the GGA haplotype (OR = 3.10; 95% CI 1.66–5.79,  $P = 4.0 \times 10^{-4}$ ; Supplementary Figures S1 and S2). Interaction between haplotype and sex was not statistically significant ( $P$  value of the interaction: 0.2506).

The genetic score created by combining the risk haplotype rs1477196G/rs17817449G/rs9939609A (considering the variant rs17817449 as the core representative SNP of this haplotype) and the risk allele rs9921255 showed statistically significant differences in its distribution between cases and controls in our series ( $P = 1.0 \times 10^{-6}$ ) (Figure 2). Thus, the risk of being obese increased by 71% for each unit increase in the number of G and C risk alleles of the haplotype core SNP and rs992155, respectively (OR = 1.71; 95% CI 1.31–2.13).

The estimated percentage of the risk of obesity attributable to being a homozygotic carrier of the combination of genetic risk variants identified was 34%, bearing in mind that this estimate was made on the basis of patients of western Spain belonging to families with a high aggregation of obesity.

#### DISCUSSION

The strategy of including subjects from families with a high proportion of obese individuals, together with the inclusion of extreme phenotypes such as a mean age of 6 years when severe overweight appeared, probably increased the power to detect

**Table 1 Results of the single association analysis**

	Cases		Controls		OR	Lower	Upper	P value	P value (FDR)
	n	%	n	%					
rs2241179									
T/T	64	35.8	73	43.2	1.00			0.18321	0.40837
C/T	90	50.3	75	44.4	0.73	0.46	1.16		
C/C	25	14.0	21	12.4	0.70	0.35	1.39		
Rs1477199									
A/A	116	63.7	127	74.7	1.00			0.03221	0.14266
A/G	58	31.9	40	23.5	0.67	0.41	1.08		
G/G	8	4.4	3	1.8	0.35	0.09	1.39		
rs7203521									
A/A	73	39.9	73	42.7	1.00			0.32448	0.52942
A/G	85	46.4	79	46.2	0.90	0.57	1.41		
G/G	25	13.7	19	11.1	0.70	0.35	1.40		
rs1861868									
A/A	49	28.2	42	26.2	1.00			0.36122	0.55989
G/A	92	52.9	84	52.5	1.17	0.70	1.97		
G/G	33	19.0	34	21.2	1.35	0.71	2.57		
rs10852521									
C/C	49	27.7	85	40.7	1.00			0.00534	0.05515
C/T	89	50.3	98	46.9	0.70	0.44	1.11		
T/T	39	22.0	26	12.4	0.42	0.23	0.78		
rs1477196									
G/G	76	42.2	91	54.2	1.00			0.01948	0.12080
G/A	78	43.3	66	39.3	0.74	0.47	1.16		
A/A	26	14.4	11	6.5	0.41	0.19	0.90		
rs17817449									
T/T	68	38.6	42	20.8	1.00			0.00036	0.01126
G/T	80	45.5	103	51.0	2.01	1.23	3.28		
G/G	28	15.9	57	28.2	2.86	1.56	5.24		
rs9939609									
T/T	60	33.1	31	19.5	1.00			0.03734	0.14471
T/A	83	45.9	85	53.5	1.87	1.09	3.20		
A/A	38	21.0	43	27.0	1.92	1.02	3.60		
rs8044769									
C/C	55	33.3	63	36.2	1.00			0.15898	0.40837
C/T	71	43.0	90	51.7	1.20	0.74	1.95		
T/T	39	23.6	21	12.1	0.54	0.28	1.04		
rs17219084									
A/A	57	31.3	52	25.0	1.00			0.92983	0.94442
A/G	82	45.1	120	57.7	1.57	0.98	2.54		
G/G	43	23.6	36	17.3	0.95	0.52	1.71		
rs8061518									
A/A	85	47.5	107	51.9	1.00			0.24392	0.50409

**Table 1 Continued on next page**

**Table 1** Continued

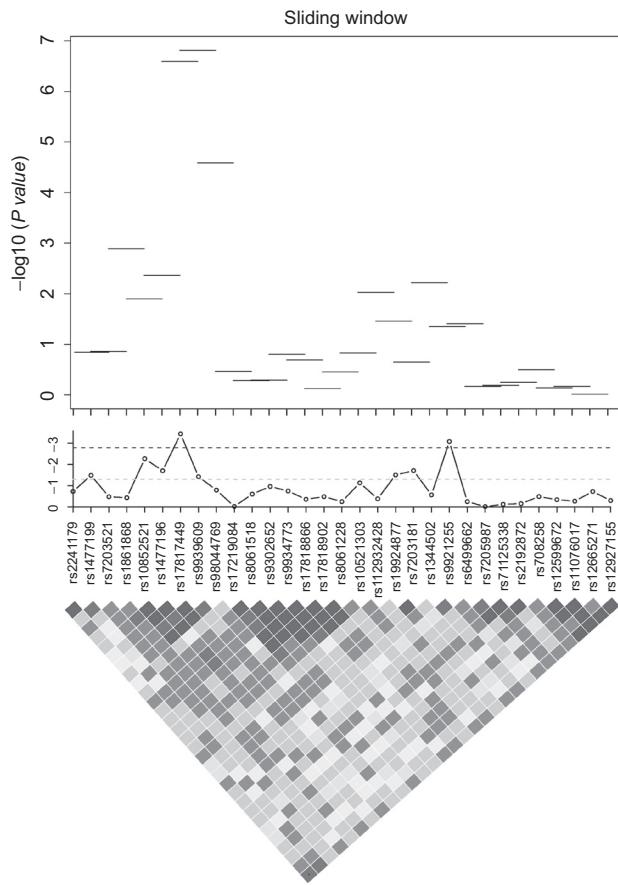
	Cases		Controls		OR	Lower	Upper	P value	P value (FDR)
	n	%	n	%					
A/G	73	40.8	82	39.8	0.89	0.58	1.38		
G/G	21	11.7	17	8.3	0.64	0.31	1.30		
rs9302652									
T/T	104	57.1	103	49.3	1.00			0.10720	0.33232
C/T	67	36.8	86	41.1	1.23	0.80	1.89		
C/C	11	6.0	20	9.6	1.85	0.83	4.11		
rs9934773									
G/G	103	57.2	88	51.5	1.00			0.17580	0.40837
G/T	66	36.7	66	38.6	1.14	0.72	1.79		
T/T	11	6.1	17	9.9	1.86	0.82	4.24		
rs17818866									
A/A	99	53.8	84	49.1	1.00			0.42999	0.60374
A/G	70	38.0	71	41.5	1.17	0.75	1.83		
G/G	15	8.2	16	9.4	1.26	0.58	2.74		
rs17818902									
T/T	101	55.8	102	49.3	1.00			0.32325	0.52942
G/T	66	36.5	88	42.5	1.28	0.83	1.97		
G/G	14	7.7	17	8.2	1.21	0.56	2.61		
rs8061228									
T/T	108	60.0	134	64.1	1.00			0.55101	0.63265
C/T	70	38.9	73	34.9	0.87	0.57	1.33		
C/C	2	1.1	2	1.0	1.00	0.14	7.43		
rs10521303									
	54	29.7	75	36.6	1.00			0.07270	0.25042
A/C	91	50.0	101	49.3	0.81	0.51	1.28		
A/A	37	20.3	29	14.1	0.57	0.31	1.05		
rs12932428									
C/C	55	30.4	53	25.5	1.00			0.40697	0.60076
C/T	85	47.0	105	50.5	1.33	0.82	2.16		
T/T	41	22.7	50	24.0	1.25	0.71	2.21		
rs9924877									
G/G	98	54.4	91	43.5	1.00			0.03096	0.14266
A/G	68	37.8	89	42.6	1.37	0.89	2.12		
A/A	14	7.8	29	13.9	2.00	0.98	4.07		
rs7203181									
C/C	93	51.1	85	40.7	1.00			0.01932	0.12080
A/C	76	41.8	94	45.0	1.33	0.86	2.04		
A/A	13	7.1	30	14.4	2.31	1.12	4.77		
rs1344502									
T/T	57	31.8	55	26.6	1.00			0.26696	0.51723
C/T	85	47.5	107	51.7	1.38	0.86	2.23		
C/C	37	20.7	45	21.7	1.35	0.75	2.42		

**Table 1** Continued on next page

**Table 1 Continued**

	Cases		Controls		OR	Lower	Upper	P value	P value (FDR)
	n	%	n	%					
<b>rs9921255</b>									
T/T	124	68.1	111	54.4	1.00			0.00083	0.01287
C/T	56	30.8	83	40.7	1.77	1.15	2.74		
C/C	2	1.1	10	4.9	5.78	1.22	27.49		
<b>rs6499662</b>									
A/A	100	54.9	106	51.0	1.00			0.55057	0.63265
A/G	68	37.4	84	40.4	1.13	0.74	1.73		
G/G	14	7.7	18	8.7	1.17	0.54	2.51		
<b>rs7205987</b>									
T/T	129	70.5	144	70.6	1.00			0.94442	0.94442
C/T	48	26.2	53	26.0	1.01	0.63	1.61		
C/C	6	3.3	7	3.4	1.05	0.34	3.26		
<b>rs1125338</b>									
T/T	41	23.0	53	25.7	1.00			0.73258	0.78311
C/T	98	55.1	102	49.5	0.89	0.54	1.47		
C/C	39	21.9	51	24.8	1.11	0.61	2.02		
<b>rs2192872</b>									
T/T	86	48.0	100	47.8	1.00			0.68788	0.76158
C/T	76	42.5	84	40.2	0.98	0.64	1.51		
C/C	17	9.5	25	12.0	1.23	0.62	2.46		
<b>rs708258</b>									
A/A	45	25.1	63	30.7	1.00			0.32000	0.52942
A/G	87	48.6	89	43.4	0.71	0.44	1.17		
G/G	47	26.3	53	25.9	0.76	0.43	1.33		
<b>rs12599672</b>									
T/T	138	75.4	149	72.7	1.00			0.44794	0.60374
A/T	41	22.4	52	25.4	1.29	0.80	2.09		
A/A	4	2.2	4	2.0	0.87	0.21	3.66		
<b>rs11076017</b>									
T/T	54	30.3	62	29.8	1.00			0.52397	0.63265
C/T	84	47.2	93	44.7	0.96	0.60	1.55		
C/C	40	22.5	53	25.5	1.22	0.69	2.13		
<b>rs2665271</b>									
A/A	47	26.0	58	28.2	1.00			0.18443	0.40837
A/G	82	45.3	98	47.6	0.88	0.54	1.44		
G/G	52	28.7	50	24.3	0.68	0.39	1.20		
<b>rs12927155</b>									
C/C	133	74.3	162	77.5	1.00			0.49132	0.63265
C/T	44	24.6	42	20.1	0.75	0.46	1.23		

The P value was computed assuming an additive model. The multiple comparison problem was addressed using a false discovery rate (FDR) approach based on the Benjamini-Hochberg method that considers correlations among SNPs.



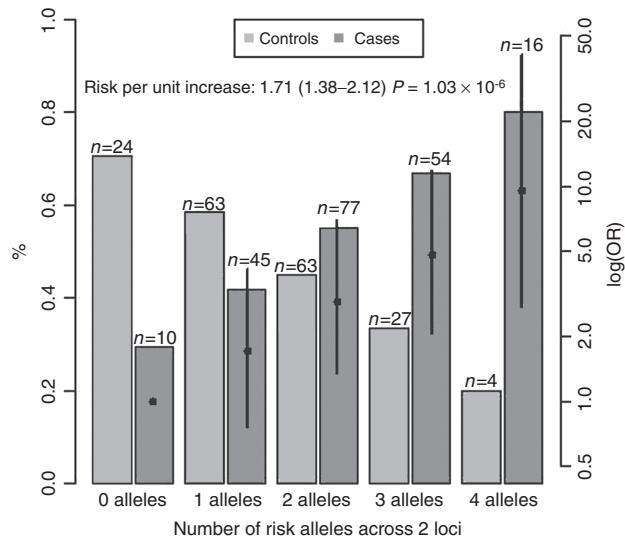
**Figure 1** Bottom panel shows the linkage disequilibrium pattern among 31 selected SNPs. The middle panel gives the  $P$  values of association between SNPs and obesity. The highest dashed line corresponds to the threshold for the significance level after correcting for multiple comparisons. The top panel illustrates the sliding window approach for the case of combining 3 successive SNPs. SNP, single nucleotide polymorphism.

**Table 2 Association analysis of obesity outcome phenotype with the haplotype combination of the best SNP combination found in the sliding window approach (rs1477196, rs17817449, and rs9939609)**

	Frequency	OR	95% CI	$P$ value
ATT	0.2639	1.00	Reference haplotype	
ATA	0.0382	0.35	(0.10–1.24)	0.1039
GGA	0.4307	2.07	(1.41–3.04)	0.0002
GGT	0.0379	0.26	(0.06–1.08)	0.0641
GTA	0.0306	0.79	(0.29–2.15)	0.6452
GTT	0.1969	1.10	(0.70–1.73)	0.6861
geno.rare	0.0019	0.35	(0.00–Infinity)	0.8491

CI, confidence interval; geno.rare, the rest of the rare haplotypes; OR, odds ratio. Overall  $P$  value:  $3.1 \times 10^{-8}$ .

genetic associations in our only moderately sized sample. Indeed, the high risk found in the present work compared to other studies could be because this strategy of selecting cases who presented obesity in childhood and who belonged to fam-



**Figure 2** Frequencies in cases and controls by number of risk alleles comprising genotypes at 2 loci that were statistically significantly associated with the phenotype after a multiple comparison correction: rs17817449 and rs9921255. The two SNPs were not in LD and were representative of the identified risk haplotype GGA and of the other block shown in **Figure 1**, respectively. The log of the odds ratio (OR) for obesity susceptibility (black dot) of each risk category is superimposed on the 95% CI for that estimate. LD, linkage disequilibrium; SNP, single nucleotide polymorphism.

ilies with a clear genetic predisposition allowed us to obtain a sample with higher penetrance variants.

In the single-marker analysis, we found that rs9939609, the SNP most frequently reported to be the core variant associated with obesity, was also significantly associated with our Spanish sample, but a close and highly correlated SNP (rs17817449) was found to be even more strongly associated. The sliding window approach confirmed these findings, since we identified a three-marker combination containing these same two SNPs. As all three SNPs of our associated haplotype are located within intron 1 of *FTO* (11), our results suggest the possible existence of potentially functional elements within this block or in high LD with it. No causal effect could be distinguished, however, due to the fact that they co-segregate almost together.

An interesting finding of the study was that the risk haplotype was found to be significant only in girls (12). This could be because we selected the obese subjects from families with a high aggregation of obesity, since it is known that the strongest risk factor for obesity is parental obesity and that this effect is even stronger when the mother is the obese parent (13). Thus, our results seem to confirm that sex-dependent genetic mechanisms could be involved, probably in conjunction with pre- and postnatal environmental factors.

Another interesting finding was that SNP rs9921255, located just before block 3, also increases the risk of being obese when in combination with the risk haplotype in block 1. This reinforces the idea that multiple susceptibility variants in the genomic region of *FTO* could influence the risk for obesity-related traits. That both of the polymorphic variants may

contribute to susceptibility to the disease stresses the need for a sequencing study of the regions in order to find rare and/or untyped variants that are actually being captured by the known SNPs existing in public databases.

In conclusion, we confirmed the previously reported association of genetic variability in intron 1 of *FTO* with the risk of obesity. Our series was formed with individuals belonging to a genetically homogeneous population of western Spain and included only severe obesity patients with an evident family history of overweight. A genetic profile has been described with which to better identify individuals with an increased susceptibility to suffer an early weight gain.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by ISCIII (PI070594) and Fundesalud (08PRI008), Junta de Extremadura.

#### DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

© 2011 The Obesity Society

#### REFERENCES

1. Reilly JJ, Armstrong J, Dorosty AR et al.; Avon Longitudinal Study of Parents and Children Study Team. Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *BMJ* 2005;330:1357.
2. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997;27:325–351.
3. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: *FTO* leads the way. *Trends Genet* 2010;26:266–274.
4. Scuteri A, Sanna S, Chen WM et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007;3:e115.
5. Price RA, Li WD, Zhao H. *FTO* gene SNPs associated with extreme obesity in cases, controls and extremely discordant sister pairs. *BMC Med Genet* 2008;24:9–4.
6. Xi B, Mi J. *FTO* polymorphisms are associated with obesity but not with diabetes in East Asian populations: a meta-analysis. *Biomed Environ Sci* 2009;22:449–457.
7. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005;76:887–893.
8. González JR, Armengol L, Solé X et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007;23:644–645.
9. Lake SL, Lyon H, Tantisira K et al. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. *Hum Hered* 2003;55:56–65.
10. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* 1995;57:289–300.
11. Dina C, Meyre D, Gallina S et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724–726.
12. Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V et al. Major gender difference in association of *FTO* gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:476–482.
13. Magnusson PK, Rasmussen F. Familial resemblance of body mass index and familial risk of high and low body mass index. A study of young men in Sweden. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1225–1231.

# Genetic risk profiles for a childhood with severely overweight

J. R. González<sup>1,2,3</sup>, M. N. Estévez<sup>4</sup>, P. S. Giralt<sup>4</sup>, A. Cáceres<sup>1,2,3</sup>, L. M. L. Pérez<sup>4</sup>, M. González-Carpio<sup>4</sup>, F. Ballester<sup>6</sup>, J. Sunyer<sup>1,2,3</sup> and R. Rodríguez-López<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>The Extremadura Obesity Observatory (OBEX.O), Badajoz, Spain; <sup>5</sup>Genetics Unit, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain; <sup>6</sup>University of Valencia, Center for Research on Public Health (CSISP), Valencia, Spain and Consortium for Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Spain

Received 29 August 2012; revised 20 February 2013; accepted 8 March 2013

## What is already known about this subject

- Genome-wide association studies have identified susceptibility loci, conferring only small effects to obesity.
- We selected 12 from the most accepted susceptibility genes to overweight, which have been corroborated in different populations and series of thousands of adult individuals.
- Single-nucleotide polymorphisms variants can have a cumulative effect on common forms of obesity, to create a genetic risk score.

## What this study adds

- We concentrated on 109 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in 12 loci previously reported in association to body mass index at genome-wide significant level, for individuals of European ancestry.
- To identify the frequency and effect size of common obesity SNPs in a discovery subsample of a group of children with high familial predisposition to morbid obesity.
- To select those genetic variants that best associate individuals with high-susceptibility genetic profiles to overweight, and to create and validate a genetic risk score (GRS).
- We compared the predictive power of each approach in an independent birth cohort, not aimed at studying obesity, and which can be considered as a suitable proxy to measure the clinical relevance of our GRS.

## Summary

**Objective:** The objective of this study was the description of a valid genetic risk score (GRS) to predict individuals with high susceptibility to childhood overweight by their genetic profiles.

**Design and methods:** Case-control study including a group of children with high-risk familial predisposition to morbid obesity. Birth cohort from general population constituted the validation sample. For the discovery sample, 218 children with non-syndromic obesity and 190 control individuals were included. The validation sample was 653 children from two birth cohorts belonging to the INMA (Infancia y Medio Ambiente [Environment and Childhood] )project. 109 SNPs located in the genes *FTO*, *SEC16B*, *BDNF*, *ETV5*, *SH2B1*, *GNPDA2*, *LYPLAL1*, *MSRA*, *TFAP2*, *KCTD15*, *MTCH2* and *NEGR1*, previously reported in association to body mass index (BMI) were analysed. For the validation sample, association between genome-wide data and BMI measurements between 3.5 and 5 years of age, were evaluated.

**Results:** The GRS includes six SNPs in the genes *FTO*, *TFAP2B*, *SEC16B*, *ETV5* and *SH2B1*. The score distribution differs among cases and controls ( $P = 9.2 \times 10^{-14}$ ) showing a significant linear association with obesity (odds ratio [OR] per allele = 1.69; confidence interval [CI] 95% = 1.46–1.97;  $P = 4.3 \times 10^{-1}$  and area under the receiver operating characteristic curve [AUC] = 0.727; CI 95% = 0.676–0.778). The results were validated by the INMA cohort (OR per allele = 1.23 CI 95% = 1.03–1.48 and AUC = 0.601 CI 95% = 0.522–0.680).

Address for correspondence: Dr R Rodríguez-López, Infanta Cristina Hospital, Genetics Unit, The Extremadura Obesity Observatory (OBEX.O), Badajoz, 06080, Spain. E-mail: raquel.rodriguez@ses.juntaextremadura.net

© 2013 The Authors

Pediatric Obesity © 2013 International Association for the Study of Obesity. **Pediatric Obesity** ••, ••••

**Conclusions:** The use of our proposed genetic score provides useful information to determine those children who are susceptible to obesity. To improve the efficiency of clinical prevention and treatment of obesity, it is essential to design individualized based protocols in advance knowledge of the molecular basis of inherited susceptibility.

**Keywords:** Obesity, inherited risk, score, SNP.

## Introduction

The prevalence of obesity in children continues to rise, expecting to reach 9.1% (60 million) worldwide by 2020 (1). Such a scenario urges for additional efforts in both investment on prevention and research relating to the identification of risk factors that may aid early intervention. It is widely accepted that genetic factors play an important role in the pathogenesis and susceptibility to obesity (2,3). Therefore, the identification of associated variants and assessment of their cumulative effects are essential in the design of prevention strategies and management of individuals genetically predisposed to obesity.

Genome-wide association studies (GWAS) have identified susceptibility loci, conferring only small effects to obesity (4–6). For example, Willer *et al.* (6) analysed changes in body mass index (BMI) and found effect sizes between 0.06 and 0.39 ( $\text{kg m}^{-2}$ ) across six loci. Thorleifsson and colleagues, focusing on obesity as a discrete trait, reported odds ratios (ORs) ranging from 1.03 to 1.26 (7) in 29 variants. Recently, a large association study including near 250 000 individuals determined 18 new loci that may play an important role in human body weight regulation, and found a maximum effect size of 0.39 ( $\text{kg m}^{-2}$ ) (8) for a single-nucleotide polymorphisms (SNP) in the *FTO* gene. Overall, GWAS have identified SNPs in a dozen genes that are related to BMI (4–8). Additional studies have also shown that SNP variants can have a cumulative effect on common forms of obesity. Li *et al.* (9), for instance, combined the effect of 12 SNPs in 20 431 individuals to create a genetic risk score (GRS). While showing a cumulative effect, the GRS on those SNPs only explained 0.9% of BMI variation, with a low predictive power of 57.4% (area under the receiver operating characteristic curve [AUC] = 0.574). An estimate that may still be inflated, given that the sample to build the score and evaluated it are the same. Similar results have also been found in a study including 6078 children (10), where the combination of 25 SNPs only explained 1.12% of the total variation for BMI z-score.

The previous studies seem to indicate that the cumulative effect of SNPs on obesity may not confer

enough predictive power. Note, however, that the creation of a GRS is not unique and may have some particular limitations on obesity-based GWAS. These studies, including a large number of individuals, have a huge heterogeneity among cases. Distinctions are not made between individuals with different types of overweight, age of onset, comorbidities, risk factors or familiar antecedents. The inclusion of a heterogeneous obese population, in particular, hinders the power of GRS measures to discriminate patients with moderate obesity. In addition, it is to expect that the majority of the individuals in a large sample study are subjected to minimal genetic influence (9,10). For such reasons, the use of the full sample of individuals in a GWAS to derive a GRS may lead to poor predictive models in independent cohorts.

These difficulties may be addressed by using a subsample of individuals of extreme genotype as a discovery sample, instead of using all the subjects in the GWAS. In relation to obesity, we propose the use of individuals of severe condition, early onset and evident familial aggregation of overweight in their families. Our hypothesis is that the exclusive use of the probands belonging to families highly predisposed to obesity will increase the likelihood of selecting candidate SNPs that may constitute a highly discriminator score. The genetic causes of obesity will then be overrepresented in the discovering sample made of a homogeneous group of individuals with high genetic component. In order to validate whether this SNP selection strategy in the extreme case subsample outperforms that of using the full GWAS sample, we compare the predictive power of each approach in an independent birth cohort, not aimed at studying obesity, and which can be considered as a suitable proxy to measure the clinical relevance of our GRS.

The purpose of the present study was then (i) to identify the frequency and effect size of common obesity SNPs in a discovery subsample of a group of children with high predisposition to morbid obesity; (ii) to select those genetic variants that best associate individuals with high-susceptibility genetic profiles to overweight; and (iii) to create and validate a GRS in an independent birth cohort from the general population. To this end, we concentrated on 109 SNPs

located in 12 loci previously reported in association to BMI at genome-wide significant level, for individuals of European ancestry (4–8).

## Methods and procedures

### Candidate genes

To identify genetic loci for an early and severe increased of weight, we examined differences in the genotype distribution of the polymorphic variability of the 12 susceptibility loci known as associated to obesity, identified by Thorleifsson *et al.* (7) and which were also corroborated by Speliotes *et al.* (8). The selected set included most of the genes related to polygenic inherited susceptibility to obesity strongly and recurrently. The MC4R gene was not considered to be analysed by using the SNP tagging strategy, because of its functional deficiency represents the most commonly monogenic cause of known human obesity. Because of this, a wide series of child obese patients have been analysed looking for pathogenic mutations in MC4R gene and, to date, none low-risk allele has been identified as potential influence on a polygenic mode of inheritance for body overweight. Data regarding common SNPs and linkage disequilibrium values in Caucasians were obtained from Ensembl (<http://www.ensembl.org>) and Hapmap (<http://www.hapmap.org>). We selected a set of 109 tag SNPs, which each one were highly correlated with the other SNPs, which are inside in its same linkage disequilibrium block ( $r^2$  from 0.52 to 1.0) and are located in the genes *FTO*, *SEC16B*, *BDNF*, *ETV5*, *SH2B1*, *GNPDA2*, *LYPLAL1*, *MSRA*, *TFAP2*, *KCTD15*, *MTCH2* and *NEGR1*. The SNPs captured most of the common variation of the selected genes the suggested obesity-associated SNPs were intronic and none was predicted to generate amino acid substitutions. Data for population of European ancestry (CEU) was downloaded from the International Haplotype Mapping Project web-site ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27\\_B36](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27_B36)) and tag SNPs were assigned using the Haploview software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). The gene region was considered between both of the chromosomal locations where 5'UTR and 3'UTR region is starting and finishing, respectively, which are detailed in the database (<http://www.ensembl.org>). To capture common variations, we considered SNPs with at least 10% of the minor allele frequency, and the pair-wise tagging with  $r^2$  value under 0.80. That selection method deselects those SNPs with  $r^2$  at least 0.80 or more with those SNPs, which were considered as tag SNPs for each defined linkage disequilibrium block. Genotyping

analyses were performed with the primer extension methods of commercially available iPLEX® Sequenom's and the mass spectrometry-based platform of MassARRAY MALDI-TOF (Sequenom, San Diego, United States). Detailed conditions are available upon request.

### Discovery sample

Individuals in the discovery sample where selected from families screened as a part of a study to detect cases of morbid obesity in Extremadura (western Spain) (11) and whose pathogenesis can be attributed primarily to genetic alterations. From this sample, we selected 218 patients who reached a weight greater than (mean + 3 SD) before 14 years of age and who referred at least two other morbid obesity cases among first- or second-degree relatives. We consider the existence of grade 3 overweight (commonly called morbid obesity) to be a BMI greater than or equal to  $40 \text{ kg m}^{-2}$ ; in children this corresponds to a BMI greater than the 95th percentile for age-matched and sex-matched control subjects from our population data. 190 controls were selected from a cohort of Spanish volunteers with ancestor of Extremadura origin. The group of control subjects was randomly selected, only serving to represent both sexes in balancing the cases and without attending to obesity research reasons. So the weights are represented: low, normal, overweight and obesity, as often found in our health area. They were assisted because own obstetric events or their partner. The study was approved by the Ethics Committee of the participating institutions and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions.

### Validation sample

We used a population-based birth cohort belonging to the INMA (Infancia y Medio Ambiente [Environment and Childhood]) Project as a validation sample. In particular, we selected the INMA cohorts of Valencia and Sabadell (Catalonia – north eastern Spain) established between 2003 and 2006. A total of 653 children were included during that period. This project aimed to study the associations between pre- and postnatal environmental exposures and growth, health and development from early foetal life until adolescence. For a recent description of INMA see Guxens *et al.* (12). Our analysis was restricted to Caucasian individuals with genome-wide data (genotyped using HumanOmni1-Quad Beadchip, Illumina) (Illumina Inc., San Diego, CA) and a BMI measurement available between 3.5 and 5 years of age

( $n = 653$ ). Weight and height were measured with calibrated scales and a wall-mounted stadiometer by trained field workers, with the children standing in light clothing and barefoot. BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Sex- and age-adjusted standard deviation scores (SDS) were constructed using Growth Analyser 3.0 (<http://www.growthanalyser.org>; Dutch Growth Research Foundation, Rotterdam, the Netherlands). Obese children in this sample were considered as those for which their BMIs were higher than the 90th percentile.

Genotypes in the INMA cohort were imputed for a total of 2 962 703 SNPs to match the SNPs analysed in the discovery sample. Imputation was based on HapMap Phase II genotypes for the CEU population using IMPUTE software (13).

### Statistical analyses

Departure from Hardy-Weinberg equilibrium for all the biallelic SNP markers was assessed using a fast exact test (14). Single SNP association was performed using likelihood ratio test (LRT) based on logistic regression models considering an additive mode of inheritance, and Benjamini-Hochberg (15) method was used to control the false discovery rate (FDR) because of multiple comparisons. We selected the SNPs that passed multiple comparisons threshold to create an *obesity-risk-allele* score based on summing the number of risk alleles (0–2) for the six selected SNPs. Our GRS thus have a maximum range between 0 and 12. An alternative GRS was computed from the allele sum weighted by the association observed for each SNP. The sum was weighted by the association score (e.g. log [OR]) arising from logistic model including each SNP individually. Both scores were compared with the obesity status. To test the predictive value for obesity risk (performance) of our metric, we estimated the impact of having each additional risk allele by computing the OR and their 95% confidence interval (CI 95%). Genetic variation in obesity was estimated using Nagelkerke  $R^2$  index (16) (pseudo- $R^2$  similar to  $R^2$  for quantitative traits). 95% CI for pseudo- $R^2$  was computed using bootstrap approach. In addition, the predictive value for obesity risk was calculated as the AUC. All the analyses were performed using SNPasoc R package (17).

## Results

### Single association analysis

From previous published GWAS on European ancestry populations, we selected a total of 109 SNPs

within the genes *FTO*, *SEC16B*, *BDNF*, *ETV5*, *SH2B1*, *GNPDA2*, *LYPLAL1*, *MSRA*, *TFAP2*, *KCTD15*, *MTCH2* and *NEGR1*. Genotype frequencies for controls were in Hardy-Weinberg equilibrium (Supporting Tables S1 and S2). The SNPs, with frequencies greater than 10% represented most of the linkage disequilibrium blocks in the regions where they were located. We found that seven SNPs located in *FTO* (rs17817449 and rs9921255), *TFAP2B* (rs760900), *SEC16B* (rs3748792), *ETV5* (rs7634510) and *SH2B1* (rs8055982 and rs7498665) were highly associated with severe obesity, after correcting for multiple comparisons (FDR = 0.05); see Table 1. The two SNPs belonging to *SH2B1* gene were in high Linkage disequilibrium (LD). Therefore, only one of them, rs7498665, was considered in the GRS computation. This SNP was selected because it has been reported in other studies (8–10).

Five out of the six SNPs involved in the GRS showed an increased risk to obesity. Table 1 shows the risk for the minor allele assuming an additive model: rs17817449 (OR = 1.72; CI 95% = 1.27–2.32), rs9921255 (OR = 1.91; CI 95% = 1.29–2.81), rs760900 (OR = 1.59; CI 95% = 1.18–2.14), rs7634510 (OR = 1.77; CI 95% = 1.21–2.58), rs8055982 (OR = 1.82; CI 95% = 1.34–2.47). On the other hand, rs3748792 showed a protective effect because frequency of the rare allele was lower in cases than in controls (OR = 0.59; CI 95% = 0.42–0.84). For this SNP, the major allele was then considered as the risk allele and its new OR was taken as 1/(OR of the minor allele) (Table 1).

### The obesity-risk-allele score

The six loci GRS for the obese individuals ranged from 1 to 10 with median equal to 5, and from 0 and 8 for controls with median equal to 4. The test for difference in score distribution was statistical significant ( $P = 9.2 \times 10^{-14}$ , Mann-Whitney *U*-test). In addition, the GRS showed significant linear association with obesity ( $P = 4.3 \times 10^{-14}$  LRT; Fig. 1a). On average, each risk allele conferred an estimated increased risk of 1.69 times the disease risk among our population (OR per allele = 1.69; CI 95% = 1.46–1.97). We additionally computed the difference in the distribution of GRS between individuals with obesity and controls with a sample partition. We defined risk categories depending on the number of risk alleles:  $\leq 2$ , 2–6,  $\geq 7$ , and observed that those individual carrying  $\geq 7$  risk-alleles had 3.1 times (OR = 3.11; IC95% 1.58–6.61) increased odds of being obese compared with those with 2–6 risk-alleles (Fig. 1). When the category  $\geq 7$  was

**Table 1** Univariate analysis of analysed SNP

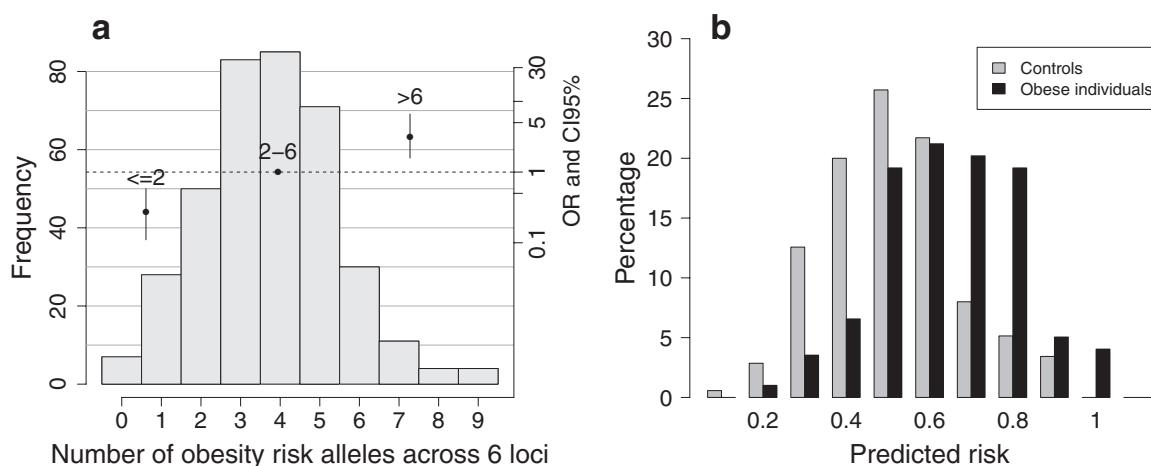
SNP	Gene	Position (bp)	Risk Allele	Controls		Cases		OR	CI 95%	P-value
				n	%	n	%			
Discovery sample										
rs17817449:T>G	<i>FTO</i>	52 370 868	G	108	61.4	160	79.2	1.84	(1.37–2.47)	$1.4 \times 10^{-5}$
rs9921255:T>C	<i>FTO</i>	52 566 829	C	58	31.9	93	45.6	1.80	(1.24–2.63)	$1.7 \times 10^{-3}$
rs760900:G>A	<i>TFAP2B</i>	50 904 593	T	116	63.7	158	77.5	1.57	(1.18–2.10)	$2.0 \times 10^{-3}$
rs3748792:C>T	<i>SEC16B</i>	176 168 278	T <sup>†</sup>	90	43.9	98	55.7	1.59	(1.13–2.22)	$6.7 \times 10^{-3}$
rs7634510:C>T	<i>ETV5</i>	187 263 257	T	51	27.9	79	38.9	1.73	(1.19–2.51)	$3.0 \times 10^{-3}$
rs8055982:A>C <sup>‡</sup>	<i>SH2B1</i>	28 788 703	C	79	43.4	126	60.6	1.78	(1.32–2.40)	$1.2 \times 10^{-4}$
rs7498665:A>G <sup>‡</sup>	<i>SH2B1</i>	28 790 742	G	79	43.4	124	60.5	1.76	(1.30–2.38)	$1.9 \times 10^{-4}$
Validation sample										
rs17817449:T>G	<i>FTO</i>	52 370 868	G	408	67.7	36	73.5	1.22	(0.80–1.84)	0.3534
rs9921255:T>C	<i>FTO</i>	52 566 829	C	213	35.3	23	46.9	1.66	(1.06–2.61)	0.0306
rs760900:G>A	<i>TFAP2B</i>	50 904 593	A	424	70.3	33	67.3	1.16	(0.77–1.77)	0.4791
rs3748792:C>T	<i>SEC16B</i>	176 168 278	A	554	91.9	47	95.9	1.22	(0.76–1.97)	0.4058
rs9831938:T>C <sup>§</sup>	<i>ETV5</i>	187 268 690 <sup>§</sup>	T <sup>§</sup>	324	53.7	27	55.1	1.16	(0.75–1.79)	0.5137
rs7498665:A>G	<i>SH2B1</i>	28 790 742	G	521	86.4	47	95.9	1.58	(1.00–2.52)	0.0456

<sup>§</sup>SNP rs7634510 was not available in the validation sample and was replaced by rs9831938 (LD = 0.98).

SNPs that compose the GRS in the discovery and validation samples. All OR are given for the risk allele of each SNP, which is the minor allele.<sup>†</sup>Except for rs378792 : C > T. In this case the original OR was converted as 1/OR of the minor allele).

<sup>‡</sup>The SNPs in gene SH2B1 were in high LD (>0.95) since they are located consecutively. Therefore, only one of them was used to build the GRS. We selected rs7498665 : A > G because it has been associated to obesity in other studies.

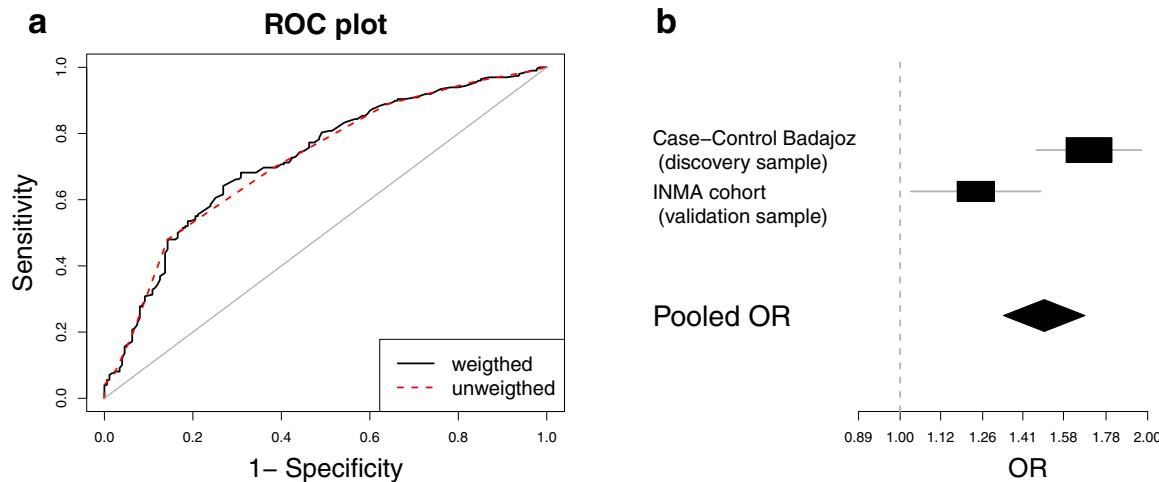
CI, confidence interval; GRS, genetic risk score; LD, linkage disequilibrium; OR, odds ratios; SNPs, single-nucleotide polymorphisms.



**Figure 1** Effect of risk alleles on obesity for the case-control study. (a) For each individual its number of risk alleles (0, 1 or 2) were summed to build a genetic risk score (GRS). Left axis represents the distribution of the GRS. Right axis shows the odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals for the grouped GRS. Individuals with 2–6 risk alleles were considered as the reference group. (b) Distribution of cases and controls (%) depending on the predicted risk.

compared with category  $\leq 2$  there was 11.7 (OR = 11.66; CI 95% = 4.62–36.91) times increase in the odds of developing obesity (Fig. 1a). Figure 1b shows the distribution of predicted risk for cases and controls. We observed that the more risk of obesity the more percentage of cases with obesity. Figure 2a shows the receiver operating characteristic curve for GRS and wGRS. The AUC

estimates how well GRS discriminates between individuals with obesity and controls. The score showed a high discrimination power (AUC = 0.727; CI 95% = 0.676–0.778). The combined effect on children with obesity is large, mainly due to the fact that those individuals are highly susceptible because of their family history. In this data, we estimated that the variant signals account for 18.9%



**Figure 2** Receiver operating characteristic (ROC) curve and odds ratios summary. (a) ROC curve for the case-control study. Solid line corresponds to genetic risk score (GRS) and dotted line is for wGRS. The area under the ROC was 0.727 (confidence interval [CI] 95% = 0.676–0.778). (b) Odds ratio (OR) corresponding to the risk per unit increase of GRS for the case-control data (derivation sample) and INMA cohort (validation sample). The combined OR was computed using a random effects model.

(bootstrap CI 95% = 9.1–32.2) of the genetic variation in morbid obesity in our case-control sample.

Four control individuals had a risk score of 7 (1. man of 35 years, and 2. woman of 33 years) and a risk score of 8 (3. man of 38 years and 4. woman of 33 years). The control 1 carries the score combination: heterozygote rs17817449 (*FTO*), homozygote rs760900 (*TFAP2B*), heterozygote rs3748792 (*SEC16B*), heterozygote rs7634510 (*ETV5*) and homozygote rs8055982 (*SH2B1*). His height and weight were 1.85 m and 125 kg, respectively. His weight at 6 years of age was calculated above 3 SDs. He reported a similar life overweight in one of her brothers and her mother. The control 2 carries the risk combination: homozygote rs17817449, heterozygote rs9921255 (*FTO*), heterozygote rs760900, heterozygote rs3748792, heterozygote rs7634510 and heterozygote rs8055982. Her height and weight maintained normal ranges. She had not familial antecedents of obesity. We could not collect these data control 3, only agreed to his history of gastrointestinal surgery for inguinal and umbilical hernias. Control 4 carries the score combination: homozygote rs17817449, heterozygote rs9921255, homozygote rs760900, homozygote rs3748792 (*SEC16B*) and heterozygote rs8055982. His height and weight were 1.70 m and 94 kg, respectively. His weight at 6 years of age was calculated above 3 standard deviations.

Only the risk score of the control 4 coincided with the combination of one of the obese patients, who in the last review (at 25 years) had a weight of 105 kg and height of 1.53 m.

### Validation

In the INMA cohort, 49 out of 653 children (7%) were obese at the age of 4. Five of the six SNPs from the previous analysis were available in the imputed data. The quality of imputation was high, with score ranging from 0.9 to 1.0 (Supporting Table S3). One of the SNPs used in the discovery sample, rs7634510, was not available in the validation cohort, and was replaced by the neighbouring rs9831938 because its chromosomal location was only 5433 pb of distance. Minor allele frequencies were almost identical in both samples (Supporting Table S3). The general characteristics of our GRS in this sample were as before: (i) the estimated ORs of the six SNPs are in the same direction. While only two of them were statistically significant at 5% level, this is probably due to the limited number of cases (Table 1); (ii) there was an increase per-allele-risk (OR = 1.23 CI 95% = 1.03–1.48); (iii) a statistically significant predictive power was also observed (AUC = 0.601 CI 95% = 0.522–0.680,  $P = 8.3 \times 10^{-3}$  for the difference from the null AUC = 0.50). As expected the genetic variation explained in this independent cohort (2.0%, CI 95% = 0.1–6.3) was lower than that for the discovery sample.

## Discussion

In the context of obesity, GWAS have been successful in discovering susceptibility loci, which confer small effects for discrete to severe sizes changes in BMI (6,7) or waist circumference (8,9). The SNPs included in commonly used platforms for GWAS strategies were selected to evenly cover the entire genome. Therein lies its utility to be used as a proxy in case-control studies, to find areas of the genome associated with any complex polygenic disease. Proved useful to identify candidate genes for obesity studies, but our work shows what many authors note, condolences to the need to analyse these genes in depth and with much finer strategies, as presented here. The significant SNPs identified in this study are the same as those previously reported SNPs in GWAS, but if they were located in the same linkage disequilibrium block that SNPs of SCORE pointed with much higher risk in much smaller sample sizes. However, the risks obtained for the identified genetic markers are difficult to compare across studies, given that the selection of the obese populations may differ substantially in their recruitment criteria, particularly on the time of onset.

Some authors have previously argued that the proportion of observed variability may be accounted by the cumulative effect of several loci (9,10). A GRS is then proposed as a suitable metric for the measurement of the combination effect among the relevant loci (18). GRS scores for obesity are typically computed from the polymorphic variants identified in previous GWAS. However, the large heterogeneity among individuals in these studies can hinder the predictive power of the measure (8,9). We show that the selection of the SNPs for the GRS using a homogeneous subsample of patients with extreme obesity improves the score's prediction. In this work, we focused on early onset and severe form of obesity, combined with variegated pattern of inheritance of excess weight.

With the combination of only six SNPs in the genes *FTO*, *TFAP2B*, *SEC16B*, *ETV5* and *SH2B1*, we are able to account for the 18.9% of observed variability in our sample with a predictive power of 72.7%. The combination of the six SNPs that comprise the SCORE in homozygous condition in the same individual is expected in the general population with an extremely low frequency. Because of that, nobody had a risk score of neither 12 nor 11 in our series, even among the obese sample. While this result is a significant improvement on those obtained by Li *et al.* (9), it overestimates the real effect of the risk score for the general population because it is based

on highly predisposed group of patients. An additional bias of both estimates is due to the fact that the selection of variables for the GRS and the assessment of its performance are both done in the same sample. The unbiased estimate of the AUC in a validation sample, not computed by Li *et al.*, indicates a real increment in the performance of our GRS, with observed variability 2% and the predictive power of 60%. Note that our selection strategy results in a reduced set of six SNPs, increasing the performance of the GRS from other studies that combine up to a dozen SNPs (8–10,19). This suggests that risk scores may suffer from over-fitting, hindering their generalizability to other samples. The selection of the obese patients who developed extreme phenotypes really improved our results, comparing in terms of the obtained variances from the majority of the association studies designed for obesity research. The explained variance is unusually high, still higher than the one observed in large studies, but surely can be due to the use of a sample including children with a high family predisposition to obesity.

We verified that two control individuals carrying risk scores of 7 and 8, respectively, exhibited severe overweights from their childhood (BMI 36.5 and 32 at 35 and 33 years, respectively). This means that the same score could predict obesity, which certainly challenges the clinical utility of the GRS as a predictive tool for the public health and/or clinical management. Although further exploration is required, the GRS predicts value for increased body weight. Our findings could lead to establish primary prevention strategies of obesity/body weight after genetic analyses in children.

The INMA birth cohort validates those results exactly, but among a more general sample.

While the selected variants show a cumulative effect, the genes to which they belong do not share functional pathways. As a consequence, different combination of genotypes might differ in their functional role in overweight. For instance, the functional capacity of the *FTO* gene has been described in relation to mild risks on heterozygous variants and to severe overweight for the non-functional allele (psychomotor delay and severe craniofacial dysmorphism) (20). Whereas, *SH2B1* may regulate body weight by enhancing hypothalamic leptin sensitivity (21) where deletion carriers exhibit hyperphagia and severe insulin resistance (22). In addition, *SH2B1* haploinsufficiency contributes significantly to severe early onset of obesity, in some cases associated with autism and mental retardation (23). Both *FTO* and *SH2B1* support a neuronal basis in relation to weight

control, governed by a similar model of inheritance and, in our study, they showed the highest risk though the SNPs analysed. The functional consequences of the mutations or haploinsufficiency of variants within *SEC16B*, *ETV5* and *TFAP2B* have not been clearly identified despite of their replication (24). However, our predictive model supports the notion that severe early onset overweight may result from a mixed model of inheritance that includes both the recessive major deleterious genes *FTO* and *SH2B1* and a polygenic component with smaller effects of *TFAP2B*, *SEC16B* and *ETV5*. However, the high heritability of the severe overweight in our probands' families is not fully covered by the attributed risk of the selected variants, and therefore an unidentified residual polygenic component might still exist.

Our results indicate that the detectable genetic variation associated with extreme overweight is comparable with that previously found in a population-based study of general BMI with a design that required tens of thousands of subjects to achieve similar power (25). This suggests that studies with enriched sample of individuals with extreme phenotype are an efficient alternative for identifying common variants associated with quantitative traits. The genetic variation explained by the same SNPs was almost tenfold different, when considering a sample of all obese individuals vs. a population-based sample. This means that in our sample is higher by the careful selection of cases, so if you want values comparable with published results from a general population or from studies with GWAS strategy, the best estimate is INMA and more similar to what would be expected.

The GRS defined from the selection of SNPs that are associated with severe obesity in a high predisposed group, allowed us to predict overweight in children in an independent and representative cohort, where the number of cases (7%) matches that of the general population. Further assessment of this GRS is still needed in birth cohorts and adult samples for designing individualized prevention protocols and clinical management. An additional subpopulation of interest where our approach can be evaluated is that of obese with hypothalamic imbalances, unable to maintain control of satiety and interference in routes of energy control.

We also propose the design of our study to search for polygenic profiles that are associated with certain comorbidities in obese patient groups. The genotype–phenotype correlations provide a basis of extreme importance to unravel the molecular basis of the clinical differences observed among individuals with severe overweight as hyperlipidae-

mia, endocrine disorders and/or cardiovascular events (26).

## Conflict of interest statement

All the authors recognize and disclose to have no conflict of interest to declare.

This work was supported by the ISCIII, Madrid for Financial support (07PI594, 10PI357) and Fundesalud, Junta de Extremadura (08PRI008).

## Acknowledgements

We would like to acknowledge María Torres Español, person-in-charge of the Sequenom platform at the CeGen's Santiago de Compostela Node, which is located in the University Clinical Hospital, managed by Dr. Angel Carracedo. Elly van der Maesen de Sombreff, who provided us help with the language.

## References

1. de Onis M, Blössner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 1257–1264.
2. Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 1998; 280: 1371–1374.
3. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 221–234.
4. 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; 316: 8889–8894.
5. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007; 3: e115.
6. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, et al. Genetic Investigation of Anthropometric Traits Consortium. Six new loci associated with body mass index highlight a neurological influence on body weight regulation. *Nat Genet* 2009; 41: 25–34.
7. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that are associated with measures of obesity. *Nat Genet* 2009; 41: 18–24.
8. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2010; 42: 937–948.
9. Li S, Zhao JH, Luan J, et al. Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 184–190.
10. Zhao J, Bradfield JP, Li M, et al. The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of paediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 2254–2257.

11. González JR, González-Carpi M, Hernández-Sáez R, et al. FTO risk haplotype among early onset and severe obesity cases in a population of western Spain. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 909–915.
12. Guxens M, Ballester F, Espada M, et al. Cohort profile: the INMA – Infancia y Medio Ambiente – (environment and childhood) Project. *Int J Epidemiol* 2012; 41: 930–940. doi:10.1093/ije/dyr054 [Epub ahead of print].
13. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies via imputation of genotypes. *Nat Genet* 2007; 39: 906–913.
14. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 887–893.
15. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 1995; 57: 289–300.
16. Nagelkerke N. A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* 1991; 78: 691–692.
17. González JR, Armengol L, Solé X, et al. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; 23: 644–645.
18. Bokor S, Meirhaeghe A, Ruiz JR, et al. Common polymorphisms in six genes of the methyl group metabolism pathway and obesity in European adolescents. *Int J Pediatr Obes* 2011; 6: e336–e344.
19. Elks CE, Loos RJ, Sharp SJ, et al. Genetic markers of adult obesity risk are associated with greater early infancy weight gain and growth. *PLoS Med* 2010; 7: e1000284.
20. Shoukier M, Wickert J, Schröder J, et al. A 16q12 microdeletion in a boy with severe psychomotor delay, craniofacial dysmorphism, brain and limb malformations, and a heart defect. *Am J Med Genet A* 2012; 158A: 229–235. doi: 10.1002/ajmg.a.34387.
21. Ren D, Zhou Y, Morris D, Li M, Li Z, Rui L. Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2007; 117: 397–406.
22. Bachmann-Gagescu R, Mefford HC, Cowan C, et al. Recurrent 200-kb deletions of 16p11.2 that include the SH2B1 gene are associated with developmental delay and obesity. *Genet Med* 2010; 12: 641–647.
23. Bochukova EG, Huang N, Keogh J, et al. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature* 2010; 463: 666–670.
24. Ng MC, Tam CH, So WY, et al. Implication of genetic variants near NEGR1, SEC16B, TMEM18, ETV5/DGKG, GNPDA2, LIN7C/BDNF, MTCH2, BCDIN3D/FAIM2, SH2B1, FTO, MC4R, and KCTD15 with obesity and type 2 diabetes in 7705 Chinese. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2418–2425.
25. Paternoster L, Evans DM, Nohr EA, et al. Genome-wide population-based association study of extremely overweight young adults – the GOYA study. *PLoS ONE* 2011; 6: e24303.
26. Horvatovich K, Bokor S, Baráth A, et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. *Int J Pediatr Obes* 2011; 6: e318–e325.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Table S1.** Genotype frequencies for controls were in Hardy-Weinberg equilibrium.

**Table S2.** Univariate analysis for the 109 SNPs within the genes *FTO*, *SEC16B*, *BDNF*, *ETV5*, *SH2B1*, *GNPDA2*, *LYPLAL1*, *MSRA*, *TFAP2*, *KCTD15*, *MTCH2* and *NEGR1*, genotyped in the case/control study.

**Table S3.** Discovery sample include our series of cases and controls. Validation sample is the INMA cohort. Five of the six SNPs from the previous analysis were available in the imputed data. The quality of imputation was high, with score ranging from 0.9 to 1.0.