

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/03/2021.

Avaliação de perdas e ganhos de DNA na região 7q11.23 em indivíduos com diagnóstico clínico de síndrome de Williams-Beuren e FISH negativo.

Letícia Cassimiro Batista

BOTUCATU-SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação de perdas e ganhos de DNA na região 7q11.23 em indivíduos com diagnóstico clínico de síndrome de Williams-Beuren e FISH negativo

Letícia Cassimiro Batista

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti Ferreira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de PósGraduação em Ciências Biológicas (Genética)

BOTUCATU-SP

2019

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

Batista, Leticia Cassimiro.

Avaliação de perdas e ganhos de DNA na região 7q11.23 em indivíduos com diagnóstico clínico de síndrome de Williams-Beuren e FISH negativo / Leticia Cassimiro Batista. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danilo Moretti Ferreira
Capes: 20205007

1. Williams, Síndrome de - Aspectos genéticos. 2. Dano ao DNA. 3. Hibridização in situ. 4. Diagnóstico.

Palavras-chave: Deleção 7q11.23; FISH (-); Síndrome de Williams-Beuren.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ademir e Dulce, por todo o esforço realizado para que nunca me faltasse nada, por entenderem minhas escolhas e sempre me incentivarem; por toda paciência e carinho que sempre me dedicaram. Vocês são meus maiores exemplos de vida e dedicação. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTO

À Deus, por conceder-me paz e sabedoria para conduzir este trabalho;

Aos pacientes e seus familiares, por aceitarem participar deste estudo. Sem vocês este projeto não seria realizado;

Ao Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, meu orientador. Obrigada pela carinho, paciência, orientações, suporte, confiança e incentivo em todos os momentos e muito obrigada pelo carinho, dedicação, observação e pela amizade construída;

A Dr. Deise Helena de Souza pela amizade, carinho e ensinamentos que foram importantíssimos para a realização deste projeto;

Ao Dr. Bruno Gamba, por todos os ensinamentos, conversas, observações e cuidado, além do auxílio na técnica de estudo molecular deste projeto;

À Profa.Dra. Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo e Dr. Bruno Gamba pelo rigor na análise e nas orientações durante a qualificação.

À Rosana Bicudo pela disponibilidade, ensinamento e carinho no laboratório.

Aos professores e alunos do Laboratório de Genética e Molecular- UFG, Goiânia, por permitir que o desenvolvesse de parte deste trabalho, além de toda a acolhida e carinho durante o curto tempo que passei lá.

À ABSW e demais centro de genéticas, e seus professores, funcionários e colaboradores, por tornar este trabalho possível;

Aos meus amigos e familiares pela amizade, pela compreensão, pelo incentivo e pela ajuda nos momentos em que mais precisei.

Aos familiares ausentes, que em todos os momentos estiveram presentes em meu coração e seus ensinamentos em vida sempre me acompanharam;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

À todos que me ajudaram neste trabalho;

Muito obrigadaa!!

*“A conquista é um acaso que talvez dependa
mais das falhas dos vencidos
do que do gênio do vencedor.”*

(Madame de Staël)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Características genéticas	14
1.2. Diagnóstico clínico e laboratorial	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Geral.....	22
2.1.1. Específico	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Casuística	23
3.2. Aspectos éticos	23
3.3. Avaliação clínica	24
3.4. Análise Molecular	24
3.4.1. Obtenção do DNA genômico.	24
3.4.2. Amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação (MLPA)	25
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES	35

6. ARTIGO.....	41
7. REFERÊNCIAS	58
8. ANEXOS.....	67
8.1. Anexo I. Ficha de Anamnese.....	67
8.2. Anexo II. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.	76
8.3. Anexo III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menores de 18 anos.	81
8.4. Anexo IV. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos.	84
8.5. Anexo V. Termo de Assentimento para maiores de 12 anos.	87
8.6. Anexo VI. Ficha com as principais características da SWB.	90
8.7. Anexo VII. Tabela das Sondas do Kit SALSA MLPA P029-C1 <i>WBS probemix</i> , lote C1 0517.....	92
8.8. Anexo VIII. Fotos do grupo de estudo.....	95
8.9. Anexo IX. Perfil Clínico do grupo de estudo.....	97
8.10. Anexo X. Tabela com as características clínicas dos pacientes dos artigos com deleções atípicas.....	108
8.11. Anexo XI. Tabela com as características genéticas dos pacientes dos artigos com deleções atípicas.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visualização gráfica da região 7q11.23 deletada na síndrome de Williams-Beuren.	13
Figura 2 – Localização das sondas do kit 029.....	22
Figura 3- Localização das deleções atípicas encontradas nos pacientes da literatura.....	29 e 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela com as frequências das principais características clínicas avaliadas na presente casuística e a frequência e (%) nos casos observados na literatura de SWB FISH (-)	24 e 25
Tabela 2- Tabela com as frequências das principais características clínicas observadas na revisão da literatura dos casos de deleções atípicas.	27 e 28

LISTA DE ABREVIATURAS

et al. e outros

LISTA DE SÍMBOLOS

Mb	megabase (s)
mL	mililitro
ng/ μ L	nanograma por microlitro
pb	pares de bases
μ L	microlitro
$^{\circ}$ C	graus Celsius
<	menor que
%	porcentagem
~	aproximadamente
(-)	negativo e/ou ausência
(+)	positivo e/ou presente
(X)	sem informação

LISTA DE SIGLAS

AAP	associação americana de pediatria
ABSW	associação brasileira da síndrome de Williams
aCGH	<i>microarray-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH)</i>
ADNPM	atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
AMC	análise de microarranjos cromossômicos
ATP	adenosina trifosfato
AVC	acidente vascular cerebral
CMA	microarranjos de alta densidade
CNV	variação do número de cópias (<i>copy number variation</i>)
CEP	comitê de ética em pesquisa
CIA	comunicação interatrial
CIV	comunicação interventricular
DNA	ácido desoxirribonucleico
DGV	<i>Database of Genomic Variations</i>
DECIPHER	<i>Database of Genomic Variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
EAP	estenose da artéria pulmonar
EASV	estenose aórtica supra-valvar
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FISH	Hibridação in situ por fluorescência (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
HLH	hélice-alça-hélice
MLPA [®]	amplificação de sondas multiplex dependente de ligação
LCR	sequências de baixo número de cópias (<i>low copy repeats</i>)
mRNA	RNA mensageiro
NAHR	recombinação alélica não homologa (<i>non allelic homologous recombination</i>)

NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NGS	<i>new generation sequencing</i> (sequenciamento de nova geração)
NPC	complexo de poros nucleares
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
QI	quociente de inteligência
RCSWB	região crítica da síndrome de Williams-Beuren
RFC	fator de replicação C
RNA	ácido ribonucleico
RN	recém-nascido
SAG	serviço de aconselhamento genético
SDs	duplicações segmentais
SNG	sequenciamento de nova geração
SWB	síndrome de Williams-Beuren
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade de Campinas
WBS	<i>Williams-Beuren syndrome</i>
WSCP	<i>Williams-Beuren syndrome cognitive profile</i>

RESUMO

A síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma doença genética caracterizada por dismorfismos faciais, anomalias cardiovasculares, deficiência intelectual e perfil cognitivo típico. A SWB é causada por uma microdeleção hemizigótica da região cromossômica 7q11.23, de ~1,5Mb a 1,8Mb de genes de cópias únicas e deleções maiores ou menores que esses limites são considerados deleções atípicas. O objetivo do trabalho foi detectar perdas ou ganhos de DNA por meio da técnica de MLPA na região crítica da SWB em pacientes com diagnóstico clínico estabelecido pela pontuação de escore da AAP, (2001) e com exame de FISH (-) realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, e assim correlacionar os achados de perdas ou ganhos de DNA com os já descritos na literatura e correlaciona-los aos fenótipos/genótipo descritos em bancos de dados público como DVG, DECIPHER, UCSC Genome Browser dentre outros. Foram selecionados 30 indivíduos com hipótese diagnóstica de SWB e análise citogenética negativa para SWB estabelecida pela técnica da FISH. O diagnóstico clínico de SWB “clássica” foi estabelecido pelo escore da Academia Americana de Pediatria (2001). Foi realizada a extração de DNA das amostras e foi aplicada a técnica de MLPA com o kit SALSA P029 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) com sondas específicas para os principais genes encontrados na região crítica da SWB. Nesta amostra predominou o sexo masculino (2M:1F) e a idade do 1º atendimento foi tardia (mediana 9,5 anos). A casuística apresentou as características faciais que determinam a face considerada como típica na SWB. Apenas 11/30 pacientes apresentavam cardiopatia, e desses apenas 2/11 apresentavam a estenose aórtica supravalvar. Das alterações gastrointestinais as mais frequentes foram as dificuldades alimentares e constipação. As características que compõem o perfil cognitivo típico da SWB as mais frequentes foram: hiperatividade, loquacidade, sociabilidade excessiva e deficiência intelectual. Apesar da casuística apresentar características típicas da SWB a análise molecular pela técnica de MLPA não detectou nenhuma perda ou ganho de DNA na região crítica da SWB. A técnica pode não ter detectado nenhuma perda ou ganho de DNA, porque as alterações podem estar presentes em regiões que não são cobertas pelas sondas presentes no kit comercial P029-C1. Assim, para os casos com diagnóstico clínico de SWB e FISH (-), sugerimos o uso de outras técnicas como o array-CGH ou NGS. Foi realizado o Aconselhamento genético dos familiares, informando esses resultados e comunicando-lhes que o estudo prosseguirá com aplicações de outras metodologias laboratoriais subsidiárias ao diagnóstico clínico do paciente.

ABSTRACT

Williams-Beuren Syndrome (WBS) is a genetic disorder characterized by facial dysmorphisms, cardiovascular anomalies, intellectual disability and typical cognitive profile. WBS is caused by a hemizygous microdeletion of the 7q11.23 chromosomal region, ~ 1.5Mb to 1.8Mb of single copy genes, and deletions larger or smaller than those limits are considered atypical deletions. The objective of this study was to detect DNA loss or gain by MLPA technique in the critical region of SWB in patients with clinical diagnosis established by AAP score (2001) and with FISH (-) examination previously performed by our search group, and thus correlate the findings of DNA loss or gain with those already described in the literature and correlate them with the phenotypes / genotype described in public databases such as DVG, DECIPHER, UCSC Genome Browser and others. Thirty individuals with diagnostic hypothesis of WBS and negative cytogenetic analysis for WBS established by the FISH technique were selected. The clinical diagnosis of “classic” WBS was established by the American Academy of Pediatrics score (2001). DNA extraction from the samples was performed and the MLPA technique was applied with the SALSA P029 kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) with probes specific for the major genes found in the critical region of the SWB. In this sample, the male gender predominated (2M: 1F) and the age of the first attendance was late (median 9.5 years). The sample presented the facial characteristics that determine the face considered as typical in WBS. Only 11/30 patients had heart disease, and of these only 2/11 had supravalvular aortic stenosis. The most frequent gastrointestinal alterations were eating difficulties and constipation. The most frequent characteristics that make up the typical SWB cognitive profile were: hyperactivity, loquacity, excessive sociability and intellectual disability. Although the sample presents typical WBS characteristics, molecular analysis by MLPA technique did not detect any DNA loss or gain in the critical WBS region. The technique may not have detected any DNA loss or gain because the changes may be present in regions that are not covered by the probes in the commercial kit P029-C1. Thus, for cases with clinical diagnosis of WBS and FISH (-),

we suggest the use of other techniques such as array-CGH or NGS. Genetic counseling of the relatives was carried out, informing these results and informing them that the study will continue with the application of other subsidiary laboratory methodologies to the clinical diagnosis of the patient.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Williams-Beuren (SWB; OMIM 194050) foi descrita de maneira independente, por Williams *et al.*, 1961 e por Beuren *et al.*, 1962; é uma doença genética com alterações do neurodesenvolvimento multissistêmico complexo, caracterizada por dismorfismos faciais, anomalias cardiovasculares, deficiência mental e de crescimento, além de possuir um perfil cognitivo típico, apresentando ansiedade e sociabilidade excessiva (AAP,2001; MORRIS *et al.*, 1988). A SWB acomete 1/7.500 nascidos vivos, está presente em todas as comunidades mundiais e etnias e acomete ambos os sexos indistintamente (STROMME; BJORNSTAD; RAMSTAD, 2002; KRUSZKA *et al.*, 2018).

A hipótese diagnóstica da SWB baseia-se na evolução clínica durante os primeiros anos de vida quando as características faciais, o perfil cognitivo e as anomalias cardíacas tornam-se evidentes. Entretanto, a grande variabilidade fenotípica nessa síndrome muitas vezes dificulta e atrasa o diagnóstico clínico.

A afecção é causada pela deleção hemizigótica de aproximadamente 1,5Mb a 1,8Mb de genes contíguos na região do braço longo do cromossomo 7 (7q11.23) (EWART *et al.*, 1993). Essa deleção engloba 28 genes de cópias únicas, dentre os quais se destaca o gene da elastina (*ELN*). Este gene codifica a proteína elastina, componente fundamental das fibras elásticas do tecido conjuntivo, sendo que a haploinsuficiência do mesmo apresenta correlação a várias características encontradas na SWB, como as cardiopatias congênitas, alterações faciais, voz rouca, envelhecimento precoce, hérnias e contraturas ou frouxidão das articulações (EWART *et al.*, 1993; AAP, 2001). As outras características clínicas da síndrome, como o perfil cognitivo típico tem sido associado à haploinsuficiência de outros genes presentes na região, como *LIMK1*, *GTF2IRD1* e *GTF2I*, pelos estudos envolvendo pacientes com deleções atípicas, que são deleções maiores ou menores que 1.5 Mb e 1.8 Mb (HIROTA *et al.*, 2003; MORRIS *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2013).

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) tem sido usada para confirmar o diagnóstico clínico e é muito eficiente em demonstrar a microdeleção da banda

7q11.23 no cromossomo 7 (LOWERY *et al.*, 1995; SUGAYAMA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2007).

As deleções atípicas são aquelas menores ou maiores que as deleções típicas, os pacientes portadores dessas deleções apresentam na maioria dos casos apenas algumas características do perfil clínico típico da SWB, como facies típicas, cardiopatias congênitas e perfil cognitivo. Portanto, a identificação de pacientes com as deleções atípicas é de grande relevância pois fornece informações para a correlação genótipo-fenótipo da SWB (DELGADO *et al.*, 2013). As deleções atípicas podem ser detectadas por técnicas como MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), qPCR (*quantitative real-time PCR*) (HOWALD *et al.* 2006; VAN HAGEN *et al.*, 2007; LAURITO *et al.*, 2013; HONJO *et al.*, 2015), NGS (*New generation sequencing*) e aCGH (YAGIHASKI *et al.*, 2014; STREATÃ *et al.*, 2016).

1.1.Características genéticas

A região crítica da síndrome de Williams Beuren (RCWB), em 7q11.23, possui uma arquitetura genômica complexa e a região de genes de cópia única possui em torno de 1,2 Mb; que está ligada a duas regiões repetitivas, repetições de cópias baixas (*LCR – Low Copy Repeats*), conhecidas também como duplicações segmentais (*SDs*) (SCHUBERT, 2009). As *LCRs* estão divididas em 3 blocos: A, B e C; que estão organizados em segmentos centromérico, medial e telomérico, e representam o substrato para a ocorrência de *crossing-over* durante a divisão meiótica (INOUE; LUPSKI, 2002), como apresentado na Figura 1. As *LCRs* são compostas tanto por genes quanto por pseudogenes (HOBART *et al.*, 2010).

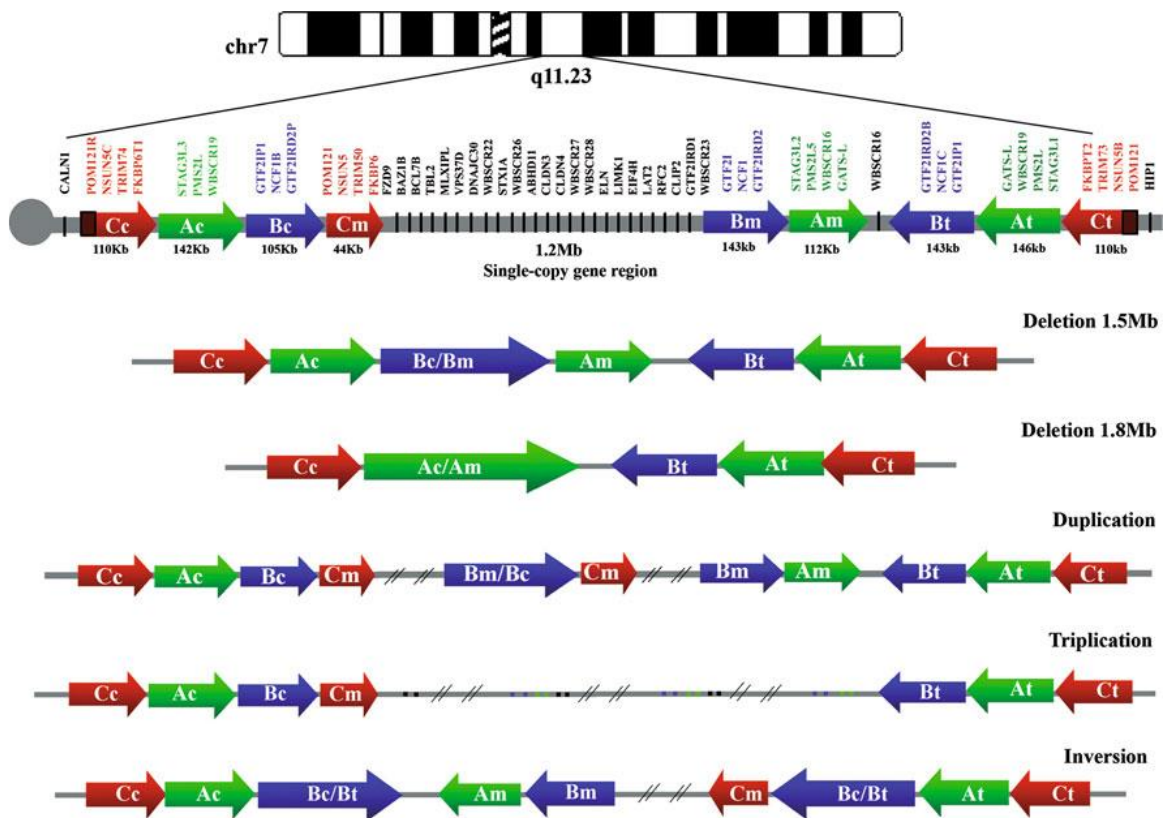


Figura 1. Visualização gráfica da região 7q11.23 deletada na síndrome de Williams-Beuren. A localização e orientação dos blocos *LCRs* (A, B e C) centromérico (c), médios (m) e teloméricos (t) estão indicados por setas coloridas, nota-se que os genes estão representados nos blocos apenas uma vez. Abaixo, as deleções típicas de 1,5Mb e 1,8Mb estão representadas com pontos de quebra dentro dos blocos B centromérico e B medial e blocos A centromérico e A medial, respectivamente. Logo abaixo há a duplicação dos blocos de *LCRs* B medial, B centromérico e C medial; há também a representação da triplicação. Por último há a representação da inversão dos blocos A medial, B medial, C medial e B telomérico (Revisto e modificado de MERLA *et al.*, 2010).

As *LCRs* possuem uma alta similaridade de sequências homólogas o que leva à predisposição para a ocorrência de um pareamento não homólogo entre blocos diferentes (*non allelic homologous recombination* - *NAHR*). Caso ocorra uma recombinação neste *NAHR* acarretará em uma deleção em uma cromátide e duplicação da região na outra cromátide, (OSBORNE *et al.*, 2001; LUPSKI, 2009). Cerca de 95% dos pacientes com diagnóstico clínico de SWB apresentam uma deleção de ~ 1,5 Mb causada por uma recombinação meiótica desigual entre os blocos B-centromérico e B-medial, ~ 3–5% exibem uma deleção de ~ 1,8 Mb entre os blocos A-centromérico e A-medial, deleções maiores ou

menores que esses limites são consideradas atípicas e já foram descritas na literatura, porém com frequências baixas (<2%) (KORENBERG *et al.*, 2000; BAYÉS *et al.*, 2003; SCHUBERT; LACCONI, 2006; SCHUBERT, 2009) (Figura 1).

A SWB é considerada uma síndrome esporádica pois a deleção tem ocorrência *de novo* (ANTONELLI *et al.*, 2006). Casos familiares onde um dos genitores é afetado e tiveram filho afetado (risco de 50%) já foram relatados (MORRIS; THOMAS; GREENBERG, 1993). Não existe predominância de origem parental (DUTLY; SCHINZEL, 1996; PÉREZ JURADO *et al.*, 1996; ROBINSON *et al.*, 1996; URBAN *et al.*, 1996; BAUMER *et al.*, 1998; BAYÉS *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 2006;).

A ocorrência da deleção pode também ser devido à presença em um dos genitores de uma inversão paracêntrica hemizigótica na RCSWB, que pode levar ao pareamento desequilibrado dos cromossomos, devido a erro de pareamento entre *LCRs* de uma mesma cromátide ou cromossomo (OSBORNE *et al.*, 2001; BAYÉS *et al.*, 2003; SCHUBERT, 2009; HOBART *et al.*, 2010). Assim, um genitor portador da inversão tem um risco aumentado em relação a população de ter um filho com a SWB, com uma frequência de aproximadamente 5,4 vezes maior do que a observada na ausência da inversão (HOBART *et al.*, 2010).

Os genes envolvidos na deleção foram definidos através de marcadores de microssatélite em indivíduos portadores de SWB (PÉREZ JURADO *et al.*, 1996). Na região comumente deletada já foram identificados 28 genes, entretanto, a correlação genótipo-fenótipo das manifestações na SWB ainda não foi totalmente esclarecida para todos os genes deletados.

Dos 28 genes da RCSWB, o único gene cuja a correlação genótipo-fenótipo foi estabelecido é o gene da elastina (*ELN*). A haploinsuficiência do *ELN* é inequivocamente responsável pelos problemas cardiovasculares e outras anormalidades do tecido conjuntivo de pacientes com SWB (EWART *et al.*, 1993). A elastina forma as fibras elásticas da matriz extracelular do tecido conjuntivo por todo o corpo, além de regular a proliferação de células musculares lisas vasculares. A haploinsuficiência da elastina resulta em arteriopatias envolvendo artérias de médio e grande calibre, levando ao estreitamento da luz. A

hipertensão é observada comumente em pacientes com SWB com e sem estenose da artéria renal (BRODER *et al.*, 1999; GIORDANO *et al.*, 2001), e sua etiologia ainda é motivo de debate. Entretanto, a patogênese da arteriopatia na SWB pode ser mais complexa e possivelmente relacionado a outros genes na região crítica da SWB.

1.2. Diagnóstico clínico e laboratorial

Os portadores da SWB apresentam alterações nas características físicas e no comportamento. As características faciais típicas incluem microcefalia, fronte ampla, estreitamento bitemporal, edema periorbital, estrabismo, íris estrelada, sobrancelhas largas, ponte nasal baixa, nariz curto e arrebicado, hipoplasia malar, filtro nasal longo, orelhas em abano, bochechas proeminentes, queixo pequeno, micrognatismo, macrostomia e lábio inferior volumoso (WILLIAMS; BARRAT-BOYERS; LOWE, 1961; BEUREN; APITZ; HARMJANZ, 1962; MORRIS *et al.*, 1988). Os pacientes também apresentam alterações dentárias, sendo a maloclusão a mais frequente, (POBER, 2010). Nas crianças é mais evidente as pregas epicânticas, bochechas proeminentes e dentes pequenos e espaçados, enquanto nos adultos é mais evidente a face e o pescoço longo e os ombros caídos (MORRIS, 2018).

Dentre as anomalias cardiovasculares envolvidas na síndrome as mais frequentes (70% a 80%) são arteriopatias, que pode afetar qualquer artéria (MORRIS *et al.*, 1988). Das arteriopatias, a mais comum e grave é a estenose aórtica supra-valvar (EASV) (75%)(MORRIS, 2018). A estenose da artéria pulmonar (EAP), embora menos frequente, é mais comum na infância e geralmente melhora com o tempo (MORRIS, 2018). Os problemas cardíacos representam a maior parte da morbidade e mortalidade da SWB, que pode ser decorrentes de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e morte súbita (WESSEL *et al.*, 2004).

As alterações no tecido conjuntivo se apresentam no perfil facial, voz rouca, presença de hérnias (umbilical ou inguinal), frouxidão das articulações e anomalias cardiovasculares (MORRIS, 2018). As alterações musculoesqueléticas são observadas nas crianças como hipotonia e frouxidão das articulações, enquanto nos adolescentes e adultos há hipertonía e

contratura das articulações(KAPLAN *et al.*, 1989; MORRIS *et al.*, 1990; LOPEZ-RANGEL *et al.*, 1992).

Na primeira infância, as crianças podem apresentar refluxo gastro-esofágico, vômitos, dificuldade em se alimentar, dores abdominais, cólicas prolongadas, constipação e as alterações endócrinas, como a hipercalcemia idiopática infantil transitória, detectável no primeiro ano de vida presente em 6 a 15% (MORRIS *et al.*, 1988; FERRERO *et al.*, 2007).

Os pacientes com SWB possuem um padrão próprio de crescimento, tendo como características deficiência de crescimento pré-natal e baixo ganho de peso, principalmente nos primeiros 4 anos. As cólicas e a dificuldade para se alimentar levam a uma nutrição deficiente que resulta em baixo peso e interfere no crescimento, assim foram desenvolvidas curvas de crescimento e peso específicos para as crianças com a síndrome (AAP, 2001). Há deficiência de crescimento pós-natal é observada nos primeiros 4 anos de vida, após esse período o ganho de peso e o crescimento linear podem melhorar na infância, entretanto no adulto a estatura ainda é considerada baixa (MORRIS *et al.*, 1988).

A deficiência intelectual é de intensidade leve a moderada e está presente em 75% dos afetados, com quociente de inteligência (QI) em torno de 50-60 (SMOOT *et al.*, 2005). Indivíduos com SWB possuem perfil cognitivo específico com um padrão característico de debilidades e habilidades. As áreas que apresentam maiores debilidades são a construção visoespacial e as habilidades motoras finas, na escrita e em algumas atividades escolares como matemática (SMOOT *et al.*, 2005). Já as áreas com maiores habilidades estão relacionadas a linguagem, reconhecimento e memorização facial e o talento musical (POBER, 2010). Os portadores da síndrome possuem um perfil comportamental e de personalidade característico, sendo extremamente sociáveis e extrovertidos (SMOOT *et al.*, 2005). Além disso, a maioria apresenta déficit de atenção, hiperatividade, ansiedade, empatia excessiva, hiperacusia e distúrbios do sono (AAP, 2001).

Embora as manifestações clínicas na SWB sejam conhecidas, elas podem ser sutis a ponto de mascarar o diagnóstico e podem não se manifestar no início da vida tornando o diagnóstico mais difícil. Algumas das causas da dificuldade do diagnóstico podem ser: 1) as características faciais típicas podem não ser óbvias no nascimento, mas podem se tornar mais

evidentes com o tempo; 2) embora os bebês tenham sintomas que podem estar relacionados à hipercalcemia, os sintomas não são específicos e a dosagem de cálcio sérico não é realizada de rotina; 3) os atrasos no desenvolvimento são frequentemente atribuídos aos problemas crônicos, e o tamanho pequeno e as características faciais infantis das crianças com SWB contribuem para fazer com que os pacientes pareçam mais novos do que sua idade cronológica (MORRIS *et al.*, 1988). Em um estudo realizado pelo nosso grupo por Souza *et al.*, 2007, as crianças com SWB tiveram um diagnóstico tardio (com mais de sete anos) e apenas três delas foram identificadas com idade abaixo de três anos, todas com graves cardiopatias congênitas, corroborando assim o estudo de Morris *et al.*, 1988, onde a idade média do diagnóstico foi de 6,4 anos.

O diagnóstico clínico é confirmado pela técnica da FISH considerada “padrão ouro” mas devido seu alto custo foram elaborados sistemas de pontuação para auxiliar os pediatras no diagnóstico clínico da SWB e na indicação do teste da FISH. Os sistemas são baseados nos aspectos clínicos apresentados pelos pacientes, onde as características recebem pontuações segundo as referências de: Lowery *et al.*,(1995); Academia Americana de Pediatria (AAP, 2001); e Sugayama *et al.*, (2007).

Os três sistemas de pontuação foram avaliados em nosso grupo por Leme *et al.*, (2013) que encontram entre eles uma alta sensibilidade e baixa especificidade, além de demonstrar que a SWB pode ser diagnosticada clinicamente usando qualquer um dos sistemas avaliados. E assim, o uso da FISH em combinação com a avaliação clínica pode ajudar a estabelecer o diagnóstico mais preciso e específico.

A literatura e a experiência laboratorial têm demonstrado que 96% dos casos com diagnóstico clínico de SWB possuem FISH positivo (BAYÉS *et al.*, 2003; SCHUBERT; LACCONE, 2006; SOUZA *et al.*, 2007;SCHUBERT, 2009). Desta forma 4% de pacientes com o fenótipo clínico de síndrome de Williams não possuem a confirmação do diagnóstico laboratorial clássico para esta afecção. Isso pode ocorrer devido:

- A microdeleção ser do tipo atípica na região crítica da SWB não envolvendo o gene da elastina (ELN) (PANI *et al.*, 2010)
- Ter ocorrido mutação de ponto em genes da região crítica da SWB.

- Deleções ou mutações em outras regiões do genoma apresentando fenocópias da SWB.
- Diagnóstico clínico errôneo.

Em vista disso, novas técnicas de citogenética moleculares com maior poder de resolução têm sido utilizadas, como a amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação (MLPA), microarranjos de alta densidade (arrayCGH) e sequenciamento de nova geração (SNG); possibilitando a detecção de alterações genéticas complexas que a técnica da FISH não foi capaz de identificar.

A MLPA é uma técnica de varredura genômica de alto rendimento, permitindo detectar alterações (perdas e ganhos) no número de cópias (CNVs) em até 50 sequências de DNA genômico alvo em uma única reação e também constatar rearranjos que não foram observados na análise padrão, sendo aplicada a ensaios específicos. As vantagens da técnica são a facilidade e rapidez na detecção de deleções, deleções atípicas e duplicações presentes no genoma e suas desvantagens estão na incapacidade de detectar rearranjos balanceados, mosaicismos em baixo grau e a sensibilidade em relação à qualidade do DNA utilizado (KOZLOWSKI; JASINSKA; KWIATKOWSKI, 2008).

Van Hagen *et al.*, 2007 confirmaram a eficácia da MLPA quando compararam a técnica com a FISH e dentre 63 pacientes com SWB, 52 tiveram a confirmação do diagnóstico com as duas técnicas, 10 pacientes não apresentaram a deleção em ambas as técnicas e um apresentou uma deleção atípica não detectada pela técnica da FISH, mas detectada pela técnica de MLPA. A técnica de MLPA foi utilizada por LAURITO *et al.*, 2013 para confirmar o diagnóstico clínico de um paciente com SWB na Argentina, comprovando a eficiência da técnica. Um grupo de pesquisadores espanhóis descobriram um novo ponto de quebra, entre os genes *LIMK1* e *EIF4H*, em três pacientes independentes. Esse rearranjo compartilhado pelos três pacientes foi revelado por um estudo de array-CGH e confirmado pela técnica de MLPA a qual detectou perdas e ganhos de genes importantes na RCSWB (PLAJA *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Honjo *et al.*, (2015) analisaram 55 pacientes com SWB, dentre eles 2 possuíam resultado da FISH (-) e foram confirmados pela MLPA; os dois casos foram reavaliados pelo nosso grupo e revelaram na verdade serem FISH (+) (dados não publicados).

A técnica de array-CGH também tem sido uma poderosa ferramenta na detecção de microdeleções e identificação de novas anormalidades citogenéticas, embora esse método seja demorado e custoso dependendo da plataforma utilizada (SNIJDERS *et al.*, 2001; SHAFFER; BEJANI, 2004).

7. REFERÊNCIAS

AAP. Health Care Supervision for Children With Williams Syndrome. **PEDIATRICS**, v. 107, n. 5, p. 1192–1204, 2001.

ANTONELL, A. et al. Williams syndrome: its clinical aspects and molecular bases. **Revista de neurologia**, v. 42 Suppl 1, p. S69-75, jan. 2006.

ANTONELL, A. et al. Partial 7q11.23 deletions further implicate GTF2I and GTF2IRD1 as the main genes responsible for the Williams-Beuren syndrome neurocognitive profile. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 5, p. 312–320, 2010.

BAUMER, A. et al. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 5, p. 887–894, 1998.

BAYÉS, M. et al. Mutational Mechanisms of Williams-Beuren Syndrome Deletions. **Am. J. Hum. Genet**, v. 73, p. 131–151, 2003.

BELLUGI, U. et al. Bridging cognition, the brain and molecular genetics: evidence from Williams syndrome. **Trends Neurosci**. v. 22, n. 5, p. 197–207, 1999.

BEUREN, A.; APITZ, J.; HARMJANZ, D. Supravalvular Aortic Stenosis in Association with Mental Retardation and a Certain Facial Appearance. **Circulation**, v. 26, n. 6, p. 1235 LP – 1240, 1962.

BOTTA, A. et al. Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. **Journal of medical genetics**, v. 36, n. 6, p. 478–80, 1999.

BOUCHIREB, K. et al. Clinical features and management of arterial hypertension in children with

Williams-Beuren syndrome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 2, p. 434–438, 2010.

BRODER, K. et al. Elevated ambulatory blood pressure in 20 subjects with Williams syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 83, n. 5, p. 356–360, 1999.

DAI, L.; BELLUGI, U.; CHEN, X. NIH Public Access. **American Journal of Medical Genetics**, n. 3, p. 302–314, 2010.

DEL CAMPO, M. et al. Hemizyosity at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension. **American journal of human genetics**, v. 78, n. 4, p. 533–42, 2006.

DELGADO, L. M. et al. A 1.3-Mb 7q11.23 atypical deletion identified in a cohort of patients with williams-beuren syndrome. **Molecular Syndromology**, v. 4, n. 3, p. 143–147, 2013.

DOYLE, T. F. et al. "Everybody in the world is my friend?" hypersociability in young children with Williams syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 124A, n. 3, p. 263–273, 2004.

DUTLY, F.; SCHINZEL, A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. **Human molecular genetics**, v. 5, n. 12, p. 1893–1898, 1996.

DUTRA, R. L. et al. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: Suitable diagnostic strategy for developing countries. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 13, 2012.

EDELMANN, L. et al. An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, n. 2, p. 136–143, 2007.

ERONEN, M. et al. Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome. **Journal**

of medical genetics, v. 39, p. 554–558, 2002.

EUTENEUER, J. et al. Molecular and phenotypic characterization of atypical Williams – Beuren syndrome. **Clinical genetics**, v.86, n. 5, p. 487–491, 2014.

EWART, A K. et al. Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. **Nature genetics**, v. 5, n. 1, p. 11–16, 1993.

FERRERO, G. B. et al. Presenting phenotype and clinical evaluation in a cohort of 22 Williams-Beuren syndrome patients. **European Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 5, p. 327–337, 2007.

FERRERO, G. B. et al. An atypical 7q11.23 deletion in a normal IQ Williams–Beuren syndrome patient. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. January 2009, p. 33–38, 2010.

FUSCO, C. et al. Smaller and larger deletions of the Williams Beuren syndrome region implicate genes involved in mild facial phenotype, epilepsy and autistic traits. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 1, p. 64–70, 2014.

GAGLIARDI, C. Unusual cognitive and behavioural profile in a Williams syndrome patient with atypical 7q11.23 deletion. **Journal of Medical Genetics**, v. 40, n. 7, p. 526–530, 2003.

GHAFFARI, M. et al. Genotype–phenotype correlation and the size of microdeletion or microduplication of 7q11.23 region in patients with Williams-Beuren syndrome. **Annals of Human Genetics**, v. 82, n. 6, p. 469–476, 2018.

GIORDANO, U. et al. Exercise testing and 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in children with Williams syndrome. **Pediatric Cardiology**, v. 22, n. 6, p. 509–511, 2001.

HELLER, R. et al. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 40, n. 8, p. e99, 2003.

HIROTA, H. et al. Williams syndrome deficits in visual spatial processing linked to GTF2IRD1 and GTF2I on chromosome 7q11.23. **Genetics in Medicine**, v. 5, n. 4, p. 311–321, 2003.

HOBART, H. H. et al. Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 154, n. 2, p. 220–228, 2010.

HONJO, R. Detecção da microdeleção 7q11 . 23 por MLPA ® e estudo clínico dos pacientes com síndrome de Williams-Beuren. 2012.

HONJO, R. S. et al. Williams-beuren syndrome: A clinical study of 55 Brazilian patients and the diagnostic use of MLPA. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

HOWALD, C. et al. Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 3, p. 266–273, 2006.

HU, S. et al. High-resolution single nucleotide polymorphism arrays identified an atypical microdeletion of the Williams-Beuren syndrome interval in a patient presenting with a different phenotype. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 5, p. 2709–2712, 2017.

HUSSEIN, I. R. et al. Genome wide array-CGH and qPCR analysis for the identification of genome defects in Williams ' syndrome patients in Saudi Arabia. **Molecular Cytogenetics**, p. 1–13, 2016.

INOUE, K.; LUPSKI, J. R. Molecular mechanisms for genomic disorders. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 3, p. 199–242, jan. 2002.

KAPLAN, P. et al. Contractures in patients with Williams syndrome. **Pediatrics**, v. 84, n. 5, p. 895–899, 1989.

KARMILOFF-SMITH, A et al. Using case study comparisons to explore genotype-phenotype correlations in Williams-Beuren syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 40, p. 136–140, 2003.

KORENBERG, J. R. et al. VI. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 12 Suppl 1, p. 89–107, jan. 2000.

KOZLOWSKI, P.; JASINSKA, A. J.; KWIATKOWSKI, D. J. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. **Electrophoresis**, v. 29, n. 23, p. 4627–4636, 2008.

KRUSZKA, P. et al. Williams–Beuren syndrome in diverse populations. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 176, n. 5, p. 1128–1136, 2018.

LAURITO, S. et al. Detection of a Williams Beuren syndrome case by MLPA. **Medicina**, v. 73, n. 1, p. 47–50, 2013.

LEME, D.E.S. et al. Assessment of clinical scoring systems for the diagnosis os Williams-Beuren syndrome. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.3, p.3407-11, 2013.

LI, L. et al. Differing Microdeletion Sizes and Breakpoints in Chromosome 7q11.23 in Williams-Beuren Syndrome Detected by Chromosomal Microarray Analysis. **Molecular Syndromology**, v. 6, n. 6, p. 268–275, 2016.

LOPEZ-RANGEL, E. et al. Williams syndrome in adults. *Am J Med Genet*, v. 44, n. 6, p. 720–729, 1992.

LOWERY, M. C. et al. Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. **American journal of human genetics**, v. 57, n. 1, p. 49–53, 1995.

LUPSKI, J. R. Genomic disorders ten years on. **Genome Medicine**, v. 1, n. 4, p. 42, 2009.

MERLA, G. et al. Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. **Human Genetics**, v. 128, n. 1, p. 3–26, 2010.

MORRIS, C. A. et al. Natural history of Williams syndrome: Physical characteristics. **The Journal of Pediatrics**, v. 113, n. 2, p. 318–326, 1988.

MORRIS, C. A. et al. Adults with Williams syndrome. **American Journal of Medical Genetics Supplement**, v. 6, p. 102–107, 1990.

MORRIS, C. A.; THOMAS, I. T.; GREENBERG, F. Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. **American journal of medical genetics**, v. 47, n. 4, p. 478–81, set. 1993.

MORRIS, C. A. et al. GTF2I hemizyosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: Genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. **American Journal of Medical Genetics**, v. 123A, n. 1, p. 45–59, 2003.

Morris CA. Williams Syndrome. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Disponível <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1249/>>, Acesso: julho de 2018.

OSBORNE, L. R. et al. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. **Nature genetics**, v. 29, n. 3, p. 321–5, 2001.

PANI, A. M. et al. Genome Rearrangements Detected by SNP Microarrays in Individuals with Intellectual Disability Referred with Possible Williams Syndrome. v. 5, n. 8, 2010.

PÉREZ JURADO, L. A. et al. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. **American journal of human genetics**, v. 59, p. 781–792, 1996.

PLAJA, A. et al. A Novel Recurrent Breakpoint Responsible for Rearrangements in the Williams-Beuren Region. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 3, p. 181–186, 2015.

POBER, B. R. Williams–Beuren Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n.3, p.239-252, 2010.

PORTER, M. A. et al. A Role for Transcription Factor GTF2IRD2 in Executive Function in Williams-Beuren Syndrome. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47457, 2012.

ROBINSON, W. P. et al. Delineation of 7q11.2 deletions associated with Williams-Beuren syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. **Genomics**, v. 34, n. 1, p. 17–23, 1996.

SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57, 2002.

SCHUBERT, C.; LACCONE, F. Williams-Beuren syndrome: Determination of deletion size using quantitative real-time PCR. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 799–806, 2006.

SCHUBERT, C. The genomic basis of the Williams - Beuren syndrome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 7, p. 1178–1197, 2009.

SHAFFER, L. G.; BEJJANI, B. A. A cytogeneticist’s perspective on genomic microarrays. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 3, p. 221–226, 2004.

SMOOT, L. et al. Medical overview and genetics of Williams-Beuren syndrome. **Progress in Pediatric Cardiology**, v. 20, n. 2, p. 195–205, 2005.

SNIJDERS, A. M. et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy

number. **Nature Genetics**, v. 29, n. 3, p. 263–264, 2001.

SOUZA, D. H. DE; MORETTI-FERREIRA, D. Fluorescent in situ hybridization (FISH) as a diagnostic tool for Williams-Beuren syndrome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 17–20, 2007.

STREȚĂ, I. et al. Array CGH - A Powerful Tool in Molecular Diagnostic of Pathogenic Microdeletions - Williams-Beuren Syndrome - A Case Report. **Current health sciences journal**, v. 42, n. 2, p. 207–212, 2016.

STROMME, P.; BJORNSTAD, P. G.; RAMSTAD, K. Prevalence estimation of Williams syndrome. **Journal of child neurology**, v. 17, n. 4, p. 269–71, abr. 2002.

SUGAYAMA, S. M. M. et al. Williams-Beuren syndrome. Cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 81, n. 5, p. 468–473, 2003.

SUGAYAMA, S. M. M. et al. Renal and urinary findings in 20 patients with Williams-Beuren syndrome diagnosed by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 5, p. 266–272, 2004.

SUGAYAMA, S. M. M. et al. Williams Syndrome: development of a new scoring system for clinical diagnosis. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 62, n. 2, p. 159–166, 2007.

TASSABEHJI, M. et al. A transcription factor involved in skeletal muscle gene expression is deleted in patients with Williams syndrome. **Eur J Hum Genet**, v. 7, n. 7, p. 737–747, 1999.

TASSABEHJI, M. et al. Genetics: GTF2IRD1 in craniofacial development of humans mice. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1184–1187, 2005.

THOMAS, N. S. et al. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 7, p. 831–837, 2006.

URBAN, Z. et al. Letters to the Editor. **Am. J. Hum. Genet**, v. 59, p. 958–962, 1996.

VAN HAGEN, J. M. et al. Contribution of CYLN2 and GTF2IRD1 to neurological and cognitive symptoms in Williams Syndrome. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 1, p. 112–124, 2007.

WESSEL, A. et al. Risk of sudden death in the Williams-Beuren syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 127A, n. 3, p. 234–237, 2004.

WILLIAMS, JCP; BARRAT-BOYERS, BG; LOWE, J. Supravalvular aortic stenosis. **Circulation**, v. 24, p. 1311–1318, 1961.

XIA, Y. et al. Clinical application of chromosomal microarray analysis for the diagnosis of Williams–Beuren syndrome in Chinese Han patients. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2019.

YAGIHASHI, T. et al. Clinical utility of an array comparative genomic hybridization analysis for Williams syndrome. **Congenital Anomalies**, v. 54, n. 4, p. 225–227, 2014.