

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MARA DELL'OSPEDALE RIBEIRO

ANÁLISE DE PORTADORES DE SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN FISH (-)
POR MLPA

BOTUCATU – SP
2015

MARA DELL'OSPEDALE RIBEIRO

**ANÁLISE DE PORTADORES DE SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN FISH
(-) POR MLPA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu como exigência parcial para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biomédicas sob orientação do Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

**BOTUCATU – SP
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ribeiro, Mara Dell Ospedale.

Análise de portadores de síndrome de Williams-Beuren
FISH (-) por MLPA / Mara Dell Ospedale Ribeiro. - Botucatu,
2015

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira

Capes: 20205007

1. Williams, Síndrome de. 2. Hibridização in situ. 3.
Ciências médicas. 4. MLPA. 5. Reação em cadeia de
polimerase.

Palavras-chave: FISH-; MLPA; Síndrome de Williams-Beuren.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada família, Milton, Marlene e Marcela, por, apesar da distância, sempre estarem ao meu lado e serem a base de tudo o que eu sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus Botucatu, e a todo corpo docente e funcionários, por tornarem possível essa oportunidade.

Ao Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, pelo seus ensinamentos e acreditar em meu potencial.

Aos companheiros de laboratório, Deise, Jakeline, Patrick, Rodrigo e Rosana, por me acolherem e incluírem na família do Serviço de Aconselhamento Genético.

Às minhas amigas companheiras de casa, Ana, Bárbara e Carol, por fazerem parte da minha família de Botucatu.

Aos membros do Laboratório de Citogenômica do LIM 03 HC-FMUSP por terem paciência ao me ensinar a técnica e possibilitar a realização desse estudo.

Aos membros da Associação Brasileira da Síndrome de Williams que lutam para que levar o conhecimento da Síndrome a todos.

Aos pacientes e responsáveis que participaram e tornaram esse estudo possível.

RESUMO

A síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma afecção genética que possui como perfil clínico deficiência mental, dificuldade de aprendizado, fâceis típicas, problemas cardíacos congênitos, comportamento hipersociável, disfunções no desenvolvimento e hipercalcemia idiopática infantil. Sua etiologia é consequência de uma microdeleção no cromossomo 7, na região 7q11.23, de aproximadamente 1,5 Mb, ocasionando a perda de 28 genes que codificam proteínas. A partir dos sinais clínicos do paciente, foram elaborados três sistemas de pontuações para ajudar no diagnóstico clínico e indicar a necessidade do diagnóstico laboratorial. O diagnóstico laboratorial padrão ouro da SWB é através do exame de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Alguns pacientes apresentam diagnóstico clínico da SWB, porém o resultado da FISH é negativo para a afecção. O objetivo desse trabalho foi Analisar a região crítica dos pacientes que possuem diagnóstico clínico para a SWB e resultado negativo da FISH através da técnica de amplificação de múltiplas sondas de ligação (MLPA). A técnica de MLPA detecta alterações de número de cópias de DNA em até 50 sítios diferentes simultaneamente, portanto é possível analisar as deleções atípicas, além de ter um custo menor que o FISH. Dentre os 18 pacientes estudados, 13 não apresentaram resultados por conta da degradação do DNA utilizado, um apresentou resultado não confiável e três apresentaram algum gene deletado que condiz com as características fenotípicas observadas. Ainda é preciso maiores estudos para elucidar a correlação genótipo-fenótipo na região crítica da SWB.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Pediatria
aCGH	Hibridização Genômica Comparativa em Microarranjos
DNPM	Desenvolvimento Neuropsicomotor
DNA	Ácido dessoxirribonucléico
<i>ELN</i>	Gene da elastina
EAP	Estenose pulmonar periférica
EASV	Estenose aórtica supra-avalvular
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
LCRs	Repetições com baixo número de cópias
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas de ligação
NAHR	Recombinação homóloga não alélica
PCR	Reação em cadeia por polimerase
SWB	Síndrome de Williams-Beuren
SAG	Serviço de Aconselhamento Genético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.2. Características Clínicas.....	1
1.3. Etiologia	1
1.4. Diagnóstico.....	4
1.5. Sistemas de Pontuação para o Diagnóstico Clínico da SWB.....	6
2. OBJETIVO	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4. RESULTADOS	11
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	13
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A Síndrome de Williams-Beuren (SWB) teve suas primeiras descrições clínicas em 1961 por Williams et al., na Nova Zelândia e em 1962 por Beuren et al., na Alemanha. Cada um descreveu um grupo de pacientes que apresentavam características semelhantes, como estenose aórtica supravalvular (EASV), deficiência mental, dimorfismos faciais, anomalias dentárias, estrabismo e temperamento amigável.

1.2. Características Clínicas

A SWB (OMIM 194050) é uma síndrome rara que possui uma prevalência de 1/7.500 nascimentos (Stromme et al., 2002). Os portadores apresentam alteração no comportamento e em características físicas.

O fenótipo da síndrome possui variações quanto à severidade e manifestações. As alterações incluem malformações cardíacas, sendo a mais comum EASV e estenose periférica pulmonar (EPP), atraso de crescimento, hiperacusia, face dismórfica e hipercalcemia.

As modificações faciais incluem: fronte alargada, orelhas grande em abano, edema periorbital, estrabismo, íris estrelada, ponte nasal baixa, filtro nasal longo, bochechas proeminentes, boca de carpa, lábio inferior grosso e micrognatismo.

Há também deficiência intelectual de intensidade leve à moderada, déficit na noção visuoespacial, loquacidade, desinibição, hiperacusia e voz rouca e grave.

1.3. Etiologia

A SWB é causada por uma microdeleção de 1,55 Mb (típica) no cromossomo 7 na região 7q11.23, envolvendo 28 genes, em 5% dos pacientes ocorre uma

microdeleção de 1,84Mb (atípica) e em 2% a microdeleção é considerada incomum pois são diferentes de 1,55 e 1,88 Mb (Schubert., 2009).

Os mecanismos de deleção estão ligados às regiões repetitivas LCR (*Low Copy Repeats*), que possuem entre 10 a 400 Kb, estão presentes em 5% de todo o genoma e são o substrato para as reações de *crossing-over* durante a divisão meiótica. Durante o *crossing-over*, a recombinação pode acontecer de maneira distinta entre homólogos não alélicos (*nonallelic homologous recombination* – NAHR) que pode causar a deleção de um ou mais genes (Lupski et al., 1998).

Os genes envolvidos na microdeleção foram analisados através de marcadores de microssatélite em indivíduos portadores da SWB. Apesar da função celular desses genes já estar esclarecida, sua relação genótipo-fenótipo nas manifestações da SWB ainda precisa ser mais aprofundada.

Tabela 1. Genes envolvidos na região crítica de SWB

Gene	Função
FKBP6	Traduz a proteína da classe das imunofilinas, tem expressão no coração, músculo esquelético, fígado, rim e testículos. Pode estar relacionado a hipercalcemia e ao atraso de crescimento na SWB (Meng et al., 1998)
FZD9	Relacionado à diminuição da degradação de beta-catenina, que está envolvida com o processo de tumorigênese em células estaminais. (Ranheim et.al., 2005)
BAZ1B	Fator de transcrição da síndrome de Williams (WSTF), expresso no tecido neural e está relacionado a alterações no metabolismo de vitamina D e hipercalcemia. (Kitagawa et al. 2003)
BCL7	Envolvido na linhagem celular do linfoma de Burkitt. (Jadayel et al., 1998)
TBL2	Traduz a proteína β -transducina, função em via de sinalização intracelular. Apresenta expressão diminuída no

	coração, músculo esquelético e testículo. (Perez Jurado et al., 1999)
WBSCR14	Traduz a proteína de transcrição basic-helix-loop-helix leucine zíper, envolvidos na proliferação, crescimento, diferenciação e apoptose celular. Um dos genes críticos da SWB. (Cairo et al., 2001)
STX1A	Traduz a proteína syntaxina 1A, possui papel fundamental na liberação e fusão de neurotransmissores nas vesículas sinápticas. Pode estar relacionado ao nível de inteligência na SWB. (Gao et al., 2010).
ELN	Traduz a proteína elastina, presente no tecido conjuntivo das artérias. Estenose aórtica supralvalvular, característica de SWB, pode ser uma consequência de uma alteração ou insuficiência no gene. (Tassabehji et al., 1997)
LIMK1	Traduz a proteína quinase, atua na formação e manutenção das sinapses, sua deleção está relacionada à perda na integração visuo-espacial. (Scott et al., 2007)
E1F4H	Relacionado ao início da tradução de RNA. (Richter et al., 1999)
RCF2	Componente do complexo de replicação do fator C, atua na ativação da DNA polimerase durante a replicação dos cromossomos. Pode estar envolvido na microcefalia e na deficiência de crescimento na SWB. (O'Driscoll, 2009)
CYLN2	Traduz a proteína de ligação intracelular, função cognitivo e motor. (Ferrero et al., 2010).
GTF2IRD1	Está envolvido no desenvolvimento e diferenciação, altamente expresso durante a odontogenese, podendo estar relacionado nas anomalias dentárias na SWB. (Ohazama, 2007)

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial padrão ouro da SWB é feito através da técnica de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) que consiste em parear um segmento da amostra de DNA com uma sonda que possui a sequência complementar ao gene *Elastina* (*ELN*) e é marcada com um fluorocromo.

Realiza-se a denaturação do DNA com sondas disponíveis no meio e, quando há a renaturação da molécula, as cópias da sonda são hibridizadas *in situ*, ou seja, no exato local onde a sequência analisada ocorre naturalmente. Essa reação pode ser visualizada posteriormente por conta da fluorescência emitida pelo fluorocromo.

96% dos pacientes portadores da SWB apresentam apenas um sinal fluorescente correspondente à região crítica da síndrome, comprovando a microdeleção da região 7q11.23, denominados então de FISH+ (Morris, 2000). Porém ela só é eficiente para o diagnóstico da microdeleção típica, quando há a deleção do gene da elastina. Outros 4% apresentam o diagnóstico clínico, porém na FISH observam-se os dois sinais fluorescentes, esses pacientes são denominados FISH-.

Outra técnica de diagnóstico molecular é a Amplificação de múltiplas sondas de ligação (MLPA), capaz de detectar deleções e duplicações em vários genes de um mesmo trecho de DNA simultaneamente.

As sondas são compostas por dois oligonucleotídeos que se unem quando se ligam à sequência-alvo, apenas as sondas complementares são amplificadas simultaneamente em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Além disso, todas possuem sequências idênticas de final 5' e 3', sendo necessário apenas um iniciador de sequência (*primer*) para a realização da PCR.

Na técnica de MLPA, o DNA é denaturado, adicionam-se as sondas para a hibridização em termociclador e o tampão de diluição que contém a enzima ligase. Posteriormente, adicionam-se os *primers*, os desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) e a polimerase para dar início à PCR. O *primer* é marcado por

fluorescência o que faz com que seja possível a detecção e quantificação dos produtos da amplificação através dos picos de fluorescência emitidos.

Posteriormente são analisados os picos produzidos na PCR. Cada pico representa uma sonda utilizada, permitindo uma análise qualitativa, já que quando há a deleção de uma cópia da sequência-alvo há uma redução de 35 a 55% no pico. O 'kit' para o diagnóstico de SWB, P029, contém sondas para oito genes localizados na região crítica da síndrome, são eles: *FKBP6*, *FZD9*, *TBL2*, *STX1A*, *ELN*, *LIMK1*, *RFC2* e *CLIP2*. Dessa forma o diagnóstico da SWB por MLPA se dá de forma precisa, pois é possível a análise de toda a região crítica, sendo relevante para a situação de pacientes com deleções atípicas que podem não ser diagnosticadas quando se utiliza a FISH.

Além da maior precisão que a FISH, o MLPA também é uma técnica mais barata, mais rápida e utiliza menor quantidade de amostra para ser realizada, porém o material genético da amostra deve estar muito bem conservado.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) além de amplificar e quantificar a quantidade de cópias de DNA, também determina o ponto de quebra cromossômico. Este método permite uma melhor avaliação dos pacientes com deleção atípica, que muitas vezes não são identificados quando utilizada a técnica da FISH. Apesar do alto custo da qPCR, quando comparada com a técnica da FISH, o tempo de execução é menor, existe a possibilidade de se analisar múltiplas amostras.

Outra técnica utilizada é a Hibridização Genômica Comparativa Cromossômica (aCGH), com ela é possível detectar alterações no número de cópias de segmentos de DNA. Consiste em realizar uma mistura com razão 1:1 de DNA teste e DNA de referência, sendo que cada um deve estar marcado com colorações diferentes. Há a disputa entre as sequências de DNA durante a hibridização na metáfase, dessa forma obtemos uma proporção do sinal de fluorescência mensurado ao longo do eixo longitudinal dos cromossomos. Posteriormente é feita a análise quantitativa dos sinais de fluorescência através de um sistema digital de imagens.

1.5. Sistemas de Pontuação para o Diagnóstico Clínico da SWB

Para orientar os clínicos na indicação de exames citogenéticos específicos para o diagnóstico da Síndrome de Williams foram criados sistemas de pontuação que levam em conta aspectos clínicos dos pacientes. No sistema proposto por Lowery et al. (1995) os pacientes são classificados como clássicos quando sua pontuação varia de quatro a dez, e incertos quando seus pontos são de zero a três.

Tabela 2. Escore elaborado por Lowery (adaptado de Lowery et al. 1995)

LOWERY	
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	PONTOS
Fáceis típicos	3
DM/ADNPM	1
EASV	2
Cardiopatia que não EASV	1
Hérnia inguinal	1
Hipercalcemia	2
TOTAL	10

O modelo apresentado pela Academia Americana de Pediatria (2001) sugere a realização da FISH quando a pontuação obtida é igual ou maior que três.

Tabela 3. Escore elaborado pela AAP (adaptado de AAP, 2001)

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS	
CRESCIMENTO (3 características = 1 ponto)	
Pós-termo > 41 semanas	Constipação crônica
Cólica prolongada > 4 m de irritabilidade	Vômitos ou refluxo gastroencefálico
Déficit de crescimento < p 5	
COMPORTAMENTO E DESENVOLVIMENTO (3 características = 1 ponto)	
Personalidade amigável	Atraso de fala, excesso de fala
Problema visuo-espacial	Ansiedade

Hiperacusia	Deficiência mental
CRANIOFACIAL (8 características = 3 pontos)	
Estreitamento bitemporal	Sobrancelhas largas
Epicanto ou ponte nasal achatada	Estrabismo
Edema periorbitário	Íris de padrão estrelado
Nariz curto ou narinas antevertidas	Nariz bulboso
Hipoplasia malar	Bochechas proeminentes
Filtro longo	Lábios espessos
Dentes pequenos, espaçados	Má oclusão
Boca grande	Lóbulos da orelha proeminentes
Queixo pequeno	
CARDIOPATIAS (1 característica = 5 pontos)	
Estenose aórtica supravalvular	Estenose artéria pulmonar periférica
OUTRAS CARDIOPATIAS (1 característica = 1 ponto)	
Hipertensão arterial	Sopro cardíaco
Outras	
TECIDO CONECTIVO (2 características = 2 pontos)	
Voz rouca	Hérnia inguinal
Pescoço longo ou ombro caído	Limitação articular ou frouxidão
Divertículo de bexiga ou intestino	Prolapso retal
CÁLCIO (1 característica = 2 pontos)	
Hipercalcemia	Hipercalciúria
ACHADOS ADICIONAIS	
Diarreia	Sinostose radioulnar
Prega sacral	Cifose, escoliose ou lordose
Enurese	Úlcera gástrica
Hipotireoidismo	
TOTAL = 15	

O sistema de Sugayama et al. (2007) sugere que quando os pontos são menores que 20 deve-se realizar o exame da FISH.

Tabela 4. Escore elaborado por Sugayama (adaptado de Sugayama et al. 2007)

SUGAYAMA	
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	PONTOS
Baixo peso ao nascimento	3
Dificuldades alimentares	3
Obstipação	3
Fáceis típico	3
EASV	3
DM	3
Personalidade amigável	2
Estrabismo	2
ADNPM	2
Dificuldade de ganho de peso	1
Outra cardiopatia que não EASV	1
Hipertensão arterial	1
Contraturas articulares	1
Hiperacusia	1
Hipoplasia ungueal	1
TOTAL	31

Leme et al. (2013) testaram os três sistemas como forma de diagnóstico clínico e demonstraram uma eficiência igual entre eles, todos apresentaram pequenas porcentagens de falsos positivos e falsos negativos.

2. OBJETIVO

Analisar a região crítica dos pacientes que possuem diagnóstico clínico para a SWB e resultado negativo da FISH através da técnica de amplificação de múltiplas sondas de ligação (MLPA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A casuística do estudo foi composta por um grupo amostral formado por 18 indivíduos que possuem cadastro junto ao SAG (Serviço de Aconselhamento Genético), sendo sete do sexo masculino e 11 do feminino. O critério de inclusão foi o indivíduo possuir uma classificação positiva (maior ou igual a três) para a SWB através do escore elaborado pela AAP e um resultado negativo através da técnica molecular da FISH.

O escore elaborado pela AAP foi aplicado aos pacientes durante a anamnese do Aconselhamento Genético conforme as características fenotípicas foram observadas e relatadas.

Para a técnica molecular da FISH foram utilizados cromossomos metafásicos obtidos de cultura temporária de linfócitos, realizada anteriormente no próprio SAG como forma de diagnóstico para o Aconselhamento Genético.

A amostra de quatro indivíduos, sendo dois do sexo feminino e dois do masculino, normais, que não possuíam a SWB, foi incluída no estudo como controles.

Para analisar a região deletada, foi coletada uma amostra de sangue periférico de cada indivíduo, e realizada a extração de DNA de linfócitos utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* e seguindo as orientações do protocolo.

Após a extração, foi realizada a técnica de MLPA, usamos o 'kit' SALSA P029-B1 (*MRC-Holland*), específico para o diagnóstico da síndrome de Williams-Beuren. Todas as etapas da técnica foram realizadas conforme o protocolo do fabricante.

O produto final da MLPA foi submetido ao sequenciamento para posterior análise da região crítica utilizando o software *GeneMarker*.

4. RESULTADOS

Infelizmente, por conta do nível de conservação em que se encontrava o material genético das amostras, só foi possível obter o resultado de cinco amostras e um controle.

A paciente A, do sexo feminino, apresentou níveis de sondas controles fora do limite padrão, fazendo com que os resultados apresentados não sejam considerados confiáveis. O paciente B, do sexo masculino, apresentou

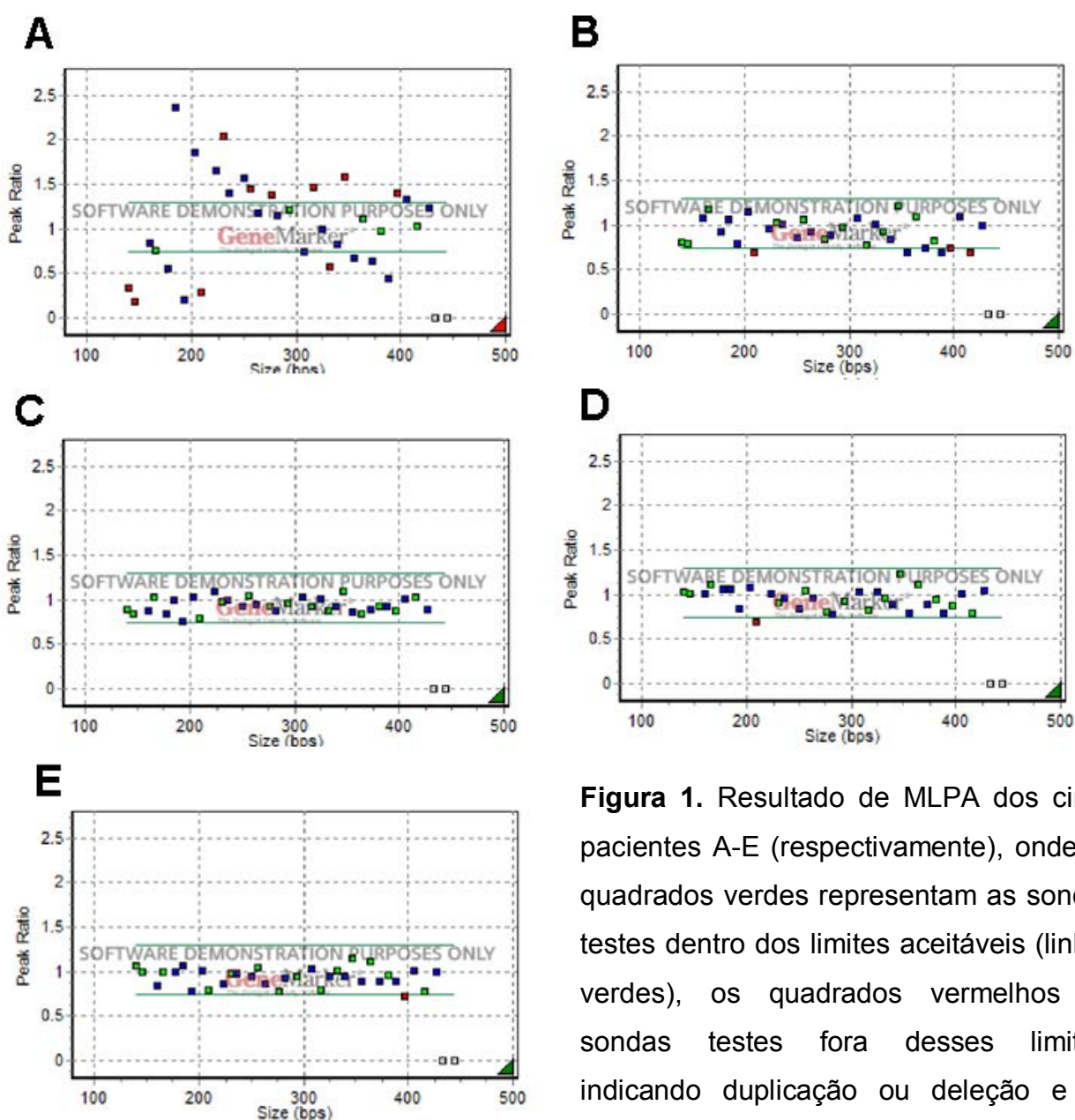


Figura 1. Resultado de MLPA dos cinco pacientes A-E (respectivamente), onde os quadrados verdes representam as sondas testes dentro dos limites aceitáveis (linhas verdes), os quadrados vermelhos as sondas testes fora desses limites, indicando duplicação ou deleção e os quadrados azuis indicando sondas controle.

deleções nas sondas dos genes, *RFC2* e *CYLN2*, e na sonda do éxon 2 do gene *HSPB1*. A paciente C, do sexo feminino, não apresentou nenhuma deleção. O paciente D, do sexo masculino, apresentou a sonda do éxon 2 do gene *HSPB1* deletada. O paciente E, do sexo masculino, apresentou a sonda do gene *RFC2* deletada (Fig. 1).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os genes que se encontram deletados nos pacientes desse estudo apresentam importante papel na expressão do fenótipo da Síndrome de Williams-Beuren.

O gene *HSPB1* está localizado fora da região comumente deletada da SWB, sua tradução dá origem à proteína HSP27, que está relacionada à aquisição de tolerância térmica e é uma das proteínas que regulariza a polimerização da actina. Stock et al. (2003) descreveu três pacientes portadores da Síndrome de Williams que apresentavam deleção maior que a clássica abrangendo genes teloméricos, entre eles encontrava-se o *HSPB1*, Stock observou que os pacientes com as maiores deleções apresentavam um menor QI, portanto sugeriu que os genes da região telomérica da SWB podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento cognitivo.

Os pacientes B e D apresentaram éxons deletados para o gene *HSPB1* e em ambos foi observada deficiência mental, porém os outros pacientes também apresentam deficiência mental, indicando, portanto, que outros genes também podem estar envolvidos no processo do desenvolvimento cognitivo.

O gene *RFC2* é componente do fator C de replicação, responsável pela ativação da DNA polimerase durante a replicação dos cromossomos. O gene faz parte do complexo RAD6-RAD18 e quando há dano no material genético tem sua atividade inibida. Pacientes da Síndrome de Williams apresentam um defeito na sinalização da ATR (ataxia telangiectasia e RAD3), defeito similar ao apresentado em outras síndromes, que também têm entre as características típicas, microcefalia e deficiência no crescimento, sugerindo que o defeito na ATR esteja ligado a essas características. (O'Driscoll et al. 2007)

O gene *RFC2* foi encontrado deletado em dois pacientes desse estudo, B e E, e ambos apresentam microcefalia e deficiência no crescimento. Enquanto os pacientes C e D não apresentaram a deleção para esse gene e não

apresentam microcefalia, porém apresentam deficiência no crescimento, indicando a interação de mais genes responsáveis por essas características.

Em ratos *knockout* que apresentavam haploinsuficiência de *CYLN2*, gene que codifica uma proteína de ligação intracelular semelhante aos transcritos parciais dos genes *WSCR3* e *WSCR4*, Hoogenraad et al. (2002) encontraram deficiência no crescimento, alterações funcionais do hipocampo e deficiência na coordenação motora. Isso, portanto pode explicar as alterações no cerebelo e no hipocampo nos portadores da SWB. Apenas o paciente B apresentou deleção no gene *CYLN2*.

A paciente A, apesar de ter apresentado um escore segundo a AAP igual a quatro, não foi considerado, pois são resultados não são confiáveis podendo alterar erroneamente as conclusões desse estudo.

O paciente B apresentou um escore igual a seis, portanto ele possui fenótipo semelhante ao da SWB, porém ele não apresenta nenhuma alteração cardiovascular, umas das principais características da SWB, na análise molecular não foram encontradas deleções de genes relacionados às doenças cardiovasculares, foram encontrados 3 genes deletados, *RFC2*, *CYLN2* e *HSPB1* que condizem com algumas características fenotípicas.

A paciente C possui um escore de sete pontos por apresentar comunicação interatrial (CIA), porém na análise molecular não foi encontrada nenhuma deleção.

A pontuação obtida pelo paciente D no escore foi igual a 6, portanto o paciente apresenta características semelhantes aos de portadores da SWB, porém na análise molecular foi encontrada apenas a deleção de um éxon do gene *HSPB1*, que está relacionado com o desenvolvimento cognitivo normal.

O gene *RFC2* deletado encontrado na análise molecular do paciente E, justifica algumas alterações observadas e que contribuíram para uma pontuação igual a 6 no escore da AAP.

A aplicação da técnica de MLPA se mostrou eficaz para detectar deleções atípicas em pacientes da SWB e permitiu relacionar as características genóticas encontradas com algumas características fenóticas observadas.

Após a análise molecular, percebemos, porém, que nem todos os achados clínicos nos pacientes são justificados por meio das deleções encontradas. Dessa forma, ainda é necessário elucidar os papéis de cada gene presente na região 7q11.23 nas manifestações características da SWB para que seja possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo.

Acreditamos que para se estabelecer esta correlação, devemos aliar técnicas nas quais é possível uma quantificação gene a gene, como, por exemplo, o MLPA, com pacientes que possuem deleções atípicas da Síndrome de Williams-Beuren, para que seja possível conhecer melhor as funções gênicas não somente a nível celular, mas também, esclarecer seus papéis na expressão da SWB.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Health Care Supervision for Children With Williams Syndrome. *Pediatrics*, v. 107, n. 5, p. 1192-1204, 2001.

BEUNDERS, G.; KAMP, J.M.V.; VEENHOVEN, R.H.; HAGEN, J.M.V.; NIEUWINT, A.W.M.; SISTERMANS, E.A. A triplication of the Williams-Beuren syndrome region in a patient with mental retardation, a severe expressive language delay, behavioural problems and dysmorphismis. *J. Med. Genet.*, v.47, p.271-275, 2010.

BEUREN AJ, APITZ J, HARMJANZ D. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and certain appearance. *Circulation* 1962

CAIRO, S. et al. WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum. Mol. Genet.*, v. 10, p. 617-27, 2001.

DAÍ, L. et al. Is it Williams syndrome? GTF2IRD1 implicated in visual-spatial construction and GTF2I in sociability revealed by high resolution arrays. *Am. J. Med. Genet.*, v. 149, p. 302-314, 2009.

DUTRA, R.L.; HONJO, R.S.; KULIKOWSKKI, L.D.; FONSECA, F.M.; JEHEE, F.S.; BERTOLA, D.R.; KIM, C.A. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Research Notes*, 2012.

DUTRA, R.L.; PIERI, P.C.; TEIXEIRA, A.C.D.; HONJO, R.S.; BERTOLA, D.R.; KIM, C.A. Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. *Clinical Science*, v. 66, 2011.

FERRERO, G.G.; BIAMINO, E.; SORASIO, L.; BANAUDI, E.; PERUZZI, L.; FORZANO, S.; DI CANTOGNO, L.V.; SILENGO, M.C. Presenting phenotype

and clinical evaluation in a cohort of 22 Williams-Beuren syndrome patients. *European Journal of Medical Genetics*, v. 50, p. 327-337, 2007.

FERRERO, G.B. et al. An atypical 7q11.23 deletion in a normal IQ Williams-Beuren syndrome patient. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 18, p. 33-38, 2010

GAO, M.C. et al. Intelligence in Williams syndrome is related to STX1A, which encodes a component of the presynaptic SNARE complex. *Plos One*, v. 5, p. e10292, 2010.

HOOGENRAAD, C.C. et al. Targeted mutation of *Cyln2* in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat. Genet.*, v. 32, p. 116-127, 2002.

JADAYEL, D.M. et al. The BCL7 gene family: deletion of BCL7B in Williams syndrome. *Gene*, v. 224, p. 35-44, 1998.

KITAGAWA, H. et al. The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell*, v.113, p. 905-917, 2003.

LEME, D.E.S.; SOUZA, D.H.; MERCADO, G.; PASTANE, E.; DIAS, A.; MORETTI-FERREIRA, D. Assessment of clinical scoring systems for the diagnosis of Williams-Beuren syndrome. *Genet. Mol. Res.*, 2013

LOWERY, M.C.; MORRIS, C.A.; EWART, A.; BROTHMAN, L.J.; ZHU, X.L.; LEONARD, C.O.; CAREY, J.C.; KEATING, M.; BROTHMAN, A.R. Strong Correlation of Elastin Deletions, Detected by FISH, with Williams-Beuren Syndrome: Evaluation of 235 Patients. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 57, p. 49-53, 1995.

LUPSKI, J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. 1998. *Trends Genetics*, v.14.

MENG, X. et al. A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. *Genomics*, v. 52, p. 130-137, 1998

MORRIS, C.A.; MERVIS, C.B. Williams syndrome and related disorders. *Annual Reviews Genomics*

O'DRISCOL, M. et al. Cellular and clinical impact of haploinsufficiency for genes involved in ATR signaling. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 81, p. 77-86, 2007.

OHAZAMA, A.; SHARPE, P.T. TFII-I gene family during tooth development: candidate genes for tooth anomalies in Williams syndrome. *Dev. Dyn.*, v. 10, p. 2884-2888, 2007.

PEREZ-JURADO, L.A. et al. TBL2, a novel transducin family member in the wbs deletion: characterization of the complete sequence, genomic structure, transcriptional variants and the mouse ortholog. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 86, p. 277-284, 1999

POBER, B.R.; Williams-Beuren Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, v. 362, p. 239-252, 2010.

RANHEIM, E.A. et al. Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood*, v. 105, p. 2487-294, 2005.

RICHTER, N.J. et al. Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 35415-35424, 1999.

SCOTT, R.W.; OLSON, M.F. LIM Kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med.*, v. 85, p. 1178-1179, 2007.

STOCK, A. D., Spallone, P. A., Dennis, T. R., Netski, D., Morris, C. A., Mervis, C. B., Hobart, H. H. Heat shock protein 27 gene: chromosomal and molecular

location and relationship to Williams syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 120A: 320-325, 2003.

STROMME, P.; BJORNSTAD, P.; RAMSTAD, K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *Journal Child Neurology*, v. 17, p. 269-271, 2002.

SUGAYAMA, S.M.M.; LEONE, C.; CHAUFFAILLE, M.L.L.F.; OKAY, T.S.; KIM, C.A. Williams Syndrome. Development of a New Scoring System For Clinical Diagnosis, v.62(2), p. 159-166, 2007.

TASSABEHJI, M. Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations. *Hum. Mol. Genet.*, v.12., p.229-237, 2003.

VAN HAGEN, J.M.; EUSSEN, H.J.F.M.M.; VAN SCHOOTEN, R.; VAN DER GEEST, J.N.; HASELEN, G.C.V.H.; WOUTERS, C.H.; ZEEUW, C.I.; GILE, J.J.P. Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: Fluorescent in situ hybridization versus Multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genetic Testing* v. 11, n.3, p.321-327, 2007.

WILLIAMS JCP, BARRATT-BOYES, LOVE JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation* 1961; 21: 1311-8

