



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS DA
SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN:
Revisão de Literatura

BIANCA ARCARO TOPÁZIO

Salvador, Bahia

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS DA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN: Revisão de Literatura

BIANCA ARCARO TOPÁZIO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de
Biologia da Universidade Federal Bahia como exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho

Salvador, Bahia

2013

Data da defesa: 05 de abril de 2013

Banca Examinadora

Profa. Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho
Instituto de Biologia - Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima
Instituto de Biologia - Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Kiyoko Abe Sandes
Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia

RESUMO

A síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma doença de etiologia genética, causada por microdeleções na região 7q11-23. As principais características clínicas da síndrome são dismorfologias faciais típicas, cardiopatia congênita e personalidade amigável. No entanto, existe uma grande variabilidade fenotípica entre os indivíduos afetados pela síndrome, o que estimula os pesquisadores a buscar as possíveis causas dessa variabilidade. As avaliações citomoleculares oferecem informações valiosas que permitem identificar o tamanho e os genes envolvidos na deleção. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar os métodos citomoleculares utilizados no diagnóstico genético da SWB quanto sua eficiência diagnóstica e relação custo benefício. O trabalho foi realizado através de revisão bibliográfica sobre os aspectos clínicos, genéticos e diagnósticos da síndrome em questão. Dentre métodos diagnósticos citomoleculares para a SWB, o mais utilizado é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), que detecta a deleção em mais de 95% dos casos. Porém, a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) mostrou ser mais informativa, fornecendo um mapeamento mais preciso da região deletada, além de ser relativamente simples, de baixo custo e mais rápida. Um método citomolecular mais abrangente é a hibridização genômica comparativa em *array* (aCGH), que apesar de permitir avaliar todo o genoma do indivíduo, ainda não tem um custo competitivo e sua abordagem ampla pode gerar dados sem relevância clínica e difíceis de interpretar. Assim, a MLPA é a técnica citomolecular mais adequada para a confirmação do diagnóstico clínico dos pacientes com SWB.

Palavras-chave: síndrome de Williams-Beuren; aspectos clínicos; citogenética molecular; diagnóstico.

ABSTRACT

The Williams-Beuren syndrome (WBS) is a disease of genetic etiology, caused by microdeletions in region 7q11-23. The main clinical characteristics of the syndrome are typical facial dysmorphology, congenital heart disease, and friendly personality. However, there is a major phenotypic variability between individuals affected by the syndrome, which stimulates the researchers to seek out the possible causes of this variability. The assessments of molecular cytogenetics offer valuable information that can identify the size and the genes involved in deletion. The main objective of this study was to evaluate the methods of molecular cytogenetics used in genetic diagnosis of the WBS as its diagnostic efficiency and cost-benefit ratio. The work was carried out through a review of the literature on the clinical aspects, and genetic diagnosis of the syndrome in question. Among diagnostic methods of molecular cytogenetics for the WBS, the most used and *in situ* hybridization (FISH), which detects the deletion in more than 95% of cases. However, the technique of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) has been shown to be more informative, providing a mapping more precise of the region deleted, in addition to being relatively simple, low-cost and faster. A method of molecular cytogenetics more comprehensive is the microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH), that in spite of allowing to evaluate the entire genome of the individual, is not yet a cost competitive and its broad approach can generate data without clinical relevance and difficult to interpret. Thus, the MLPA is the most appropriate technique of molecular cytogenetics for the confirmation of the clinical diagnosis of patients with WBS.

Key-words: Williams-Beuren syndrome; clinical aspects; molecular cytogenetics; diagnostic.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Giovanina Maria e Antônio Sérgio, por todo amor e por me ensinarem a ter garra e lutar pelos meus objetivos e sonhos. Ao meu irmão, Bruno, pelos momentos de força e apoio.

À todos integrantes do Laboratório de Genética Humana e Mutagênese, em especial, minha orientadora Acácia Fernandes, pelos ensinamentos, orientação e incentivos em boa parte da minha vida acadêmica, que tornou possível a conclusão dessa monografia.

À todos os professores do curso, tão importantes no meu desenvolvimento acadêmico ao longo desses quatro anos.

Aos amigos e colegas, especialmente Brisa, Cássia, Lucas e Rafael, e ao meu namorado, Danilo, por todo carinho e dedicação, me apoiando nos momentos de dificuldades e incertezas dessa fase tão marcante.

Obrigada a todos, essa vitória é minha e de vocês!

ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
AGRADECIMENTOS	(i)
ÍNDICE	(ii)
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. METODOLOGIA	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
4.1 HISTÓRICO	5
4.2 EPIDEMIOLOGIA	5
4.3 ASPECTOS CLÍNICOS	6
4.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	10
a. Genes envolvidos na região crítica da Síndrome de Williams-Beuren (WBSCR)	14
4.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CITOMOLECULAR	17
5. DISCUSSÃO	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma síndrome de microdeleção ou de deleção de genes contíguos, causada pela perda de uma cópia de aproximadamente 20 genes presentes na região 7q11-23, que abrange 1.5 a 1.8 milhões de pares de bases. Na maioria dos casos, a deleção ocorre esporadicamente, porém há relatos de famílias com herança autossômica dominante para a síndrome (SMOOT et al., 2005; POBER, 2010; HONJO et al., 2012; DUTRA et al., 2012).

A SWB é caracterizada por caracteres faciais distintos, baixa estatura, hipotonia, retardo mental, comportamento amigável e hiper-social, doença cardíaca congênita, hipercalcemia infantil e hipertensão arterial. Os pacientes com esta síndrome também podem apresentar outras manifestações clínicas variáveis em alguns órgãos como rins e olhos, e sistemas gastrointestinal e osteoarticular. Muitos problemas médicos adicionais complicam o quadro da SWB, tais como dificuldades de alimentação, cólicas, irritabilidade e anomalias dentais. Todos os pacientes com SWB têm deficiências intelectuais, com grau variando de leve a moderado, e demonstram perfil cognitivo característico de pontos fortes e fracos (SMOOT et al., 2005; DUTRA et al., 2012; HONJO et al., 2012).

A depender dos genes envolvidos na deleção, o fenótipo dos pacientes da SWB variam de uma estenose aórtica supravalvular (EASV) a uma expressão completa das características de SWB. Devido à grande variabilidade fenotípica da SWB, ela é um excelente modelo para estudos de correlação genótipo-fenótipo (POBER, 2010; HONJO et al., 2012).

Embora relativamente rara, a SWB tem se tornado cada vez mais bem conhecida em ambos os círculos, profissional e leigo, devido a seu perfil cognitivo de personalidade e comportamento distintos. Seu amplo espectro fenotípico ainda não esclarecido desperta os pesquisadores a investigar as possíveis causas dessa variabilidade.

A típica dismorfologia facial da SWB, em conjunto com um ou mais problemas médicos apresentados acima, induzem ao teste laboratorial para confirmar a deleção de uma cópia dos genes da região 7q11-23. Técnicas citomoleculares como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), a amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) e a hibridização genômica comparada por *arrays* (aCGH) são aplicadas

para confirmar o diagnóstico clínico da SWB, apresentando graus de detecção e informações diferentes acerca da deleção (DUTRA et al., 2012).

Identificar o tamanho das deleções dos pacientes com SWB e quais genes estão envolvidos em cada deleção pode fornecer informações valiosas para a correlação genótipo-fenótipo e essas informações podem ser obtidas através da aplicação das técnicas citomoleculares. O principal objetivo dessa pesquisa é descrever as técnicas citomoleculares que podem ser utilizadas no diagnóstico da SWB e qual delas é mais adequada para avaliar minuciosamente a deleção envolvida em casos diversos da SWB.

As vantagens e desvantagens das diferentes técnicas citomoleculares de diagnóstico da SWB são largamente debatidas no meio científico e a definição de qual melhor técnica aplicar em cada paciente é de grande relevância para condução adequada do paciente durante a busca pela confirmação do diagnóstico etiológico da doença. Além de que, o entendimento dos processos genéticos que levam ao fenótipo da SWB dependerá de uma boa metodologia diagnóstica. Outro aspecto a ser levado em consideração é o custo da instrumentação laboratorial e a disponibilidade dessas técnicas.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo principal descrever a síndrome de Williams-Beuren a respeito de seus aspectos clínicos, genéticos e diagnósticos.

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- Descrever as características clínicas da SWB;
- Identificar a etiologia genética da SWB e quais os genes presentes na região 7q11.23 que têm relação com os sintomas clínicos da SWB;
- Associar quais os possíveis papéis dos genes deletados com o fenótipo para SWB;
- Enumerar os métodos citomoleculares de diagnóstico para a SWB;
- Estabelecer quais vantagens e desvantagens de cada método citomolecular apresentado;
- Discutir qual método citomolecular é mais informativo e, ao mesmo tempo, com melhor custo-benefício.

3. METODOLOGIA

A presente pesquisa foi realizada a partir de uma extensa revisão bibliográfica sobre os aspectos clínicos, genéticos e diagnósticos da síndrome de Williams-Beuren, com base na busca de artigos em livrarias científicas *online*, tais como SCIELO (*Scientific Eletronic Library Online*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando os bancos de dados PubMed, PubMed Central e PubMedHealth.

O trabalho foi realizado no período de outubro de 2012 a fevereiro de 2013. Os termos de pesquisas utilizados foram: Williams-Beuren syndrome; Williams-Beuren syndrome cytogenetics; Williams-Beuren syndrome aspects clinics; Williams-Beuren syndrome aspects genetics; Williams-Beuren syndrome cytogenetics diagnostic; Williams-Beuren syndrome MLPA; Williams-Beuren syndrome FISH; Williams-Beuren syndrome aCGH. A busca foi feita por meio de palavras presentes nos títulos e resumos dos artigos.

A seleção dos artigos de interesse foi em conformidade com o assunto proposto, sendo descartados os estudos, que apesar de constarem nos resultados das pesquisas, não estavam diretamente relacionados com o tema dessa revisão bibliográfica.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 HISTÓRICO

Os primeiros relatos de casos do que hoje chama-se síndrome de Williams-Beuren foram descritos como duas enfermidades diferentes, aparentemente não-relacionadas. Williams et al. (1961) relataram um quadro clínico distinto em que pacientes apresentavam estenose aórtica supravalvular, características faciais incomuns, retardo de crescimento e “subnormalidade” mental. Pouco tempo depois, Beuren et al. (1962) independentemente, descreveram essa mesma condição, porém incluindo no fenótipo outras estenoses vasculares, anomalias dentárias e personalidade amigável (SMOOT et al., 2005). Descrições subsequentes de pacientes com características comuns aos fenótipos citados acima indicaram que estas eram variações de uma mesma doença, a síndrome de Williams-Beuren (POBER, 2010).

A primeira causa atribuída a SWB foi a teratogenicidade da vitamina D, baseado em experimentos que mostram estenose aórtica supravalvular e anomalias cranianas em fetos de coelhos expostos a altas doses de vitamina D. Mais tarde, duas evidências convincentes mostraram que a síndrome de Williams-Beuren é genética e não teratogênica: a transmissão da SWB de pais para filhos e a caracterização fenotípica da síndrome de estenose aórtica supravalvular familiar de herança autossômica dominante. A estenose aórtica supravalvular familiar, a qual também é causada por deleção do gene da elastina (*ELN*), está associada com anomalias cardiovasculares que são comuns na SWB, porém com poucas outras características encontradas na síndrome de Williams-Beuren (POBER, 2010).

A partir de então, a SWB passou a ser reconhecida por suas características mais aparentes, descritas inicialmente por Williams e Beuren e seus respectivos colaboradores, e a ser considerada uma doença de etiologia genética.

4.2 EPIDEMIOLOGIA

Embora a SWB seja uma síndrome amplamente reconhecida, dados de sua prevalência na população geral são limitados. A incidência relatada da SWB está entre 1:7.500 e 1:20.000. Essa ampla variação na incidência relatada para a SWB pode ter

ocorrido por dificuldades na identificação e encaminhamento de pacientes para diagnóstico, como aqueles que apresentam dismorfologias indistintas ou atípicas, sendo estes negligenciados. A SWB não apresenta nenhuma preferência étnica ou sexual, sendo diagnosticada em diferentes grupos étnicos e áreas geográficas (STROMME, 2002; HELLER et al., 2003; DUTRA et al., 2012; HONJO et al., 2012).

4.3 ASPECTOS CLÍNICOS

Pacientes com SWB podem apresentar sérios problemas médicos, apesar de, em geral, terem uma boa saúde. Algumas condições comumente vistas em bebês, tais como cólicas, perturbações do sono, infecções de ouvido recorrentes e estrabismo, acometem com maior frequência os bebês com SWB (SMOOT et al., 2005).

O perfil clínico geral de crianças e adultos com SWB inclui baixa estatura com déficit de crescimento, características faciais típicas, problemas dentários, personalidade e comportamento complexos, retardo mental leve a moderado, doenças cardiovasculares congênitas, hipertensão arterial, hipercalcemia e/ou hipercalciúria, anomalias musculoesqueléticas, problemas gastrointestinais e hiperacusia. O quadro clínico de cada paciente pode variar, até mesmo em um mesmo indivíduo ao longo da vida, apresentando todos ou apenas uns poucos sinais clínicos relatados acima (MORRIS et al., 1988; POBER, 2010; DUTRA et al., 2012).

A baixa estatura, comum nos pacientes com SWB, está relacionada com um retardo de crescimento intrauterino significativo. Na infância, as taxas médias de crescimento de crianças com SWB ficam abaixo do normal por 1 ou 2 cm/ano (MORRIS et al., 1988). Além disso, muitas dessas crianças mostram diminuição na velocidade de crescimento anual e, precoce, surto de crescimento atenuado na adolescência. Esse padrão de crescimento, marcado por um atraso seguido de rápido crescimento, também contribui para a estatura diminuída dos adultos (POBER, 2010).

Dismorfologias faciais sutis estão presentes em todos os pacientes com SWB. A extensão das dismorfologias varia entre os indivíduos, bem como, ao longo da vida do mesmo indivíduo (MORRIS et al., 1988). As características faciais mais notáveis em crianças com SWB incluem volume periorbital, íris estrelada em indivíduos com olhos azuis, ponte nasal plana, pequeno nariz arrebitado, filtro longo, perfil facial plano,

queixo pequeno e pele delicada (SMOOT et al., 2005). Ao longo do tempo, essa aparência facial sofre mudanças, frequentemente com engrossamento dessas características nos adultos (POBER, 2010).

Problemas dentários e orais são comumente encontrados em pacientes com SWB. Achados evidentes incluem dentes pequenos e amplamente afastados, má oclusão e ausência de um ou mais dentes (AXELSSON et al., 2003).

Os perfis de personalidade e comportamento da SWB são bem complexos. O estereótipo mais relatado é que todos indivíduos com SWB têm comportamento excessivamente amigável. Isso, entretanto, é uma caracterização incompleta e muito simplificada, que negligencia importantes mudanças desenvolvimentais que ocorrem ao longo da vida dos pacientes (SMOOT et al., 2005).

Estudos recentes com grupos de pacientes com diferentes idades revelaram mudanças comportamentais e de personalidade significativas com o passar dos anos, sendo o padrão estereotipado mais visto em crianças, do que em indivíduos mais velhos. Os adultos com SWB, em geral, exibem sérios problemas emocionais e comportamentais, relações sociais pobres, desinibição, preocupações e altos níveis de ansiedade (DAVIES, 1998). Além disso, muitos indivíduos com SWB têm problemas de atenção, manifestados como hiperatividade e quase todos mostram ansiedade antecipatória proeminente (por exemplo, sobre eventos próximos), mas ausência de ansiedade social (por ex., sobre conhecer estranhos). Outras doenças psiquiátricas tais como depressão, sintomas obsessivos compulsivos, fobias, ataques de pânico e estresse pós-traumático têm sido observadas em um amplo grupo de adultos com SWB (SMOOT et al., 2005).

Portanto, as características de personalidade e neuro-comportamentais da SWB são detectáveis cedo na vida e, geralmente, passam por mudanças com ajustes ao longo da vida dos pacientes (FRANCKE, 1999). Essas dificuldades têm grandes efeitos na qualidade de vida da maioria das pessoas com SWB (POBER, 2010).

Withers (1996) chamou atenção para o fato que crianças com SWB são relutantes em trocar de superfície na qual elas costumam andar ou brincar e não gostam de areia e superfícies desniveladas. Esse “novo” sinal clínico pode não ser restrito apenas às crianças.

Muitos pacientes com SWB apresentam retardo mental variando de leve a moderado, com um QI médio de 50 – 60. Porém, nem todos os indivíduos com SWB têm retardo mental, alguns apresentam QI próximo a média normal baixa da população geral (QI 70 a 90) (SMOOT et al., 2005). Entretanto, a cognição desses pacientes é mais complexa que o indicado apenas pelo QI. Indivíduos com SWB têm perfil cognitivo desigual, com padrão característico de pontos fortes e fracos. Conseqüentemente, um QI global pode ser ilusório e esconder esse padrão. Os relativos pontos fortes estão relacionados com a memória auditiva de rotina e certos aspectos da linguagem, combinados com pontos fracos nas habilidades visual-espaciais e visual-motoras (POBER, 2010).

Muitos desses indivíduos demonstram dificuldades com escrita à mão e desenham objetos de forma desconexa, embora melhorias sejam vistas com a prática e idade. Tipicamente, pessoas com SWB têm dificuldades nas áreas acadêmicas básicas de leitura, fala e matemática, e frequentemente atingem apenas níveis de 7 a 8 anos de idade nessas áreas. Além do atraso do início da fala em crianças com SWB, adolescentes e adultos apresentam prejuízos de linguagem geral leves, embora a linguagem desses indivíduos seja rica em efeito, prosódia e enriquecimento narrativo (SMOOT et al., 2005).

A habilidade melhor do que esperada de reconhecer faces, assim como, a fascinação com estas, são características proeminentes na SWB. Acredita-se que a destreza de reconhecer faces esteja relacionada com o interesse social aprimorado visto em pessoas com SWB (SMOOT et al., 2005).

Estenose de artérias de médio e grande porte, devido ao espessamento dos lúmens vasculares pelo supercrescimento da musculatura lisa constitui a anomalia cardiovascular típica da SWB. Essa patologia frequentemente forma a base do diagnóstico clínico da síndrome, principalmente na infância, quando outros sinais podem estar ausentes (POBER, 2010; SMOOT et al., 2005).

A lesão característica e mais comum é a estenose aórtica supra-avalvular (EASV), a qual pode apresentar-se sozinha ou ocorrer simultaneamente em vários locais, incluindo o arco aórtico, a aorta descendente e as artérias pulmonar, coronária, renal, mesentérica e intracranial. A EASV, cuja severidade varia de leve a severa, é encontrada em aproximadamente 70% dos pacientes com SWB (POBER, 2010).

A EASV isolada também pode ocorrer na forma familiar, na qual segue padrão de herança autossômico dominante. O padrão e a patologia das duas formas de estenose, esporádica e familiar, são clinicamente indistinguíveis, pois ambas são causadas por haploinsuficiência funcional da elastina. Porém a forma familiar carece de outras características clínicas típicas da SWB (SMOOT et al., 2005).

Estenoses no lado esquerdo podem ser estáveis nos pacientes com SWB, mas progressões das obstruções podem ocorrer, especialmente durante os cinco primeiros anos de vida. No entanto, obstruções no fluxo ventricular direito, particularmente estenoses pulmonares periféricas, frequentemente se resolvem espontaneamente. Raramente, pacientes são encontrados tendo uma “síndrome aórtica média”, na qual a aorta torácica e/ou a aorta abdominal e suas ramificações são acometidas. Estenoses ou oclusão dos óstios coronários podem ocorrer na ausência da EASV (POBER, 2010).

Estenose pulmonar periférica compreende a segunda doença cardiovascular mais comum da SWB (HALLIDIE-SMITH et al., 1988; ZALZSTEIN et al., 1991). Complicações cardiovasculares são a principal causa de morte na SWB. Uma avaliação formal da expectativa de vida dos pacientes com SWB é deficiente (POBER, 2010).

Hipertensão é notada em 40-60% dos casos da SWB (MORRIS et al. 1990; BRODER et al., 1999), muitos dos quais requerem tratamentos com medicamentos anti-hipertensivos após demonstrarem a ausência de patologia corrigível cirurgicamente. Arteriopatias aumenta significativamente o risco de hipertensão nesses pacientes (SMOOT et al., 2005), porém a base para a hipertensão ainda não foi identificada. Modelos animais sugerem que pressões sanguíneas mais altas em pacientes com SWB do que nos controles pode refletir uma adaptação fisiológica ao sistema vascular anormal (POBER, 2010).

A SWB pode ser considerada uma doença poli-endócrina associada com anomalias de cálcio e tireóide. A frequência de ocorrência de hipercalcemia não é conhecida, por ser, na maioria das vezes, assintomática ou estar associada com sintomas não específicos (como, cólicas ou irritabilidade, hipotonia, diminuição de apetite e constipação) que comumente ocorre mesmo em pacientes com SWB que têm níveis de cálcio normais. O período de maior risco para hipercalcemia é durante a infância, ainda que a hipercalcemia possa ocorrer em qualquer idade (SMOOT et al., 2005).

Hipercalciúria pode ocorrer na ausência da hipercalcemia e aumenta o risco de nefrocalcinose. A etiologia do metabolismo anormal de cálcio em SWB permanece desconhecida (MORRIS et al., 1988; KRUSE et al., 1992). A anomalia de tireóide mais comum é o hipotireoidismo clínico ou subclínico, encontrado em aproximadamente 20% da população com SWB. *Diabetes mellitus* também tem sido observada em adultos com SWB (MORRIS et al., 1988).

Problemas músculo-esqueléticos encontrados na SWB são específicos para cada grupo de idade dos pacientes; crianças jovens tendem a ter hipotonia e relaxamento das articulações, enquanto que adolescentes e adultos tendem a desenvolver contraturas das articulações assim como lordose e, ocasionalmente, escoliose (MORRIS et al., 1990).

Os problemas gastrointestinais na SWB são comuns tanto em crianças quanto adultos. As crianças frequentemente apresentam cólicas e dificuldades de alimentação que podem contribuir para o déficit de crescimento. Refluxo gastroesofageal e constipação são encontrados em quase metade das crianças com SWB (MORRIS et al., 1988).

Prazer pela música é uma característica quase unânime em pacientes com SWB, que inclui habilidades de canto, manuseio de instrumentos musicais e reconhecimento de canções. Em um aparente paradoxo, sensibilidade a certos barulhos, particularmente tempestades ou fogos de artifício, desenvolve-se em mais de 90% dos casos da síndrome (POBER, 2010). Não é claro, entretanto, se existe uma verdadeira propensão ou talento, ou se isso é apenas um interesse musical aumentado, especialmente por componentes rítmicos (SMOOT et al., 2005). Problemas de audição incluem otites recorrentes, hiperacusia e perda de audição neurosensorial suave em adultos (MORRIS et al., 1988).

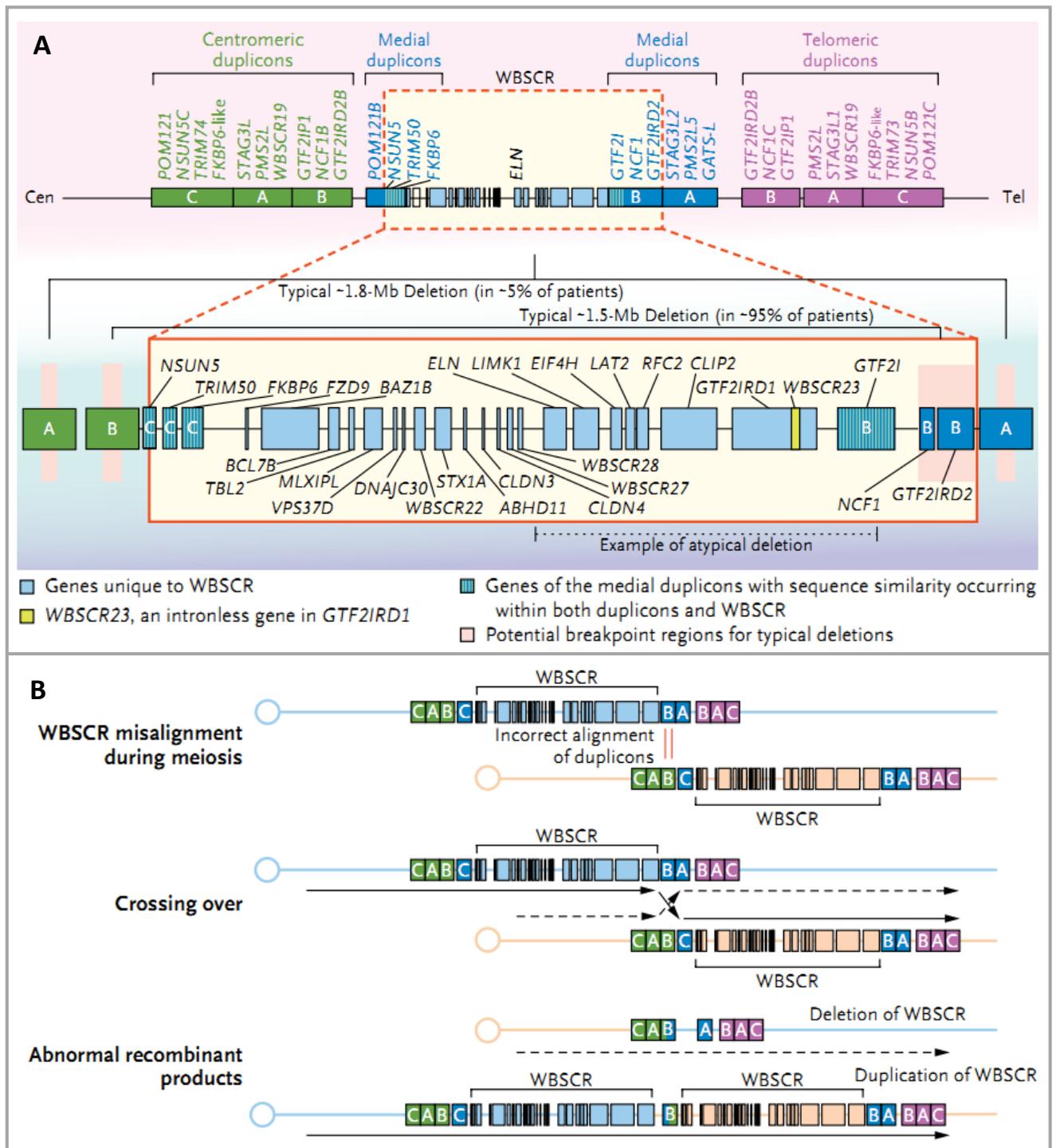
4.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Até recentemente, a causa da SWB era atribuída a fatores teratogênicos ou maternos. Entretanto, no início dos anos 90, dados publicados favoreceram a etiologia genética da SWB. Foram relatados gêmeos monozigóticos concordantes para SWB e a transmissão da síndrome de pais para filhos. Esses dados indicam que embora a SWB ocorra esporadicamente na maioria dos casos, ela é geneticamente causada, e pode ser

transmitida em uma herança autossômica dominante (SMOOT et al., 2005; DUTRA et al., 2012; HONJO et al., 2012).

A região crítica da SWB foi mapeado em 7q11-23 e contém o gene da elastina (*ELN*), bem como outros genes adjacentes. A deleção pode ocorrer no cromossomo 7 herdado maternalmente ou paternalmente em igual proporção (SMOOT et al., 2005; POBER, 2010). Pérez-Jurado et al. (1996) demonstraram existir uma aparente diferença significativa entre os pacientes com SWB em relação à altura, peso e circunferência da cabeça, dependendo da origem parental da deleção. A origem materna estaria associada com parâmetros de crescimento menor em pacientes com SWB. Brondum-Nielsen et al. (1997) também mostraram uma possível tendência de menor retardo de crescimento em pacientes com deleção paterna comparados com a deleção materna. Entretanto, Wu et al. (1998) não encontraram correlação entre origem parental e estatura em seus pacientes. Um estudo mais recente de Partsch et al. (1999) revelou que a baixa estatura em pacientes com SWB é devido à taxa de crescimento diminuída no início da infância seguida de uma fase de crescimento precoce e puberdade antecipada. Estudos de Dutra et al. (2012) mostram não haver diferença clínica em relação ao tamanho e a origem parental da deleção.

A microdeleção do cromossomo 7 envolvida na SWB ocorre devido a arquitetura genética única nessa região (Figura 1A). Especificamente, a região deletada, referida como a região cromossômica da SWB, é flanqueada por conjuntos de genes altamente homólogos e pseudogenes organizados em blocos de repetição de baixas cópias conhecidos como *duplicons*. O alto grau de homologia entre esses *duplicons* flanqueadores, bem como sua proximidade entre cada um, predispõe a região cromossômica da SWB em cada cromossomo 7 a desalinhar durante a meiose podendo levar ao crossing-over desigual e posterior deleção da região da SWB (Figura 1B). A presença de uma pequena deleção ou duplicação dentro dos *duplicons* é outro fator de risco para desalinhamento meiótico (HELLER et al., 2003; POBER, 2010; DUTRA et al., 2012; HONJO et al., 2012).



Os *duplicons* que flanqueiam a região cromossômica da SWB também predispõem a região a mudanças genéticas, tais como duplicações e inversões. Pacientes com duplicações da região cromossômica da SWB não se assemelham, nem fisicamente, nem

cognitivamente, aos pacientes com SWB. Seus perfis cognitivos incluem prejuízos das habilidades de linguagem expressiva, atrasos de desenvolvimento e, em alguns casos, características semelhantes a autistas. Inversão de toda região cromossômica da SWB, encontrado em aproximadamente 7% da população geral, é considerada um polimorfismo benigno, uma vez que os portadores são fenotipicamente normais (SMOOT et al., 2005; POBER, 2010; DUTRA et al., 2012).

Em mais de 98% dos pacientes que apresentam diagnóstico clínico para SWB, os pontos de quebra da deleção incidem dentro dos *duplicons*, resultando nas deleções típicas da síndrome. A maioria das quebras ocorrem em *duplicons* médios ou centroméricos e leva a uma deleção de aproximadamente 1.5 milhões de pares de base de DNA, envolvendo de 26 a 28 genes. Com menor frequência, uma deleção ligeiramente maior, de 1.8 milhões de pares de bases, codificando todos os 28 genes pode ocorrer. A microdeleção mais comum, com cerca de 1.5 Mb, é encontrada em 90 a 95% dos pacientes (ver Figura 1A) (HELLER et al., 2003; SMOOT et al., 2005; DUTRA et al., 2012; HONJO et al., 2012). No entanto, nenhuma diferença fenotípica, além do risco de hipertensão, tem sido notada entre pacientes que têm deleções de ambos os tamanhos (POBER, 2010; DUTRA et al., 2012), derrubando a hipótese que a diferença no tamanho das deleções poderia explicar a variabilidade fenotípica dos pacientes com SWB.

Cerca de 2% dos pacientes têm deleções atípicas, que podem ser a causa da variabilidade fenotípica substancial entre os pacientes com SWB (DUTRA et al., 2012). Aqueles com uma pequena deleção atípica envolvendo a porção telomérica da região cromossômica da SWB têm características comuns da síndrome enquanto que, reciprocamente, aqueles cuja deleção atípica não envolve esta porção da região cromossômica têm características mais suaves da SWB. Em conjunto, esses achados indicam que deleções envolvendo apenas genes próximos a extremidade telomérica são suficientes para levar ao perfil neurodesenvolvimental típico da SWB (POBER, 2010).

Apesar dos avanços genéticos, a considerável variabilidade fenotípica observada entre os pacientes com SWB permanece inexplicada. A especulação inicial que a variação no tamanho da deleção resultava nessa variabilidade fenotípica foi refutada. Explicações prováveis incluem polimorfismos nas cópias não deletadas dos genes da região cromossômica que afeta a função da proteína ou o nível de expressão, efeitos

variáveis da deleção na expressão de genes vizinhos, ou efeitos de genes modificadores, incluindo alterações epigenéticas, em outro local do genoma (POBER, 2010).

Pacientes saudáveis que não carregam a deleção, a qual ocorre espontaneamente durante a gametogênese, têm a probabilidade de menos de 1% de terem um segundo filho com SWB. A maioria dos adultos com SWB escolhem não reproduzir, mas aqueles que reproduzem têm uma chance de 50% que cada filho herde a síndrome. Entretanto, portadores de inversão da região crítica da SWB são mais propensos a produzir um gameta que abriga a região cromossômica da SWB deletada, tendo um risco 4 vezes maior de transmitir a deleção à prole. O risco maior ocorre devido a um aumento nos eventos de desalinhamento dos cromossomos 7 durante a meiose. (SMOOT et al., 2005; POBER, 2010).

a. Genes envolvidos na região crítica da Síndrome de Williams-Beuren (WBSCR)

Embora pelo menos 21 genes tenham sido identificados na deleção da SWB, suas contribuições individuais para os fenótipos dos pacientes ainda não estão completamente estabelecidas. Até agora, apenas a deleção do gene da elastina (*ELN*) tem seu efeito bem esclarecido. Entretanto, a hemizigosidade do *ELN* é necessária, porém não suficiente para causar, sozinha, a SWB (HELLER et al., 2003). Foram propostas possíveis contribuições fenotípicas da hemizigosidade de outros seis genes da região crítica da SWB (genes *LIMK1*, *CYLN2*, *GTF2I*, *GTF2IRD1*, *RFC2* e *STX1A*), apesar de ainda não ser clara essa relação (FRANCKE, 1999; SMOOT et al., 2005; POBER, 2010; HONJO et al., 2012). Até o momento, não há estudos que indiquem as contribuições dos outros genes envolvidos na deleção desta síndrome.

Enquanto intensas pesquisas ainda estão em curso a fim de identificar em que os genes deletados na região cromossômica da SWB são importantes na manifestação fenotípica da síndrome, evidências inequívocas mostram que a hemizigosidade do gene *ELN* causa a patologia cardiovascular da SWB (SMOOT et al., 2005). A quebra do *ELN* por translocação ou deleção parcial está firmemente associada à estenose aórtica supra-avalvular (EASV). O gene *ELN*, que codifica a proteína tropoelastina, é composto por 34 éxons, distribuídos em aproximadamente 50 Kb no centro da região deletada da SWB (FRANCKE, 1999).

Embora a perda de um alelo do *ELN* produza o fenótipo cardiovascular da SWB, as consequências fenotípicas da perda de outros alelos dentro da região cromossômica deletada são muito menos claras. Os efeitos da hemizigidade, o papel de cada gene e se fenótipos selecionados requerem perda combinada de vários genes têm sido inferidos de estudos de pacientes com deleções atípicas e modelos com camundongos que têm os genes de interesse superexpressos ou subexpressos. A região cromossômica da SWB em humanos e sua região correspondente em camundongos são similares, contendo quase os mesmos genes, na mesma ordem (POBER, 2010; HONJO et al., 2012).

Em relação ao gene *ELN*, apesar dos camundongos hemizigóticos serem considerados clinicamente e hemodinamicamente normais, estudos histológicos revelaram aumento no número de lamelas de elastina em seus vasos sanguíneos arteriais, similar aos achados em vasos aórticos de pacientes com EASV. Camundongos homozigotos *Eln*^{-/-} carecem completamente da síntese de tropoelastina, o que aumenta a espessura dos vasos aórticos devido ao acúmulo de musculatura lisa, podendo levar à obliteração do lúmen vascular e morte neonatal (FRANCKE, 1999). De todos os indivíduos hemizigóticos para *ELN*, 50 – 60% apresentam EASV (PÉREZ-JURADO et al., 1996). Estreitamento de outras artérias pode ocorrer, sendo a estenose pulmonar periférica a mais encontrada. O mecanismo preciso que desencadeia o crescimento proliferativo do músculo liso, injúrias vasculares e obstrução arterial progressiva, ainda tem que ser esclarecido. Enquanto nenhum outro achado cardíaco foi relatado em camundongos *Eln*^{-/-}, algumas anomalias do tecido conjuntivo em indivíduos com SWB têm sido atribuídas à hemizigidade do *ELN*: flacidez precoce da pele, voz rouca, inchaço periorbital, hérnia e divertículo de colón do intestino e vesícula. A presença de características faciais típicas de SWB, mesmo na ausência de EASV sugere que outros genes além do *ELN* são grandes contribuintes para essas características (FRANCKE, 1999; SMOOT et al., 2005; HONJO et al., 2012).

Pacientes com EASV familiar de herança autossômica dominante carregam uma deleção muito pequena na região crítica da SWB envolvendo a perda somente de *ELN* e o seu gene vizinho imediato *LIMK1*. Esse gene ganhou notoriedade quando foi proposto que a perda de uma cópia do gene *LIMK1* resulta em comprometimento da construção visual-espacial, uma característica comum na SWB. O gene *LIMK1* codifica uma proteína quinase-LIM1 que é altamente expressa em neurônios e tem papel na regulação da estrutura citoesquelética por filamentos de actina. Camundongos homozigotos para *LIMK1*,

que têm as duas cópias deletadas do gene, têm função sináptica anormal, respostas de medo e aprendizado espacial alterados, fornecendo evidência adicional que *LIMK1* tem papel importante na construção visual-espacial. Entretanto, muitos pacientes com deleções muito pequenas ou atípicas que incluem o *LIMK1* além do *ELN* não têm comprometimento visual-espacial, assim, o *LIMK1* pode ser necessário, mas não suficiente para determinar esse fenótipo. Se a haploinsuficiência da quinase-LIM1 contribui para o perfil cognitivo típico da SWB, ou se é preciso a deleção de outros genes, continua sendo fortemente debatido (FRANCKE, 1999; SMOOT et al., 2005; POBER, 2010; HONJO et al., 2012).

Existe um consenso, entretanto, que os genes *CYLN2*, *GTF2IRD1* e *GTF2-I*, mais teloméricos da região crítica da SWB, são genes candidatos para a causa do retardo mental e possivelmente outros aspectos da personalidade da SWB (SMOOT et al., 2005).

O gene *CYLN2*, igualmente conhecido como CLIP2, codifica CLIP-170, também chamada de restina, uma proteína ligante citoplasmática que é abundantemente expressa no cérebro e media interações entre organelas celulares e microtúbulos. Deleção do gene *Cyln2* em camundongos resulta em deficiência de crescimento leve, anomalias de cérebro sutis e comprometimento da coordenação motora (FRANCKE, 1999; SMOOT et al., 2005; POBER, 2010).

O gene *GTF2I* é o mais telomérico da região crítica da SWB e codifica o TFII-I, um fator de transcrição que está envolvido na desacetilação de histonas e remodelamento da estrutura da cromatina. TFII-I é amplamente expresso, mas sua função pode ser sensível a dosagem em certos tecidos tais como o cérebro. Possivelmente, está envolvido com anomalias craniofaciais, dentárias, retardo de crescimento, perfil cognitivo da SWB e prejuízos de respostas visuais (SMOOT et al., 2005; POBER, 2010).

Imediatamente ao lado do *GTF2I* está o gene *GTF2IRD1* relacionado, estruturalmente e funcionalmente, que codifica um fator de transcrição da família TFII-I. Perda apenas do gene *GTF2IRD1* pode não ter efeitos no fenótipo da SWB; entretanto consequências adversas podem resultar da deleção combinada de *GTF2IRD1* e *GTF2I*, possivelmente devido desregulação sinérgica de programas de desenvolvimento. Estudos suportam a hipótese que a hemizigosidade dos dois genes em conjunto está associada com déficits cognitivo e motor específicos da SWB (SMOOT et al., 2005; HONJO et al., 2012).

Pacientes que têm deleções que englobam todos ou alguns dos genes mais teloméricos tem inteligência próximo a normalidade e graus variáveis de comprometimento das habilidades visual-espaciais e visual-construtivas. Os estudos dos limites de deleções de indivíduos com EASV e SWB, claramente, implicam o gene *GTF2I* na definição do perfil cognitivo da SWB. Os genes *GTF2IRD1* e *CYLN2* podem também contribuir para os fenótipos cognitivo e de personalidade dos pacientes com SWB (SMOOT et al., 2005).

O gene *RFC2* codifica a segunda maior subunidade de um complexo com cinco proteínas, que é essencial para os processos de replicação do DNA. A perda de uma cópia desse gene pode afetar a eficiência da replicação de DNA, contribuindo, assim, para déficit de crescimento e outros problemas de desenvolvimento. O papel exato da deleção do gene *RFC2* no fenótipo de pacientes com SWB não é completamente claro (FRANCKE, 1999; HONJO et al., 2012).

Genes inclusos na região cromossômica da SWB mais próximos ao centrômero também podem contribuir para o fenótipo dos pacientes afetados por essa síndrome, tal como o gene *STX1A*. A hemizigosidade de *STX1A*, que codifica uma proteína específica do cérebro essencial para a liberação dos neurotransmissores das vesículas sinápticas, pode contribuir com a memória auditiva aprimorada documentada em alguns indivíduos com SWB. Outra possível contribuição fenotípica desse gene são os prejuízos de tolerância a glicose, vistos em casos de SWB (FRANCKE, 1999; POBER, 2010).

A presença de somente uma cópia, ao invés de duas cópias, de cada gene da região cromossômica da SWB deve reduzir a expressão das proteínas codificadas pela metade. Embora dados empíricos confirmem que isso ocorre com a maioria dos genes, existem exceções tecido-específicas, tais como o gene *GTF2IRD1*. Além disso, muitos genes não deletados que flanqueiam a região cromossômica da SWB, inesperadamente, exibem expressão diminuída, possivelmente devido a efeito de posição (POBER, 2010).

4.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CITOMOLECULAR

O mapeamento genético e físico demonstrou que a SWB é uma síndrome de microdeleção ou de deleção de genes contíguos no braço longo do cromossomo 7

(7q11.23) que, em geral, envolve uma microdeleção de aproximadamente 1.5 milhões de pares de base de DNA (SMOOT et al., 2005; DUTRA et al., 2012).

A SWB pode se apresentar durante a infância com características físicas sutis, problemas cardiovasculares e/ou déficit de crescimento. A suspeita de SWB em crianças e/ou adolescentes, frequentemente, ocorre durante trabalhos de acompanhamento de problemas do desenvolvimento, tais como atrasos de desenvolvimento, desordens de atenção e/ou problemas escolares (SMOOT et al., 2005).

O reconhecimento da SWB geralmente se inicia com o médico clínico. Apesar da consistência das características clínicas gerais, o amplo espectro de anomalias e a variabilidade fenotípica frequentemente leva a diferenças significativas no número de pacientes diagnosticados. Critérios de diagnóstico clínico têm apenas utilidade modesta quando comparados com testes laboratoriais rápidos e precisos. A confirmação da suspeita clínica é essencial para o monitoramento clínico do paciente e aconselhamento genético da família (POBER, 2010; DUTRA et al., 2012).

No início dos anos 70, técnicas de bandamento de cromossomos foram desenvolvidas, facilitando o reconhecimento de anomalias cromossômicas que permitiram a identificação segura de cada cromossomo humano e a detecção de aneuploidias, bem como muitos rearranjos estruturais. A técnica de bandamento de rotina apresenta, em média, resolução de 400-500 bandas, sendo possível identificar, com segurança, deleções ou duplicações com mais de 10 Mb. Técnicas de bandamento de alta-resolução, não são rotineiramente realizadas em laboratórios de citogenética, apesar de alcançar uma resolução de aproximadamente 1.000 bandas. Nesse nível de resolução, uma alteração entre 3 e 5 Mb pode ser detectada. Alterações maiores que 3 Mb são extremamente difíceis de serem detectadas com esses métodos (SHAFFER & BEJJANI, 2004). Para superar essas limitações, técnicas de citogenética molecular foram desenvolvidas.

Nos anos 80 e 90, métodos de hibridização *in situ* foram desenvolvidos para detectar sutis alterações submicroscópicas, sendo a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) a técnica mais comum. Essa metodologia permite que sequências conhecidas do DNA seja inserido em uma variedade de vetores, tais como plasmídeos e cromossomos artificiais de bactérias (BAC's) e sejam utilizadas como sondas para hibridizar com regiões específicas dos cromossomos humanos. Aplicações da FISH incluem mapeamento

gênico e detecção de rearranjos e aneuploidias citogenéticas (SHAFFER & BEJJANI, 2004).

Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), envolvendo sondas específicas para o gene *ELN*, estabelece o diagnóstico da SWB por mostrar a presença de apenas um alelo de *ELN*, ao invés de dois alelos. Embora a técnica de FISH continue a ser a técnica laboratorial mais utilizada, o diagnóstico também pode ser estabelecido por meio de análise de marcadores de microssatélites, amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA), exame de reação da cadeia de polimerase (PCR) quantitativa ou teste de hibridização genômica comparativa (CGH). Destes testes disponíveis, apenas FISH, MLPA e CGH são técnicas citomoleculares de diagnóstico da SWB (POBER, 2010; HONJO et al., 2012).

Schouten et al. (2002) propuseram, pela primeira vez, a MLPA, uma técnica de quantificação de número de cópias de DNA. A técnica é um ensaio múltiplo que utiliza até 40 sondas ao mesmo tempo, sendo cada uma correspondente a uma sequência de DNA diferente, para estimar o número de cópias relativas de cada sequência. Desde que a técnica de MLPA foi desenvolvida, têm sido testada como método diagnóstico em muitas doenças envolvendo anomalias cromossômicas, incluindo a SWB (DUTRA et al., 2012).

O procedimento da MLPA envolve desnaturação, seguida por hibridização, amplificação por PCR e separação dos produtos da PCR por eletroforese capilar. A comparação de sinais de fluorescência, apresentados em um gráfico com picos por um *software* de análise dos resultados, entre o DNA teste e um DNA controle permite quantificar as sequências de interesse na amostra de DNA. A técnica de MLPA é frequentemente aplicada para detectar variação no número de cromossomos, perda ou ganho de regiões submicroscópicas e deleção ou duplicação gênicas. Normalmente, as sequências específicas utilizadas são diferentes éxons do(s) gene(s) de interesse (SCHOUTEN et al., 2002; KOZLOWSKI et al., 2008).

A hibridização genômica comparativa (CGH) é, possivelmente, a maior conquista na área de estratégias de triagens genômicas. Na CGH, dois genomas são diretamente comparados para detectar diferenças no conteúdo de DNA. Os dois genomas são diferentemente marcados com dois fluorocromos distintos e comparados para examinar a taxa dos dois fluorocromos nos cromossomos metafásicos. No entanto, estas técnicas, por se basearem em cromossomos metafásicos, têm uma resolução limitada que é

definida pelos cromossomos metafásicos ao nível de um cariótipo com aproximadamente 450 bandas (alterações de 5 a 10 Mb). Além disso, a CGH não é capaz de identificar rearranjos balanceados, tais como translocações recíprocas, translocações robertsonianas e inversões (SHAFFER & BEJJANI, 2004).

Pouco depois, a CGH passou a ser aplicado em *microarrays* (aCGH). A aCGH tem os mesmos princípios que o tradicional CGH, exceto que os segmentos de DNA clonados (por exemplo, BAC) são substitutos dos cromossomos metafásicos como etiquetas para a hibridização. A relação entre os genomas etiquetados, são comparados com um *software* de análise. Por usar BAC's, as alterações são imediatamente ligadas a marcadores genômicos/genéticos, assim, a resolução do genoma é determinada pelas distâncias de mapa entre os marcadores (alvos) ou pelo tamanho dos clones utilizados. Mesmo com os avanços da aCGH, a técnica ainda não permite a detecção rearranjos balanceados. Assim, a análise de cariótipo deve ser realizada em todos os resultados de aCGH normais quando a anomalia cromossômica é ainda suspeitada com base no fenótipo clínico (SHAFFER & BEJJANI, 2004).

5. DISCUSSÃO

Considerando os métodos citogenéticos disponíveis para a confirmação do diagnóstico clínico da SWB, suas aplicações e limitações, é preciso estabelecer qual deles tem mais sucesso na detecção da deleção envolvida na síndrome.

A região mais comumente deletada na SWB, com aproximadamente 1.5 Mb, está abaixo do limiar de detecção da técnica de citogenética clássica por bandamento G, que é capaz de detectar apenas deleções maiores que 10 Mb. Mesmo a técnica de bandamento de alta-resolução, capaz de identificar alterações de 3 – 5 Mb, dificilmente permite detectar a microdeleção em 7q11-23 (SHAFFER & BEJJANI, 2004; SMOOT et al., 2005). Portanto, é importante a aplicação de técnicas citomoleculares para o diagnóstico genético da SWB.

Vale ressaltar a importância da realização do cariótipo, mesmo em pacientes com suspeita de síndromes de microdeleção, para descartar a ocorrência de outras anomalias cromossômicas que também podem influenciar no fenótipo. A cariotipagem deve ser a técnica de triagem para a aplicação das técnicas citomoleculares, uma vez que, a maioria dessas técnicas avalia apenas a região de interesse e/ou necessitam da confirmação dos achados através do cariótipo.

A FISH é considerado a técnica padrão para o diagnóstico citomolecular da SWB, com poder de detectar mais de 95% dos indivíduos com esta síndrome. Entretanto, é uma técnica de intenso esforço laboratorial, demorada, e que não permite a detecção do exato tamanho da deleção (SELLNER & TAYLOR, 2004; DUTRA et al., 2012; HONJO et al., 2012). Além disso, as principais desvantagens práticas da aplicação da técnica é a incapacidade de detectar pequenas deleções e duplicações e o fato de ser facilmente afetado pela qualidade das metáfases (EUN HAE CHO et al., 2009). Assim, comparado com outras técnicas citomoleculares, a FISH é um método de baixo rendimento relativo (SELLNER & TAYLOR, 2004). Portanto, é uma boa ferramenta de diagnóstico dos casos de SWB mais comuns, porém no caso de deleções atípicas pode resultar em falsos negativos, necessitando do encaminhamento para técnicas mais abrangentes.

A técnica de MLPA tem sido introduzida nos laboratórios de diagnóstico de DNA para detecção de deleções e/ou duplicações em muitas doenças gênicas, sendo considerada uma técnica altamente informativa. A técnica de MLPA é efetiva na detecção

da deleção na SWB, fornecendo um mapeamento mais preciso da deleção na região crítica, quando comparado com a técnica de FISH. Um kit de MLPA, específico para a SWB, foi desenvolvido e está disponível comercialmente. Esse kit é capaz de detectar deleções ou duplicações em um ou mais éxons dos genes *ELN*, *CLIP2*, *TBL2*, *STX1A*, *LIMK1*, *RFC2* e *FKBP6* da região cromossômica da SWB, tendo uma abrangência maior da região deletada, inclusive permitindo identificar os pontos de quebras da deleção (DUTRA et al., 2012; HONJO et al., 2012).

As vantagens mais importantes da MLPA são sua relativa simplicidade, baixo custo, retorno rápido (2 dias), facilidade de “multiplexagem” que permite confiança elevada nos resultados, alta acurácia na estimativa do número de cópias e estimativa da extensão da deleção e o potencial de combinar a análise do número de cópias com outras aplicações, como, por exemplo, detecção de metilação. Ao contrário da FISH, a MLPA é menos demorado e capaz de detectar deleções pequenas e atípicas e duplicações (SHOUTEN et al., 2002; KOZLOWSKI et al., 2008; EUN HAE CHO et al., 2009; DUTRA et al., 2012).

A análise de MLPA deve ser cautelosa a fim de evitar má interpretação de polimorfismos presentes nos sítios de anelamento das sondas como deleções. Sobre a identificação de polimorfismos clinicamente significantes, muitos estudos têm se concentrado na variação do número de cópias (CNV) do genoma humano. Assim, para interpretação dos resultados da MLPA, especialmente quando deleções simples e duplicações são encontradas, pesquisa no banco de dados atualizado de CNVs é uma ferramenta importante para prevenir falsos positivos (EUN HAE CHO et al., 2009).

A aCGH tem muitas vantagens sobre a citogenética clássica e a FISH, tais como, a capacidade de cobrir todo o genoma, alta-resolução, rapidez e sensibilidade. Assim, a aCGH têm provado ser um método poderoso e promissor na detecção de microdeleções e na identificação de anomalias citogenéticas novas. Entretanto, a resolução da aCGH pode variar dependendo do modelo e formato do “array”. Além disso, esse método é relativamente difícil e custoso, e requer laboratórios com equipamentos adequados (SHAFFER et al., 2007; DUTRA et al., 2012).

Apesar de ainda não ter um custo competitivo, a técnica de aCGH oferece vantagens se a clínica não é claramente consistente com a SWB, ou se o paciente tem

uma deleção atípica, uma vez que esse método pode delimitar os genes deletados em todo o genoma (POBER, 2010).

As limitações de métodos citomoleculares estabelecidos incluem baixa resolução, como no caso da CGH que têm essencialmente a mesma resolução do bandamento G; a necessidade de se ter um alvo para a aplicação da FISH, com microdeleções suspeitas e conhecidas; e os procedimentos intensivamente trabalhosos. O desenvolvimento da aCGH aumentou a resolução da análise, eliminou a necessidade de alvos para a FISH e diminuiu substancialmente o trabalho laboratorial (SHAFFER & BEJJANI, 2004).

A abordagem através de todo genoma que alguns pesquisadores estão usando para a confirmação do diagnóstico clínico, é susceptível a gerar dados que podem ser difíceis de interpretar. Alterações em regiões do genoma sem relevância clínica estabelecida pode também tornar uma interpretação útil em onerosa para os citogeneticistas clínicos. Assim, um diagnóstico útil através da aCGH deve ser confiável, detectar com precisão as anormalidades cromossômicas envolvidas e apresentar resultados interpretáveis. O resultado diagnóstico por aCGH pode necessitar confirmação por FISH, seguido da análise de cariótipo para delinear as anomalias (SHAFFER & BEJJANI, 2004; SHAFFER et al., 2007).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síndrome de Williams-Beuren é uma síndrome de microdeleção de genes contíguos que resulta em um amplo e característico perfil clínico. Descrita simultânea e independentemente por Williams e Beuren, em 1961 e 1962, respectivamente, a SWB é caracterizada por anomalias cardiovasculares, comumente a estenose aórtica supravalvular, traços faciais distintos, retardo mental e personalidade típica, frequentemente amigável. Embora apresente uma clínica de fácil identificação, entre os pacientes com SWB há uma grande variabilidade fenotípica, ainda de causa a ser esclarecida.

Causada pela deleção de aproximadamente 1.5 Mb na região do cromossomo 7q11-23, a SWB ocorre com frequência de 1:7.500 a 1:20.000, sem preferências étnicas ou sexuais e com igual proporção entre herança materna e paterna. A deleção, em geral, sucede de maneira esporádica, resultando em uma mutação *de novo*, porém há relatos de casos de transmissão de pais para filhos com padrão de herança autossômica dominante.

A região deletada do cromossomo 7 inclui o gene da elastina (*ELN*) bem como outros genes próximos. Segmentos amplamente homólogos que flanqueiam essa região, à predispõe a desalinhamento meiótico que pode resultar em deleção ou duplicação dos genes da região crítica da SWB. Os efeitos da hemizigosidade de cada gene ainda não é claro, apenas do gene *ELN*, que nitidamente está associado às doenças cardiovasculares congênitas. Genes mais teloméricos da região deletada, tais como *CYLN2*, *GTF2IRD1* e *GTF2-I*, parecem contribuir para o retardo mental e algumas características de personalidade dos pacientes com SWB. Genes mais centroméricos também contribuem para o fenótipo da SWB.

Uma vez que a resolução da citogenética clássica, bem como a de alta-resolução, não tem capacidade de detectar microdeleções, métodos citomoleculares de diagnóstico foram desenvolvidos para permitir a confirmação do diagnóstico clínico da SWB. A técnica mais utilizada em laboratórios de diagnóstico é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), capaz de identificar o número de alelos do gene *ELN* através de sondas específicas para a região da SWB. A FISH é uma importante ferramenta no diagnóstico de pacientes com SWB, porém é um procedimento demorado e trabalhoso, não sensível a deleções atípicas menores e que não informa o tamanho da deleção.

Outro método citomolecular que está sendo aplicado na detecção da SWB é a amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA). Essa técnica permite a quantificação do número de cópias de segmentos de interesse, podendo ser estudados mais de 40 sondas específicas por ensaio. Diferentemente da FISH, a MLPA é uma técnica relativamente simples, de baixo-custo, rápida e de alta acurácia nas estimativas do número de cópias e extensão das deleções. Assim, ela é capaz de detectar deleções e duplicações pequenas e os relativos pontos de quebra da alteração cromossômica, fornecendo um mapeamento mais preciso desta.

A hibridização genômica comparativa em *array* (aCGH) é abrangente método de diagnóstico citomolecular, capaz de avaliar todo o genoma de uma vez. Porém, seu custo ainda muito alto não o torna a técnica mais indicada para diagnóstico de todos os casos de SWB. Em pacientes com aspectos clínicos inconsistentes e/ou deleções atípicas em outros cromossomos, a aCGH apresenta grandes vantagens. Ainda é importante ressaltar que a abordagem de todo o genoma para diagnóstico clínico pode fornecer dados difíceis de serem interpretados e sem relevância clínica estabelecida, podendo necessitar de confirmação posterior através de métodos menos abrangentes como cariótipo e FISH.

Levando em consideração a relação de custo-benefício, a instrumentação necessária e a quantidade de informação oferecida pelo método diagnóstico, a MLPA mostrou ser a técnica citomolecular mais adequada para aplicar nos diversos pacientes com SWB. Tanto deleções típicas quanto atípicas são passíveis de serem identificadas pela técnica, inclusive com a estimativa da extensão da deleção, o que fornece informações cruciais para o melhor entendimento da relação genótipo-fenótipo dos indivíduos com SWB.

Assim, os pacientes com suspeita de SWB devem ser encaminhados, primeiramente, à cariotipagem em que anomalias cromossômicas maiores podem ser identificadas, e subsequentemente, à técnica de MLPA para a confirmação do diagnóstico clínico e obtenção de informações acerca da deleção, permitindo estudos de correlação genótipo-fenótipo posteriores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AXELSSON, S., BJORNLAND, T., KJAER, I., HEIBERG, A., STORHAUG, K. **Dental characteristics in Williams syndrome: a clinical and radiographic evaluation.** *Acta Odontol Scand*; vol. 61:129–36, 2003.

BEUREN, A.J., APITZ, J., HARMJANZ, D. **Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and certain facial appearance.** *Circulation*; vol. 26:1235– 40, 1962.

BRODER, K., REINHARDT, E., AHERN, J., LIFTON, R., TAMBORLANE, W., POBER, B. **Elevated ambulatory blood pressure in 20 subjects with Williams syndrome.** *Am J Med Genet* vol. 83:356– 60, 1999.

BRONDUM-NIELSEN, K.; BECK, B.; GYFTODIMOU, J.; HORLYK, H.; LILJENBERG, U.; PETERSEN, M.B.; PEDERSEN, W.; PETERSEN, N.B.; SAND, A.; SKOVBY, F.; STAFANGER, G.; ZETTERQVIST, P., TOMMERUP, N. **Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphisms.** *Hum. Genet.* 99, p. 56 – 61, 1997.

DAVIES, M.; UDWIN, O., HOWLIN, P. **Adults with Williams syndrome – preliminary study of social, emotional and behavioural difficulties.** *Br. J. Psychiatry*, 172, p. 273 – 276, 1998.

DUTRA, R.L., HONJO, R.S., KULIKOWSKI, L.D., FONSECA, F.M., PIERI, P.C., 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*, vol. 5:13, 2012.

EUN HAE CHO, M.D., BO YA NA PARK, M.S., JUNG HEE CHO, M.T., YOU SUN KANG, M.T. **Comparing Two Diagnostic Laboratory Tests for Several Microdeletions Causing Mental Retardation Syndromes: Multiplex Ligation-Dependent Amplification vs Fluorescent In Situ Hybridization.** *Korean J Lab Med*, vol. 29, p. 71-76, 2009.

FRANCKE, U. **Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms.** *Human Molecular Genetics*, vol. 8, no. 10 Review, p. 1947 – 1954, 1999.

HALLIDIE-SMITH, K.A., KARAS, S. **Cardiac anomalies in Williams-Beuren syndrome.** *Arch Dis Child*; vol. 63:809– 13, 1988.

HELLER, R., RAUCH, A., LÜTTGEN, S., SCHRÖDER, B., WINTERPACHT, A. **Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome.** *J Med Genet*, vol. 40, e99, 2003.

HONJO, R.S., DUTRA, R.L., NUNES, M.M., GOMY, I., KULIKOWSKI, L.D., JEHEE, F.S., KIM, C.A. **Atypical Deletion in Williams e Beuren Syndrome Critical Region Detected by MLPA in a Patient with Supravalvular Aortic Stenosis and Learning Difficulty.** *Letter to the Editor / Journal of Genetics and Genomics*, vol. 39, p. 571 – 574, 2012.

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

KRUSE, K., PANKAU, R., GOSCH, A., WOHLFAHRT, K. **Calcium metabolism in Williams-Beuren syndrome.** *J Pediatr*, vol. 121:902–7, 1992.

MORRIS, C.A., DEMSEY, S.A., LEONARD, C.O., DILTS, C., BLACKBURN, B.L. **Natural history of Williams syndrome: physical characteristics.** *J Pediatr*, vol. 113, p. 318– 326, 1988.

MORRIS, C.A., LEONARD, C.O., DILTS, C., DEMSEY, S.A. **Adults with Williams syndrome.** *Am J Med Genet Suppl* vol. 6, 1990.

PARTSCH, C.J.; DREYER, G.; GOSCH, A.; WINTER, M.; SCHNEPPENHEIM, R.; WESSEL, A. and PANKAU, R. **Longitudinal evaluation of growth, puberty, and bone maturation in children with Williams syndrome.** *J. Pediatr.* 134, p. 82 – 89, 1999.

PÉREZ-JURADO, L.A.; PEOPLES, R.; KAPLAN P.; HAMEL, B.C. and FRANCKE, U. **Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth.** *Am. J. Hum. Genet*, 59, p. 781 – 792, 1996.

POBER, B.R. **Williams-Beuren syndrome.** *N. Engl. J. Med.* p. 362-239, 2010.

SCHOUTEN, J.P, MCELGUNN, C.J., WAAIJER, R., ZWIJNENBURG, D., DIEPVENS, F., PALS, G. **Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 12, 2002.

SELLNER, L.N., TAYLOR, G.R. **MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions.** *Human Mutation* vol. 23, p. 413-419, 2004.

SHAFFER, L.G., BEJJANI, B.A. **A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays.** *Human Reproduction Update*, vol.10, no.3, p. 221-226, 2004.

SHAFFER, L.G., BEJJANI, B.A., TORCHIA, B., KIRKPATRICK, S., COPPINGER, J., BALLIF, B.C. **The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities:** cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *AmJ Med Genet Part C Semin Med Genet*, vol. 145C, p. 335–345, 2007.

SMOOT, L., ZHANG H., KLAIMANC, C.,SCHULTZ, R., POBER B. **Medical overview and genetics of Williams-Beuren syndrome.** *Progress in Pediatric Cardiology*, vol. 20, p. 195 – 205, 2005.

STROMME, P., BJORNSTAD, P.G., RAMSTAD, K. **Prevalence estimation of Williams syndrome.** *J Child Neurol*, vol. 17, p. 269–271, 2002.

WILLIAMS, J.C., BARRATT-BOYES, B.G., LOWE, J.B. **Supravalvular aortic stenosis.** *Circulation*; vol. 24, p. 1311– 1318, 1961.

WITHERS, S. **A new clinical sign in Williams syndrome.** *Arch. Dis. Child.*, vol. 75, p. 89, 1996.

WU, Y.Q.; SUTTON, V.R.; NICJERSON, E.; LUPSKI, J.R.; POTOCKI, L.; KORENBERG, J.R.; GREENBERG, F.; TASSABEHJI, M. and SHAFFER, L.G. **Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin.** *Am. J. Med. Genet.*, vol. 78, p. 82 – 89, 1998.

ZALZSTEIN, E., MOES, C.A., MUSEWE, N.N., FREEDOM, R.M. **Spectrum of cardiovascular anomalies in Williams-Beuren syndrome.** *PediatrCardiol*, vol. 12, p; 219– 223, 1991.