

BIANCA ARCARO TOPÁZIO

**ESTUDO GENÉTICO E CLÍNICO DA
SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN EM
PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO**

Salvador

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIODIVERSIDADE

ESTUDO GENÉTICO E CLÍNICO DA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN EM PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO

BIANCA ARCARO TOPÁZIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Mestre em Genética e Biodiversidade*.

ORIENTADORA: DRA. ACÁCIA FERNANDES LACERDA DE CARVALHO

Salvador
2016

Sistema de Bibliotecas da UFBA

Topázio, Bianca Arcaro.

Estudo genético e clínico da síndrome de Williams-Beuren em pacientes do Nordeste brasileiro / Bianca Arcaro Topázio. - 2016.

86 f.: il.

Inclui anexos.

Orientadora: Profª. Drª. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade

Diretora do Instituto de Biologia

Profª. Drª. Sueli Almuina Holmer Silva

Chefe do Departamento de Biologia

Profª. Drª. Sueli Almuina Holmer Silva

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade

Profª. Drª. Moema Cortizo Bellintani

Universidade Federal da Bahia – Instituto de Biologia

Reitor: João Carlos Salles Pires da Silva

Vice-Reitor: Paulo César Miguez de Oliveira

Chefe de Gabinete: Suani Tavares Rubim de Pinho

Este trabalho foi desenvolvido nos seguintes locais:

Laboratório de Genética Humana e Mutagênese – Instituto de Biologia –
Universidade Federal da Bahia

Laboratório de Genética Humana - Hospital Universitário Prof. Edgar Santos –
Universidade Federal da Bahia

Ambulatório de Genética Geral - Hospital Universitário Prof. Edgar Santos -
Universidade Federal da Bahia

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho

Professora Adjunta

Disciplina de Genética

Instituto de Biologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA

COLABORADORES

Dr^a Angelina Xavier Acosta

Dr^a Erlane Marques Ribeiro

Dr^a Gabriela Gayer

Dr^a Maria Juliana Rodovalho

Profa. Dr^a Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima

BIANCA ARCARO TOPÁZIO

**Estudo Genético e Clínico da Síndrome de Williams-Beuren em Pacientes do
Nordeste Brasileiro**

Presidente da banca: Prof^a Dr^a Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho

Banca examinadora – Membros Titulares

Professora Doutora: Kiyoko Abe Sandes

Professora Doutora: Izolda Nunes Guimarães

Banca examinadora – Membros Suplentes

Professora Doutora: Maria Betânia Pereira Toralles

Professora Doutora: Lília Maria de Azevedo Moreira

Aprovada em: ____/____/____

*Aos pacientes com Síndrome de
Williams-Beuren e suas famílias.*

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho, pela orientação, incentivo, confiança e ensinamentos ao longo de mais uma jornada acadêmica juntas que culminou na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade da Universidade Federal da Bahia, seus professores e coordenadores, pelos aprendizados e desenvolvimento acadêmico.

A todos os pacientes e médicos geneticistas dos centros colaboradores que participaram desse estudo.

Ao amigos e colegas do Laboratório de Genética Humana e Mutagênese do Instituto de Biologia, pelas sessões científicas, amizade e companheirismo durante o desenvolvimento do trabalho. **Em especial, profa. Dra. Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima**, pelo apoio durante o trabalho, **e os amigos Jéssica Fernandes e Pedro Rocha**, pela constante ajuda na realização das técnicas.

Aos amigos da Citogenética do Laboratório DNA, pelo apoio nesta reta final.

Aos integrantes do Laboratório de Genética Humana do COM-HUPES, pelo auxílio na busca de pacientes e disponibilidade para análise e captura das imagens da FISH.

Ao Laboratório de Citogenômica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e ao suporte técnico-científico da MRC-Holland e Citogem, pelo treinamento e suporte na implantação da técnica de MLPA.

À Dra. Taisa Manuela Bonfim Machado Lopes e à MSc. Silvana Sousa da Paz, pela colaboração nas corridas de eletroforese capilar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram comigo na realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Giovanina Maria Arcaro e Antônio Sérgio Topázio, meus exemplos de vida, por todo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas, por me ensinarem a ter garra e sempre lutar pelos meus objetivos e sonhos com perseverança e honestidade. Devo tudo a vocês!

Aos meus amigos-irmãos, Brisa Mascarenhas, Lucas Sá Teles, Rafael Santiago e Cássia Marques, por todo carinho, dedicação, incentivo em todos os bons e maus momentos.

Ao meu namorado, Danilo Meirelles, pelo amor, companheirismo, paciência e compreensão nos momentos de dificuldades e incertezas, e por me incentivar a realizar todos os meus objetivos.

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema da região crítica da síndrome de Williams-Beuren (7q11.23). Fonte: POBER, 2010 – adaptado.----- 7
- Figura 2 - Ilustração do desalinhamento da WBSCR e suas possíveis consequências. Fonte: Pober, 2010 – adaptado.----- 8
- Figura 3 - Esquema da sonda da FISH específica para SWB (Cytocell Aquarius – cat. No. LPU 011). Sinal verde: sonda de referência marcando centrômero do cromossomo 7; sinal vermelho: sonda de interesse na região 7q11.23. Fonte: Catálogo 2012/2013 de sondas Cytocell.----- 19
- Figura 4 - Localização das sondas e seus genes correspondentes na região 7q11.23 do kit SALSA MLPA *probemix* P029-B1 *Williams-Beuren Syndrome*. ----- 20
- Figura 5 - FISH em metáfases dos pacientes 18 e 09 evidenciando, respectivamente, duas cópias da WBSCR e uma única cópia, configurando uma microdeleção. Sinal vermelho: WBSCR em 7q11.23; sinal verde: referência. ----- 22
- Figura 6 - Gráfico do resultado de MLPA do paciente 11 gerado pelo *software Coffalyser.Net*, evidenciando a perda de uma cópia dos genes detectados pelas sondas na WBSCR do kit P029-B1, confirmando a deleção típica da SWB. As sondas dos genes *POR* e *HSPB1*, não deletadas neste paciente, se localizam no *duplicons* mais telomérico à WBSCR, não pertencendo a deleção típica da SWB. ----- 23
- Figura 7 - Pacientes com diagnóstico de SWB confirmado por FISH e MLPA. Observar sinais clínicos da SWB como: testa larga, bochechas cheias, ponta nasal bulbosa, boca grande com sorriso largo e dentes pequenos e espaçados. ----- 23
- Figura 8 - Gráfico do resultado de MLPA da paciente 18 gerado pelo *software Coffalyser.Net*, evidenciando duas cópias de todas as regiões detectadas pelas sondas do kit P029-B1, confirmando a ausência de alterações de número de cópias na WBSCR. - 24

Figura 9 - Gráfico do resultado de MLPA do paciente 17 gerado pelo software Coffalyser.Net, evidenciando três cópias dos genes identificados por todas as sondas de interesse do kit P029-B1, confirmando a duplicação atípica da WBSCR. ----- 24

Figura 10 - Pacientes sem diagnóstico conclusivo para SWB. Observar sinais clínicos característicos da SWB mais sutis. ----- 25

Figura 11 - Paciente 17 com duplicação atípica de 7q11.23. Observar fissuras palpebrais curtas e filtro curto (característico da duplicação de 7q11.23) e volume periorbital e boca grande (característico da SWB).----- 26

Figura 12 - Fotos das pacientes 1 e 10 (filha e mãe) com diagnóstico confirmado para SWB familiar. Observar características faciais típicas da SWB em ambas (plenitude periorbital, ponta nasal bulbosa, bochechas cheias, filtro longo, boca grande, lábios grandes e proeminentes, dentes pequenos e espaçados).----- 27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Caracterização clínica dos pacientes com SWB confirmada pela FISH e MLPA.

----- 28

Quadro 2 – Caracterização clínica dos pacientes não diagnosticados para SWB. ----- 30

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Ficha de avaliação clínica -----	47
Anexo 2 – Protocolo para diagnóstico clínico da Síndrome de Williams-Beuren -----	53
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes - Rede IGDM) -----	55
Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Novos pacientes) -----	58
Anexo 5 – Lista de sondas do kit SALSA MLPA <i>probemix</i> P029-B1 – <i>Williams-Beuren Syndrome</i> -----	62
Anexo 6 – Parecer Comitê de Ética (Rede IGDM) -----	63
Anexo 7 – Parecer Comitê de Ética (novos pacientes) -----	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCGH: Hibridação Genômica Comparativa por *array* (*array-based Comparative Genomic Hybridization*)

ADNPM: Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor

APAE: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais

BAC: Cromossomo artificial de bactéria (*Bacterial Artificial Chromosome*)

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLDN4: gene *Claudin 4* (OMIM *602909)

CLIP2: gene *Cap-gly- domain-containing Linker Protein 2* (OMIM *603432)

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂: Dióxido de carbono, gás carbônico

COM-HUPES: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos

DI: Deficiência intelectual

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

DP: Desvio-padrão

EASV: Estenose aórtica supra-avalvular

EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

ELN: gene *Elastin* (OMIM *130160)

FISH: Hibridização *In situ* por Fluorescência (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

FKBP6: gene *FK506-Binding protein 6* (OMIM *604839)

FZD9: gene *Frizzled Drosophila homolog 9* (OMIM *601766)

GTF2I: gene *General transcription factor II-I* (OMIM *601679)

GTF2IRD1: gene *GTF2I Repeat domain-containing protein 1* (OMIM *604318)

HSPB1: gene *Heat-shock 27-KD protein 1* (OMIM *602195)

IBIO: Instituto de Biologia

ICS: Instituto de Ciências da Saúde

IGDM: Investigação Genética da Deficiência Mental

ISCN: Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*)

Kb: Kilobase

KCl: Cloreto de Potássio

LCR: Repetição de cópias de poucas bases (*Low Copy Repeats*)

LGHM: Laboratório de Genética Humana e Mutagênese

LIMK1: gene *LIM Domain Kinase 1* (OMIM *601329)

M: Molar

MAPH: Hibridização de Múltiplas Sondas Amplificáveis (*Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation*)

Mb: Megabase

mL: Mililitro

MLPA: Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

MRI: Imagem de ressonância magnética (*Magnetic Resonance Imaging*)

NAHR: Recombinação Homóloga Não-alélica (*Non Allelic Homologous Recombination*)

NCF1: gene *Neutrophil cytosolic factor 1* (OMIM *608512)

ng: Nanograma

OMIM: Herança Mendeliana em Humanos Online (*Online Mendelian Inheritance in Men*)

pb: Par de base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

POR: gene *Cytochrome p450 oxidoreductase* (OMIM *124015)

q: braço longo do cromossomo

QI: Quociente de inteligência

RFC2: gene *Replication factor C, subunit 2* (OMIM *600404)

rpm: Rotação por minuto

RPMI: meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

STX1A: gene *Syntaxin 1* (OMIM *186590)

SWB: Síndrome de Williams-Beuren (OMIM #194050)

TBL2: gene *Transducin-beta-like 2* (OMIM *605842)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFBA: Universidade Federal da Bahia

WBSCR: Região cromossômica da síndrome de Williams-Beuren

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
1 A Síndrome de Williams-Beuren	5
2 Caracterização genética da Síndrome de Williams-Beuren	7
2.1 Contribuições fenotípicas dos genes envolvidos na região crítica da Síndrome de Williams-Beuren	9
3 Estudo citogenômico da Síndrome de Williams-Beuren	11
OBJETIVOS	14
1 Geral	15
2 Específicos	15
MATERIAIS E MÉTODOS	16
1 Casuística	17
2 Metodologia	17
2.1 Citogenética clássica	18
2.2 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	18
2.3 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	19
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	46

RESUMO

Introdução: A Síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma doença de etiologia genética, causada pela microdeleção da região 7q11.23. As principais características clínicas da síndrome são dismorfologias faciais típicas, deficiência intelectual, cardiopatia congênita e personalidade amigável. A Hibridação *In Situ* por Fluorescência (FISH) é uma importante ferramenta no diagnóstico de pacientes com SWB, sendo considerada a técnica “padrão ouro”, porém é limitada por sua resolução, não identificando deleções atípicas e duplicações. A *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) surge, então, como uma alternativa à FISH sendo uma técnica mais informativa que permite a caracterização detalhada da região deletada. **Objetivos:** O presente estudo teve como objetivo principal identificar e caracterizar alterações genômicas na região crítica da SWB não diagnosticadas pela FISH. **Casuística:** Foram estudados 24 pacientes da rede pública de saúde do Nordeste Brasileiro que apresentavam cariótipo normal e suspeita / diagnóstico clínico da SWB. **Metodologia:** Foram realizadas as técnicas de FISH e MLPA e caracterização clínica dos pacientes. **Resultados:** O presente trabalho confirmou o diagnóstico clínico para SWB de 16/24 (66,7%) pacientes estudados. A MLPA confirmou todas as 16 deleções identificadas pela FISH, além de caracterizá-las como deleções típicas da região crítica da SWB. Nos demais 8 pacientes que apresentavam FISH normal, a MLPA confirmou a ausência de alterações citogenômicas em 7 deles, e identificou uma duplicação atípica da região crítica da SWB em um paciente, contrariando o diagnóstico clínico. Além disso, foi identificado um caso SWB familiar entre mãe e filha, raramente encontrado na SWB. **Conclusões:** A avaliação genética nesse estudo permitiu confirmar a SWB na maioria dos pacientes estudados. Ambas as metodologias da FISH e MLPA são eficientes na confirmação diagnóstica da SWB. No entanto, somente a MLPA é capaz de caracterizar e identificar possíveis duplicações. O diagnóstico genético de pacientes com suspeita clínica de SWB é de grande importância para o prognóstico dos pacientes, esclarecimentos aos familiares e realização de aconselhamento genético preciso para estas famílias.

Palavras-chave: síndrome de Williams-Beuren; citogenômica; MLPA; FISH; microdeleções,

ABSTRACT

Introduction: Williams-Beuren syndrome (WBS) is a genetic etiology disease caused by microdeletion of 7q11.23 region. The main clinical features of the syndrome are typical facial dysmorphism, intellectual disability, congenital heart disease and friendly personality. The Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) is an important tool in the diagnosis of patients with WBS, considered the technique "gold standard", but is limited by its resolution, not identifying atypical deletions and duplications. The Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) arises, then, as an alternative to FISH, a more informative technique that allows detailed characterization of the deleted region. **Objectives:** This study aimed to identify and characterize genomic alterations in the critical region of WBS not diagnosed by FISH. **Patients:** We studied 24 patients in the public health of the Brazilian Northeast with normal karyotype and suspected / clinical diagnosis of WBS. **Methodology:** We performed the techniques of FISH and MLPA and clinical characterization of patients. **Results:** This study confirmed the clinical diagnosis for WBS in 16/24 (66.7%) patients. The MLPA has confirmed all 16 deletions identified by FISH, and characterize them as typical deletions of critical region of WBS. In the remaining 8 patients with normal FISH, the MLPA confirmed the absence of changes in 7q11.23 in 7 of them, and identified an atypical duplication of the critical region of the WBS in one patient, contrary to the clinical diagnosis. In addition, it identified a case of WBS familial between mother and daughter, rarely found in WBS. **Conclusions:** The genetic evaluation in this study confirmed the WBS in most patients. Both methods of FISH and MLPA are effective in diagnostic confirmation of WBS. However, only the MLPA is able to characterize and identify possible duplications. Genetic diagnosis of patients with clinical suspicion of WBS is of great importance for the prognosis of patients, explanations to family and making an accurate genetic counseling for these families.

Keywords: Williams-Beuren syndrome; cytogenomics; MLPA; FISH; microdeletions.

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Williams-Beuren (SWB) (OMIM #194050) é causada por microdeleção de aproximadamente 1,5 Mb na região 7q11.23 no cromossomo 7 de origem materna ou paterna, envolvendo cerca de 20 genes (Pober, 2010; Honjo et al., 2012). A hemizigiosidade desses genes causa um quadro clínico característico da síndrome, facilmente identificado por sinais faciais típicos como volume periorbital, ponte nasal plana, boca grande e lábios grossos, além de personalidade amigável, deficiência intelectual (DI) leve a moderada, anomalias cardiovasculares congênitas e hipersensibilidade ao som (Pober, 2010; Euteneuer et al., 2014). Apesar da fácil identificação desses sinais, a confirmação genética do diagnóstico clínico nem sempre ocorre.

Em geral, esses pacientes são encaminhados aos ambulatórios de genética médica devido à DI idiopática, muitas vezes acompanhada por alguma cardiopatia congênita. No entanto, apresentam cariótipo normal necessitando, por se tratar de uma síndrome de microdeleção, de estudos citomoleculares para o diagnóstico efetivo.

Existem diferentes técnicas citomoleculares que podem ser utilizadas no diagnóstico genético da SWB. A Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH) e a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) são técnicas eficazes na detecção da microdeleção em 7q11.23 característica da SWB (Dutra et al., 2012) e devem ser aplicadas para a confirmação do diagnóstico clínico da síndrome e estudo citomolecular mais detalhado da microdeleção.

O presente estudo dá continuidade a uma pesquisa anterior realizada pela Rede de Investigação Genética de Deficiência Mental (Rede IGDM – CNPq – Edital MCT/CNPq/CT-SAÚDE N°57/2010) entre 2011 e 2014, na qual pacientes com suspeita clínica de SWB foram atendidos, todos com cariótipo normal. Cerca de 58% destes pacientes tiveram o diagnóstico de SWB confirmado pela FISH, no entanto, 42% destes permaneceram sem conclusão. Acredita-se que, nesses pacientes, outras alterações genômicas em 7q11.23, não detectáveis pela FISH, possam estar presentes.

Assim, o objetivo principal dessa pesquisa foi identificar e caracterizar alterações genômicas em 7q11.23 não diagnosticadas pela FISH nos pacientes com diagnóstico clínico da SWB atendidos na rede pública de saúde do Nordeste Brasileiro utilizando a técnica de MLPA.

O expressivo número de pacientes com suspeita de SWB atendidos em ambulatórios de genética de hospitais públicos, muitos dos quais ainda sem diagnóstico conclusivo para a SWB, destaca a importância desse estudo.

A utilização em instituições públicas de saúde de exames genéticos mais abrangentes e informativos como a MLPA pode permitir ampliar a taxa de diagnóstico genético da SWB além de caracterizar genomicamente a alteração envolvida. O diagnóstico preciso proporciona tratamento clínico multidisciplinar aos pacientes direcionado às peculiaridades da síndrome, além de oferecer informações de risco de recorrência para aconselhamento genético individualizado para cada família.

REVISÃO DE LITERATURA

1 A Síndrome de Williams-Beuren

A 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 (pb). A deleção pode ocorrer no cromossomo 7 herdado matematicamente ou patematicamente em igual proporção (Smoot et al., 2005; Pober, 2010). Na maioria dos casos, a deleção ocorre esporadicamente, porém há relatos de famílias com herança autossômica dominante para a síndrome (Cortada et al., 1980; Sadler et al., 1993; Morris et al., 1993; Smoot et al., 2005; Pober, 2010; Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012).

A SWB é caracterizada, principalmente, por aspectos faciais distintos, baixa estatura com déficit de crescimento, hipotonia, DI, comportamento amigável e hiper-social, doença cardíaca congênita com prevalência da estenose aórtica supra-avalvular (EASV) e hipercalcemia infantil (Smoot et al., 2005; Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012; Euteneuer et al., 2014).

Os pacientes com esta síndrome também podem apresentar outras manifestações clínicas variáveis em rins, olhos, sistemas gastrointestinal e osteoarticular. Alguns problemas médicos adicionais complicam o quadro da SWB, tais como dificuldades de alimentação, cólicas, irritabilidade e anomalias dentais (Smoot et al., 2005; Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012).

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, ponte nasal plana, nariz pequeno e 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).

A EASV é um importante sinal clínico para a suspeita da SWB, porém esse não é um sinal único da SWB e, portanto, não deve ser considerado patognomônico. A ausência de EASV ou outras doenças cardíacas congênitas não exclui o diagnóstico de SWB (Honjo et al., 2014).

Todos os pacientes com SWB têm DI, com grau variando de leve a moderado, com um quociente de inteligência (QI) médio de 50 – 60. Porém, 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 (Mervis et al., 2000; Pober, 2010).

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 pode ser devido a 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 et al., 2002; Heller et al., 2003; Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012).

A depender dos genes envolvidos na deleção, o fenótipo dos pacientes com SWB pode variar de um único sinal clínico à expressão completa das características de SWB (Pober, 2010; Honjo et al., 2012). 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). Devido a essa grande variabilidade fenotípica, a SWB é um excelente modelo para estudos de correlação genótipo-fenótipo (Pober, 2010; Honjo et al., 2012).

2 Caracterização genética da Síndrome de Williams-Beuren

A região crítica da SWB (WBSCR) foi mapeado em 7q11.23 e contém o gene da elastina (*ELN*), bem como outros genes adjacentes (Figura 1).

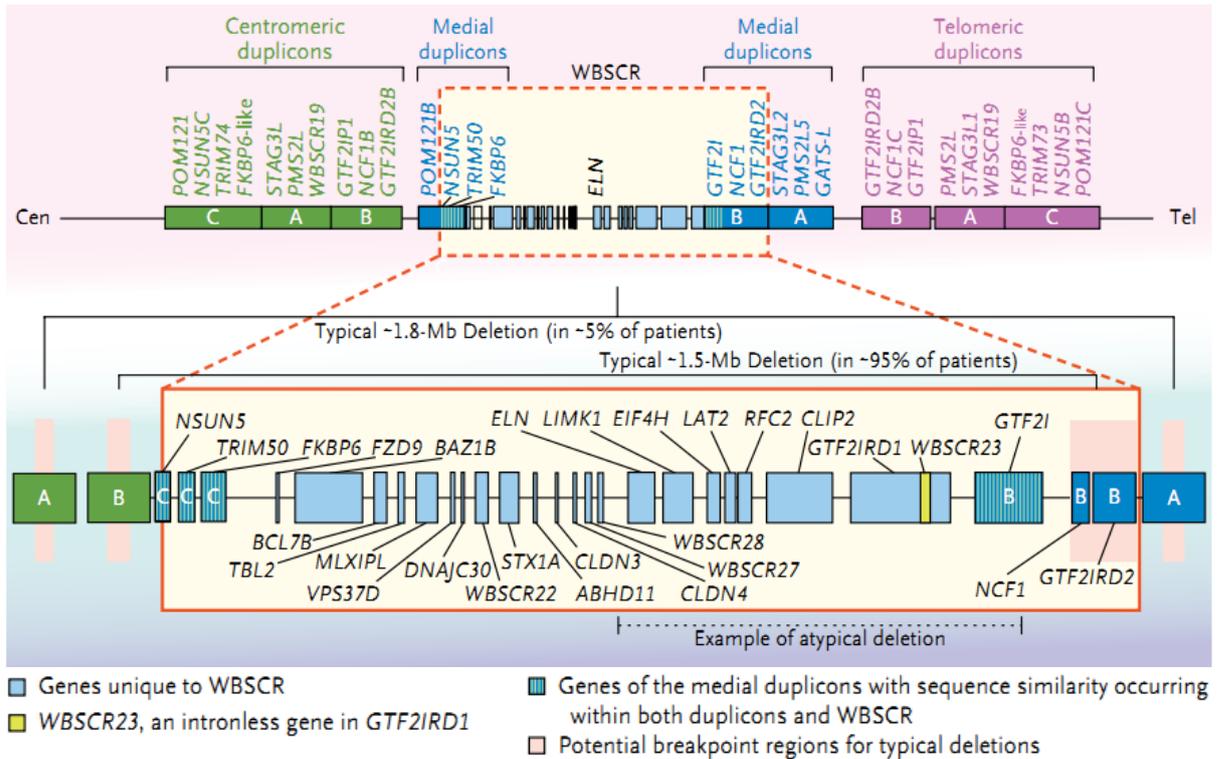


Figura 1 – Esquema da região crítica da síndrome de Williams-Beuren (7q11.23). Fonte: POBER, 2010 – adaptado.

A microdeleção do cromossomo 7 envolvida na SWB ocorre devido a arquitetura genética única dessa região. 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 cópias de poucas bases (LCR's) conhecidos como *duplicons*. O alto grau de homologia entre esses *duplicons* flanqueadores, bem como a proximidade entre eles, 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. Sendo assim, a recombinação homóloga não-alélica (NAHR) entres os *duplicons* é o principal mecanismo de origem da SWB (Lupski, 1998; Heller et al., 2003; Pober, 2010; Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012).

Assim como em outras desordens causadas por NAHR, os *duplicons* que flanqueiam a região cromossômica da SWB também predispõem a região a outras mudanças genéticas, tais como duplicações e inversões (Figura 2) (Lupski and Stankiewicz, 2005; Pober, 2010). Pacientes com duplicações da região cromossômica da

SWB não se assemelham, nem fisicamente, nem cognitivamente, aos pacientes com SWB. Já a 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).



Figura 2 - Ilustração do desalinhamento da WBS CR e suas possíveis consequências. Fonte: Pober, 2010 – adaptado.

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 (Figura 1). A maioria das quebras ocorre em *duplicons* médios ou centroméricos e leva a uma deleção de aproximadamente 1,5 Mb, envolvendo de 26 a 28 genes. Com menor frequência, uma deleção ligeiramente maior, de 1,8 Mb, abrangendo cerca de 28 genes pode ocorrer. A microdeleção típica mais comum, com cerca de 1,5 Mb, é encontrada em 90 a 95% dos pacientes (Heller et al., 2003; Smoot et al., 2005; Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012). No entanto, nenhuma diferença fenotípica, além do risco de hipertensão, tem sido notada entre pacientes que têm deleções típicas de ambos os tamanhos (Pober, 2010; Dutra et al., 2012), derrubando a hipótese que a diferença no tamanho das deleções típicas poderia explicar a variabilidade fenotípica dos pacientes com SWB.

Cerca de 2% dos pacientes têm deleções atípicas na WBS CR, ou seja apresentam deleções menores que 1,5 Mb ou maiores que 1,8 Mb, e frequentemente demonstram manifestações clínicas atípicas (Bayés et al., 2003; Dutra et al., 2012; Honjo et al., 2014).

Essas deleções atípicas 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).

2.1 Contribuições fenotípicas dos genes envolvidos na região crítica da Síndrome de Williams-Beuren

Embora pelo menos 21 genes tenham sido identificados na deleção da SWB (Figura 1), suas contribuições individuais para as características dos pacientes ainda não estão completamente estabelecidas. Até agora, apenas a deleção do gene da elastina (*ELN*) tem seu efeito bem esclarecido. Entretanto, a hemizigiosidade do *ELN* é necessária, porém não suficiente para causar, sozinha, a SWB (Heller et al., 2003).

Foram propostas possíveis contribuições fenotípicas da hemizigiosidade de outros seis genes da região crítica da SWB (*LIMK1*, *CLIP2*, *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; Euteneuer et al., 2014). Até o momento, não há estudos que indiquem as contribuições dos outros genes envolvidos na deleção desta síndrome.

A quebra do *ELN* por translocação ou deleção parcial está firmemente associada à 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). Apesar da clara associação entre a hemizigiosidade do *ELN* e doenças cardíacas congênitas na SWB, pelo menos 15% dos pacientes com deleção em *ELN* não apresentam anomalias cardíacas. Fatores epigenéticos, como variações no número de cópias em outras regiões do genoma, podem ter papel importante na manifestação das cardiopatias associadas à SWB (Honjo et al., 2014).

A perda de uma cópia do gene *LIMK1*, vizinho ao *ELN*, 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, sendo

importante, porém, não suficiente na determinação do perfil cognitivo da SWB (Francke, 1999; Smoot et al., 2005; Pober, 2010; Honjo et al., 2012; Euteneuer et al., 2014).

Existe um consenso que os genes *CLIP2*, *GTF2IRD1* e *GTF2-I*, mais teloméricos da região crítica da SWB, são genes candidatos para a causa da DI e possivelmente outros aspectos da personalidade da SWB (Smoot et al., 2005).

O gene *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 (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. 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*, relacionados 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 hemizigiosidade destes dois genes em conjunto está associada com anomalias craniofaciais, déficit cognitivo e motor específicos da SWB (Smoot et al., 2005; Honjo et al., 2012; Euteneuer et al., 2014).

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 *CLIP2* 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 (Francke, 1999; Honjo et al., 2012).

Genes inclusos na WBSCR mais próximos ao centrômero também podem contribuir para o fenótipo dos pacientes afetados por essa síndrome, tal como o gene *STX1A*. A

hemizigossidade 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 à 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. 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). Além da expressão reduzida e possíveis efeitos de posição, outros fatores podem contribuir para o fenótipo da SWB, como variação genética em alelos não-deletados ou modificadores genéticos em outras posições do genoma (Euteneuer et al., 2014).

3 Estudo citogenômico da Síndrome de Williams-Beuren

A região mais comumente deletada na SWB, com aproximadamente 1,5 Mb de tamanho, está abaixo do limiar de detecção da técnica de citogenética clássica por bandamento GTG, 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 and Bejjani, 2004; Smoot et al., 2005). Assim, é importante a aplicação de técnicas citomoleculares para o diagnóstico e o estudo genético da SWB.

O método da FISH possibilita que sequências conhecidas do DNA sejam inseridas 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 (Shaffer and Bejjani, 2004). A FISH, envolvendo sondas específicas para a WBSCR, permite o diagnóstico da SWB ao mostrar a presença de apenas uma cópia dos genes desta região, ao invés de duas cópias. É considerada a técnica padrão para o diagnóstico citomolecular da SWB, com poder de detectar mais de 95% dos indivíduos com esta síndrome (Pober, 2010; Honjo et al., 2012).

Sabendo que mudanças no número de cópias de certas sequências específicas de cromossomos estão frequentemente envolvidas na causa ou predisposição a doenças humanas e síndromes, Schouten e colaboradores (2002) desenvolveram a técnica de MLPA, após perceber que pouquíssimas das técnicas de diagnóstico disponível na época

eram capazes de detectar deleções ou duplicações em um único éxon de um gene, especialmente quando pouca quantidade de DNA estava disponível. A MLPA se baseou na técnica de *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation* (MAPH) na qual já era possível amplificar 40 sondas específicas em uma única reação, utilizando um único par de *primers*, porém exigia imobilização do DNA e exaustivas lavagens das sondas não ligadas. Eles, então, desenvolveram a técnica de MLPA, capaz de amplificar diversas regiões do genoma, inclusive vários éxons de um mesmo gene, em uma reação única, sem a necessidade de imobilização do DNA nem de remover o excesso de sonda, utilizando amostras de DNA tão pequenas quanto 20 ng.

Assim, a MLPA é uma técnica de quantificação de número de cópias de DNA. A técnica é um ensaio múltiplo que utiliza até 50 sondas ao mesmo tempo, sendo cada uma correspondente a uma sequência de DNA diferente, para estimar o número de cópias relativas de cada sequência. Cada sonda no kit de MLPA tem um comprimento único e pode, portanto, ser facilmente identificada (Schouten et al., 2002).

Na MLPA, nenhuma amostra de DNA é amplificada durante a PCR, e sim as sondas que hibridizaram na amostra de DNA em estudo. Todas as sondas hibridizadas têm sequências terminais idênticas, permitindo amplificação de todas as sondas simultaneamente utilizando apenas um par de *primers*. O uso de um único par de *primers* de PCR para amplificar todas as sondas, torna o método muito robusto. Após a PCR, os produtos de amplificação são separados e quantificados por eletroforese capilar (Schouten et al., 2002).

A comparação de sinais de fluorescência, apresentados em um gráfico com picos por um *software* de análise dos resultados, entre o DNA teste e o 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; Kozłowski et al., 2008). Desde que foi desenvolvida, a técnica tem sido utilizada como método diagnóstico em muitas doenças envolvendo anomalias cromossômicas, incluindo a SWB (Dutra et al., 2012).

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 *FKBP6*, *FZD9*, *TBL2*, *STX1A*, *ELN*, *LIMK1*, *RFC2* e *CLIP2* da região

cromossômica da SWB. Além desses genes dentro da WBSCR, o kit de MLPA para SWB também permite detectar alterações nos genes *POR* e *HSPB1*, localizados no *duplicons* mais telomérico à WBSCR. Assim, a avaliação dos pacientes com suspeita de SWB com esse kit de MLPA possui uma abrangência maior da região deletada, inclusive permitindo sugerir o tamanho da deleção (Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1 Geral

Identificar e caracterizar alterações genômicas na região 7q11.23 em pacientes com suspeita clínica de SWB atendidos na rede pública de saúde do Nordeste Brasileiro utilizando a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).

2 Específicos

- Identificar alterações genômicas envolvidas na SWB não diagnosticadas pela FISH.
- Caracterizar as microalterações em 7q11.23 nos pacientes estudados.
- Aumentar a taxa de diagnóstico genético da SWB.
- Descrever clinicamente os pacientes com diagnóstico genético da SWB.
- Comparar a sensibilidade da FISH e da MLPA no diagnóstico da SWB.
- Implantar a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) na Universidade Federal da Bahia para atender os pacientes da rede pública de saúde da região Nordeste do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 Casuística

A casuística deste trabalho constitui-se de pacientes com diagnóstico clínico para SWB e cariótipo normal atendidos em ambulatórios de genética médica de instituições públicas de saúde do Nordeste do Brasil.

O presente estudo dá continuidade a uma pesquisa anteriormente realizada pela Rede de Investigação Genética de Deficiência Mental (Rede IGDM – CNPq – Edital MCT/CNPq/CT- SAÚDE N°57/2010) realizada entre 2011 a 2014. A Rede IGDM atendeu 24 (vinte e quatro) pacientes com suspeita de SWB e cariótipo normal. Aproximadamente 58% destes pacientes confirmaram a suspeita da SWB através da FISH, porém 42% não obtiveram essa confirmação.

Utilizamos neste estudo, pacientes oriundos da pesquisa Rede IGDM (cadastro CEP 13/11) e novos pacientes admitidos ao estudo através da pesquisa “Alterações Citogenômicas em Pacientes com Anomalias Congênitas” (CEP COM-HUPES parecer 993.246) a partir de março de 2015.

Os centros ambulatoriais em parceria com este trabalho são o Ambulatório de Genética Médica do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES/UFBA – Salvador/BA), o Hospital Infantil Albert Sabin (Fortaleza/CE) e a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE - São Luiz/MA).

2 Metodologia

A pesquisa iniciou-se com a triagem clínica, onde o médico geneticista avaliou as características clínicas gerais do paciente, através de ficha de avaliação clínica (Anexo 1). Uma vez estabelecida a suspeita para a SWB, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexos 3 e 4) aos responsáveis pelos pacientes que concordaram em participar do estudo. Após a assinatura do TCLE foram coletados dados clínicos específicos para SWB através do Protocolo para Diagnóstico Clínico da Síndrome de Williams-Beuren (Anexo 2) e material biológico do paciente (5 mL de sangue periférico em heparina e 5 mL de sangue periférico em EDTA) para as análises laboratoriais.

Todos os pacientes dessa pesquisa realizaram cariotipagem com bandamento GTG, além das técnicas de FISH e MLPA.

Nos pacientes com FISH alterado, a MLPA foi realizada com o objetivo de caracterizar a deleção encontrada, identificando seu tamanho e os genes envolvidos. Já

nos pacientes com FISH normal, a MLPA foi realizada com o intuito de identificar alterações citogenômicas na região crítica da SWB não identificadas pela FISH que expliquem o quadro clínico dos pacientes, além de caracterizar a alteração.

Os testes de citogenética clássica, a FISH e a MLPA foram realizados no Laboratório de Genética Humana e Mutagênese (LGHM) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (IBIO/UFBA) com colaboração dos laboratórios de Genética Humana do COM-HUPES/UFBA e de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA).

2.1 Citogenética clássica

A citogenética clássica foi realizada a partir da cultura *in vitro* de linfócitos do sangue periférico coletado em heparina, seguindo a técnica de Moorhead et al. (1960).

Aproximadamente 0,5 mL de sangue total de cada amostra foi semeado em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1 mL de fito-hemaglutinina. A cultura foi mantida em incubadora à 37°C e 5% CO₂ por 72h, quando, então, foi aplicado 0,1 mL colchicina e após 45 minutos, realizado choque hipotônico com KCl 0,075M. O material foi fixado em metanol e ácido acético (3:1) e então montado em lâminas. As lâminas foram submetidas ao bandamento GTG (resolução 400-550 bandas) segundo modificação da técnica descrita por Yunis & Sanchez (1973). Foram analisadas 20 metáfases de cada paciente, sendo este número aumentado quando houve suspeita de mosaïcismo. O cariótipo foi determinado segundo as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética (ISCN) 2013.

2.2 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A FISH foi realizada nas lâminas das preparações cromossômicas de acordo com os métodos descritos por Pinkel et al. (1986). Foram utilizadas sondas comerciais Cytocell específicas para SWB (Figura 3) de acordo com o protocolo do fabricante. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência *Olympus* utilizando os filtros adequados às sondas utilizadas. Foram analisados 20 núcleos interfásicos e/ou metáfases para cada paciente.

A sonda utilizada no estudo abrange a WBSCR, envolvendo os genes *FZD9*, *TBL2*, *CLDN4*, *ELN*, *LIMK1*, *RFC2*, *CLIP2*, *GTF2IRD1*, *GTF2I* e *NCF1*, como mostrado na ilustração a seguir.

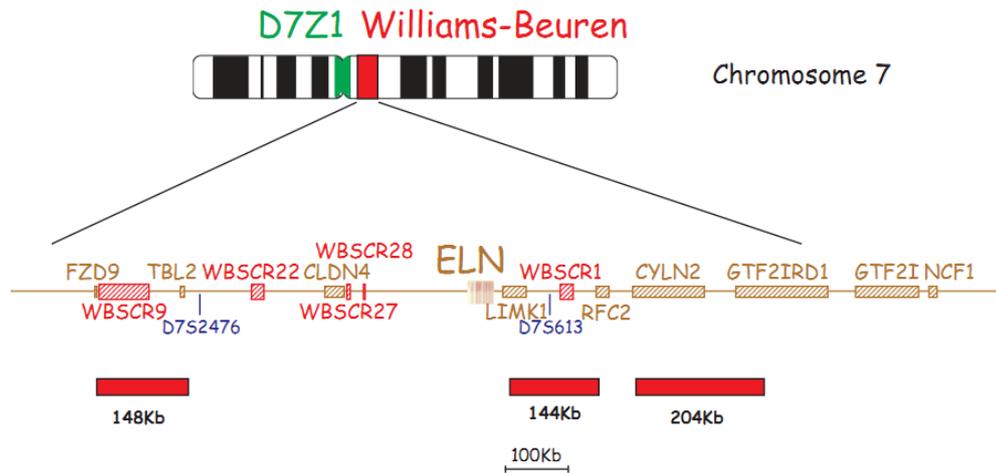


Figura 3 - Esquema da sonda de FISH específica para SWB (Cytocell Aquarius – cat. No. LPU 011). Sinal verde: sonda de referência marcando centrômero do cromossomo 7; sinal vermelho: sonda de interesse na região 7q11.23. Fonte: Catálogo 2012/2013 de sondas Cytocell.

2.3 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Extração de DNA genômico: o sangue em EDTA foi centrifugado a 2.000 rpm, durante 10 minutos, para separação total de hemácias e leucócitos, sendo que apenas a camada leucocitária foi utilizada no processo de extração de DNA. O material genético foi extraído com o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* da Promega segundo protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (BioDrop®) e armazenadas em freezer à -20°C.

O procedimento da MLPA envolve cinco etapas: (1) desnaturação; (2) hibridização das sondas ao DNA estudado, (3) ligação dos oligonucleotídeos que compõem as sondas, permitindo que elas emitam fluorescência; (4) amplificação por PCR e (5) separação dos produtos da PCR por eletroforese capilar. Os reagentes e enzimas necessários em todas as etapas da MLPA são vendidos comercialmente em um único kit de MLPA pela empresa MRC-Holland, juntamente com as sondas específicas.

Neste estudo, foi utilizado o kit de sondas da empresa MRC-Holland específico para a SWB (SALSA MLPA *probemix* P029-B1 *Williams-Beuren Syndrome* – Anexo 5) e as reações de MLPA foram realizadas segundo orientações do fabricante. Esse kit de sondas contém 10 sondas que detectam sequências no gene *ELN*; 15 sondas que detectam sequências fora do gene *ELN*, porém incluídas na região comumente deletada da SWB; e 5 sondas na região 7q11, fora da região típica. Além disso, 9 sondas de referência estão inclusas nesse kit, detectando diferentes outras regiões autossômicas (Figura 4).

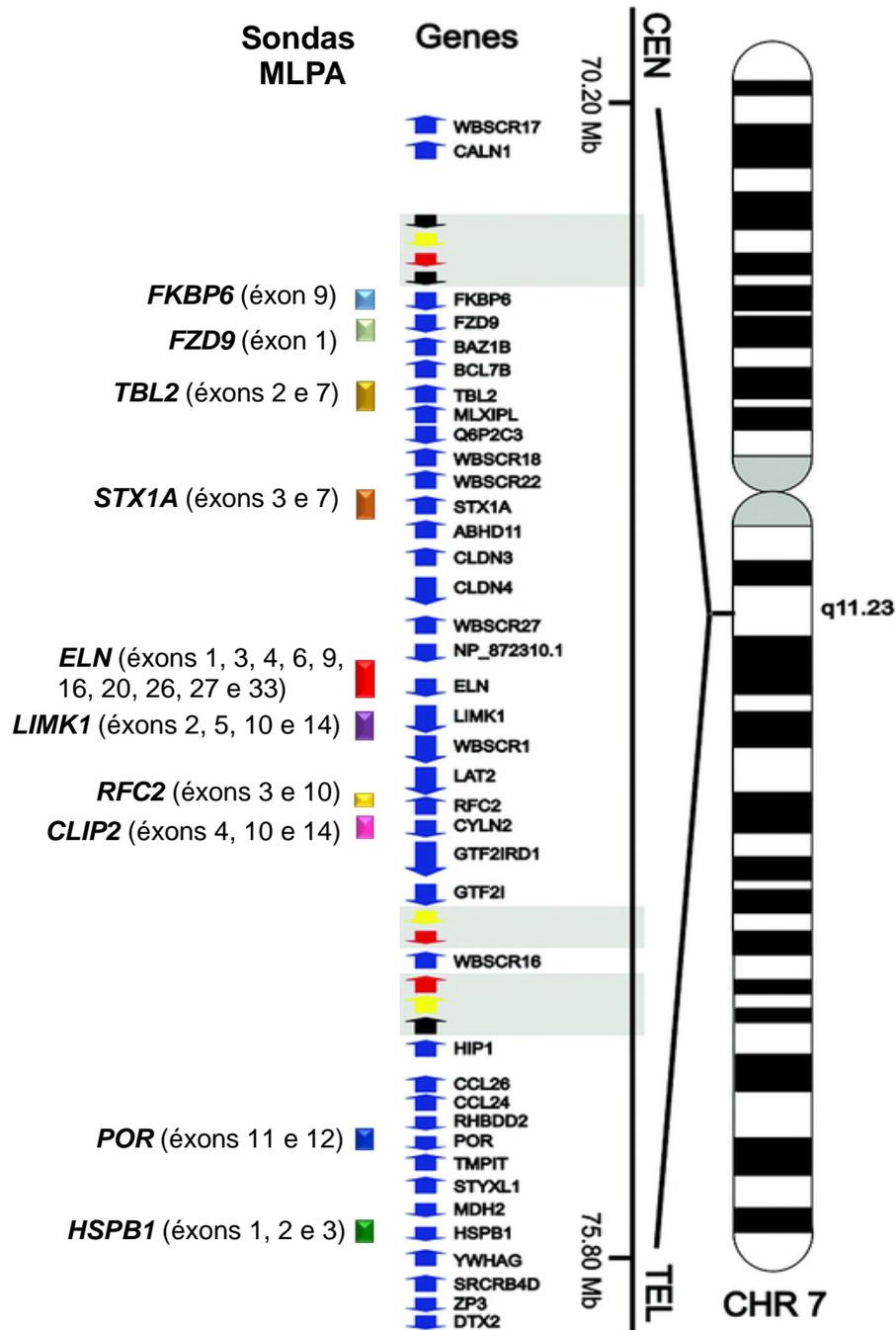


Figura 4 - Localização das sondas e seus genes correspondentes na região 7q11.23 do kit SALSA MLPA *probemix* P029-B1 *Williams-Beuren Syndrome*.

Os dados gerados foram analisados por meio do *software Coffalyser.Net* (MRC-Holland). A altura do pico de cada produto de amplificação reflete o número relativo de cópias de cada sequência-alvo. Assim, os resultados foram considerados alterados quando o tamanho do pico da amostra analisada foi menor do que 0,75 (deleção) ou maior do que 1,25 (duplicação) quando comparados aos de amostras normais. Por se tratar de um teste citogenômico comparativo, em todas as reações de MLPA foram utilizados pelo menos quatro controles normais.

RESULTADOS

RESULTADOS

O presente estudo constitui-se de 24 pacientes (13 do sexo feminino e 11 do sexo masculino) com suspeita e/ou diagnóstico clínico de SWB, sendo 17 pacientes atendidos durante a pesquisa da Rede IGDM e 7 pacientes novos. Estes pacientes foram oriundos dos centros ambulatoriais parceiros do estudo: 11 pacientes do Ambulatório de Genética Médica do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES/UFBA – Salvador/BA), 10 pacientes da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE - São Luiz/MA) e 3 pacientes do Hospital Infantil Albert Sabin (Fortaleza/CE).

A média de idade dos pacientes no momento do atendimento no ambulatório foi de 8,03 anos (DP \pm 7,81), com idade mínima de 1 ano e 2 meses e máxima de 40 anos.

Todos os pacientes apresentaram cariótipo normal. Quanto a técnica da FISH, 16 pacientes (66,7%) apresentaram FISH alterado, confirmando a hemizigosidade dos genes da WBSCR, e 8 (33,3%) demonstraram FISH normal, evidenciando as duas cópias dos genes desta região (Figura 5).

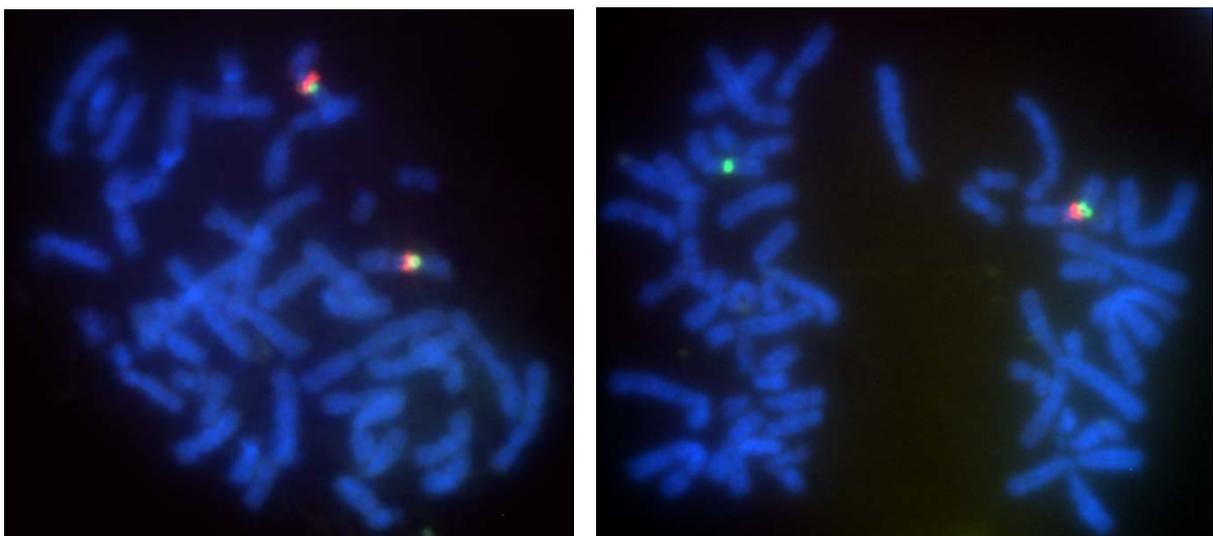


Figura 5 - FISH em metáfases dos pacientes 18 e 09 evidenciando, respectivamente, duas cópias da WBSCR e uma única cópia, configurando uma microdeleção. Sinal vermelho: WBSCR em 7q11.23; sinal verde: referência.

A MLPA foi realizada em todos os pacientes com FISH normal e FISH alterado. Dos 16 pacientes com FISH alterado para SWB, todos confirmaram a deleção através da MLPA, evidenciando apenas uma cópia dos genes *FKBP6*, *FZD9*, *TBL2*, *STX1A*, *ELN*, *LIMK1*, *RFC2* e *CLIP2*, todos dentro da WBSCR, configurando uma deleção típica da SWB (Figura 6). A caracterização clínica destes pacientes pode ser observada na Figura 7 e Quadro 1.

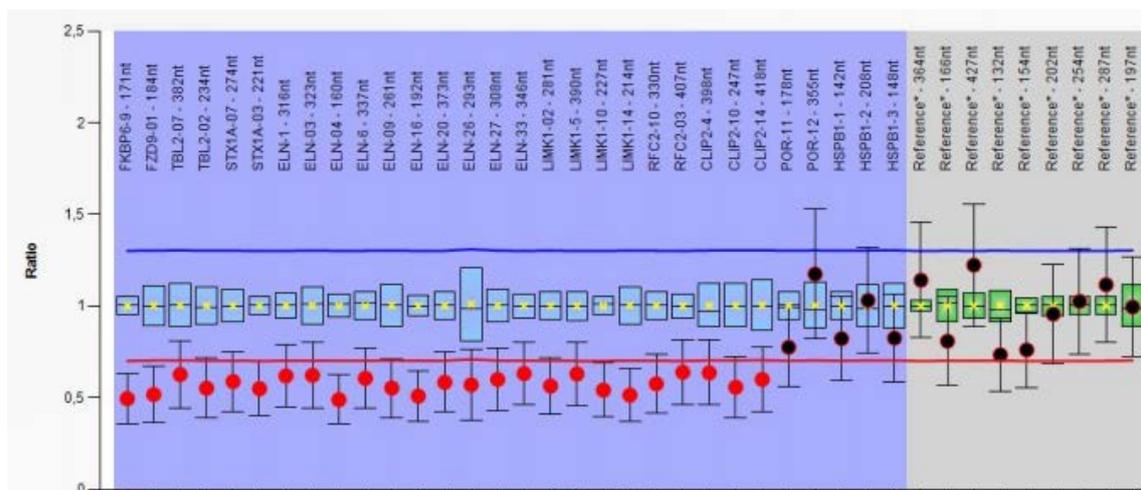


Figura 6 - Gráfico do resultado de MLPA do paciente 11 gerado pelo *software Coffalyser.Net*, evidenciando a perda de uma cópia dos genes detectados pelas sondas na WBSCR do kit P029-B1, confirmando a deleção típica da SWB. As sondas dos genes *POR* e *HSPB1*, não deletadas neste paciente, se localizam no *duplicons* mais telomérico à WBSCR, não pertencendo a deleção típica da SWB.



Figura 7 - Pacientes com diagnóstico de SWB confirmado por FISH e MLPA. Observar sinais clínicos da SWB como: testa larga, bochechas cheias, ponta nasal bulbosa, boca grande com sorriso largo e dentes pequenos e espaçados.

Entre os 8 pacientes com FISH normal para SWB, o resultado da MLPA demonstrou presença em duas cópias de todas as regiões cobertas pelas sondas do kit em 7 deles, confirmando a ausência de deleções na WBSCR (Figura 8). No entanto, o paciente 17 com

FISH normal para SWB apresentou uma duplicação da região WBSCR ao invés de uma deleção, um resultado inesperado para o estudo (Figura 9). A caracterização clínica destes pacientes pode ser observada na Figura 10 e Quadro 2.

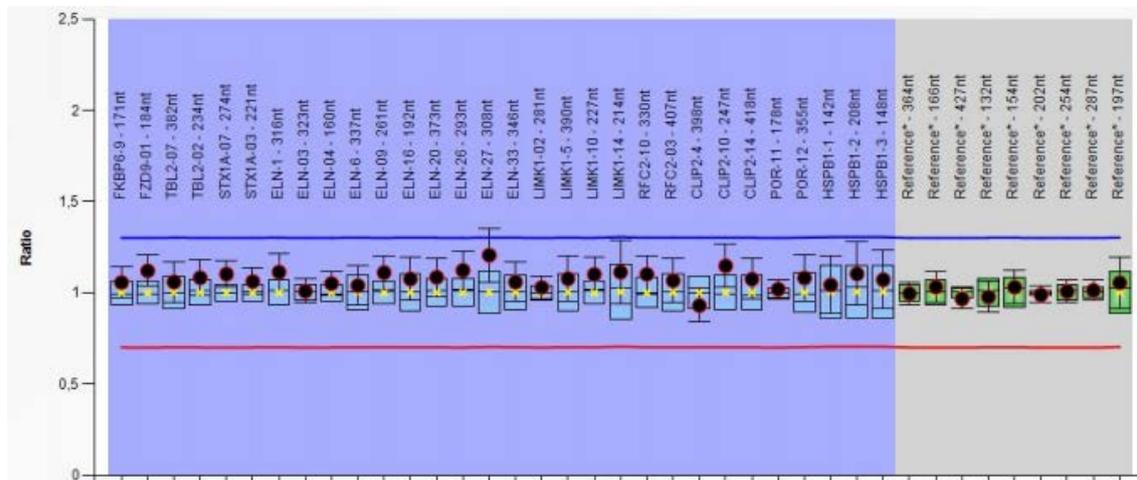


Figura 8 - Gráfico do resultado de MLPA da paciente 18 gerado pelo software *Coffalyser.Net*, evidenciando duas cópias de todas as regiões detectadas pelas sondas do kit P029-B1, confirmando a ausência de alterações de número de cópias na WBSCR.

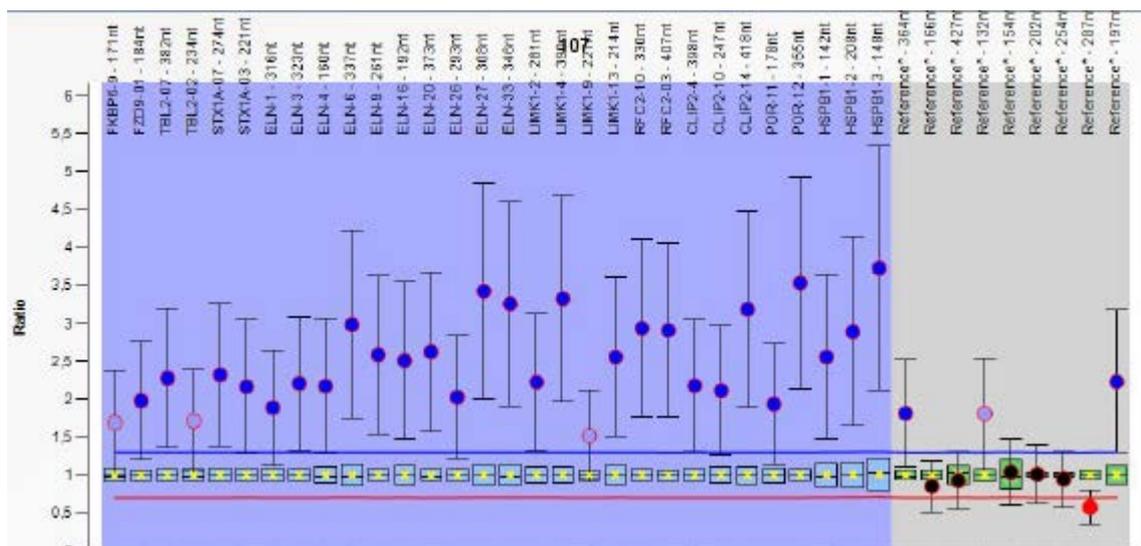


Figura 9 - Gráfico do resultado de MLPA do paciente 17 gerado pelo software *Coffalyser.Net*, evidenciando três cópias dos genes identificados por todas as sondas de interesse do kit P029-B1, confirmando a duplicação atípica da WBSCR.



Figura 10 - Pacientes sem diagnóstico conclusivo para SWB. Observar sinais clínicos característicos da SWB mais sutis.

O paciente portador da duplicação 7q (Figura 11), do sexo masculino, foi encaminhado ao ambulatório de genética médica pela mãe aos 11 anos e 2 meses devido atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) e DI. Foram relatados vômitos constantes; demora em sustentar a cabeça, sentar-se sozinho e no controle do esfíncter; afinidade com música e incômodo com sons altos. Além disso, o paciente apresentou diagnóstico de fobia e de esquizofrenia. Avaliação clínica detalhada mostrou olhos com volume periorbital, filtro curto, boca grande, mandíbula pequena e maloclusão, pescoço longo, clinodactilia discreta, liberdade excessiva das articulações, personalidade amigável, retardo na iniciação da fala, dificuldade de aprendizado e ecocardiograma normal. A análise do Protocolo para Diagnóstico Clínico para SWB (Anexo 2) deste paciente mostrou um escore de 4 pontos, considerado baixo, uma vez que o escore médio de pacientes com SWB é de 9 (DP \pm 2,86), porém indicativo para estudo por FISH (Committee on Genetics, 2001). O FISH mostrou-se negativo para a SWB, porém o MLPA evidenciou a duplicação atípica em 7q11.23.



Figura 11 - Paciente 17 com duplicação atípica de 7q11.23. Observar fissuras palpebrais curtas e filtro curto (característico da duplicação de 7q11.23) e volume periorbital e boca grande (característico da SWB).

Também foi observado neste estudo, um caso de SWB familiar que mostra uma transmissão vertical mãe-filha de uma deleção típica da SWB. A filha (paciente 1) foi encaminhada ao ambulatório de genética aos 5 anos e 9 meses de idade pela avó materna por apresentar ADNPM. Inicialmente, foi relatado comportamento de autoagressão, constipação crônica, dificuldade em reconhecer alfabeto e números escritos e histórico de otite. Avaliação clínica detalhada mostrou marcha atípica, discurso excessivo com comportamento amistoso e dismorfologias faciais como: epicanto, persistência de gordura periorbitária bilateral, íris estrelada, lábios grossos, dentes espaçados e maloclusão dentária. Ecocardiografia evidenciou estenose pulmonar e coarctação de aorta, ambos, leves.

Durante atendimento clínico da paciente, a avó materna relatou um quadro clínico semelhante na mãe da paciente (paciente 10) com: demora para andar, discurso excessivo, dificuldade escolar, discrepância entre aquisição verbal e motora, comportamento amistoso, agressividade com a mãe, sem medo de estranhos e incômodo com sons altos. Também é possível observar características faciais típicas da SWB na mãe da paciente, com grande semelhança entre as duas (Figura 12).



Figura 12 - Fotos das pacientes 1 e 10 (filha e mãe) com diagnóstico confirmado para SWB familiar. Observar características faciais típicas da SWB em ambas (plenitude periorbital, ponta nasal bulbosa, bochechas cheias, filtro longo, boca grande, lábios grandes e proeminentes, dentes pequenos e espaçados).

No presente estudo, 7/24 (29,2%) pacientes não obtiveram diagnóstico genético comprobatório para a SWB. O escore médio obtido na análise do Protocolo para Diagnóstico Clínico da SWB nesses pacientes foi de 4,85 pontos, considerado baixo para o diagnóstico da síndrome. No entanto, pacientes que obtêm escore ≥ 3 pontos são indicados ao estudo da SWB através da FISH (Committee on Genetics, 2001).

Quadro 1 - Caracterização clínica dos pacientes com SWB confirmada pela FISH e MLPA.

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Média / Frequência (%)
ESCORE*	12	7	9	7	12	3	4	5	3	NI	5	11	8	4	NI	7	6,92
IDADE	5a 9m	15a 6m	2a 3m	10a 9m	2a 2m	9a 6m	6a 6m	5a 4m	5a 6m	40a	6a 9m	4a 3m	1a 2m	9a 10m	10a 8m	4a 3m	09 a
SEXO	F	F	F	M	M	M	F	M	F	F	M	F	F	M	F	F	10 F / 6 M
FISH	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	
MLPA	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	
Crescimento																	
Retardo de crescimento	-	+	+	+	-	-	-	-	-	NI	+	+	+	+	+	+	09/15 (60,0)
Comportamento e desenvolvimento																	
Personalidade excessivamente amigável	+	+	+	+	NI	NI	+	+	+	+	+	+	NI	+	+	+	13/13 (100,0)
Hipersensibilidade ao som	+	+	+	+	+	NI	+	-	+	+	+	+	+	+	NI	+	13/14 (92,8)
Ansiedade	+	-	+	+	+	NI	+	-	+	NI	+	+	NI	+	NI	+	10/12 (83,3)
ADNPM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16/16 (100,0)
Atraso na iniciação da fala	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	NI	+	+	+	14/15 (93,3)
Aspectos faciais																	
Testa larga	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	NI	+	11/15 (73,3)
Plenitude periorbital	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	NI	+	NI	NI	12/13 (92,3)
Orelhas proeminentes	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NI	NI	+	NI	+	NI	+	06/12 (50,0)
Nariz curto ou anteversão das narinas	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	+	NI	13/14 (92,8)
Ponta nasal bulbosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NI	+	NI	NI	12/13 (92,3)
Bochechas cheias	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	+	NI	NI	12/13 (92,3)
Filtro longo	+	+	+	-	+	-	+	+	NI	+	+	+	+	NI	NI	+	11/13 (84,6)
Boca grande	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	NI	+	+	+	13/15 (86,6)

Continuação: **Quadro 1** – Caracterização clínica dos pacientes com SWB confirmada pela FISH e MLPA.

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Média / Frequência (%)
Lábios grossos e proeminentes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	15/16 (93,7)
Mandíbula pequena	+	+	+	-	+	NI	+	-	+	NI	+	-	NI	NI	NI	NI	07/10 (70,0)
Hipoplasia malar	+	+	+	+	+	NI	+	-	-	NI	+	+	NI	+	NI	NI	09/11 (81,8)
Dentes pequenos e bem espaçados	+	+	-	+	+	+	+	-	-	NI	+	+	NI	+	NI	+	10/13 (76,9)
Maloclusão	+	+	NI	-	+	+	+	-	-	NI	+	-	NI	+	NI	+	08/12 (66,7)
Problemas cardiovasculares																	
Estenose aórtica supravalvular	-	-	NI	-	-	NI	NI	+	NI	NI	NI	+	-	-	-	-	08/10 (80,0)
Estenose periférica de artéria pulmonar	+	-	NI	-	+	NI	NI	-	NI	NI	NI	-	+	-	-	-	
Outra doença cardíaca congênita	-	+	NI	+	-	NI	NI	-	NI	NI	NI	-	+	-	-	+	
Anormalidades do tecido conectivo																	
Voz rouca	+	+	+	+	NI	NI	NI	+	+	NI	NI	-	NI	+	NI	+	08/09 (88,9)
Pescoço longo ou ombros inclinados	+	+	+	+	+	+	NI	-	-	+	+	NI	-	NI	NI	+	09/12 (75,0)
TOTAL DE CARACTERÍSTICAS	20/24	20/24	18/20	18/24	18/22	13/15	15/19	12/24	13/24	09/13	18/19	17/23	9/11	17/20	07/10	16/18	

Legenda: a: anos; m: meses F: feminino; M: masculino; AL: alterado; NO: normal; DEL: deleção; +: presente; -: ausente; NI: não informado; ADNPM: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

* Escore obtido na análise do Protocolo para Diagnóstico Clínico da Síndrome de Williams-Beuren, baseado no *Committee on Genetics*, 2001.

Quadro 2 – Caracterização clínica dos pacientes não diagnosticados para SWB.

Pacientes	17*	18	19	20	21	22	23	24	Média / Frequência (%)
ESCORE**	4	8	NI	5	5	4	3	5	4,85
IDADE	11a 2m	11a 3m	5a 6m	6a	1a 7m	3a	11a 6m	2a 7m	07 a
SEXO	M	F	F	M	M	F	M	M	3 F / 5 M
FISH	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
MLPA	DUP	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
Crescimento									
Retardo de crescimento	+	+	NI	-	-	+	+	-	04/07 (57,1)
Comportamento e desenvolvimento									
Personalidade excessivamente amigável	+	+	+	-	-	NI	-	+	04/07 (57,1)
Hipersensibilidade ao som	+	+	+	-	+	NI	-	+	05/07 (71,4)
Ansiedade	+	+	NI	-	+	NI	+	-	04/06 (66,7)
ADNPM	+	+	+	+	+	+	+	+	08/08 (100,0)
Atraso na iniciação da fala	+	+	+	+	+	-	+	-	06/08 (75,0)
Aspectos faciais									
Testa larga	-	+	NI	+	+	+	-	+	05/07 (71,4)
Plenitude periorbital	+	+	+	-	+	+	-	+	06/08 (75,0)
Orelhas proeminentes	-	-	NI	+	-	+	-	-	02/07 (28,6)
Nariz curto ou anteversão das narinas	-	-	NI	+	+	+	+	+	05/07 (71,4)
Ponta nasal bulbosa	-	+	NI	+	+	+	-	+	05/07 (71,4)
Bochechas cheias	-	+	NI	-	+	+	+	+	05/07 (71,4)
Filtro longo	-	+	NI	+	-	+	-	NI	03/06 (50,0)
Boca grande	+	+	NI	+	-	-	-	+	04/07 (57,1)

Continuação: **Quadro 2** – Caracterização clínica dos pacientes não diagnosticados para SWB.

Pacientes	17*	18	19	20	21	22	23	24	Média / Frequência (%)
Lábios grossos e proeminentes	-	+	+	+	+	-	-	-	04/08 (50,0)
Mandíbula pequena	+	+	NI	-	+	NI	-	-	03/06 (50,0)
Hipoplasia malar	+	+	NI	-	-	NI	-	+	03/06 (50,0)
Dentes pequenos e bem espaçados	-	-	NI	-	+	+	-	+	03/07 (42,8)
Maloclusão	+	+	NI	-	-	NI	-	-	02/06 (33,3)
Problemas cardiovasculares									
Estenose aórtica supra-avalvular	-	NI	-	-	-	-	-	-	03/07 (42,8)
Estenose periférica de artéria pulmonar	-	NI	-	-	-	-	-	-	
Outra doença cardíaca congênita	-	NI	-	-	+	+	-	+	
Anormalidades do tecido conectivo									
Voz rouca	-	+	NI	NI	-	NI	-	-	01/05 (20,0)
Pescoço longo ou ombros inclinados	+	+	+	+	-	NI	-	-	04/07 (57,1)
TOTAL DE CARACTERÍSTICAS	12/24	18/21	07/10	10/23	13/24	11/16	6/24	12/23	

Legenda: a: anos; m: meses F: feminino; M: masculino; AL: alterado; NO: normal; DUP: duplicação; +: presente; -: ausente; NI: não informado; ADNPM: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

* Paciente com Síndrome da Duplicação 7q11.23.

** Escore obtido na análise do Protocolo para Diagnóstico Clínico da Síndrome de Williams-Beuren, baseado no *Committee on Genetics*, 2001.

DISCUSSÃO

O diagnóstico genético da SWB, causada, na maioria das vezes, por uma deleção de 1,5 a 1,8 Mb na região 7q11.23, depende do uso de técnicas citomoleculares, por se tratar de uma síndrome de microdeleção. Entretanto, 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.

No presente trabalho, a utilização conjunta das metodologias da FISH e MLPA permitiu confirmar o diagnóstico clínico da SWB em 16/24 (66,7%) dos pacientes estudados. Com isso, foi possível demonstrar não haver diferença quanto a sensibilidade das técnicas para o diagnóstico da SWB típica. Ambas permitiram identificar a deleção em todos os pacientes desse estudo, sendo que a MLPA possibilitou a caracterização da região envolvida na alteração, sendo, portanto mais informativa do que a FISH.

Além disso, a MLPA isoladamente permitiu identificar um paciente com Síndrome da Duplicação 7q11.23 não identificada pela FISH. A técnica da FISH tem limitações quando se trata de detectar duplicações, principalmente em tandem, o que explica a não evidência da duplicação da WBSCR no resultado deste paciente.

Os resultados de MLPA deste estudo mostraram uma concordância de 95,8% com os resultados da FISH. Salientando que o único paciente que apresentou resultados discordantes entre FISH e MLPA, na verdade não possui SWB, e sim, Síndrome da Duplicação 7q11.23. Esta alta concordância entre as técnicas já foi observada em outros estudos de pacientes com suspeita de SWB como em van Hagen et al. (2007) e Cho et al. (2009).

Todos os pacientes demonstraram a mesma deleção envolvendo os genes *FKBP6*, *FZD9*, *TBL2*, *STX1A*, *ELN*, *LIMK1*, *RFC2* e *CLIP2*, dentro da WBSCR, enquanto os genes *POR* e *HSPB1*, localizados em *duplicons* mais teloméricos à WBSCR não estavam deletados. Isso nos permite afirmar que estes pacientes apresentam deleções típicas da SWB.

Apesar da FISH ser capaz de detectar cerca de 95% dos casos de SWB (Poerber, 2010; Honjo et al., 2012), é uma técnica de intenso esforço laboratorial, demorada, e que não permite a detecção do tamanho da deleção (Sellner and Taylor, 2004; Dutra et al., 2012; Honjo et al., 2012). Além disso, tem como desvantagens práticas a incapacidade de

detectar pequenas deleções e duplicações e o fato de ser facilmente afetado pela qualidade das metáfases (Cho et al., 2009).

Ao contrário da FISH, a técnica de MLPA é menos demorada, uma vez que não necessita de cultivo celular, e é tão efetiva quanto a FISH na detecção da deleção na SWB, fornecendo um mapeamento mais preciso da WBSCR, além de ser capaz de identificar deleções pequenas e duplicações (Schouten et al., 2002; Kozłowski et al., 2008; Cho et al., 2009; Dutra et al., 2012).

O custo médio de cada teste de MLPA foi de R\$ 62,00 enquanto que na FISH esse custo foi de R\$ 115,00 (considerando-se apenas o preço dos kits), mostrando que a MLPA possui um melhor custo-benefício quando comparado a FISH. Assim, a técnica de MLPA mostra-se como uma alternativa mais informativa, mais barata e com o mesmo poder de detecção da deleção da SWB.

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, personalidade e caracteres faciais típicos. O diagnóstico da SWB baseia-se, primeiramente, no reconhecimento de achados clínicos característicos (Committee on Genetics, 2001).

O *Committee on Genetics* (2001) descreve um Protocolo para Diagnóstico Clínico da SWB (Anexo 2) no qual é indicado como suspeito para essa síndrome o paciente que possuir um escore médio de 9 pontos ($DP \pm 2,86$). Entre os pacientes deste estudo com diagnóstico genético confirmado, o escore médio foi de 6,92 pontos, dentro do desvio-padrão esperado, e todos apresentavam fenótipo bem característico da síndrome.

Entre os pacientes com SWB confirmados nessa pesquisa, as características comportamentais mais frequentes foram: personalidade excessivamente amigável (100%), ADNPM (100%), atraso na iniciação da fala (93,3%) e hipersensibilidade ao som (92,8%).

A literatura descreve uma frequência de 50 a 90% de ADNPM nos indivíduos com SWB (Sugayama et al., 2003; Pober, 2010; Morris, 2010) e para hipersensibilidade ao som uma incidência de 85 a 95% nestes pacientes (Sabbag, 2012).

A respeito dos sinais faciais característicos da SWB, os mais observados entre os pacientes com SWB confirmada foram: lábios grossos e proeminentes (93,7%), nariz curto ou anteversão das narinas (92,8%), plenitude periorbital (92,3%), ponta nasal bulbosa (92,3%), bochechas cheias (92,3%) e boca grande (86,6%).

Quanto aos problemas cardiovasculares, 80% dos pacientes com SWB confirmada apresentaram alguma cardiopatia, sendo 20% acometidos por EASV, 30% por estenose

periférica de artéria pulmonar e 30% por outras cardiopatias, como sopro cardíaco e forame oval patente. Essa frequência condiz com a literatura, cuja incidência é de 50 a 80% nos pacientes com SWB (Sugayama et al., 2003; Pober, 2010; Morris, 2010).

A SWB, em geral, é diagnosticada logo na infância, uma vez que as características de personalidade e neuro-comportamentais da síndrome são detectáveis cedo na vida destes pacientes (Francke, 1999). A média de idade ao atendimento dos pacientes com diagnóstico confirmado para SWB neste estudo foi de 6,53 anos ($DP \pm 8,92$), o que é compatível com o diagnóstico ainda na infância desta síndrome. Apenas uma paciente (paciente 10) teve seu diagnóstico para SWB na fase adulta, por volta dos 40 anos de idade, motivado pelo diagnóstico de sua filha (paciente 1), também com SWB.

Na grande maioria dos casos, a deleção da SWB ocorre de maneira esporádica, configurando uma deleção *de novo* (Smoot et al., 2005; Pober, 2010; Honjo et al., 2012; Dutra et al., 2012). Porém, a partir da década de 60, alguns relatos de gêmeos monozigóticos concordantes para a SWB começaram a surgir. Em 1993, Morris e colaboradores relataram pais e filhos afetados pela SWB, inclusive uma transmissão pai-filho, o que colocou a herança autossômica dominante como a causa mais provável da SWB familiar.

A duplicação atípica em 7q11.23, identificada no paciente 17 abrange uma região maior do que a normalmente deletada na SWB, envolvendo os genes *POR* e *HSPB1* em *duplicons* teloméricos. Este foi um resultado inusitado para o presente estudo, uma vez que paciente com duplicação 7q11.23 não se assemelham, nem fisicamente, nem cognitivamente, aos pacientes com SWB.

A Síndrome de Duplicação 7q11.23 (OMIM #609757) foi primeiro descrita em 2005 por Somerville e colaboradores e é um dos possíveis resultados da recombinação homóloga não-alélica (NAHR), assim como a deleção da SWB (Stankiewicz and Lupski, 2002; Dixit et al., 2013). A prevalência da duplicação é estimada em 1:13.000 – 20.000 nascidos vivos (Van der Aa et al., 2009), porém estudos mais recentes apontam uma prevalência maior, em torno de 1:7.500 nascidos-vivos, depois que portadores saudáveis foram descritos, sugerindo que a duplicação possa ser indetectável em alguns indivíduos (Torniero et al., 2008; Velleman and Mervis, 2011).

O fenótipo associado a essa duplicação é altamente variável, no entanto, prejuízo na linguagem, problemas de comportamento e DI são características constantes nestes pacientes (Somerville et al., 2005; Kriek et al., 2006; Depienne et al., 2007; Berg et al., 2007; Torniero et al., 2007; Orellana et al., 2008; Beunders et al., 2010; Dixit et al., 2013).

O fenótipo completo da duplicação de 7q11.23 não é claro, tornando a triagem clínica específica não-confiável (Torniero et al., 2008; Merritt and Lindor, 2008; Van der Aa et al., 2009). Algumas anomalias menos comuns têm sido descritas em um ou mais casos como: trigonocefalia, convulsões, hipotonia, anormalidades do cérebro na imagem de ressonância magnética (MRI), fissura labial e/ou do palato, atresia coanal, baixa estatura, hérnia diafragmática congênita, anomalias vertebrais, frouxidão ligamentar, craniossinostose, glaucoma congênito, cútis marmórea, e neutropenia (Kriek et al., 2006; Torniero et al., 2007, 2008; Merritt and Lindor, 2008; Orellana et al., 2008; Van der Aa et al., 2009; Merla et al., 2010; Dixit et al., 2013).

Porém, em 2009, Van der Aa e colaboradores descreveram pela primeira vez o fenótipo facial associado a esta duplicação, incluindo: testa proeminente, sobrancelhas retas e bem colocadas, olhos profundos, fissuras palpebrais curtas, ponta do nariz longa e/ou columela, nariz largo, filtro curto e lábio superior fino. Esse perfil facial associado a duplicação 7q11.23 foi sustentado em relatos de casos posteriores (Beunders et al., 2010; Dixit et al., 2013). Essas características são contrárias as achadas em pacientes com SWB, caracterizados por linguagem expressiva relativamente fluente e articulada, nariz curto, filtro longo e lábios proeminentes (Somerville et al., 2005; Van der Aa et al., 2009; Dixit et al., 2013). O contraste entre os fenótipos associados com a SWB e a duplicação 7q11.23 sugere que os genes dentro desta região cromossômica são sensíveis a dosagem (Somerville et al., 2005).

Das características descritas até o momento para a Síndrome da Duplicação 7q11.23, o paciente em questão apresenta prejuízo na linguagem, DI, problemas comportamentais (fobia / esquizofrenia), convulsões, hipotonia, frouxidão ligamentar, fissuras palpebrais curtas, columela discretamente alongada e filtro curto. São poucas características avaliáveis para sugerir a duplicação. A literatura sobre duplicação atípica em 7q11.23, abrangendo *duplicons* teloméricos, mostra não haver características adicionais ou mais severas nestes casos, quando comparados aos casos de duplicação típica (Berg et al., 2007).

Por outro lado, o paciente apresenta características sugestivas de SWB como: volume periorbital, boca grande, mandíbula pequena e maloclusão, pescoço longo, personalidade amigável, afinidade musical e hiperacusia.

Este caso evidencia a grande importância de uma avaliação clínica minuciosa e eficiente e do conhecimento das diversas síndromes genéticas e seus aspectos clínicos para diminuir e evitar os casos de falsos-negativos. Além da necessidade da confirmação

diagnóstica através de testes genéticos que possam comprovar o desequilíbrio genético envolvido.

Entre os pacientes sem diagnóstico para SWB confirmado, a avaliação dos aspectos clínicos demonstrou que as características comportamentais mais frequentes foram: ADNPM (100%), atraso na iniciação da fala (75%) e hipersensibilidade ao som (71,4%). A personalidade excessivamente amigável, característica da SWB, foi observada em 57,1% destes pacientes.

Apesar da frequência de 100% de ADNPM destes pacientes está de acordo com a literatura para a SWB (Sugayama et al., 2003; Pober, 2010; Morris, 2010), essa é uma característica presente em diversas outras síndromes genéticas.

Com relação aos sinais faciais característicos da SWB, os mais observados entre os pacientes não confirmados pelos testes genéticos foram: plenitude periorbital (75%), testa larga (71,4%), nariz curto ou anteversão das narinas (71,4%), ponta nasal bulbosa (71,4%) e bochechas cheias (71,4%). Apesar destas características também estarem entre as mais observadas nos pacientes com SWB confirmada, a frequência nos pacientes não confirmados foi menor.

Quanto aos problemas cardiovasculares, apenas 42,8% dos pacientes não confirmados apresentaram alguma cardiopatia, tendo sido observado apenas sopro cardíaco e forame oval patente, e nenhuma cardiopatia mais comumente associada à SWB.

Mesmo com sinais clínicos para SWB mais sutis entre os pacientes não confirmados, estes pacientes apresentam perfil clínico indicativo para a síndrome em questão.

Manifestações clínicas atípicas e sutis podem ser atribuídas às deleções atípicas na WBSCR (Dutra et al., 2012; Honjo et al., 2014), como também podem ser atribuídas à variações em alelos não-deletados no cromossomo 7 normal e/ou a alelos em *loci* modificadores localizados em outra posição no genoma (Euteneuer et al., 2014; Segura-Puimedon et al., 2014).

É indicado para esses pacientes análise em microarranjos para detectar possíveis alterações genômicas envolvidas.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O fenótipo da Síndrome de Williams-Beuren (SWB) é bem característico e de fácil reconhecimento, o que permitiu o diagnóstico clínico dos pacientes em estudo e posterior confirmação genética da maioria dos casos.

Ambas as metodologias (FISH e MLPA) permitiram a confirmação da SWB em 16/24 (66,7%) dos pacientes estudados, principalmente, porque todos os pacientes com diagnóstico confirmado apresentavam deleções típicas, que compreendem cerca de 98% dos casos de SWB descritos na literatura.

A MLPA demonstrou melhor custo-benefício do que a FISH no diagnóstico genético da SWB, mostrando-se assim, como uma alternativa mais informativa, barata e simples, que possibilita a detecção de microduplicações e a caracterização da região envolvida na alteração.

Todos os pacientes com SWB confirmados neste estudo apresentam quadro clínico característico da síndrome, destacando-se: personalidade excessivamente amigável (100%), ADNPM (100%), atraso na iniciação da fala (93,3%), hipersensibilidade ao som (92,8%) e cardiopatias congênitas (80%). Entre os aspectos faciais destacou-se: lábios grossos e proeminentes (93,7%), nariz curto ou anteversão das narinas (92,8%), plenitude periorbital (92,3%), ponta nasal bulbosa (92,3%), bochechas cheias (92,3%) e boca grande (86,6%).

A MLPA permitiu a identificação de um paciente com duplicação atípica em 7q11.23, não condizente com SWB e não evidenciada pela FISH. O paciente com Síndrome da Duplicação 7q11.23 apresenta características sutis de ambas as síndromes, o que justifica o diagnóstico clínico incorreto de SWB, ao mesmo tempo que destaca a importância da avaliação genética na determinação exata da síndrome.

Apesar da maioria dos casos de SWB ocorrerem por deleções esporádicas, o presente estudo identificou um caso de SWB familiar, mostrando uma transmissão vertical mãe-filha da deleção típica da síndrome.

O diagnóstico genético de pacientes com suspeita clínica de SWB é de grande importância para a confirmação da alteração genômica envolvida, prognóstico dos pacientes estudados, esclarecimentos aos familiares e realização de um aconselhamento genético preciso para estas famílias.

REFERÊNCIAS

Bayés, M, Magano, LF, Rivera, N, Flores, R, Pérez Jurado, L a. 2003. **Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions.** *Am. J. Hum. Genet.* 73: 131–151.

Berg, JS, Brunetti-Pierri, N, Peters, SU, Kang, S-HL, Fong, C-T, Salamone, J, Freedenberg, D, Hannig, VL, Prock, LA, Miller, DT, Raffalli, P, Harris, DJ, Erickson, RP, Cunniff, C, Clark, GD, Blazo, M a, Peiffer, D a, Gunderson, KL, Sahoo, T, Patel, A, Lupski, JR, Beaudet, AL, Cheung, SW. 2007. **Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region.** *Genet. Med.* 9: 427–441.

Beunders, G, van de Kamp, JM, Veenhoven, RH, van Hagen, JM, Nieuwint, AWM, Sintermans, E a. 2010. **A triplication of the Williams-Beuren syndrome region in a patient with mental retardation, a severe expressive language delay, behavioural problems and dysmorphisms.** *J. Med. Genet.* 47: 271–275.

Cho, EH, Park, BYN, Cho, JH, Kang, YS. 2009. **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.* 29: 71–6.

Committee on Genetics. 2001. **American Academy of Pediatrics: Health care supervision for children with Williams syndrome.** *Pediatrics* 107: 1192–1204.

Cortada, X, Taysi, K, Hartmann, AF. 1980. **Familial Williams syndrome.** *Clin. Genet.* 18: 173–6.

Depienne, C, Heron, D, Betancur, C, Benyahia, B, Trouillard, O, Bouteiller, D, Verloes, A, LeGuern, E, Leboyer, M, Brice, A. 2007. **Autism, language delay and mental retardation in a patient with 7q11 duplication.** *J. Med. Genet.* 44: 452–458.

Dixit, a., McKee, S, Mansour, S, Mehta, SG, Tanteles, G a., Anastasiadou, V, Patsalis, PC, Martin, K, McCullough, S, Suri, M, Sarkar, a. 2013. **7q11.23 Microduplication: A recognizable phenotype.** *Clin. Genet.* 83: 155–161.

Dutra, RL, Honjo, RS, Kulikowski, LD, Fonseca, FM, Pieri, PC, Jehee, FS, Bertola, DR, Kim, C a. 2012. **Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries.** *BMC Res. Notes* 5: 13.

- Euteneuer, J, Carvalho, C, Kulkarni, S, Vineyard, M, Mark Grady, R, Lupski, J, Shinawi, M. 2014. **Molecular and phenotypic characterization of atypical Williams-Beuren syndrome.** *Clin. Genet.* 86: 487–491.
- Francke, U. 1999. **Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms.** *Hum. Mol. Genet.* 8: 1947–54.
- Heller, R, Rauch, a, Lüttgen, S, Schröder, B, Winterpacht, a. 2003. **Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome.** *J. Med. Genet.* 40: e99.
- Honjo, RS, Dutra, RL, Furusawa, EA, Zanardo, EA, Sampaio, L, Costa, DA, Kulikowski, LD, Bertola, DR, Kim, CA. 2014. **Williams-Beuren Syndrome : A Clinical Study of 55 Brazilian Patients and the Diagnostic Use of MLPA.** *Biomed Res. Int.*
- Honjo, RS, Dutra, RL, Nunes, MM, Gomy, I, Kulikowski, LD, Jehee, FS, Kim, CA. 2012. **Atypical deletion in Williams-Beuren syndrome critical region detected by MLPA in a patient with supraaortic stenosis and learning difficulty.** *J. Genet. Genomics* 39: 571–4.
- ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** L.G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid (eds); S. Karger, Basel 2013.
- Kozłowski, P, Jasinska, AJ, Kwiatkowski, DJ. 2008. **New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Electrophoresis* 29: 4627–36.
- Kriek, M, White, SJ, Szuhai, K, Knijnenburg, J, van Ommen, G-JB, den Dunnen, JT, Breuning, MH. 2006. **Copy number variation in regions flanked (or unflanked) by duplicons among patients with developmental delay and/or congenital malformations; detection of reciprocal and partial Williams-Beuren duplications.** *Eur. J. Hum. Genet.* 14: 180–189.
- Lupski, JR, Stankiewicz, P. 2005. **Genomic disorders: Molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes.** *PLoS Genet.* 1: 0627–0633.
- Lupski, JR. 1998. **Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits.** *Trends Genet.* 14: 417–422.

- Merla, G, Brunetti-Pierri, N, Micale, L, Fusco, C. 2010. **Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region.** *Hum. Genet.* 128: 3–26.
- Merritt, JL, Lindor, NM. 2008. **Further clinical description of duplication of Williams-Beuren region presenting with congenital glaucoma and brachycephaly.** *Am. J. Med. Genet. Part A* 146: 1055–1058.
- Mervis, CB, Robinson, BF, Bertrand, J, Morris, C a, Klein-Tasman, BP, Armstrong, SC. 2000. **The Williams syndrome cognitive profile.** *Brain Cogn.* 44: 604–28.
- Moorhead, P. S.; Nowell, P. C.; Mellman, W. J.; Battips, D. M.; Hungerford, D. A. 1960. **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.** *Exp. Cell Res.* 20: 613-616.
- Morris, C a, Demsey, S a, Leonard, CO, Dilts, C, Blackburn, BL. 1988. **Natural history of Williams syndrome: physical characteristics.** *J. Pediatr.* 113: 318–26.
- Morris, CA, Thomas, IT, Greenberg, F. 1993. **Williams Syndrome: Autosomal Dominant Inheritance.** *Am. J. Med. Genet.* 47: 478 – 481.
- Morris, CA. 2010. **Introduction: Williams syndrome.** *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 154C: 203–8.
- Orellana, C, Bernabeu, J, Monfort, S, Roselló, M, Oltra, S, Ferrer, I, Quiroga, R, Martínez-Garay, I, Martínez, F. 2008. **Duplication of the Williams-Beuren critical region: case report and further delineation of the phenotypic spectrum.** *J. Med. Genet.* 45: 187–189.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. W. 1986. **Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 83, pp. 2934-2938, May.
- Pober, BR. 2010. **Williams-Beuren syndrome.** *N. Engl. J. Med.* 362: 239–52.
- Sabbag, ARC. 2012. **Pesquisa de Síndromes de Microdeleção em Pacientes com Deficiência Intelectual por Meio da Técnica de MLPA - Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação.** 169 f. il. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP.

- Sadler, LS., Robinson, LK., Verdaasdonk, KR., Gingell, R. 1993. **The Williams Syndrome: Evidence for Possible Autosomal Dominant Inheritance.** *Am. J. Med. Genet.* 47: 468 – 470.
- Schouten, JP, McElgunn, CJ, Waaijer, R, Zwijnenburg, D, Diepvens, F, Pals, G. 2002. **Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Nucleic Acids Res.* 30: e57.
- Segura-Puimedon, M, Sahún, I, Velot, E, Dubus, P, Borralleras, C, Rodrigues, AJ, Valero, MC, Valverde, O, Sousa, N, Herault, Y, Dierssen, M, Pérez-Jurado, L a, Campuzano, V. 2014. **Heterozygous deletion of the Williams-Beuren syndrome critical interval in mice recapitulates most features of the human disorder.** *Hum. Mol. Genet.* 23: 6481–6494.
- Sellner, LN, Taylor, GR. 2004. **MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions.** *Hum. Mutat.* 23: 413–9.
- Shaffer, LG, Bejjani, B a. 2004. **A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays.** *Hum. Reprod. Update* 10: 221–6.
- Smoot, L, Zhang, H, Klaiman, C, Schultz, R, Pober, B. 2005. **Medical overview and genetics of Williams-Beuren syndrome.** *Prog. Pediatr. Cardiol.* 20: 195–205.
- Somerville, MJ, Mervis, CB, Young, EJ, Seo, E-J, del Campo, M, Bamforth, S, Peregrine, E, Loo, W, Lilley, M, Pérez-Jurado, L a, Morris, C a, Scherer, SW, Osborne, LR. 2005. **Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus.** *N. Engl. J. Med.* 353: 1694–1701.
- Stankiewicz, P, Lupski, JR. 2002. **Genome architecture, rearrangements and genomic disorders.** *Trends Genet.* 18: 74–82.
- Stromme, P, Bjomstad, PG, Ramstad, K. 2002. **Prevalence Estimation of Williams Syndrome.** *J. Child Neurol.* 17: 269–271.
- Sugayama, SMM, Moisés, RL, Wagênfur, J, Ikari, NM, Abe, KT, Leone, C, Silva, CAA da, Chauffaille, M de LL, Kim, CA. 2003. **Síndrome de Williams-Beuren. Anomalias Cardiovasculares em 20 Pacientes Diagnosticados pela Hibridização In Situ por Fluorescência.** *Arq. Bras. Cardiol.* 81: 462–467.

Torniero, C, Dalla Bernardina, B, Novara, F, Cerini, R, Bonaglia, C, Pramparo, T, Ciccone, R, Guerrini, R, Zuffardi, O. 2008. **Dysmorphic features, simplified gyral pattern and 7q11.23 duplication reciprocal to the Williams-Beuren deletion.** *Eur. J. Hum. Genet.* 16: 880–887.

Torniero, C, dalla Bernardina, B, Novara, F, Vetro, A, Ricca, I, Darra, F, Pramparo, T, Guerrini, R, Zuffardi, O. 2007. **Cortical dysplasia of the left temporal lobe might explain severe expressive-language delay in patients with duplication of the Williams-Beuren locus.** *Eur. J. Hum. Genet.* 15: 62–67.

Van der Aa, N, Rooms, L, Vandeweyer, G, van den Ende, J, Reyniers, E, Fichera, M, Romano, C, Delle Chiaie, B, Mortier, G, Menten, B, Destrée, A, Maystadt, I, Männik, K, Kurg, A, Reimand, T, McMullan, D, Oley, C, Brueton, L, Bongers, EMHF, van Bon, BWM, Pfund, R, Jacquemont, S, Ferrarini, A, Martinet, D, Schrandt-Stumpel, C, Stegmann, AP a, Frints, SGM, de Vries, BB a, Ceulemans, B, Kooy, RF. 2009. **Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome.** *Eur. J. Med. Genet.* 52: 94–100.

Van Hagen, JM, Eussen, HJFMM, van Schooten, R, van Der Geest, JN, Lagers-van Haselen, GC, Wouters, CH, De Zeeuw, CI, Gille, JJP. 2007. **Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Genet. Test.* 11: 321–7.

Velleman, SL, Mervis, CB. 2011. **Children with 7q11.23 Duplication Syndrome: Speech, Language, Cognitive, and Behavioral Characteristics and their Implications for Intervention.** *Perspect Lang Learn Educ.* 18: 108–116.

Yunis, J.J., Sanchez, O. 1973. **G-banding and chromosome structure.** *Chromosoma*, 44, p. 15.

ANEXO 1

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

1. IDENTIFICAÇÃO

Data: Serviço: RG no serviço de Origem:

Nome:

Idade atual: data de nascimento: sexo: () m () f Procedência:

Nome / idade / profissão / escolaridade:

Pai:

Mãe:

2. HISTÓRIA CLÍNICA**INFORMANTE:****3. ANTECEDENTES MATERNO-OBSTÉTRICOS:****4. ANTECEDENTES PRÉ-NATAIS**

Idade mãe e nº gestação (do propósito): Duração da gestação:

Pré-Natal: () sim () Rede Pública () Particular () não

Nº consultas no pré-natal:

Sorologias (citar quais e resultados)

Mês do início dos movimentos fetais:

Teratógenos:

outras intercorrências:

5. PERINATAIS

Parto: Cesárea () Indicação:

Local: Assist.: Apresentação:

Trabalho de parto/ intercorrências:

Peso: Estat.: PC: PT: Apgar:

Teve alta com quantos dias?

Ventilação mecânica: () não () sim/Tempo..... Berçário: () não () sim/Tempo.....

CTI neo natal: () sim/Tempo: Incubadora: () não () sim/Tempo

Infeções/febre: () não () sim/Tempo....Convulsões neonatais () não () Sim/Tempo..

Icterícia () não () sim/Tempo

Início sucção/ estado consciência: () normal () deficiente Cianose: () sim () não

Choro: () rápido () demorado () miado de gato

Alteração Suor/ Urina: () não () odor de ninho de rato () chulé () adocicado

6. RECÉM-NASCIDO:

Triagem neonatal: não () sim () normal ()

DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR:

Sustentar cabeça:.....Rolar:.....Sentar c/ apoio:.....Sentar s/apoio: Arrastar-se:...

Engatinhar:.. Em pé c/ apoio:Deambular c/ apoio:Deambular: Fala:

Controle esfíncteres: diurno Noturno: Atualmente:

Aparecimento do 1º dente: () não sabe () não () 5-7m () 8-12m () 13-18m () 19-24m
() >2a

Fechamento da F.A.: () não sabe () não () 9-17mês () 18-24 mês () após 2 a

7. ANTECEDENTES FAMILIARES:

8. HEREDOGRAMA**9. EXAME FÍSICO:****DADOS ANTROPOMÉTRICOS**

Medida	Ítem	Medida	Ítem
Percentil		Percentil	
Estatura	Comp. Mão
Peso	Comp. Dedo médio
..... Vértex-púbis	Pênis
..... Relação SS/SI	Testículos
..... Envergadura	PC mãe
PC	PC pai
..... BA	Estatura mãe
..... AP	Estatura pai
..... PT		

.....	Índice cefálico	
.....	D.I. externa	
.....	D.I. interna	
.....	Fenda palp.	

EXAME FÍSICO GERAL E DETALHAMENTO:

10. EXAMES SUBSIDIÁRIOS REALIZADOS e RESULTADOS: data e resultado	
	STORCH
	FO:
	RX CRANIO
	US abdome
	CT CRANIO
	RNM ENCÉFALO
	BIOQUÍMICA
	CARIÓTIPO
	MOLECULAR
	TRIAGEM DE EIM
	TRIAGEM NEONATAL

11. AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA:

.....

12. DIAGNÓSTICO**Grupo Clínico:**

- DM com ACM**
- DM com anomalia isolada de SNC**
- DM sem ACM com Psicose**
- DM sem ACM com Epilepsia**
- DM sem ACM com HF AR**
- DM sem ACM com HF AD**
- DM sem ACM com HF LX**
- DM sem ACM com HF ND**

Grupo Etiológico:

- Anomalias cromossômicas**
- Numérica**
 - Estrutural**
- Anomalias gênicas**
- Herança clássica**
 - Herança não clássica**
- Causas Ambientais**
- Multifatoriais**
- Heterogênea**
- Não Definida**
- Sindrômica**
 - Não Sindrômica**
- Período**
- Prénatal**
 - Perinatal**
 - Pósnatal**

CID 10:

13. PLANEJAMENTO FAMILIAR

Deseja outros filhos: não () sim () não sabe ()

Está usando anticoncepcional: não () sim () qual?

14. ENTIDADE NA QUAL ESTÁ INSERIDO / ESTIMULAÇÃO

() escola tradicional, qual?

() sala normal () sala de recurso () com professora Itinerante

- escola especial creche CAMS, estão querendo transferi-la
- Fisioterapia: Não Sim/ desde..... Fonoaudiologia: Não Sim/ desde
- TO: Não Sim/ desde Psicologia: Não Sim /desde
- OUTRO, qual?

15. CONDUTA:

ANEXO 2**PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN**

Data: serviço: RG no serviço de Origem:

Nome: Idade atual: data de nascimento:

Crescimento (evidência passada ou presente) *Se presentes 3 de 5, marque 1*

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Nascimento pós-termo (>41 semanas) | <input type="checkbox"/> Cólica prolongada: irritabilidade > 4 meses |
| <input type="checkbox"/> Retardo de crescimento e ganho de peso < 5º percentil | |
| <input type="checkbox"/> Vômitos ou refluxo gastroesofágico | <input type="checkbox"/> Obstipação crônica |

Comportamento e Desenvolvimento *Se presentes 3 de 6, marque 1 ponto*

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Personalidade excessivamente amigável | <input type="checkbox"/> Atraso no crescimento ou retardo mental |
| <input type="checkbox"/> Hipersensibilidade ao som | <input type="checkbox"/> Problemas visoespaciais |
| <input type="checkbox"/> Ansiedade | <input type="checkbox"/> Retardo na iniciação da fala, seguido por discurso excessivo |

Aspectos faciais *Se presentes 8 de 17, marque 3 pontos*

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Estreitamento bitemporal | <input type="checkbox"/> Testa larga |
| <input type="checkbox"/> Dobras epicânticas ou ponte nasal plana | <input type="checkbox"/> Plenitude periorbital |
| <input type="checkbox"/> Estrabismo | <input type="checkbox"/> Padrão iridiano de rendilhado estrelado |
| <input type="checkbox"/> Nariz curto ou anteversão das narinas | <input type="checkbox"/> Ponta nasal bulbosa |
| <input type="checkbox"/> Bochechas cheias | <input type="checkbox"/> Hipoplasia malar (ossos maxilares planos) |
| <input type="checkbox"/> Filtro longo | <input type="checkbox"/> Lábios grossos e proeminentes |
| <input type="checkbox"/> Dentes pequenos e bastante espaçados | <input type="checkbox"/> Maloclusão |
| <input type="checkbox"/> Boca grande | <input type="checkbox"/> Mandíbula pequena |
| <input type="checkbox"/> Lóbulos das orelhas proeminentes | |

Problemas cardiovasculares**Por ecocardiografia (a) *Se presente 1 de 2, marque 5 pontos* _____**

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Estenose aórtica supravalvar | <input type="checkbox"/> Estenose periférica de artéria |
|---|---|

Problemas cardiovasculares (b)**Se presente 1 de 3, marque 1 ponto** _____ Outra doença cardíaca congênita Hipertensão Murmúrio cardíaco**Anormalidade do tecido conectivo****Se presentes 2 de 6, marque 2** Voz rouca Pescoço longo ou ombros inclinados Hérnia inguinal Limitação ou liberdade excessiva de articulação Divertículos intestinais/vesicais Prolapso retal**Estudos do cálcio****Se presentes 1 de 2, marque 2 pontos** Hipercalcemia Hipercalciúria**Total de pontos:** _____

*Se o total de pontos for menor que 3 o diagnóstico de Síndrome de Williams-Beuren é improvável. Se o escore for ≥ 3 , o estudo de FISH deve ser considerado. Pacientes com Síndrome de Williams tiveram escore médio de 9 (SD \pm 2,86).

*Fonte: Committee on Genetics; American Academy of Pediatrics: Health care supervision for children with Williams syndrome. Pediatrics. 2002;109:329."

Diagnóstico clínico:

A Síndrome de Williams é caracterizada pela presença de fâcies dismórfica, doença cardiovascular, geralmente estenose aórtica supravalvar, deficiência mental um perfil cognitivo característico e hipercalcemia idiopática.

Teste genético

A base para o diagnóstico da Síndrome de Williams é a detecção da deleção de genes contígua na região crítica da Síndrome de Williams-Beuren (WBsCR), que envolve o gene da elastina, *ELN*. Mais de 99% das pessoas com o diagnóstico clínico da SWB tem essa deleção de genes contígua, o que pode ser detectado usando o teste de FISH (fluorescent in situ hybridization) ou análise de mutação marcada.

ANEXO 3**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**
INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES
(Pacientes - Rede IGDM)

Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa “Implantação de uma Rede de Investigação Genética da Deficiência Mental nas Regiões Norte/Nordeste/Centro-Oeste no Âmbito do SUS”. Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender bem peça mais esclarecimento e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as suas dúvidas.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

Algumas pessoas apresentam atraso do desenvolvimento (para sentar, andar e/ou falar) e dificuldade para aprender desde o nascimento devido defeitos que ocorreram na formação do cérebro. Sabemos que em cerca de metade dessas pessoas a dificuldade para aprender pode ter sido causada por alterações na constituição genética (DNA), outra metade pode ter sido por problemas na gestação ou no parto de causa ambiental, e ainda, em alguns casos ainda não conseguimos determinar a causa. O atraso do desenvolvimento pode apresentar diferentes formas entre as pessoas podendo ser leve, moderado ou grave. Nós estamos fazendo um estudo para tentar conhecer quais são essas causas e também para verificar se essas pessoas apresentam problemas em outras partes do corpo além da dificuldade para aprender.

De que forma posso auxiliar neste estudo?

Você pode auxiliar neste estudo autorizando a participação e publicação de dados da consulta, no que diz respeito aos exames médicos da pessoa, ao exame físico, aos exames realizados como os bioquímicos, citogenéticos e de biologia molecular (caso tenham sido realizados durante a investigação diagnóstica), e de fotografias quando for para mostrar alguma característica relevante.

Quais os riscos e limites que podem ser encontrados nos exames?

Para fazer este exame é necessário tirar um pouco de sangue. O único incômodo será a picada da agulha.

O paciente não terá nenhum dano físico na realização deste exame. Não é necessário estar em jejum, nem tomar nenhum medicamento. Os procedimentos são iguais ao exame de sangue de rotina.

É raro, mas é possível, que por problemas técnicos, o exame forneça resultados inconclusivos sendo necessário repetir o exame.

Os resultados obtidos para essa pesquisa são absolutamente confidenciais, portanto serão comunicados somente à pessoa ou responsável e ao profissional médico que acompanha a pessoa. A comunicação dos resultados a terceiros só poderá ser realizada mediante autorização do interessado.

Como será feita esta pesquisa?

As pessoas que atendem ao objetivo do estudo serão convidadas para participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Os participantes serão atendidos pelo médico que fará algumas perguntas, examinará e se necessário poderá solicitar alguns exames.

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar no entendimento sobre a deficiência mental, direcionando médicos, educadores, terapeutas e outros profissionais no tratamento do paciente melhorando a saúde e condição de vida.

O que vai ser feito com o material e os dados coletados de cada paciente?

O material e a ficha-protocolo com resultados dos exames dos pacientes serão armazenados no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos - Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras não serão oferecidas a outros centros ou laboratórios e serão registradas por números, para evitar identificação dos pacientes. A identificação dos pacientes será mantida em sigilo absoluto e estará sob a guarda dos pesquisadores responsáveis.

A pessoa ou responsável legal poderá escolher entre ser informado ou não dos resultados do estudo; aqueles que se interessarem em saber sobre os resultados obtidos com o presente estudo serão orientados pela médica geneticista.

Eu, _____, manifesto o meu consentimento com envolvimento do meu filho no projeto de pesquisa intitulado: “Implantação de uma Rede de Investigação Genética da Deficiência Mental nas Regiões Norte-Nordeste-Centro Oeste no Âmbito do SUS.”

A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos na folha de informação em anexo, foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.

- Eu compreendo que meu filho poderá não ter benefício direto por participar do estudo;
- Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconfortos e inconveniências, como foi destacado na folha de informações, foram explicados a mim;
- Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e meu filho não será identificado a partir delas;
- Eu compreendo que posso retirar meu filho do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos pelo meu filho;
- Eu compreendo que não haverá pagamento para meu filho por participar deste estudo;
- Eu tive a oportunidade de discutir a participação de meu filho neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo, e/ou tive a oportunidade de ter um membro da família ou amigo presente enquanto o projeto de pesquisa estava sendo explicado pelo pesquisador;
- Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, depois de assinado, e da folha de informações;
- Eu concordo que o material coletado (sangue) de meu filho seja utilizado no projeto acima.

Assinatura do responsável

Assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador

ANEXO 4**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES****(Novos pacientes)**

Título do Estudo: ALTERAÇÕES CITOGENÔMICAS EM PACIENTES COM ANOMALIAS CONGÊNITAS

Pesquisador Responsável: Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho

O(A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o(a) senhor(a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

O objetivo do estudo é investigar microalterações genômicas em pacientes com anomalias congênitas utilizando a técnica de citomolecular de *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) permitindo diagnosticar estes pacientes, proporcionando suporte e aconselhamento genético adequado.

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 36 meses.

A sua participação no estudo será de aproximadamente 36 meses.

Descrição do Estudo

Participação do estudo aproximadamente 100 indivíduos.

Este estudo será realizado no Laboratório de Genética Humana e Mutagenese (LGHM) localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

O(a) Senhor(a) foi escolhido(a) a participar do estudo porque apresenta anomalia(s) congênita(s) com suspeita de causa genética.

O(a) Senhor(a) não poderá participar do estudo se sua(s) anomalia(s) congênita(s) for de causa ambiental, por exposição a teratogênicos ou outra causa que não seja genética.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, serão realizados exame de citogenética clássica (cariótipo) para análise de constituição cromossômica. Caso o resultado do cariótipo seja normal, a amostra do paciente será submetida à técnica de MLPA, para análise de número de cópias de regiões específicas do genoma, de interesse para o estudo. Quando necessário, as

amostras serão submetidas à técnica de FISH para confirmação dos resultados obtidos pela MLPA.

Os exames serão realizados a partir de coleta de sangue por punção periférica (aproximadamente 5 mL cada) da veia do antebraço em dois tubos (Heparina e EDTA). As amostras não serão oferecidas a outros centros ou laboratórios e serão registradas por números, para evitar identificação dos pacientes. A identificação dos pacientes será mantida em sigilo absoluto e estará sob a guarda dos pesquisadores responsáveis.

Os resultados dos exames serão fornecidos dentre de 30 a 90 dias após a coleta do material biológico. Ao final da avaliação será entregue um relatório contendo informações do paciente e que conterá as informações necessárias para que o responsável pelo paciente possa receber um aconselhamento genético adequado.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Existem riscos baixos na presente pesquisa, associados com a coleta de sangue que incluem, em alguns casos: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos.

Não é necessário estar em jejum, nem tomar nenhum medicamento. Os procedimentos são iguais ao exame de sangue de rotina.

Benefícios para o participante

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar no entendimento sobre as anomalias congênitas, direcionando médicos, educadores, terapeutas e outros profissionais no tratamento do paciente melhorando a saúde e condição de vida.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

O TCLE baseado na resolução 466/12 do item IV.3 - TCLE sob o ponto do esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência que terão os participantes da pesquisa, a garantia de plena liberdade ao participante, de recusar participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e a garantia de manutenção do sigilo e da privacidade.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo Termo de Consentimento (revisado) informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. As duas vias devem estar devidamente assinadas por você e pelo pesquisador responsável.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Ao aceitar participar desta pesquisa, você terá acompanhamento no Laboratório de Genética Humana e Mutagênese, sob a responsabilidade da Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho, durante e após a sua participação no estudo.

A responsável pelo estudo nesta instituição é a Dra. Acácia Fernandes Lacerda de Carvalho, com o auxílio da mestrandia Bianca Arcaro Topázio que poderão ser encontradas no endereço: Rua Barão de Jeremoabo, 147 – Ondina, Instituto de Biologia da UFBA, CEP: 40170-115, Salvador – Bahia ou nos respectivos telefones: (71) 3283-6540 ou (71) 3283-6541.

Você poderá ainda obter informações com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, através do contato: (71) 3283-8043, ou no endereço: Rua Augusto Viana, s/n.º, 1º andar, Canela – Salvador – Bahia – Cep: 40.110-060.

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado “ALTERAÇÕES CITOGENÔMICAS EM PACIENTES COM ANOMALIAS CONGÊNITAS”.

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum dos meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização de meus registros médicos (prontuários medico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

Nome do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina

Data

Assinatura do Sujeito de Pesquisa	
Nome do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)	Data
Assinatura do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa (quando aplicável)	
Nome da pessoa obtendo o Consentimento	Data
Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento	
Nome do Pesquisador Principal	Data
Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal	

ANEXO 5

Lista de sondas do kit SALSA MLPA *probemix* P029-B1 – Williams-Beuren Syndrome

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	ELN	7q11.23
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
132 *	Reference probe 00797-L21698	5q31		
142 *	HSPB1 probe 09538-L09961			Exon 1
148 *	HSPB1 probe 09540-L09963			Exon 3
154 *	Reference probe 14924-L16657	6q22		
160 *	ELN probe 17573-L21523		Exon 4	
166 *	Reference probe 15865-L18430	2p16		
171 ¥	FKBP6 probe 01629-L21865			Exon 9
178 *	POR probe 13768-L21866			Exon 11
184 *	FZD9 probe 17574-L21867			Exon 1
192 *	ELN probe 17575-L21525		Exon 16	
197 *	Reference probe 05525-L04953	20q13		
202	Reference probe 01116-L00620	8q21		
208 *	HSPB1 probe 09539-L09962			Exon 2
214 *	LIMK1 probe 17576-L21868			Exon 14
221 *	STX1A probe 17577-L21869			Exon 3
227 *	LIMK1 probe 08235-L21870			Exon 10
234 *	TBL2 probe 17578-L21872			Exon 2
247 *	CLIP2 probe 17580-L21530			Exon 10
254 *	Reference probe 08718-L08729	9q21		
261 *	ELN probe 17579-L21529		Exon 9	
274 *	STX1A probe 17582-L21880			Exon 7
281 *	LIMK1 probe 17584-L21534			Exon 2
287 *	Reference probe 03926-L20793	15q21		
293 *	ELN probe 17583-L21881		Exon 26	
308 *	ELN probe 16350-L21883		Exon 27	
316 ¥	ELN probe 01333-L21882		Exon 1	
323 *	ELN probe 17585-L21884		Exon 3	
330 *	RFC2 probe 17586-L21885			Exon 10
337 ¥	ELN probe 01334-L21886		Exon 6	
346	ELN probe 01335-L00879		Exon 33	
355 *	POR probe 12692-L13770			Exon 12
364 *	Reference probe 06489-L06015	1p13		
373 ¥	ELN probe 01336-L21887		Exon 20	
382 *	TBL2 probe 17587-L21537			Exon 7
390 ¥	LIMK1 probe 01337-L21889			Exon 5
398 *	CLIP2 probe 17588-L21888			Exon 4
407 *	RFC2 probe 17589-L21890			Exon 3
418	CLIP2 probe 01339-L00885			Exon 14
427	Reference probe 07817-L07547	3p22		

* New in version B1 (from lot B1-1211 onwards).

¥ Changed in version B1 (from lot B1-1211 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

ANEXO 6

Parecer Comitê de Ética (Rede IGDM)

Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: Implantação de uma Rede de Investigação Genética da Deficiência Mental nas Regiões Norte/Nordeste/Centro-Oeste no âmbito do SUS.

Pesquisador Responsável: Angelina Xavier Acosta

Data da Versão: 10/03/2011 **Cadastro:** 13/11 **Data do Parecer:** 19/05/2011

Grupo e Área Temática: I.1 Genética Humana

Objetivos do Projeto
Geral: Implantar uma rede multicêntrica e multidisciplinar para o diagnóstico genético da deficiência mental no âmbito do SUS para as regiões NO-NE-CO.
Específicos:

1. Sistematizar um protocolo clínico e laboratorial para investigação da DM estruturando um modelo de atenção à saúde em genética clínica no âmbito SUS;
2. Caracterização epidemiológica da DM nas regiões NO-NE-CO;
3. Disponibilizar técnicas laboratoriais de citogenética e biologia molecular para o diagnóstico da DM;
4. Implantar e disponibilizar a técnica de aCGH de forma criteriosa e eficiente para diagnóstico da DM atendendo à demanda das regiões NO-NE-CO que não dispõem dessa tecnologia no âmbito do SUS, minimizando as desigualdades nacionais;
5. Definir a frequência das causas cromossômicas e gênicas na etiologia da DM nas regiões avaliadas;
6. Proporcionar otimização do Aconselhamento Genético, manejo, tratamento e suporte aos pacientes e familiares a partir da definição diagnóstica da DM.

Sumário do Projeto
Trata-se de um estudo multicêntrico e multidisciplinar para o diagnóstico genético da Deficiência Mental - DM no âmbito do SUS para as regiões NO-NE-CO. O grupo será composto por 400 pacientes com DM isolada ou sindrômica de etiologia desconhecida, triados com suspeita de causa genética, provenientes do ambulatório de Genética Médica do HUPES/UFBA/Salvador e mais 07 Instituições colaboradoras do NO-NE-CO. Todos os casos serão triados utilizando uma anamnese clínica padrão e submetidos a análises de citogenética clássica. Nos pacientes cuja etiologia da DM não for definida pela citogenética clássica, FISH e biologia molecular, as fichas clínicas serão revistas e serão selecionados 50 pacientes cujo score de Vries for acima de 6, para realizar o aCGH (Hibridação Genômica Comparativa em array). A UFBA dispõe de 02 laboratórios de Genética: Laboratório de Genética Humana e Mutagênese (LGHM) do Instituto de Biologia e o Laboratório de Genética Médica (LGM), pertencente ao HUPES. Cada instituição colaboradora deverá endereçar a UFBA (LGHM) suas respectivas amostras junto com o TCLE e ficha clínica preenchida dos pacientes. Os testes de citogenética clássica e de biologia molecular serão realizados no LGHM e o FISH e aCGH serão realizados no LGM. Cada centro participante em geral dispõe de laboratórios específicos, com exceção de Maceió, Natal e São Luiz que não realizam cariótipo e irão encaminhar suas amostras para o LGHM e LGM. Para amostras com suspeitas de EIM, a investigação laboratorial contará com o apoio da Rede EIM do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) vinculado a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ao final da avaliação será entregue um relatório contendo informações do paciente, material utilizado para análise, testes realizados com as respectivas metodologias, resultado

Pagina 1-3
Versão 01/2004



dos testes e conclusão diagnóstica, o que possibilitará que o responsável pelo paciente receba um aconselhamento genético adequado.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Sim
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Projeto Multicêntrico
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Metodo	
Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 400 Na Instituição 50
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Menores de 18 anos
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/2011
Data de término prevista	06/2011
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Projeto Aprovado.

O Estudo será realizado em Estados das regiões NO-NE-CO, a saber: Hospital Infantil Albert Sabin (Ceará); Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário de Alagoas; Departamento de Pediatria do Hospital Universitário do Mato Grosso do Sul; Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte e Universidade de Potiguar; Hospital Universitário de Bettina (Pará); APAE de São Luiz (Maranhão) e Faculdade de Medicina da Universidade de Cuiabá.

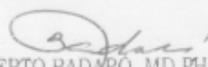
O estudo segue as determinações da Resolução CNS 196/96 e não tem reparos éticos a sua aprovação.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

• O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

• O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.


ROBERTO BADARÓ, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

ANEXO 7

Parecer Comitê de Ética (novos pacientes)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES CITOGENÔMICAS EM PACIENTES COM ANOMALIAS CONGÊNITAS

Pesquisador: ACACIA FERNANDES LACERDA DE CARVALHO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 36319214.4.0000.0049

Instituição Proponente: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 993.246

Data da Relatoria: 19/03/2015

Apresentação do Projeto:

As alterações cromossômicas constituem causa frequente de abortamento, anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor. As anomalias congênitas (AC) são alterações estruturais, funcionais e/ou bioquímico-moleculares detectáveis ao nascimento ou que se manifestam em etapas mais avançada da vida. A citogenética clássica, na resolução de 400 a 550 bandas cromossômicas reconhece a maioria dessas anormalidades e é utilizada rotineiramente como o único exame diagnóstico para a maioria dos pacientes.

Entretanto, o cariótipo clássico não é suficiente para caracterizar alterações menores que 5 Mb. Atualmente, a aplicação das novas técnicas citomoleculares, como Multiplex Ligationdependent Probe Amplification (MLPA), Hibridação in situ por Fluorescência (FISH) e Hibridação Genômica em array tem permitido cada vez mais a identificação de microdeleções e microduplicações antes não detectadas, como causas de malformações congênitas. O objetivo deste estudo é

implantar a técnica de MLPA na Bahia para investigar anormalidades citogenômicas como causa das ACs.

O grupo amostral será composto por cerca de 100 pacientes com AC de etiologia desconhecida,

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

CEP: 40.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 993.246

avaliados com suspeita de causa genética, provenientes principalmente do Ambulatório de Genética Médica do COMHUPES/UFBA/Salvador.

As análises genéticas incluirão os testes de citogenética clássica e citomolecular (MLPA e FISH). A implantação da técnica de MLPA na UFBA para pesquisa etiológica de AC permitirá o acesso à investigação ampla e de alta tecnologia aos pacientes

do SUS minimizando as diferenças nacionais existentes para esses diagnósticos.

Objetivo da Pesquisa:

Testes de citogenética clássica e citomolecular (MLPA e FISH). A implantação da técnica de MLPA na UFBA para pesquisa etiológica de AC permitirá o acesso à investigação ampla e de alta tecnologia aos pacientes do SUS minimizando as diferenças nacionais existentes para esses diagnósticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Existem riscos baixos na participação na presente pesquisa, associados com a coleta de sangue que incluem, em alguns casos: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. Não é necessário estar em jejum, nem tomar nenhum medicamento. Os procedimentos são iguais ao exame de sangue de rotina.

Benefícios:

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar no entendimento sobre as anomalias congênitas, direcionando médicos, educadores, terapeutas e outros profissionais no tratamento do paciente melhorando a saúde e condição de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide conclusões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide Conclusões.

Recomendações:

Recomenda-se:

- Acrescentar o endereço do CEP nos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento;
- Postar separadamente do Projeto o Termo de Assentimento.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

CEP: 40.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 993.246

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.

Situação: Projeto Aprovado.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

CEP: 40.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 993.246

SALVADOR, 20 de Março de 2015

Assinado por:
REGINA SANTOS
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela **CEP:** 40.110-060
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 **Fax:** (71)3283-8140 **E-mail:** cep.hupes@gmail.com