



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

ABORDAGEM DIAGNÓSTICA DA SÍNDROME DE WILLIAMS - BEUREN

MARINA MACHADO SANTOS

Goiânia – GO
2016



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

ABORDAGEM DIAGNÓSTICA DA SÍNDROME DE WILLIAMS - BEUREN

MARINA MACHADO SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Goiânia – GO
2016

S237a Santos, Marina Machado
Abordagem diagnóstica da síndrome de Williams-Beuren[
manuscrito]/ Marina Machado Santos.-- 2016.
106 f.; il. 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto
Senso em Genética, Goiânia, 2016
Inclui referências f.74-83

1. Williams, Síndrome de. 2. Deficiência mental. 3.
Cromossomos humanos - Anomalias - Diagnóstico. 4.
Genética humana. I.Silva, Cláudio Carlos da. II.Pontifícia
Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 575.1(043)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010
Goiânia ● Goiás ● Brasil
Fone: (62) 3946.1021 ● Fax: (62) 3946.1397
www.pucgoias.edu.br ● prograd@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 121/2016

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: MARINA MACHADO SANTOS

DEFENDIDA EM 16 DE MAIO DE 2016 E Aprovado COM CONCEITO..... A

O título foi alterado () não (X)sim Abordagem Diagnóstica da Síndrome de Williams - Beuren

BANCA EXAMINADORA

Cláudio Carlos da Silva
.....
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás
(presidente-orientador)

Lysa Bernardes Minasi
.....
Profa. Dra. Lysa Bernardes Minasi / PUC Goiás
(Membro interno)

Angela Adamski da Silva Reis
.....
Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis / UFG
(membro externo)

Dedicatória
À minha família,
meu pai Paulo Santos
minha mãe Cleusa Gonçalves Machado Santos
e meus irmãos Gisele Machado Santos Guimarães Faria e Paulo Santos Júnior.
Pelo amor, incentivo e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus**. Sem a presença dessa vibração maravilhosa que é a fé em Deus na minha vida não teria conseguido superar todos os obstáculos que surgiram no meu caminho. Sem ELE eu não teria conseguido conquistar nenhuma vitória.

Aos meus pais, **Cleusa Gonçalves Machado Santos** e **Paulo Santos**, que representam a minha base familiar. Sempre presentes na minha vida, me repreendendo em certos momentos e orientando e me ajudando em outros.

Aos meus irmãos **Gisele Machado Santos Guimarães Faria** e **Paulo Santos Júnior**, pela força e companheirismo dados á mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Cláudio Carlos da Silva**, por sua amizade, pelos seus ensinamentos, por sua dedicação, por sua paciência e essencial auxílio na conclusão do meu trabalho. E especialmente por ser meu orientador em várias etapas da minha vida acadêmica.

Às famílias dos pacientes que participaram deste estudo, pois nos oferecem confiança, respeito e esperança no desenvolvimento da ciência.

A todos os professores do Mestrado em Genética da PUC Goiás, a aprendizagem que cada um me proporcionou com certeza vai auxiliar no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À secretária do mestrado, **Alessandra Malta de Oliveira**, por ser sempre solícita a responder e solucionar minhas dúvidas.

Aos amigos da 7ª Turma do Mestrado em Genética da PUC Goiás, vivemos momentos únicos que jamais esquecerei. Em especial agradeço ao meu colega de mestrado que tornou-se um grande amigo **Willame Luz**. Desejo que as amizades feitas no decorrer deste mestrado durem para sempre.

Ao laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, englobando funcionários e estagiários, em especial à **Damiana Miriam da Cruz**, **Aldaíres Vieira de Melo**, **Lilian de Souza Teodoro**, **Lorryne Guimarães Oliveira**, **Cristiano Luiz Ribeiro** e **Irene Plaza Pinto**.

A todos os meus colegas de trabalho, que sempre me incentivaram e torceram por mim.

“Não há fé inabalável senão aquela que pode encarar a razão, face a face, em todas as épocas da Humanidade.”

Allan Kardec

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
EPÍGRAFE	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xiii
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 A Síndrome de Williams-Beuren	21
2.1.1 Histórico & Etiologia	21
2.1.2 Aspectos Clínicos	22
2.1.3 Aspectos Genéticos e Fenotípicos da Deleção e da Duplicação em 7q11.23	26
2.1.4 Caracterização Molecular dos Mecanismos de Formação da CNV ou rearranjo 7q11.23	30
2.2. Técnicas laboratoriais que marcaram o desenvolvimento da Citogenética	34
2.2.1 Cariótipo	35
2.2.2 Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	39
2.3 Técnicas Moleculares utilizadas para diagnóstico da SWB	41
2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
2.3.2 MLPA (do inglês, <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>).....	44
2.3.3 Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA)	46
3 OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Geral	50
3.2. Objetivos Específicos	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Casuística	52
4.2 Coleta e realização das técnicas laboratoriais	52
4.3 Cariótipo com bandas G	52
4.4 FISH (Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência)	53
4.5 Extração e Quantificação das amostras de DNA	53
4.6 Análise Cromossômica por Microarranjos	54
4.6.1 Descrição do método de CMA	54
4.6.2 Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs	55
4.6.3 Busca de alterações e Interpretação das CNVs	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
Paciente 1	57
Paciente 2	62
Paciente 3	66
Paciente 4	67

6	CONCLUSÃO	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8	APÊNDICE	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A) Dois pacientes (casos 1 e 2) com características craniofaciais típicas de SWB com 9 anos de idade; B) Os mesmos pacientes (casos 1 e 2) com 19 anos de idade. A face tornou-se mais alongada, os cumes supraorbitais são mais proeminentes e os lábios mais volumosos. Ambos pacientes mostraram um enrugamento prematuro da pele (Sugayama e colaboradores, 2007).....	22
Figura 2.	Representação esquemática do cromossomo 7. A seta em vermelho destaca a região 7q11.23 frequentemente deletada na SWB (Fonte: DUTRA, 2011)	27
Figura 3.	Esquema parcial do mapa de transcrição da região 7q11.23. No topo está o cromossomo normal, no centro e abaixo os cromossomos com as deleções clássicas da SWB (1.55 e 1.84 Mb). Os diferentes duplicons centromérico (c), medial (m) e telomérico (t) dentro da LCR. As orientações são representadas pelas setas específicas bloco A (amarela), bloco B (vermelha), bloco (c) azul claro. As unidades de transcrição são representadas por retângulos azuis escuros. (Fonte: BAYÉS et al., 2003, adaptada)	33
Figura 4.	Imagem que estabeleceu 46 como o número de cromossomas da espécie humana. Em [A] Metáfase e em [B] Pareamento cromossômico após a fixação e coloração com corante Giemsa (CANDEIAS, 2012, adaptada).....	36
Figura 5.	Aspecto cromossômico evidenciando as bandas observadas no Bandejamento G. Em [A] bandeamento com resolução de 550 bandas e em [B] cromossomos pareados com resolução de 850 bandas (CANDEIAS, 2012, adaptado).....	38
Figura 6.	Metáfase humana após realização da Técnica de FISH utilizando sonda cromossômica VYSIS® para o diagnóstico da Síndrome de Willians-Beuren. O cromossomo 7 normal apresenta sinais fluorescentes vermelhos e verdes. O cromossomo 7 com a microdeleção exibe apenas o sinal fluorescente verde que identifica uma região controle, evidenciando a deleção em 7q11.23 (POBER, 2010, adaptado).....	40
Figura 7.	Fluxograma explicando as etapas de encaminhamento, análise, seleção e as técnicas de citogenética clássica e molecular utilizadas no referido estudo	51
Figura 8.	Interface do programa <i>Chromosome Analysis Suite</i> ® 2.0 (Chas®, Affymetrix – EUA), software de análise dos dados citogenômicos contidos na matriz de genotipagem, demonstrando os resultados genômicos dos pacientes 2 (azul), 3 (preto) e 4 (roxo)	106

- Figura 9. Paciente 1.** atendida no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação para SWB. [A] Aspecto facial caracterizado pela presença de bochechas proeminentes, filtro nasal longo e boca grande com lábios volumosos, má formação da arcada dentária; [B] Baixa implantação da orelha; [C] Alterações musculoesqueléticas na mão esquerda; [D] Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; [E] resultado de FISH indicando a presença de dois sinais verdes para a sonda controle de hibridação e um sinal vermelho caracterizando a deleção em 7q11.23 57
- Figura 10. Paciente 2.** Atendido no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação clínica de DI. [A] e [B]: Aspectos faciais; dismorfismos faciais suaves com testa larga, nariz alto e largo, filtro curto, sobrancelhas retas; [C] Mão comprida com dedos longos; [D] Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; [E] imagem da CMA mostrando a duplicação da região 7q11.23 (destaque no círculo). 63
- Figura 11. Paciente 3.** Atendida no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação clínica de SWB. A: aspectos faciais com testa curta, ponte nasal larga, sobrancelhas retas; B: baixa implantação da orelha; C: Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; D: resultado de FISH demonstrando a presença de dois sinais verdes para a sonda controle de hibridação e dois sinais vermelhos para o gene *ELN* caracterizando FISH negativo para SWB; E: imagem da CMA mostrando as LCSH no cromossomo X 66
- Figura 12. Paciente 4.** Atendido no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação clínica para SWB. [A] aspectos faciais com testa pequena, ponte nasal fina, queixo alongado, orelhas com otoplastia; [B] Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; [C] resultado de FISH demonstrando a presença de dois sinais fluorescentes verdes - sonda controle de hibridação no cromossomo 7 e dois sinais fluorescentes vermelhos (7q11.23) caracterizando FISH negativo para SWB..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sistema de pontuação baseado no fenótipo (Fonte: Sugayama e colaboradores, 2007).....	24
Tabela 2.	Comparação dos aspectos clínicos em relação às alterações cromossômicas da região crítica para a SWB (Fonte: Dutra, 2011)	29
Tabela 3.	Características das diferentes metodologias de bandeamento cromossômico	37
Tabela 4.	Recomendações para CMA em pacientes com Retardo/Deficiência Intelectual, Transtornos do Espectro Autista, Anomalias Congênicas Múltiplas Não Explicadas (Fonte: Miller e colaboradores, 2010)..	49
Tabela 5.	Características gerais dos pacientes participantes deste estudo.....	56

LISTA DE ABREVIACÕES

- AAIDD:** do inglês, *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* – Associação Americana do Desenvolvimento da Deficiência Intelectual
- aCGH:** do inglês, *Array Comparative Genomic Hybridization* – Hibridização Genômica Comparativa em Arranjos
- AgNor:** Coloração pela Prata das Regiões Organizadoras de Nucléolos
- Alu:** Sequências *Alu*
- APAE:** Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
- BAR:** Bandas G de Alta Resolução
- CAAE:** Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CBG:** Coloração da Heterocromatina Constitutiva
- CMA:** do inglês, *Chromosomal Microarray* – Análise Cromossômica por Microarranjos
- CNVs:** do inglês, *Copy Number Variation* – Variação do Número de Cópias
- DD/ID:** Retardo/Deficiência do Desenvolvimento Intelectual
- DECIPHER:** do inglês *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensemble Resources* – Banco de Dados de Imbalances Cromossômicos e Fenótipos em Humanos usando Recursos Ensemble
- DGV:** do inglês *Database of Genomic Variants* – Banco de Dados de Variantes Genômicas
- DI:** Deficiência Intelectual
- DNA:** do inglês *Deoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP's:** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA:** do inglês, *Ethylendiaminetetraacetic Acid* – Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
- DSA:** Desordens do Espectro Autista
- ELN:** Gene da Elastina
- FISH:** do Inglês, *Fluorescence in situ Hybridization* – Hibridização Fluorescente *in situ*
- GTG:** Bandeamento G por Tripsina e Giemsa
- GTL:** Bandeamento G por Tripsina e Leishmann
- GWAS:** do inglês, *Genome-wide Association Studies* – Estudos de Associação Genômica Ampla
- HII:** Hipercalcemia Idiopática Infantil
- LCR:** do inglês, *Low Copy Repeat* – Repetições de Poucas Cópias

LaGene/LACEN/SES-GO: Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular /Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros / Secretaria de Estado da Saúde de Goiás

LCSH: do inglês, *Long Contiguous Stretch of Homozygosity* - Longos Trechos Contínuos de Homozigose

LOH: do inglês, *Loss of Heterozygosity* - Perda de Heterozigose

MAPD: do inglês, *Median Absolute Pairwise Difference* – Mediana Absoluta da Diferença Pareada

MAPH: do inglês, *Multiplex Amplifiable Probe Hybridization* – Hibridização de Sondas Amplificáveis por Multiplex

MLPA: do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – Amplificação Multiplex de Sonda Dependente de Ligação

MS-MLPA: do inglês, *Methylation-Specific MLPA* – Amplificação Multiplex de Sonda dependente de Ligação e Metilação Específica

NAHR: do inglês, *Non Allelic Homologous Recombination* – Recombinação Homóloga Não Alélica

NCBI: do inglês, *National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional para a Informação Biotecnológica

NPR/PUC Goiás: Núcleo de Pesquisas Replicon/Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Nspl: Enzima de Restrição *Nspl*

OMIM: do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*: Herança Mendeliana em Humanos Online

PCR: do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

PGD: do inglês, *Pre-implantation Genetic Diagnosis* - Diagnóstico Genético Pré-Implantacional

RHG: Bandeamento G Reverso

RM: Retardo Mental

RMI: Retardo Mental Idiopático

RNA: do inglês, *Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonucléico

RT-MLPA: do inglês, *Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – Amplificação Multiplex de Sonda dependente de Ligação por Transcrição Reversa

SNP: do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de um Único Nucleotídeo

SNP-array: do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism Array* – Microarranjos de Polimorfismos um Único Nucleotídeo

SUS: Sistema Único de Saúde

SVAS: do inglês, *Supravalvular Aortic Stenosis* - Estenose Aórtica Supra valvular

SWB: Síndrome de Williams-Beuren

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

WBSCR: do inglês, *Williams-Beuren Syndrome Critical Region* - Região Crítica da Síndrome de Williams-Beuren

RESUMO

As anomalias cromossômicas causam fenótipos específicos e complexos resultantes de desequilíbrios na dose normal de genes localizados em um segmento cromossômico específico, sendo responsáveis por 60 % ou mais das síndromes genéticas identificáveis. A Síndrome de Williams-Beuren (SWB) caracteriza-se por anomalias múltiplas e deficiência intelectual, descrita independentemente por Williams et al. (1961) e por Beuren et al. (1962). A SWB consiste em uma doença genética causada pela microdeleção em 7q11.23, que ocasiona o atraso no desenvolvimento físico e intelectual associado com alterações cardíacas congênitas, dimorfismos faciais, retardo mental e ocasionalmente hipercalcemia infantil. A variação fenotípica existente nesta síndrome dificulta o seu diagnóstico clínico. Com o desenvolvimento de novas tecnologias citomoleculares e o aumento de estudos voltados para o conhecimento das características clínicas desta síndrome, busca-se explicar melhor a correlação genótipo-fenótipo na SWB. O presente estudo relata algumas técnicas utilizadas para o diagnóstico da SWB, como Cariótipo, MLPA e PCR, dando ênfase em FISH e CMA. Adicionalmente, são descritos quatro pacientes encaminhados ao LaGene/SES e NPR/PUC pelo serviço público de saúde, onde três destes pacientes apresentavam hipótese diagnóstica para a SWB e um paciente para a DI. Para os quatro pacientes não houve êxito no diagnóstico pela citogenética convencional. A técnica de FISH foi útil na elucidação diagnóstica para um paciente, enquanto que a CMA foi utilizada no estudo dos outros 3 casos. A análise cromossômica por microarranjo detectou longos trechos contínuos de homozigose de significado clínico incerto em Xq11.1q13.1 e um caso de microduplicação na região 7q11.23, que é definida como região crítica da SWB. O estudo da correlação genótipo-fenótipo na Síndrome de Williams-Beuren foi estabelecido para alguns dos genes detectados pelo CMA. Entretanto outros genes detectados não tiveram sua relação estabelecida, necessitando assim de estudos posteriores.

Palavras - chave: Síndrome de Williams - Beuren, FISH, CMA, Região 7q11.23, Microduplicação

ABSTRACT

Chromosomal abnormalities cause specific and complex phenotypes due to imbalance in the normal dosage of genes located in a specific chromosomal segment. They account for 60% or even more of all the identifiable genetic syndromes. Williams-Beuren syndrome (WBS) is related to a group of multiple defects and intellectual disabilities, described independently by Williams et al. (1961) and Beuren et al. (1962). The WBS is a genetic disease characterized by a microdeletion of the 7q11.23 region, which delay the physical and intellectual development and it is associated with congenital cardiac abnormalities, facial dimorphism, mental retardation and occasionally infantile hypercalcemia. The existing phenotypic variation in this syndrome hinders clinical diagnosis. Through the development of new cytomolecular technologies and the increased number of studies regarding the clinical features of this syndrome, seeks a better understanding of the genotype-phenotype correlation in WBS. The present study reports some of these techniques used for the diagnosis of WBS, such as Karyotype, MLPA, PCR, with emphasis on FISH and CMA. Additionally, we described four patients who were referred to LaGene/SES and NPR/PUC by the public health service. Three of them had clinical suggestion of WBS and the fourth patient of ID. The confirmation was unsuccessful regarding the diagnostic through techniques of conventional cytogenetics for all of the patients. FISH technique was useful in the diagnostic investigation of a patient while CMA was used to study the other 3 cases. Chromosomal microarray analysis detected long stretches of homozygosity of uncertain clinical significance at the Xq11.1q13.1 region and a microduplication at the 7q11.23 region, the latter is defined as a critical region of WBS. The study of genotype-phenotype correlation in WBS has been established for some genes detected by CMA. But other genes did not show a strong relation to the syndrome, thus requiring further investigation.

KEYWORDS: Williams-Beuren Syndrome, FISH, CMA, 7q11.23 Region, Microduplication.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento significativo que os estudos genéticos obtiveram nas últimas décadas permitiu uma melhor compreensão de doenças genéticas que apresentavam um conhecimento limitado. Diante disso, e buscando atender aos anseios de um número cada vez maior de especialidades, esforços têm sido realizados para se detectar, o quanto antes, as malformações congênitas, os desvios metabólicos, as doenças degenerativas hereditárias, as displasias esqueléticas e uma diversidade de distúrbios genéticos passíveis de diagnóstico pré ou pós-natal (CHAVES & NICOLAU, 2013; ALBANO, 2000; SOUZA et al., 2010).

As alterações cromossômicas são responsáveis por uma grande proporção significativa dos insucessos reprodutivos, malformações congênitas e deficiência intelectual (CHAVES & NICOLAU, 2013; PEREIRA et al., 2009; SOUTO, 2012). Contudo, algumas alterações cromossômicas também são identificadas em pacientes que apresentam um fenótipo dismórfico mínimo (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006). No ano de 2010, a *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (AAIDD), propôs o uso da expressão *intellectual disability* (deficiência intelectual) no lugar de *mental retardation* (retardo mental), pois esta nomenclatura tem sido considerada pejorativa pelas próprias pessoas com deficiência e por aqueles que advogam por elas (STORNILO et al., 2011).

A Deficiência Intelectual (DI) é caracterizada como o resultado do funcionamento intelectual inferior à média, que aparece na criança, sendo acompanhada de limitações importantes nas atividades adaptativas. A DI tem sido considerada como um sinal de diversas condições clínicas diferentes, incluindo muitas doenças genéticas clássicas e outras raras. Os fatores genéticos estão envolvidos em aproximadamente 30% dos casos de DI e as causas ambientais estão implicadas em 20% dos casos. No entanto, em 50% dos casos a causa ainda permanece como não definida (STORNILO et al., 2011).

Segundo Cunha (2015), a DI corresponde a uma das categorias mais amplas de distúrbios genéticos, acometendo de 1% a 3% da população em países industrializados, enquanto que nos países em desenvolvimento, como o Brasil, Argentina e Chile, estima-se uma prevalência cerca de três vezes maior. Nesse contexto, mais de 40% dos casos de DI

grave são causados por condições mendelianas monogênicas ou anomalias cromossômicas. Com relação à DI, no Brasil, com 185 milhões de habitantes, cerca de 25 milhões (14%) apresentam algum tipo de deficiência. Desses, aproximadamente 17 milhões (68%) apresentam deficiência intelectual.

Em todos os estudos etiológicos sobre deficiência intelectual as anomalias cromossômicas numérica e estrutural são um dos fatores que contribuem de forma mais significativa para o seu desenvolvimento. Estas anomalias cromossômicas também se associam principalmente a problemas de crescimento e a uma vasta gama de anomalias menores, como características faciais dismórficas e outras malformações estruturais de diferentes sistemas: cardíaco, urogenital e membros. O conjunto destas características é chamado de fenótipo cromossômico (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006).

Souza (2003; 2013) e Medina (2014) descrevem a Síndrome de Williams-Beuren (SWB) como uma doença do grupo das anomalias múltiplas, incluindo a deficiência intelectual. A SWB foi descrita inicialmente por Williams et al. (1961) e posteriormente por Beuren et al. (1962). Esta síndrome caracteriza-se como uma doença genética que promove o atraso no desenvolvimento físico e intelectual da criança associado com alterações cardíacas congênitas e dimorfismos faciais. A SWB é causada pela microdeleção em 7q11.23 (LEME et al., 2013). Além de deficiência intelectual e déficit de crescimento pré-natal, a taxa de crescimento pós-natal é aproximadamente 75% do normal. Em 65% dos indivíduos com a SWB observa-se a diminuição do cérebro (microcefalia) com deficiência intelectual moderada (QI 50 a 70) e personalidade extrovertida (SANTORO, 2014).

Na década de 90 houve um aumento significativo em estudos voltados para este grupo de doenças genéticas. Diversas pesquisas foram direcionadas para as regiões críticas das microdeleções, que muitas vezes resultam em fenótipos complexos (SOUZA, 2003). Mais recentemente, a análise cromossômica, apresentando melhor precisão e resolução, representa um procedimento diagnóstico cada vez mais importante em várias áreas da medicina clínica, tornando-se muito utilizada para correlacionar determinadas patologias com alterações do cariótipo normal (CHAVES & NICOLAU, 2013).

O progresso mais importante nos últimos anos foi o desenvolvimento da tecnologia da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), onde uma sonda cromossômica sítio

específica marcada com fluorescência, se hibridiza em regiões cromossômicas metafásicas, profásicas ou interfásicas, facilitando a rápida e precisa identificação das regiões envolvidas (MASCENA, 2009). Outras técnicas moleculares têm permitido avanços consideráveis no campo da citogenética clínica, propiciando a determinação de microdeleções e microduplicações com elevada resolução e sensibilidade (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006; CUNHA, 2015). A Análise Cromossômica por Microarranjos (CMA, do inglês, *Chromosomal Microarray*) representa uma destas novas metodologias, sendo capaz de fornecer alto poder investigativo de variações genéticas estruturais ou CNVs (CUNHA, 2015).

O referido estudo baseia-se em promover uma revisão de técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren e descreve a análise das alterações genômicas observadas em quatro pacientes, utilizando a técnica de CMA para os casos em que o Cariótipo e FISH apresentaram resultados insuficientes para o diagnóstico clínico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Síndrome de Williams-Beuren

2.1.1. Histórico e Etiologia

Os primeiros estudos relacionados com a Síndrome de Williams-Beuren (SWB) foram realizados em 1951, por Fanconi e em 1959, por Sissman e colaboradores no qual descreveram pacientes com sinais clínicos peculiares até então não pertencentes a nenhuma síndrome descrita, como hipercalcemia idiopática na lactância, estenose aórtica supravalvar (EASV) e deficiência intelectual (DUTRA, 2011).

Posteriormente, em 1961, Williams e colaboradores descreveram quatro crianças com fácies peculiares e estenose aórtica supravalvular (EAS). No ano seguinte, Beuren e colaboradores descreveram quatro pacientes com características clínicas semelhantes somadas á presença da estenose da artéria pulmonar. Estes achados não haviam sido descritos na literatura (NUNES, 2010).

A teratogenicidade da vitamina D foi sugerida como uma primeira causa para o desenvolvimento da SWB, baseado em experimentos que mostram estenose aórtica supravalvular e anomalias cranianas em fetos de coelhos expostos a altas doses de vitamina D (OLIVEIRA, 2013). Posteriormente, evidências convincentes mostraram que a síndrome de Williams-Beuren apresenta padrões genéticos e não teratogênicos (POBER, 2010).

A Síndrome de Williams-Beuren (OMIM 194050) é um distúrbio neurodesenvolvimental causado por uma deleção hemizigótica na região cromossômica 7q11.23 (ROSSI, 2010) que inclui o gene da elastina (MACHADO et al., 2001). É um distúrbio genético raro, mas bem reconhecido, que afeta o tecido conjuntivo e o sistema nervoso central (MACHADO et al., 2001; MERVIS & VELLEMAN, 2011).

A SWB apresenta incidência estimada de 1: 20.000 até 1:50.000 nascidos vivos (SOUZA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2010) e prevalência maior de 1:7.500 nascidos vivos (ROSSI, et al., 2006 e 2007; MERVIS & VELLEMAN, 2011; DUTRA et al., 2012; AMARAL et al., 2013; LEME et al., 2013; SANTORO & PINATO, 2014), em igual proporcionalidade entre homens e mulheres (AAP, 2001; DUTRA et al., 2012; SANTORO, 2014). Sua ocorrência é geralmente esporádica na maioria das famílias,

embora haja relatos de raros casos familiares, que apresentam padrão de herança autossômica dominante (MACHADO et al., 2001; DUTRA, 2011; SOUZA, 2003 e 2013; TOPAZIO, 2013; LEME et al., 2013).

2.1.2. Aspectos Clínicos

O paciente com SWB é caracterizado por várias anomalias incluindo dismorfismos faciais típicos, defeitos cardíacos congênitos, déficit de crescimento, deficiência intelectual e ocasionalmente hipercalcemia infantil (SUGAYAMA, 2007).

O fenótipo da SWB inclui aspecto facial típico caracterizado pela presença de bochechas proeminentes, narinas antevertidas, filtro nasal longo, proeminência periorbitária e boca grande com lábios volumosos (Figuras 1A e 1B) (BAYÉS, 2003; SANTORO, 2014; SANTORO & PINATO, 2014).



Figura 1. A) Dois pacientes (casos 1 e 2) com características craniofaciais típicas de SWB com 9 anos de idade; B) Os mesmos pacientes (casos 1 e 2) com 19 anos de idade. A face tornou-se mais alongada, os cumes supraorbitais são mais proeminentes e os lábios mais volumosos. Ambos pacientes mostraram um enrugamento prematuro da pele (Sugayama e colaboradores, 2007).

Indivíduos com SWB chamam atenção também pela característica vocal rouca; baixa estatura; hiperacusia; alterações cardiovasculares; e, deficiência intelectual. Aproximadamente 75 a 80% dos casos com a SWB têm a confirmação de alterações cardíacas, sendo a mais frequente a estenose aórtica, encontrada em aproximadamente 65% dos casos (SUGAYAMA et al., 2003; ROSSI, 2010). Estenose aórtica pulmonar,

hipertensão, anormalidades renais, alterações do trato urinário e anormalidades endocrinológicas, problemas na tireóide também foram relatadas (AMARAL et al., 2013; LI et al., 2015).

A hipercalcemia é uma manifestação comum e pode estar presente, principalmente na infância, sendo a prevalência deste sintoma bastante variável, uma vez que dependendo da idade do diagnóstico, este quadro pode ter revertido (PEREZ-JURADO et al., 1996; ROSSI, 2010). As crianças com SWB geralmente necessitam de um acompanhamento pediátrico durante a infância ou adolescência, visto que o exame genético de rotina realizado na amniocentese não detecta microdeleções cromossômicas (AAP, 2001).

Segundo estudo realizado por Santos (2009), em pacientes com SWB o padrão estrelado da íris apresenta importância diagnóstica e suas alterações oculares que incluem: íris com padrão estrelado (42%), estrabismo (45%), tortuosidade dos vasos retinianos (42%), hipoplasia do nervo óptico (5%), atrofia da aréola peripapilar (5%) e opacidade puntiforme no cristalino (84%).

Geralmente apresentam hiperacusia, uma hipersensibilidade aos sons que muitas vezes vem acompanhada de uma forte atração pela música (SANTOS, 2009; SBRUZZI, 2006). O fenótipo comportamental da SWB apresenta a ocorrência de problemas incluindo dificuldade de atenção; hiperatividade; irritabilidade; mudança de humor repentina; mas, ao mesmo tempo também são dotados de uma sociabilidade marcante (ROSSI, 2010; POBER, 2010). Além de um conjunto de manifestações cognitivas e de linguagem que resultam em comportamentos comunicativos e sociais bastante peculiares a esta síndrome (ROSSI et al, 2007).

A SWB destaca-se na literatura mundial por seu intrigante funcionamento neurocognitivo, por apresentar características que sugerem a dissociação entre os domínios cognitivos verbais e não-verbais, denominado “*Williams Syndrome Cognitive Profile*” (Padrão Cognitivo da Síndrome-de-Williams). Esse fenótipo inclui também a facilidade para habilidades musicais e para o reconhecimento facial. A característica de fala fluente, bem articulada e gramaticalmente correta, contrastando com prejuízos cognitivos, compuseram as primeiras e principais descrições sobre o fenótipo comportamental da SWB (ROSSI, 2010).

Sugayama e colaboradores (2007) desenvolveram um sistema de pontuação baseado em achados clínicos e as suas associações significativas com os resultados do teste citogenético FISH de 20 pacientes com indicação de SWB, associado a uma revisão de meta análise (Tabela 1). Desta forma, este sistema de pontuação permitiu aos médicos diferenciar entre aqueles indivíduos que podem ser diagnosticados de forma confiável como tendo síndrome de Williams somente a partir dos achados clínicos e aqueles que precisam se submeter ao teste de FISH para um diagnóstico correto.

Tabela 1. Sistema de pontuação baseado no fenótipo (Fonte: Sugayama e colaboradores, 2007)

Características	Pontos
Baixo peso ao nascer	3
Dificuldades alimentares	3
Constipação Intestinal	3
Fácies típica	3
SVAS*	3
Deficiência Intelectual	3
Personalidade Amigável	3
Estrabismo	2
Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor	2
Dificuldade de ganho de peso	1
Doença cardíaca congênita não SVAS	1
Hipertensão arterial	1
Contraturas articulares	1
Hiperacusia	1
Hipoplasia unguial	1
Total	31

*SVAS = estenose aórtica supra-avalvular.

Estudos sobre fenótipo cognitivo, comportamental, social e de linguagem em pessoas com a síndrome descrevem padrões consistentes de deficiência intelectual em níveis variados, comportamentos elevados de sociabilidade e empatia, bom desempenho em tarefas que demandam uso de linguagem expressiva, prejuízos em habilidades de linguagem receptiva, comportamentos estereotipados, agressividade, comorbidades

psiquiátricas como fobias específicas, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (POBER, 2010; SERACENI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010; AMARAL et al., 2013).

O Quociente Intelectual (QI) dos indivíduos com a SWB frequentemente varia entre 50 e 70, caracterizando prejuízo intelectual entre moderado a limítrofe, sendo o rebaixamento do QI total atribuído ao prejuízo nas tarefas executivas, suscitando a suposta dissociação entre as habilidades verbais e não-verbais (ROSSI, 2010).

Rossi e colaboradores (2009) analisaram o perfil da fluência da fala de um grupo com a SWB e compararam com um grupo controle pareado por gênero e idade mental semelhante, utilizando o Teste de Linguagem Infantil – área da fluência. Foi relatado que indivíduos com a SWB demonstraram um perfil da fala com a presença de disfluências verbais, que podem ser decorrentes de prejuízo no processamento léxico-semântico e sintático da informação verbal. Entretanto, por ser um estudo realizado com grupo amostral pequeno, foi ressaltada a necessidade de investigações mais sistemáticas e conclusivas sobre este tema.

Ashwort et al. (2013) relataram em seu estudo sobre o sono em crianças com síndrome de Down e síndrome de Williams que os problemas do sono são específicos de cada síndrome. Crianças com SW demonstraram longos períodos de latências durante o sono, embora alguns relatos apontem para serem resistentes a adormecer. Entretanto, uma vez adormecidos, possuem uma qualidade de sono satisfatória. Estes resultados mostraram que os problemas do sono são comuns e destacaram a necessidade de posteriores avaliações em grupos atípicos.

Segundo Amaral e colaboradores (2013) as alterações cardiovasculares e renais são características que podem significar indícios elegíveis para afirmar que indivíduos com SWB são mais vulneráveis ao estresse em ambientes diversos, principalmente no ambiente escolar. Os resultados obtidos com este estudo mostraram que crianças e adolescentes com SWB apresentaram índices elevados de estresse, não havendo diferença estatisticamente significativa entre o nível de estresse e gênero, tipo de escola e valor de QI nos pacientes com SWB.

Os aspectos faciais característicos comuns da síndrome propiciam semelhança com duende (elfinlike), e por isso alguns autores designaram de forma errônea esse distúrbio

como síndrome da face de duende (*Elfin-Facies Syndrome*) (ROSSI et al., 2006; SOUZA, 2013). A característica sociável e falante que os indivíduos com a SWB apresentam conferiu-lhes a denominação da síndrome *Cocktail Party Speech (CPS)*. As características CPS incluem comportamento falante, fala fluente com precisão articulatória, uso de frases estereotipadas e de clichês, hábito de inserir experiências pessoais e irrelevantes ao contexto, além de comportamentos perseverativos (ROSSI et al., 2007; SANTORO & PINATO, 2014). Estas denominações possuem conotação pejorativa e não refletem o conjunto de sintomas associados com a síndrome. A designação mais aceita pelos pais e profissionais é síndrome de Williams-Beuren, ou simplesmente síndrome de Williams (SOUZA, 2013).

A correlação fenótipo-genótipo na síndrome de Williams-Beuren apresenta muitos pontos a serem elucidados, surgindo assim o interesse de vários autores em discorrer sobre essa síndrome, com abordagem voltada, principalmente, para os aspectos genéticos da mesma (MACHADO et al., 2001).

2.1.3. Aspectos Genéticos e Fenotípicos da Deleção e da Duplicação em 7q11.23.

Investigada com um perfil de doença genética rara, estudos ampliaram o conhecimento das características clínicas desta síndrome, estabelecendo testes diagnósticos confiáveis que revelaram a SWB como uma das doenças genéticas mais comumente reconhecidas na infância (AAP, 2001). Em casos de diagnóstico pré-natal e diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) são necessários testes genéticos moleculares que detectem a deleção da região crítica da síndrome (WBSCR) (MORRIS, 2013).

A Síndrome de Williams-Beuren (SWB) é um distúrbio genético causado por uma microdeleção na região cromossômica 7q11.23 (Figura 2) (MACHADO et al., 2001; AAP, 2001; SOUZA, 2003 e 2013). O diagnóstico da SWB inclui análise do quadro clínico somado a testes laboratoriais como a técnica de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) que detecta a hemizigosidade do gene da elastina a partir da análise sanguínea (MACHADO et al., 2001; SANTORO, 2014).

A maioria dos casos na SWB é de origem *de novo* com um risco de recorrência menor que 5% em casos familiares (SBRUZZI, 2006; DUTRA, 2011). A síndrome apresenta um padrão de herança autossômica dominante (ROSSI, 2010; MORRIS, 2013), entretanto existe a possibilidade teórica de mosaicismo de células germinativas (SOUZA, 2003). Nestes casos, o teste pré-natal é possível, mas raramente é solicitado porque a maioria dos casos ocorre em apenas um único membro da família; e não existem indicadores de pré-natal para gestantes de baixo risco (MORRIS, 2013).

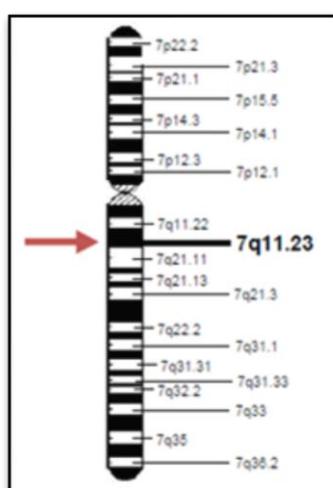


Figura 2. Representação esquemática do cromossomo 7. A seta em vermelho destaca a região 7q11.23 frequentemente deletada na SWB (Fonte: DUTRA, 2011).

A SWB representa uma rara síndrome de deleção de genes contíguos (SUGAYAMA et al., 2003; SBRUZZI, 2006) que abrange uma região cromossômica de 1.5 a 1.8 Mb (ROSSI et al., 2006; TOPAZIO, 2013), contendo 28 genes (ROSSI, 2010; MEDINA, 2014; LI et al., 2015). A haploinsuficiência destes genes leva a um fenótipo característico, mas a correlação genótipo-fenótipo ainda é pouco estabelecida (SOUZA, 2013).

A deleção é causada por uma ou duas quebras cromossômicas, e subsequente perda de determinado segmento de material genético. Um portador de uma deleção cromossômica, que possui um homólogo normal e o outro homólogo excluído, é monossômico para a informação genética sobre o segmento correspondente do homólogo normal. As consequências clínicas geralmente refletem na haploinsuficiência (incapacidade de uma única cópia do material genético para realizar as funções

normalmente executadas por duas cópias) e parecem depender do tamanho do segmento suprimido, além do número e funções dos genes que contenha (JACKSON, 2002).

Principal mecanismo responsável pela SWB, a deleção origina-se por pareamento incorreto entre cromossomos homólogos ou entre cromátides-irmãs (intercromossômico) em 66%, enquanto que 34% das deleções ocorrem por alinhamento intracromossômico incorreto (DUTRA, 2011). Enquanto que a duplicação acarreta na presença a mais de um mesmo segmento de um cromossomo, sendo mais comuns e menos prejudiciais que as deleções (MASCENA, 2009). Embora as duplicações devessem ocorrer com frequência similar das deleções, isso não ocorre. As duplicações têm sido identificadas recentemente devido a ausência de fenótipo compatível com SWB, porém com comprometimento de fala e linguagem similar ou mais severas do que aquelas apresentadas pelos pacientes com deleção (SOUZA, 2013).

Estudo demonstrou que o fenótipo nas duplicações em SWB tem emergido recentemente e o amplo espectro clínico ainda precisa ser bem elucidado. No entanto, aponta evidências que as duplicações geram aspectos clínicos mais leves, e aspectos faciais menos distintos daqueles pacientes com características clínicas típicas na SWB (Tabela 2). Outro recente estudo foi descrito o primeiro caso de triplicação na região crítica para a SWB, pela metodologia de array-CGH (do inglês, *array Comparative Genomic Hybridization*), em um paciente com deficiência intelectual, problemas comportamentais, dimorfismos faciais típicos para a SWB e um grave atraso de linguagem (DUTRA, 2011).

O primeiro gene associado à base genética da SWB foi o gene Elastina (*ELN*) (ANTONELL et al., 2010), descoberto a partir de um estudo familiar com segregação da EASV em que foi constatada uma translocação recíproca t(6;7)(p21.1;q11.23) (SBRUZZI, 2006). Com esta descrição o estudo foi replicado nos casos com diagnóstico clínico da SWB, uma vez que a EASV era uma das principais características fenotípicas descritas na síndrome, sendo então confirmada a deleção de *ELN* na região 7q11.23. Aproximadamente 95% dos casos com fenótipo positivo para a SWB apresentam o gene *ELN* deletado (PEREZ-JURADO et al., 1996, BAYÉS et al., 2003; ROSSI, 2010; MEDINA, 2014).

Tabela 2. Comparação dos aspectos clínicos em relação às alterações cromossômicas da região crítica para a SWB (Fonte: Dutra, 2011)

Aspectos clínicos	Deleção de 7q11.23	Duplicação de 7q11.23
Características faciais	Fronte alargada	Fronte alargada
	Ponte nasal baixa	Nariz amplo, alargado
	Filtro longo	Filtro curto
	Lábios grossos	Lábios finos
Alterações no crescimento e endócrino	Retardo no crescimento	Crescimento normal
	Hipercalcemia	Nível normal de cálcio
Alterações cardiovasculares	EASV	Alterações cardíacas congênicas
	Hipertensão	
Alterações no tecido conectivo	Frouxidão articular	Frouxidão articular
Alterações neurológicas	Hipotonia	Hipotonia
		Ansiedade
	Alterações no cérebro *	Alterações no cérebro *
Alterações cognitivas	Atraso no desenvolvimento	Atraso no desenvolvimento
	Deficiência intelectual	Deficiência intelectual
	Ampla expressão de linguagem	Atraso de fala e linguagem
	Deficiência visuoespacial	Amplo padrão visuoespacial
Alterações comportamentais	Hipersociabilidade	Problemas de interação social/comportamento agressivo
	Comportamento autista	Comportamento autista
	Déficit de atenção	Déficit de atenção

*Alterações não específicas detectadas por ressonância magnética

O gene *ELN* tem um tamanho aproximado de 45 Kb, codifica a proteína elastina, sendo formado por 34 éxons, numa proporção íntron: éxon 19:1. Uma translocação ou deleção parcial pode ocasionar a quebra do *ELN* associando ao desenvolvimento da estenose aórtica supravalvular na SWB (TOPÁZIO, 2013).

Outros genes envolvidos são o *BAZ1B* (OMIM, 605681) o qual foi associado à hipercalcemia, o gene *GTF2IRD1* (OMIM, 604318) possivelmente responsável pela

patologia craniofacial e os genes *LIMK1*, *CYLN2* e *GTF2I* (OMIM, 601679), todos ligados a aspectos do atraso cognitivo (MENDES, 2012). Entretanto, os genes *CYLN2*, *GTF2IRD1* e *GTF2-I*, estariam relacionados à deficiência intelectual e possivelmente outros aspectos da personalidade da SWB (TOPÁZIO, 2013).

Destacam-se ainda alguns genes que têm alto grau de expressão no sistema nervoso central o *FZD9* e *STXIA*; bem como o *RFC2* que promove a replicação do DNA e pode influenciar o crescimento (SOUZA, 2003).

Antonell e colaboradores (2010) realizaram um estudo, pela técnica de MLPA (Amplificação Multiplex de Sonda dependente de Ligação) e microssatélites, com duas famílias que apresentavam características clínicas para a SWB. Segundo dados relatados na literatura e as conclusões deste estudo, reforçam o conhecimento que a SWB é certamente uma síndrome de genes contíguos causada pelos efeitos produzidos pela haploinsuficiência de vários genes na região crítica da WBSCR.

Enquanto que a deleção do gene *ELN*   responsável pelo fenótipo cardiovascular, com *NCF1* como um modificador para a pressão arterial, os genes relacionados com TFII-I parecem ser os principais associados para o perfil neurocognitivo, especialmente deficiência intelectual e deficiência visual-espacial, bem como contribuintes para algumas características craniofaciais de SWB. As correla es clínico-moleculares realizadas nestas duas famílias confirmam que a hemizigosidade funcional para os genes *GTF2I* e *GTF2IRD1*   a principal causa do perfil neurocognitivo e alguns aspectos do fenótipo clínico da SWB (ANTONELL et al., 2010).

Os pacientes com deleções tendem a ter um atraso no desenvolvimento variando de leve a grave, características fenotípicas comportamentais e múltiplas anomalias físicas. As consequências das duplica es são menos conhecidas, mas geralmente apresentam um espectro clínico mais variável e benigno (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006).

2.1.4. Caracteriza o Molecular dos Mecanismos de Forma o da CNV ou rearranjo 7q11.23.

Alguns estudos observaram a complexidade da varia o do número de cópias e identificaram que várias CNVs não podem ser decorrentes de um único evento mutacional

ou por duas ou três mutações simples (PINTO et al., 2007; COSTA, 2016) O principal mecanismo para a formação da CNV é a NAHR que ocorre em uma taxa acima de 10^{-4} por geração, taxa essa maior quando comparado ao surgimento de polimorfismos (SNP) no genoma, sendo de 10^{-8} por geração (DUTRA, 2011).

As CNVs são definidas como alterações no DNA maiores do que 1 kb que diferem entre indivíduos, não se distribuem aleatoriamente ao longo do genoma, e a sua presença correlaciona-se com características estruturais cromossômicas por exemplo, repetições invertidas, duplicações e regiões altamente homólogas. As CNVs são importantes ferramentas para diagnóstico, mais precisamente na modulação do espectro fenotípico em doenças monogênicas e multigenéticas, por envolverem duplicações ou deleções em grandes regiões do DNA (MENDES, 2012).

As CNVs têm um impacto considerável na saúde mental humana e estão implicadas na patogênese de várias desordens neuropsiquiátricas, aumentando o risco de desenvolver desordens neurocomportamentais de início precoce (CHONG et al., 2014). As CNVs foram identificadas pela primeira vez em pacientes com aspectos sindrômicos característicos, como na Síndrome de Williams-Beuren, Síndrome de Smith-Magenis, Síndrome de Sotos, Síndrome DiGeorge/Velocardiofacial (PINTO, 2015).

Os elementos repetitivos presentes nas CNVs são descritos como sequências pequenas (1 a 20 nucleotídeos) organizados em múltiplas cópias no genoma. Mais de 55% do genoma é formado por elementos repetitivos, sendo que as sequências *Alu* são as mais abundantes e presentes em mais de um milhão de cópias no genoma (DUTRA, 2011). A presença de segmentos *Alu* na união dos blocos na região WBSCR, indica que essas sequências podem contribuir para a formação de grandes regiões com duplicações (SCHUBERT, 2009) e sua inserção próxima ao gene *ELN* também pode contribuir para o pareamento incorreto na SWB (DUTRA, 2011).

A região cromossômica 7q11.23 *Williams Beuren Syndrome Critical Region* (WBSCR) é flanqueada por regiões repetitivas altamente homólogas, denominadas *Low Copy Repeat* (LCR) que estão organizadas em 3 blocos denominados A, B, C centroméricos, medial e teloméricos (BAYES et al., 2003; CUSCÓ et al., 2008; SCHUBERT, 2009; ROSSI, 2010; SOUZA, 2013; LI et al., 2015). Os blocos de LCRs centromérico e mediano são transcritos no mesmo sentido, embora em sequência diferente,

enquanto o LCR telomérico apresenta a mesma sequência do LCR centromérico mas com uma direção de transcrição oposta (CUSCÓ et al. 2008; MENDES, 2012).

As LCRs favorecem a ocorrência de *crossing over* desigual durante a meiose, uma vez que estas regiões apresentam alta taxa de recombinação cromossômica levando à deleção da SWB. Este pareamento ocorre entre o cromossomo homólogo não alélico, denominado *Non Allelic Homologous Recombination* (NAHR) entre os blocos de LCR, especialmente entre o Bloco B centromérico e medial, nos casos de deleção típica de 1.5 Mb (BAYÉS, 2003; ROSSI, 2010).

Um número crescente de síndromes estão sendo associadas com microrreorganizações do DNA localizadas nas regiões LCR do genoma, por exemplo, as síndromes de Williams (del 7q11.2), Prader-Willi e Angelman (del 15q11-q13), Smith-Magenis (17q11.2) e a síndrome velocardiofacial (del 22q11.2) (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006). Análises de haplótipos com marcadores polimórficos na Síndrome de Williams-Beuren, na Síndrome de Angelman e Prader-Willi e na Síndrome de DiGeorge têm demonstrado que NARH intercromossômica são a causa de até 2/3 dos cromossomos deletados. Adicionalmente, NARHs intracromossômicas entre cromátides irmãs são responsáveis por até 1/3 das deleções nos cromossomos humanos (THOMAS et al., 2006; COSTA, 2016).

A maioria dos casos com a SWB apresentam deleção entre 1.2 Mb a 1.9 Mb, embora também sejam encontradas deleções entre 0.2 Mb a 2.5 Mb. As deleções atípicas correspondem à perda de segmentos inferiores ou superiores a 1.5 Mb (PEREZ JURADO et al., 1996). A deleção comum na SWB é variável, em torno de 1,55 Mb e contém 28 genes de cópia única na WBSCR. Esta perda ocorre pela recombinação desigual entre os segmentos centroméricos e medial do Bloco B (presente em 96% dos casos), que se encontram na mesma orientação (BAYES, 2003; SCHUBERT, 2009; ROSSI, 2010; SOUZA, 2013; MORRIS, 2013; MEDINA, 2014). Enquanto que as deleções de 1.84 Mb ocorrem em 8% dos casos com a SWB, com ponto de quebra entre o Bloco A centromérico e medial (Figura 3) (BAYÉS et al., 2003; CUSCÓ et al., 2008; NUNES, 2010; DUTRA, 2011; LI et al., 2015).

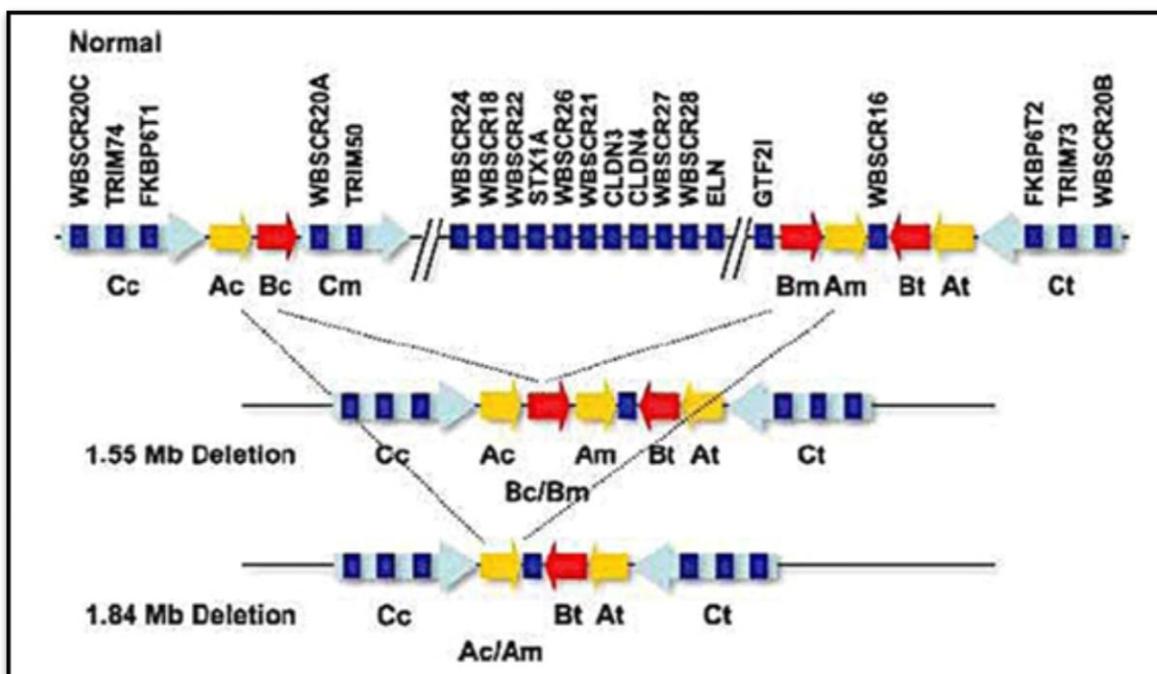


Figura 3. Esquema parcial do mapa de transcrição da região 7q11.23. No topo está o cromossomo normal, no centro e abaixo os cromossomos com as deleções clássicas da SWB (1.55 e 1.84 Mb). Os diferentes duplicons centromérico (c), medial (m) e telomérico (t) dentro da LCR. As orientações são representadas pelas setas específicas bloco A (amarela), bloco B (vermelha), bloco (c) azul claro. As unidades de transcrição são representadas por retângulos azuis escuros. (Fonte: BAYÉS et al., 2003, adaptada).

A recombinação homóloga não-alélica (NAHR) entre LCR desalinhados é o mecanismo subjacente à maioria das desordens genômicas. Este processo pode envolver ambos os homólogos do cromossomo (intercromossômicas) ou cromátides separadas de um único cromossomo (intracromossômica) (THOMAS et al., 2006). Quando estes desalinhamentos ocorrem em LCRs orientados no mesmo sentido causam, deleções e duplicações, ou inversões quando o pareamento ocorre em LCRs com orientação invertida (MEDINA, 2014).

Estudos anteriores realizados por Bayés e colaboradores (2003) verificaram que uma inversão na região crítica 7q11.23 (SWBinv-1) presente em 28% (21 de 74) dos genitores de pacientes com a SWB pode causar o mal pareamento do cromossomo 7 e levar a uma deleção ou duplicação. A frequência deste polimorfismo mostrou-se bastante alta quando comparada com a de indivíduos normais (5,7%).

Acumulam-se, portanto, evidências moleculares da participação de mecanismos específicos de recombinação, intra ou intercromossômica, promovendo a formação de

rearranjos estruturais. A recombinação poderia ocorrer como parte do mecanismo de reparo das quebras. Alternativamente, o emparelhamento meiótico de sequências parálogas, ou seja, de sequências com homologia que não se situam nas mesmas regiões dos cromossomos homólogos, poderia levar à formação de alterações cromossômicas por *crossing-over* desigual (COSTA, 2016).

2.2. Técnicas laboratoriais que marcaram o desenvolvimento da Citogenética

A Citogenética é uma ciência relativamente moderna, que teve como marco inicial o desenvolvimento de técnicas de coloração e bandeamento que permitiram a visualização e a caracterização dos cromossomos (SILVA, 2012). O início da citogenética humana é associado aos estudos conduzidos por Walther Flemming, a partir da publicação de suas primeiras ilustrações dos cromossomos humanos em 1882 (CUNHA, 2015).

A palavra “*cromossoma*” é de origem grega, resultando da junção das palavras “*khroma*”, que significa cor e “*soma*”, que significa corpo. São denominados assim porque, nas primeiras experiências laboratoriais realizadas, os cientistas verificaram que estas estruturas podiam ser facilmente coradas permitindo a sua visualização (CANDEIAS, 2012). As primeiras ideias sobre cromossomos surgiram no fim do século XIX, quando os primeiros estudos mitóticos foram realizados. Um dos primeiros cientistas a descrever o processo da divisão celular mitótica de forma clara foi o zoólogo alemão Anton Schneider, em 1873 (MASCENA, 2009).

No Final do século XIX, com a ampliação nas resoluções das lentes ópticas, a citogenética recebe um impulso tecnológico que garantiria a identificação e a determinação correta do número de cromossomos humanos, incluindo a observação do dimorfismo próprio dos cromossomos sexuais (CUNHA, 2015). O cariótipo humano foi então definido por Joe H. Tjio e A. Levan como diplóide ($2n=46$), com uma notação cariotípica de 46,XY e 46,XX para os sexos masculino e feminino, respectivamente (JACOBS, 2014). O desenvolvimento das técnicas de bandeamento cromossômico no início da década de 70 facilitou a identificação de diversas anormalidades cromossômicas. Esta estratégia permite a identificação mais precisa de cada cromossomo humano e, conseqüentemente, a detecção

de aneuploidias e uma diversidade de rearranjos estruturais, incluindo translocações, deleções e duplicações cromossômicas (SHAFFER & BEJJANI, 2004).

A história da citogenética divide-se em dois períodos: [1] *Citogenética Clássica* que destaca-se com a hipótese de que os fatores responsáveis pela transmissão de características estavam localizados nos cromossomos (MASCENA, 2009), e o segundo período; com a incorporação de técnicas e metodologias moleculares da [2] *Citogenética Molecular*, dentre as quais as principais são: Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), técnicas de bandeamento com fluoróforos ou grupos de corantes específicos que permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada (CHAVES & NICOLAU, 2013) Atualmente, a Análise Cromossômica por Microarranjos (CMA), a Amplificação Multiplex e Hibridização de Sondas (MAPH, do inglês, *Multiplex Amplification and Probe Hybridization*) e a Amplificação Multiplex de Sonda dependente de Ligação (MLPA, do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) têm-se caracterizado como técnicas mais modernas da citogenômica (CUNHA, 2015). A CMA é uma tecnologia recente, de estratégia extremamente útil como uma ferramenta adicional para os diagnósticos genéticos. Essa metodologia tem sido recomendada como teste de diagnóstico de primeira linha para pacientes com atraso global de desenvolvimento, deficiência intelectual, transtornos do espectro do autismo e anomalias congênitas múltiplas (PEREIRA et al., 2014).

2.2.1. Cariótipo

Segundo Mascena (2009) a análise citogenética é realizada a partir do estudo do cariótipo que representa a descrição de um conjunto de cromossomos, incluindo a contagem do número total e as características morfológicas distintivas dos mesmos.

Conforme Shaffer & Tommerup (2005), em 1959 foi proposto um sistema de nomenclatura para os cromossomos, que seria usado internacionalmente e continua em vigor até os dias atuais, sendo conhecido como Sistema Internacional para Nomenclatura Citogenética Humana (do inglês, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*). Os 46 cromossomos humanos são organizados em 23 pares, como mostra a Figura 4A (JACKSON, 2002). Os pares de autossomos são numerados de 1 a 22 em

ordem decrescente de tamanho e os cromossomos sexuais são denominados X e Y. Todos os cromossomos são reunidos em sete grupos nomeados de A a G, conforme apresentados na Figura 4B (SHAFFER & TOMMERUP, 2005; CHAVES & NICOLAU, 2013). O cariótipo foi definido como sendo gradativo, contendo cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos e um sistema simples do tipo X/Y para a determinação sexual (CUNHA, 2015).

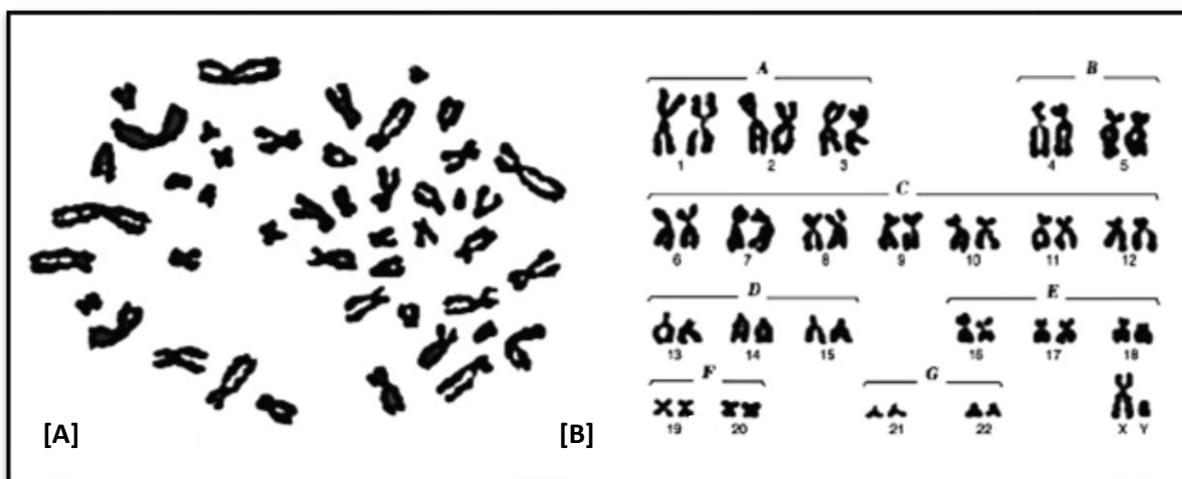


Figura 4. Imagem que estabeleceu 46 como o número de cromossomas da espécie humana. Em [A] Metáfase e em [B] Pareamento cromossômico após a fixação e coloração com corante Giemsa (CANDEIAS, 2012, adaptada).

Num cariótipo, os cromossomos são organizados de acordo com o tamanho e propriedades morfológicas observadas durante a divisão celular, particularmente na fase de metáfase, quando os cromossomos estão num estado de máxima compactação (SILVA, 2012). A colchicina é usada como um bloqueador da formação do fuso, e posteriormente as células são submetidas ao choque hipotônico, para serem fixadas e coradas (TICIANELLI et al., 2011).

Com o aprimoramento das técnicas para o estudo dos cromossomos, foram propostas diversas metodologias de bandeamento cromossômico. Dentre elas, se destaca o bandeamento GTG, que usa tripsina e Giemsa para revelar bandas escuras e claras nos cromossomos humanos, denominadas de bandas G. O bandeamento GTG possibilitou estudar as alterações estruturais envolvendo os cromossomos de uma metáfase e, conseqüentemente, aumentou a resolutividade dos diagnósticos citogenéticos das

condições humanas (JACOBS, 2014; CUNHA, 2015). Posteriormente, outras técnicas de bandeamento foram desenvolvidas, como o bandeamento G reverso (bandas RHG), a coloração da heterocromatina constitutiva (bandas CBG) e a coloração das regiões organizadoras do nucléolo pela impregnação da prata (coloração AgNor), sendo que cada metodologia apresenta propriedades e aplicações específicas, conforme apresentado na Tabela 3. Nos estudos de rotina, as técnicas de bandeamento G o método GTG (com Giemsa) ou método GTL (com Leishmann), tornaram-se as mais utilizadas nos laboratórios de citogenética (CANDEIAS, 2012).

Tabela 3. Características das diferentes metodologias de bandeamento cromossômico

Metodologia	Resolução	Aplicação	Referências
GTG/GTL	450 a 550 bandas	Identificação dos pares de cromossomos homólogos, pequenas deleções e anomalias estruturais (em metáfase)	SHAFFER & BEJJANI, 2004; CANDEIAS, 2012; SOUTO, 2012; CUNHA, 2015
GTG/GTL	800 a 850 bandas	Análise de cromossomos em prófase ou prometáfase	JACKSON, 2002; SILVA, 2012; CANDEIAS, 2012; CUNHA, 2015
G/BAR	>850 bandas	Identificação de microdeleções	CANDEIAS, 2012; SOUTO, 2012
RHG	n/a	Visualização das regiões teloméricas	CANDEIAS, 2012; SILVA, 2012
CBG	n/a	Identificação dos centrômeros, da heterocromatina pericentromérica dos cromossomos 1, 9, 16 e a região distal do braço longo do cromossomo Y	CANDEIAS, 2012; SOUTO, 2012; SILVA, 2012
AgNOR	n/a	Identificação das regiões organizadoras do nucléolo (NORs)	CANDEIAS, 2012; SOUTO, 2012; SILVA, 2012

Legenda: GTG – Bandeamento G GTG utilizando Tripsina e Giemsa, GTL – Bandeamento G que usa Tripsina e Leishmann, G/BAR – Bandeamento G de alta resolução, RHG - Bandeamento G reverso, CBG - Coloração da Heterocromatina Constitutiva e AgNOR - coloração das Regiões Organizadoras de Nucléolos pela impregnação da prata. n/a – Não se aplica

O estudo citogenético foi ampliado por Yunis (1979), por meio do desenvolvimento das chamadas bandas G de alta resolução (BAR), associado aos estudos que avaliavam culturas de linfócitos, nas quais se obteve um maior número de células em prófase e prometáfase. Dessa forma foi possível obter cromossomos mais distendidos e,

consequentemente, um padrão de bandeamento mais detalhado, e conseguiu-se aumentar o padrão de resolução de 550 para mais de 850 bandas, conforme apresentado na Figura 5 (CANDEIAS, 2012).

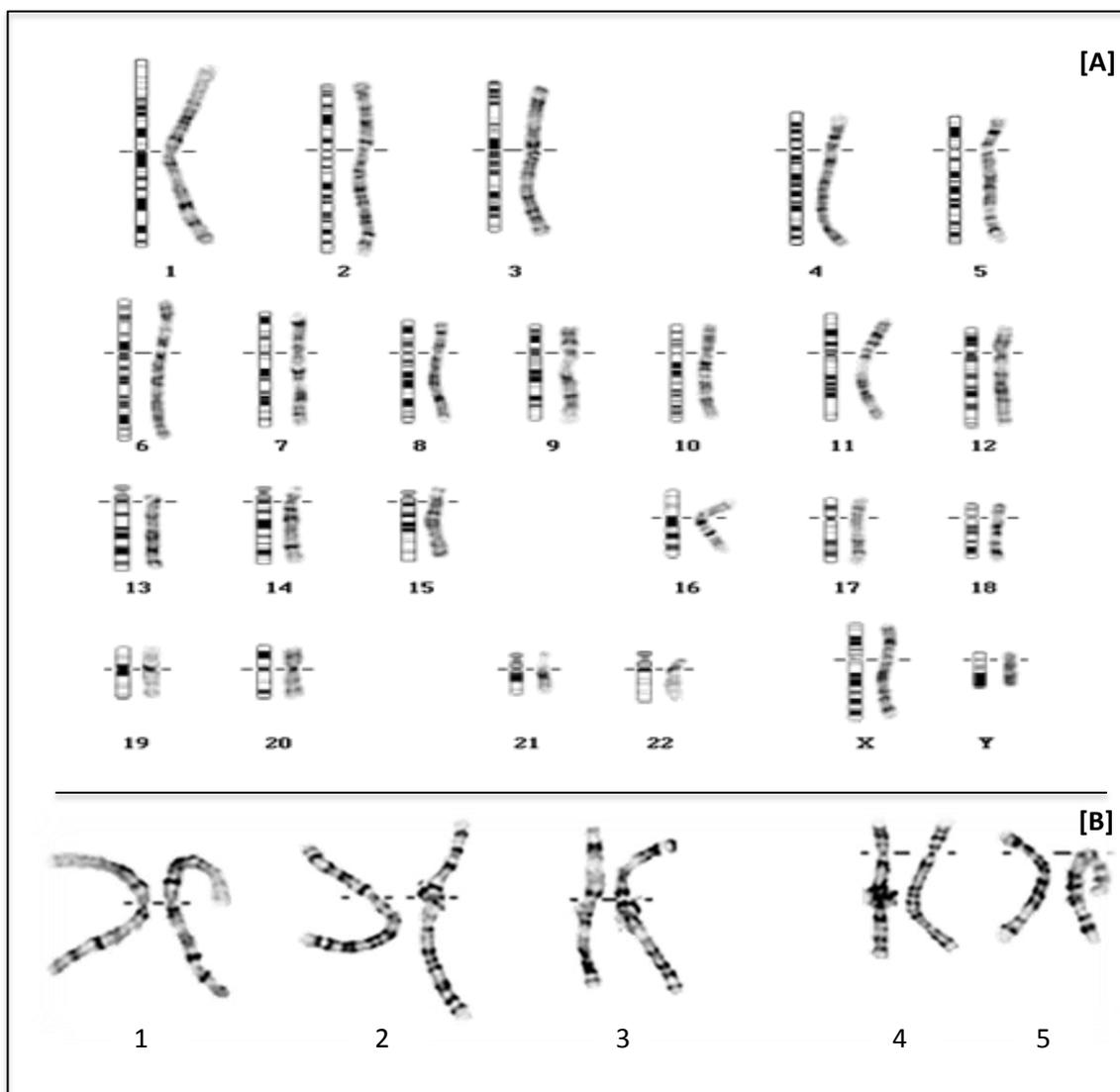


Figura 5: Aspecto cromossômico evidenciando as bandas observadas no Bandeamento G. Em [A] bandeamento com resolução de 550 bandas e em [B] cromossomos pareados com resolução de 850 bandas (CANDEIAS, 2012, adaptado).

Por meio da aplicação desta metodologia, várias síndromes clínicas já conhecidas (*Síndrome de Williams-Beuren*, *Síndrome de Prader-Willi* e *Angelman*, *Síndrome de Smith-Magenis*, dentre outras) puderam ser relacionados com pequenas alterações cromossômicas, surgindo então a designação de “Síndrome por Microdeleção” (CANDEIAS, 2012).

Cada cromossomo apresenta uma série de regiões, bandas escuras e claras e que são, o reflexo visível de unidades funcionais a nível molecular (SILVA, 2012). Com emprego destas técnicas tornou-se possível a identificação de todos os cromossomos, inclusive dos cromossomos alterados em número e na sua morfologia, surgindo então os primeiros trabalhos nesta área (SOUTO, 2012).

A análise cromossômica é relativamente trabalhosa e possui limitações que incluem inconsistências com o padrão de resolução de bandas rotineiramente alcançados. Adicionalmente, há dificuldade em visualizar alguns rearranjos devido às propriedades de coloração de regiões específicas do genoma, como microduplicações (SHAFFER & BEJANI, 2004).

No entanto, ressalta-se a necessidade da realização do cariótipo, mesmo em pacientes com suspeita clínica de pequenas deleções. A cariotipagem deve ser usada como uma técnica de triagem para a posterior aplicação das técnicas citomoleculares (TOPAZIO, 2013). Desta forma, é importante esclarecer que, mesmo que o cariótipo tenha um resultado normal, existe a possibilidade de não ter sido identificadas alterações, necessitando de exames complementares (PEREIRA, 2009).

2.2.2. Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

Na última década a aplicação das técnicas moleculares no estudo dos cromossomos permitiu um espetacular avanço no campo da citogenética clínica (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006). A partir da citogenética molecular, que representa a união de abordagens citogenéticas com a biologia molecular, (JACKSON, 2002) desenvolveu-se a hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) que tem aumentado significativamente a resolução e aplicação da citogenética (SOUZA, 2003).

A técnica de FISH permite a identificação e a localização de uma sequência específica do DNA em uma banda cromossômica. O DNA dos cromossomos metafásicos é desnaturado na própria lâmina (por isso *in situ*), hibridizados com a sonda de DNA complementar marcada com um fluoróforo, e visualizados posteriormente por fluorescência ou por filme de raio X (SUGAYAMA et al., 2003).

Segundo Mascena (2009) a metodologia FISH não deve ser confundida com uma técnica de coloração pois se trata de uma técnica de detecção específica de sequências de bases de DNA (ou RNA) onde, a sonda marcada se hibridiza aos cromossomos nas fases de metáfase, prófase ou intérfase . Como as sondas são específicas para um local, FISH pode ser utilizado para a identificação de alterações cromossômicas menores, incluindo pequenas deleções, duplicações ou translocações (JACKSON, 2002). As aplicações dessa técnica incluem o mapeamento cromossômico, detecção citogenética de rearranjos e aneuploidias. Especificamente, as sondas para as aneuploidias mais comuns, incluem os cromossomos 13, 18, 21, X e Y, são utilizadas para rastrear rapidamente em casos de gravidez de alto risco. Sondas para sequências únicas e locais específicos foram desenvolvidas para deleções específicas (como na síndrome de Williams-Beuren), microdeleções de locais variados, rearranjos encontrados na fusão de genes e todas as regiões teloméricas e centroméricas (SHAFFER & BEJANI, 2004).

A metodologia FISH tem sido considerada como a técnica citomolecular mais usada pelos laboratórios para o diagnóstico da síndrome de Williams-Beuren (NUNES, 2010; LEME et al., 2013; LI et al., 2015), pois apresenta uma capacidade de detectar mais de 95% dos indivíduos que apresentam a deleção em 7q11.23 (DUTRA et al., 2012). Esta metodologia baseia-se na ligação de sondas de DNA marcadas com fluorocromos que se ligam ao gene *ELN*. A marcação é visualizada como pontos fluorescentes de cores diferentes, evidenciando a presença de apenas um alelo do gene *ELN* em vez de dois, como demonstrado na Figura 6 (POBER, 2010).

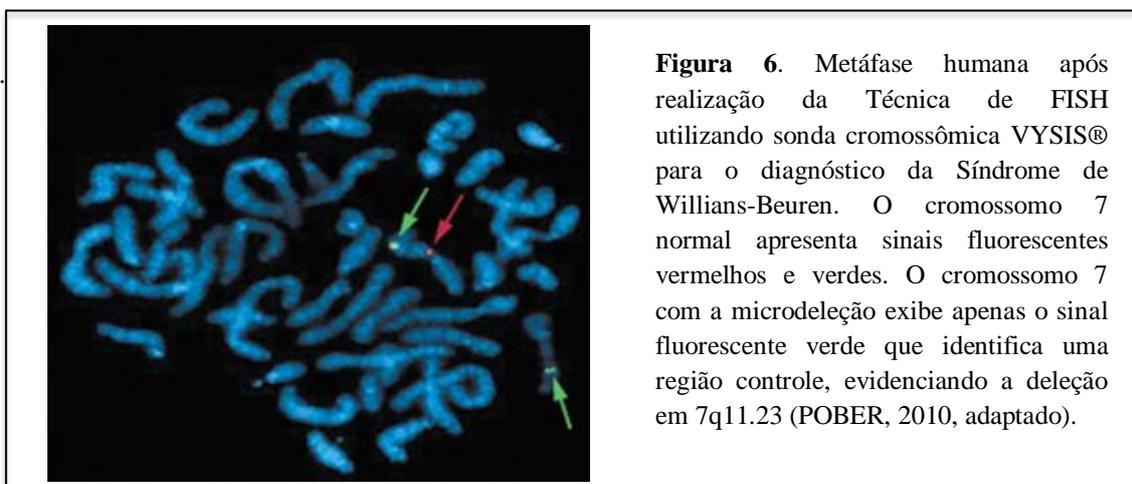


Figura 6. Metáfase humana após realização da Técnica de FISH utilizando sonda cromossômica VYSIS® para o diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren. O cromossomo 7 normal apresenta sinais fluorescentes vermelhos e verdes. O cromossomo 7 com a microdeleção exibe apenas o sinal fluorescente verde que identifica uma região controle, evidenciando a deleção em 7q11.23 (POBER, 2010, adaptado).

Adicionalmente, FISH é uma técnica que exige uma intensa otimização laboratorial, e não permite a detecção do tamanho exato da deleção (DUTRA et al., 2012). Dentre as desvantagens da sua aplicação está a incapacidade de detectar deleções e duplicações muito pequenas (inferior a 5Mb) e ainda por ser facilmente afetada pela qualidade dos preparados cromossômicos. Quando comparada com outras técnicas citomoleculares (CMA e MLPA), FISH comporta-se como um método de menor rendimento relativo, porém de menor custo. Portanto, representa uma ferramenta importante para o diagnóstico de casos clínicos das microdeleções mais comuns. Nos casos de deleções atípicas pode resultar em falsos negativos, necessitando da confirmação por técnicas mais abrangentes (TOPAZIO, 2013).

2.3. Técnicas Moleculares utilizadas para diagnóstico da SWB

2.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Ao longo do desenvolvimento, as células e tecidos se diferenciam e mudam com o avanço da idade do organismo. Nesse processo incluem alterações teloméricas, acúmulo de mutações no DNA, a senescência de estruturas celulares e de órgãos, e mudanças na expressão gênica. Tanto a diferenciação de tecidos quanto os efeitos do envelhecimento são pelo menos parcialmente causadas por modificações químicas no genoma, tais como a metilação do DNA (DE OLIVEIRA JUNIOR & DE LIMA LINS, 2012; SINISCALCO et al., 2013).

Uma das primeiras marcas epigenéticas estudadas em eucariotos é a metilação em citosinas do DNA, que atua como uma modificação de forma herdável e estável afetando a atividade dos genes e a biologia celular (FERNANDEZ et al., 2012; DE OLIVEIRA JUNIOR & DE LIMA LINS, 2012). Os processos epigenéticos são mecanismos altamente complexos, e pequenas falhas no estabelecimento ou manutenção desses mecanismos podem alterar a fisiologia normal da célula e desencadear o desenvolvimento de doenças nos indivíduos portadores (DE OLIVEIRA, 2012).

A metilação do DNA tem sido associada ao controle celular normal de expressão gênica, enquanto que a hipermetilação aberrante pode levar ao silenciamento de genes. A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em uma citosina de um dinucleotídeo

CpG, e é conseguida pela adição de um grupo metil (CH₃-) na posição 5' do anel de citosina mediada pela enzima DNA metil transferase (BOLLATI et al., 2010; DE OLIVEIRA JUNIOR & DE LIMA LINS, 2012; DE OLIVEIRA, 2012; SINISCALCO et al., 2013).

Nos mamíferos, esta modificação ocorre nos dinucleotídeos CpG e pode ser catalisada por três diferentes enzimas, DNMT1 e DNMT3a, e DNMT3b. A metilação do DNA desempenha um papel no silenciamento da transcrição de genes e na formação da heterocromatina, que é a forma condensada da cromatina. Como uma modificação epigenética, a metilação do DNA permite que esses estados de silenciamento gênicos sejam herdados ao longo das divisões celulares (DE OLIVEIRA JUNIOR & DE LIMA LINS, 2012).

Muitos dos mecanismos envolvidos com o estabelecimento e manutenção da metilação em sítios específicos do DNA ainda são desconhecidos, porém é certa a influência que essa modificação epigenética desempenha na organização da cromatina, levando à repressão de inúmeros genes e elementos transponíveis (DE OLIVEIRA, 2012).

A descoberta da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR) revolucionou os procedimentos de diagnóstico molecular nos laboratórios a nível mundial. Desenvolvida por Kary Banks Mullis (prêmio Nobel de química de 1993 pelo desenvolvimento dessa técnica) em abril de 1983, essa técnica de biologia molecular consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos. A PCR tornou-se a principal técnica molecular utilizada, não apenas em estudos básicos do genoma humano mas também em aplicações de diagnóstico e descoberta de drogas (MENDES, 2012; DE CAMARGO & DA SILVA, 2014).

A técnica de PCR promove, por meio de etapas de variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA *in vitro* (PASTERNAK, 2002). A reação de amplificação de DNA por PCR envolve o emprego dos quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras (*primers*) e uma DNA polimerase termoestável. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucleico, a partir de uma fita molde (TICIANELLI et al., 2011). O princípio da PCR envolve três etapas básicas de variação de temperatura por ciclo; a) Desnaturação da fita molde de DNA; b) Pareamento de dois iniciadores sintéticos de composições distintas, que funcionam como os iniciadores

da reação de polimerização, ligando-se à região complementar da fita de DNA alvo que sofrerá a duplicação (Renaturação do DNA); c) Amplificação por meio da enzima *Taq* DNA polimerase, das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando os quatro dNTP's como substrato da reação de polimerização, promovendo a síntese do DNA (PASTERNAK, 2002; DE CAMARGO & DA SILVA, 2014).

A PCR para a análise de metilação específica foi desenvolvida por Stephen Baylin e Jim Herman na Escola de Medicina de Johns Hopkins, e tem sido usada para detectar a metilação de ilhas CpG no genoma. O DNA é primeiramente tratado com bissulfito de sódio, o qual converte bases de citosina não metiladas em uracila, a qual é reconhecida pelos *primers* da PCR como timina (PREZZI & DUARTE, 2010).

A desaminação da citosina remove o grupo amina da posição 4, e isso a transforma em uracila, que vai parear com adenina ao invés de parear com guanina (o par C-G altera para U-A); a metilação da citosina no carbono 5 a transforma em metilcitosina, que, se for desaminada, tornar-se-á timina, com um oxigênio no lugar da amina. Duas reações de PCRs são então conduzidas no DNA modificado, usando posições de iniciadores idênticas exceto em alguma ilha CpG dentro das sequências de iniciação. As ilhas CpG são metiladas e por isso a citosina delas não se converte em uracila. Nesses pontos, um *primer* reconhece o DNA com citosinas para amplificar o DNA metilado, e o outro *primer* reconhece o DNA com uracila ou timina para amplificar o DNA não metilado (DE CAMARGO & DA SILVA, 2014).

Nesse contexto, PCR faz parte integrante da moderna biotecnologia molecular, que trouxe um enorme progresso a áreas como o diagnóstico de doenças, medicina forense entre muitas outras para além da investigação em Biologia (PREZZI & DUARTE, 2010). Desde sua aplicação, rápidos avanços nas técnicas de genética molecular têm revolucionado a prática da patologia, anatomia e análises clínicas. As técnicas moleculares são agora aplicáveis a todas as áreas do laboratório clínico (PREZZI & DUARTE, 2010).

Em contraste, apesar das facilidades do uso da PCR para estudos de metilação, os protocolos dessa metodologia empregados no diagnóstico da SWB tem sido cada vez menos utilizados. Uma das justificativas para uma restrição do uso dessa estratégia diagnóstica é o elevado índice de resultados falsos negativos observados quando o

emprego da PCR para a metilação de genes presentes em 7q11.23 (DE CAMARGO & DA SILVA, 2014).

2.3.2. MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Após a implementação do cariótipo convencional para confirmação de diagnósticos de alterações cromossômicas no diagnóstico fetal, surgiram outros procedimentos, principalmente os baseados nas tecnologias de biologia molecular, que proporcionaram um grande avanço nesta área, como o aumento da capacidade de automatização e maior precisão na detecção de pequenas alterações genômicas (inferiores a 5 Mb). Dentre essas tecnologias e no âmbito do diagnóstico pré-natal destaca-se a MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (MENDES, 2012).

A MLPA representa um ensaio da genética molecular semi-quantitativa inicialmente desenvolvida por Schouten e colaboradores em 2002. Esta técnica tem como base a PCR multiplex e utiliza mais de 40 sondas, cada uma específica para uma sequência de DNA diferente (principalmente éxons de um gene específico de interesse) o que permite avaliar o número de cópias relativas de cada sequência de DNA (MENDES, 2012; DUTRA et al., 2012; TOPÁZIO, 2013).

No protocolo da MLPA observa-se uma desnaturação do DNA alvo, seguida por hibridização, amplificação por PCR e separação dos amplicons por eletroforese capilar. A comparação de sinais de fluorescência, apresentados em um gráfico com picos por um software de análise dos resultados, entre o DNA teste e um DNA controle permite quantificar as sequências de interesse na amostra de DNA. A técnica de MLPA é frequentemente aplicada para detectar variação no número de cópias, 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 (DUTRA et al., 2012).

A técnica de MLPA tem sido cada vez mais inserida nas rotinas dos laboratórios de diagnóstico genético para detecção de deleções e/ou duplicações em muitas doenças gênicas, e está sendo considerada como uma técnica informativa e inovadora, com muito potencial para conquistar novas abordagens. A técnica de MLPA é uma metodologia efetiva na detecção da deleção em 7q11.23 responsável pela SWB, fornecendo um

mapeamento preciso desta deleção na região crítica, quando comparado com a técnica de FISH. Um kit de reagentes para MLPA, específico para a SWB está disponível comercialmente. Esse kit é capaz de detectar deleções ou duplicações em um ou mais éxons dos genes presentes na região cromossômica crítica da SWB, tendo uma abrangência maior da região deletada, inclusive permitindo identificar os pontos de quebras da deleção (TOPÁZIO, 2013).

Adicionalmente, uma das principais áreas de aplicação desta tecnologia tem sido a investigação pós-natal de alterações no número de cópias subteloméricas em pacientes com atraso mental e outras anomalias do desenvolvimento, com uma taxa média de detecção de aproximadamente 8 a 11%. Também tem obtido sucesso no diagnóstico pré-natal de aneuploidias cromossômicas e no diagnóstico de síndromes de microdeleção /microduplicação recorrentes, tais como a síndrome de Williams-Beuren e a síndrome de DiGeorge, entre outras, substituindo gradualmente a análise de FISH convencional (MENDES, 2012).

É importante destacar que a MLPA também é capaz de quantificar a expressão gênica (RT-MLPA), detectar metilação no DNA (MS-MLPA) e realizar genotipagem de mutações pontuais/SNPs ou quaisquer rearranjos com essa sequência específica. Um total de até 96 amostras podem ser analisadas simultaneamente, estando os resultados disponíveis em 24 h, o que a torna uma técnica rápida e de elevado rendimento. Outras vantagens incluem o fato de ser muito sensível (apenas 20 ng de DNA são necessários para a análise), específica (pode ser utilizada para distinguir sequências que diferem em apenas um nucleotídeo), reproduzível, simples, fiável e de baixo custo quando comparada com outras tecnologias, como aCGH (do inglês, *array Comparative Genomic Hybridization*). Outra importante vantagem da MLPA é que os números de cópias podem ser determinados a partir de apenas uma única amostra de um indivíduo afetado. As desvantagens incluem, a incapacidade de detectar poliploidias e alterações estruturais cromossômicas equilibradas, bem como a contaminação celular materna em amostras femininas e o fato de apresentar uma baixa sensibilidade para mosaicismo (MENDES, 2012).

2.3.3. Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA)

A Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA) representa um método recente da citogenômica, que aumenta a resolução e detecta pequenas variações no número de cópias de algumas sequências cromossômicas, denominadas CNVs (do inglês, *Copy Number Variants*). Para a avaliação dos cromossomos humanos, a CMA usa o recurso de sondas desenhadas e constituídas de oligonucleotídeos contendo um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism*) para marcar as regiões clinicamente relevantes do genoma. Para a detecção de uma CNV, a sequência do DNA do paciente é comparada com a mesma sequência do genoma de referência. Os dados da CMA podem ser bastante informativos, permitindo alcançar o diagnóstico dos casos nos quais a condição genética seja causada por ganhos ou perdas de sequências cromossômicas (MILLER et al., 2010; CUNHA, 2015).

Os grandes avanços tecnológicos disponíveis para a investigação molecular dos genomas, por exemplo, os microarranjos de polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphism Array* – SNP-array), possibilitaram a identificação de polimorfismos em todo o genoma humano e não apenas em genes alvos. Isto permitiu estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide Association Studies* – GWAS), onde todo o genoma é analisado em vez de apenas regiões ou genes candidatos. Experimentos com microarranjos de DNA (SNP-array) permitiram a identificação de variações no número de cópias, incluindo deleções e duplicações (CUSCÓ et al., 2008; MILLER et al., 2010; COSTA, 2016).

A CMA oferece a capacidade para analisar todo o genoma humano com um único chip que possui uma resolução que é pelo menos 10 vezes maior do que a melhor análise cromossômica por bandeamento G. Atualmente é estabelecida como um primeiro teste da citogenômica para a detecção rápida e precisa de anomalias cromossômicas (MILLER et al., 2010; PINTO, 2015). Em geral, a utilização de microarranjos para análise de CNVs no DNA em pesquisas e como ferramenta para diagnóstico clínico em laboratórios, teve um grande impacto no campo da genética médica, permitindo esclarecer as relações genótipo-fenótipo em distúrbios conhecidos e para identificar novas síndromes (ZILINA et al., 2014).

Embora a matriz de hibridização genômica tenha sido amplamente utilizada para identificação de CNVs somáticas que são adquiridos no câncer, vários grupos têm agora utilizado esta tecnologia para estudos de CNVs constitucionais em pacientes com retardo mental idiopático (ZAHIR & FRIEDMAN, 2007). A avaliação laboratorial dos pacientes com retardo / deficiência de desenvolvimento intelectual (DD / DI), anomalias congênitas e características dismórficas mudou significativamente nos últimos anos com a introdução de tecnologias de microarranjos e polimorfismo de nucleotídeo único (MILLER et al., 2010; ZILINA et al., 2014). Com estes avanços, a CMA tem mostrado consistentemente um rendimento diagnóstico mais elevado do que o cariótipo convencional (MANNING & HUDGINS, 2010; CHONG et al., 2014).

Variantes estruturais, em conjunto com SNP e outras alterações de sequências pequenas, as CNVs correspondem como principais contribuintes para a variação genética entre os indivíduos. Embora as CNVs em algumas regiões do genoma não causem nenhuma consequência fenotípica óbvia, em outras regiões podem ter uma influência significativa, quer isoladamente ou em combinação com outros fatores genéticos ou ambientais. As contribuições das CNVs à variação ou doença fenotípica sugere-se que ocorram principalmente através da alteração de dosagem ou inativação de genes, modificando a regulação da expressão gênica, mesmo a grandes distâncias, ou desmascarando mutações recessivas sobre o outro alelo. Além disso, a variação genética estrutural normal poderia aumentar o risco de rearranjos secundários associados com doenças, quer somáticas, causando uma doença esporádica no indivíduo, ou na linhagem germinativa, predispondo a doença na descendência (CUSCÓ et al., 2008).

As CNVs são amplamente distribuídas, ocupando aproximadamente 30% do genoma humano, com mais de 100.000 identificadas, e são presentes em diferentes números de cópias entre os indivíduos, geralmente de 1 a 5 cópias. Contribuem para a variação genética e diversidade fenotípica em relação a evolução, suscetibilidade e etiologia de doenças individuais (COSTA, 2016).

As metodologias da citogenômica aumentaram a resolutividade do diagnóstico, pois alterações que afetavam a sequência do cromossomo na ordem de $\leq 5\text{Mb}$ passaram a ser observadas e sua relevância clínica pode ser caracterizada. Neste cenário, estudos recentes têm demonstrado o papel dos rearranjos cromossômicos subtelo méricos e submicroscópicos

para a elucidação dos agravos genéticos (GUITART-FELIUBADALÓ et al., 2006; CHAVES & NICOLAU, 2013; JACOBS, 2014; CUNHA, 2015).

Estudo realizado por Pinto e colaboradores (2014) com o uso da CMA permitiu a identificação de rearranjos genômicos em uma menina gravemente afetada com deficiência intelectual, anomalias congênitas múltiplas e dismorfologia intensa, apesar de apresentar seu cariótipo normal.

No entanto, a CMA possui algumas limitações, devido à natureza do rearranjo cromossômico. Em estudo realizado por Minasi e colaboradores (2015), a CMA identificou somente a microdeleção que compunha a maioria do mosaicismos no probando analisado. O ganho do cromossomo 13 isocêntrico e a monossomia do cromossomo 13 estavam ausentes na CMA devido suas limitações para a detecção de baixo nível de mosaicismos.

A utilização da análise por microarranjos une citogeneticistas e geneticistas moleculares com uma abordagem relativamente comum para resolver questões sobre o genoma. Anormalidades de tamanhos menores, semelhantes a duplicação de Xq22 na doença de Pelizaeus-Merzbacher ou as exclusões de 22q11 na síndrome velocardiofacial e 7q11.2 na síndrome de Williams-Beuren, podem ser mais rapidamente detectadas por tal abordagem (JACKSON, 2002).

Miller e colaboradores (2010) revisaram as evidências para a utilização da CMA e a definiram como um teste de primeira linha para a investigação de retardo/deficiência de desenvolvimento intelectual (DD/DI), anomalias congênitas múltiplas e desordens do espectro autista (DSA), baseado num estudo com 21.698 pacientes encaminhados para as indicações citadas anteriormente, no qual o rendimento do diagnóstico foi de 12,2% maior do que a de um cariótipo G de alta resolução (Tabela 4) (MANNING & HUDGINS, 2010).

Ao solicitar a CMA, o médico deve estar ciente das várias plataformas atualmente em uso e suas limitações. Deve também compreender que tipo de testes de acompanhamento serão realizados, e no qual, em caso de resultados anormais. Além disso, para deleções e duplicações, estudos parentais (por FISH ou preparações de metáfase) devem ser realizados para descartar a presença de algum rearranjo cromossômico, como uma inserção ou duplicação herdada. A CMA também não deve ser utilizada em casos de história familiar de rearranjo cromossômico em um indivíduo fenotipicamente normal ou

em casos de abortos múltiplos, lembrando que a CMA não pode detectar baixo nível de mosaicismos ou, em alguns arranjos, a poliploidia (MANNING & HUDGINS, 2010).

Tabela 4. Recomendações para CMA em pacientes com Retardo/Deficiência Intelectual, Transtornos do Espectro Autista, Anomalias Congênicas Múltiplas Não Explicadas (Fonte: Miller e colaboradores, 2010).

Recomendação para Plataforma CMA:

As normas para CMA não devem ser específicas para uma plataforma matriz específica. As matrizes baseadas em clones BAC, oligonucleotídeos longos ou SNP de detecção de oligonucleotídeos curtos pode alcançar a cobertura e resolução recomendados.

Recomendações para Cobertura da CMA e Densidade da Sonda:

1. A fim de realizar o mesmo propósito a que se destina como um cariótipo, CMA deve ter uma cobertura uniforme de detectar todas as áreas de desequilíbrio em uma resolução excede a de um cariótipo (~ 5 Mb). Atualmente, para detectar CNV recomendamos uma resolução de ≥ 400 kb em todo o genoma como um equilíbrio de sensibilidade analítica e clínica.
2. Para oligonucleotídeos e matrizes de SNP, sondas múltiplas consecutivas são necessárias para permitir que uma chamada seja feita, de modo que a matriz tem de ser concebida para incluir densidade de sonda suficiente para cada região de destino. Note-se que as matrizes de SNP podem exigir um maior número de sondas consecutivas para permitir uma ligação confiável.
3. Os laboratórios que escolherem adicionar sondas para cobrir loci de doenças mendelianas deve declarar explicitamente o desequilíbrio mínimo detectável e sensibilidade clínica do ensaio para cada doença em cada locus e apontar a disponibilidade de tecnologia baseada na sequência para a detecção de mutações que não sejam identificáveis por CMA.

Recomendações relacionadas a rearranjos equilibrados, Baixo Nível de Mosaicismo e história familiar conhecida, Anormalidades cromossômicas ou perda reprodutiva:

1. CMA pode detectar mais desequilíbrios genômicos patogênicos submicroscópicos que o número de rearranjos equilibrados que não consegue detectar. Citogeneticamente rearranjos equilibrados e baixo nível de mosaicismo, não seriam detectados pelo CMA, causando apenas uma pequena proporção de todos os casos não explicados de DD / DI, DSA e / ou ACM.
2. Cariotipagem G de alta resolução deve ser oferecido a pacientes com história familiar de um rearranjo cromossômico equilibrado, história de múltiplos abortos espontâneos, ou outras condições.

Recomendações para um banco de dados CMA:

1. Banco de dados CMA deve ser " plataforma neutra " e capaz de incorporar informações com base na posição cromossômica de acordo com o genoma humano (Hg) compilação
 2. Todos os dados brutos devem ser livremente acessíveis a todos os investigadores qualificados que se inscreverem com dbGaP pelo NCBI.
 3. Os dados da curadoria devem ser lançados publicamente em base trimestral e disponibilizados aos principais recursos genômicos e fornecedores comerciais, bem como indivíduos e laboratórios clínicos.
-

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Revisar as diversas abordagens metodológicas para o diagnóstico citogenético e molecular da Síndrome de Williams-Beuren, incluindo a evolução dos procedimentos laboratoriais.

3.2. Objetivos Específicos

- Apresentar pacientes com indicação e/ou suspeita clínica de SWB e DI encaminhados para o diagnóstico na rede pública de saúde do Estado de Goiás e Núcleo de Pesquisas Replicon;
- Descrever as principais alternativas para o diagnóstico da SWB, incluindo a citogenética clássica, FISH e CMA:
- Utilizar a técnica de CMA para analisar alterações genômicas em pacientes que apresentaram resultados sem alterações visíveis no cariótipo;
- Relatar a elucidação do diagnóstico genético de paciente com hipótese clínica para DI como um caso de Microduplicação na região 7q11.23.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular / Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (LaGene/LACEN/SES-GO) e no Núcleo de Pesquisas Replicon, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (NPR/PUC Goiás). A base de dados dos pacientes encaminhados ao LaGene/LACEN/SES-GO foi analisada, do período de 2004 a 2014, e 9 pacientes com indicação clínica para a SWB foram encontrados. Associado a este estudo o caso de um paciente com indicação clínica para DI que foi diagnosticado como um caso de microduplicação na região 7q11.23, totalizando 10 pacientes. O fluxograma de desenvolvimento das atividades deste estudo encontra-se demonstrado na Figura 7.

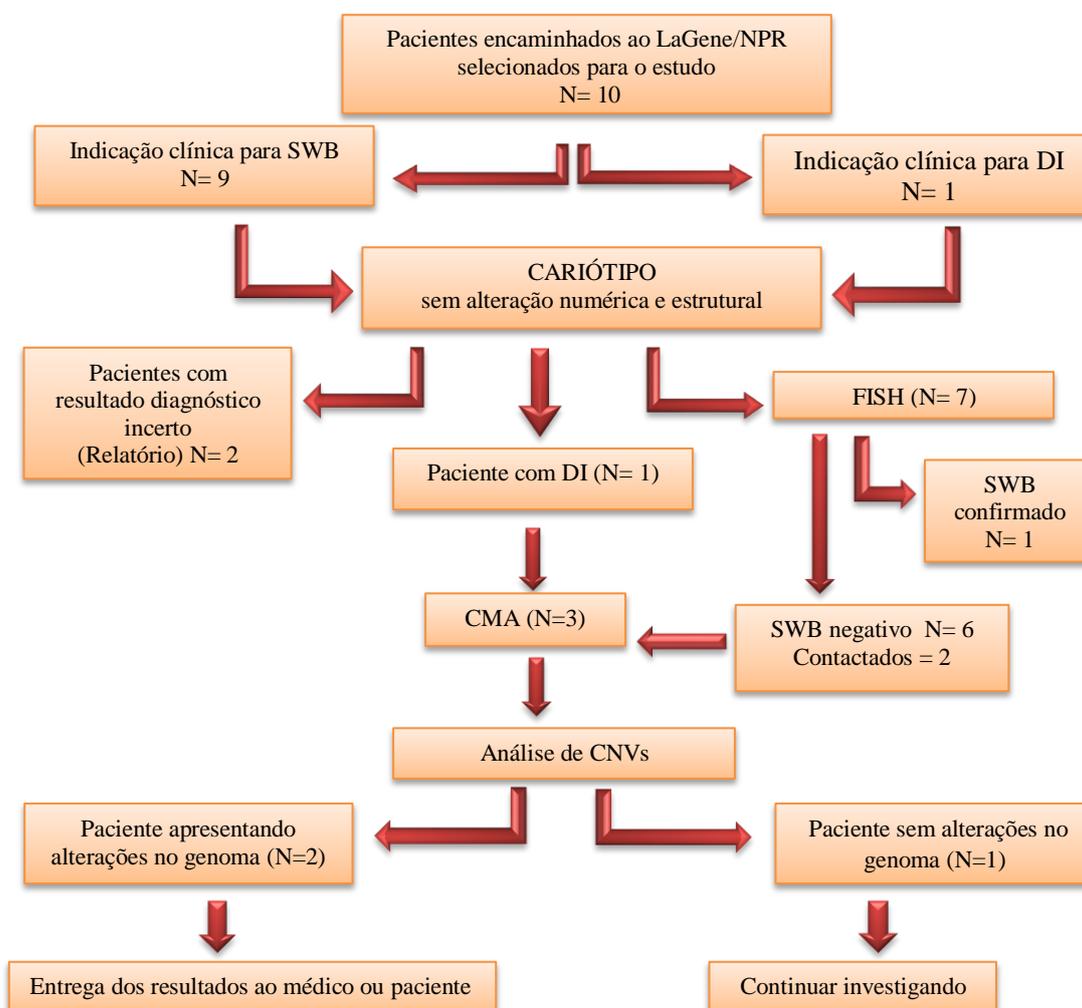


Figura 7: Fluxograma explicando as etapas de encaminhamento, análise, seleção e as técnicas de citogenética clássica e molecular utilizadas no referido estudo.

4.1. Casuística

Os 10 pacientes selecionados foram submetidos à realização do cariótipo, seguido de FISH e CMA, conforme o fluxograma anteriormente apresentado. Desta forma, os pacientes com suspeita clínica e resultados de cariótipo e FISH não conclusivos - negativos para a SWB, foram selecionados para participar do projeto.

Os pacientes e/ou seus responsáveis convidados que concordaram em participar, foram orientados sobre o desenvolvimento e objetivos do estudo e desta forma, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme apresentado no Anexo I. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Goiás, com o CAAE 0051.0.168.000-11.

Como critério de exclusão, os pacientes e/ou responsáveis que não assinaram o TCLE e/ou não foram contactados para a coleta de sangue foram excluídos deste estudo.

4.2. Coleta e realização das técnicas laboratoriais

As amostras de sangue periférico (5mL) foram obtidas por punção venosa utilizando seringa heparinizada para realização do cariótipo. Para a realização do CMA, uma segunda coleta de 5mL de sangue com EDTA foi realizada em outro momento, visando amostras para a obtenção do DNA. O sangue foi acondicionado em tubos tipo *ependorf* devidamente identificados. Posteriormente, as amostras de sangue periférico com EDTA foram armazenadas a -20°C para posterior isolamento e purificação do DNA.

4.3. Cariótipo com bandas G

As amostras de sangue heparinizado foram submetidas à cultura de linfócitos T a curto prazo, conforme protocolos convencionais para a obtenção de metáfases, (VERMA e BABU, 1995) conforme apresentado no Anexo II. Após a realização da cultura, a suspensão de células foi gotejada sobre vapor de banho-maria a 60°C, em lâminas limpas e desengorduradas. Para a realização do cariótipo com banda G (bandeamento GTG), as lâminas produzidas na cultura celular foram envelhecidas à temperatura ambiente por sete dias e posteriormente tratadas em solução de tripsina (Gibco/Invitrogen Corporation, Nova Zelândia) diluída em PBS (Laborclin, Brasil) a 0,25% e coradas em solução de giemsa a 4% (Gibco/Invitrogen Corporation, Nova Zelândia). Para a análise cromossômica, as

metáfases foram capturadas sob microscopia de luz branca com o auxílio de uma estação de cariotipagem contendo um microscópio Axioplan 2 Imaging® (Carl Zeiss, Alemanha) com platina motorizada controlada pelo Metafer® 3.4.0 (Metasystems Corporation, Alemanha) e analisadas com auxílio do software IKAROS® (Metasystems Corporation, Alemanha). Conforme as recomendações do Manual de Boas Práticas para os laboratórios de Citogenética do Brasil, publicado em 2004 pela Sociedade Brasileira de Genética, foram analisadas, no mínimo, 20 metáfases por paciente.

4.4. FISH (Hibridização *in situ* por fluorescência)

Os pacientes que exibiram cariótipo normal, as lâminas previamente preparadas durante a realização do cariótipo e que não foram utilizadas na análise citogenética clássica foram encaminhadas para a realização do FISH, conforme Anexo III. Dessa forma escolheu-se uma região na lâmina na qual se encontrava o material apropriado para a realização do teste. Preferencialmente, escolheu-se as regiões onde se encontravam vários núcleos interfásicos e/ou com metáfases bem espalhadas. A hibridização foi realizada em um hibridizador de lâminas (Hybrite®, Abbott Molecular, Estados Unidos da América) utilizando a sonda cromossômica VYSIS®. As imagens obtidas foram capturadas sob microscopia de epifluorescência com o auxílio de uma estação de cariotipagem contendo um microscópio Axioplan 2 Imaging® (Carl Zeiss, Alemanha), platina motorizada para escaneamento da lâmina e as imagens analisadas com auxílio do software ISIS® (Metasystems Corporation, Alemanha).

4.5. Extração e Quantificação das amostras de DNA

Para a realização da extração de DNA foi utilizado o kit de extração de DNA Illustra Blood GenomicPrep® Mini Kit (GE Healthcare, Reino Unido). Posteriormente a quantificação da concentração de DNA($\text{ng}/\mu\text{L}$) existente em cada amostra foi realizada pelo espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare, Reino Unido). Tanto a extração como a quantificação da concentração de DNA foram executados seguindo as orientações dos protocolos sugeridos por seus fabricantes conforme indicado no Anexo IV.

4.6. Análise Cromossômica por Microarranjo

A análise cromossômica por microarranjo (CMA) foi conduzida em um GeneChip CytoScan HD® (Affymetrix – Estados Unidos da América, EUA), uma matriz de genotipagem abrangente para o genoma humano. A matriz de genotipagem apresenta ampla cobertura do genoma e maior desempenho para a análise de alterações cromossômicas humanas, sendo capaz de detectar variações genéticas estruturais. O CytoScan HD® possui mais de 99% de sensibilidade na detecção de CNVs, determinação de perda de heterozigose (LOH) e baixos níveis de mosaicismos. A matriz do chip possui cerca de 2,6 milhões de cópias de marcadores, incluindo aproximadamente 750 mil SNPs e cerca de 2 milhões de sondas não polimórficas. As sondas que integram o chip apresentam tamanho de 25 pb.

4.6.1. Descrição do método de CMA

A metodologia consiste em um ensaio composto por múltiplas sondas de hibridização alelo-específicas que são complementares às regiões de SNP presentes na fração reduzida do genoma amplificado no ensaio (Anexo V). As sondas são constituídas de 25 oligonucleotídeos, com o SNP variável localizado no 13º nucleotídeo. Elas são redundantes e espalhadas ao longo do chip, para atenuar quaisquer efeitos da variação devido a localização física na matriz. Cada sonda tem uma localização fixa no arranjo do chip.

A metodologia se iniciou com uma digestão do DNA amostral com uma enzima de restrição (*NspI*) fornecida pelo fabricante. Este passo requer aproximadamente 250 ng de DNA. Em seguida, o DNA digerido foi ligado a adaptadores específicos e, posteriormente, amplificados por PCR, mediante o uso de *primers* universais. O DNA fragmentado por digestão enzimática e amplificado foi marcado com biotina e hibridado no GeneChip® HD por 18 horas. Após a hibridização, os chips foram digitalizados no GeneChip® Scanner 3.000 7G (Affymetrix, EUA). Ao final da digitalização, os sinais luminosos foram lidos e capturados pelo software Array GeneChip® Command Console® (AGCC®, Affymetrix, EUA) gerando arquivos .CEL, e as análises dos dados foram realizadas pelo software Chromosome Analysis Suite® 2.0 (ChAS®, Affymetrix, EUA). Os arquivos .CEL obtidos pelo escaneamento dos chips foram usados para estabelecer os genótipos dos SNPs

contidos nas CNVs. As duas principais métricas de controle de qualidade do GeneChip™ HD array foram *Median Absolute Pairwise Difference* (MAPD), escore aplicado para marcadores de número de cópias. Para o cenário do presente estudo foram usados os parâmetros de MAPD ≤ 0.25

4.6.2. Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs

A grande quantidade de informações disponibilizadas pelo uso do GeneChip® HD faz necessário realizar análises complexas para o tratamento dos dados e obtenção de um resultado fidedigno. Para executar essa etapa, as análises genéticas e citogenéticas dos resultados fornecidos foram executadas no Software Chas®. Com o uso deste software, foi possível investigar alterações estruturais ao longo do genoma e identificar variações no número de cópias, perdas de heterozigose (LOH) de segmentos de DNA de regiões gênicas presentes nas amostras estudadas, auxiliando as interpretações dos resultados.

4.6.3. Busca de alterações e Interpretação das CNVs

Na tentativa de explicar o fenótipo dos pacientes, a CMA foi realizada nos pacientes, com o objetivo de se identificar a presença de CNVs, regiões de LOH, duplicações e deleções em regiões do DNA. Para a análise das CNVs foi empregada uma estratégia que permitiu a identificação de CNV, cujos filtros foram estabelecidos para regiões contendo 50 marcadores para ganho e 25 marcadores para perda.

As CNVs encontradas foram confrontadas com bases de dados de controles saudáveis, incluindo o DGV do inglês *Database of Genomic Variants* – Banco de Dados de Variantes Genômicas, encontrado em <http://projects.tcag.ca/variationand>, a base de dados do CytoScan HD, fornecida pela Affymetrix e a base de dados de síndromes genéticas conhecidas como o DECIPHER do inglês *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensemble Resources* – Banco de Dados de Imbalances Cromossômicos e Fenótipos em Humanos usando Recursos Ensemble, disponível em <https://decipher.sanger.ac.uk>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo apresenta os resultados da análise citogenética dos pacientes encaminhados ao LaGene/LACEN/SES-GO e NPR/PUC, no período de 2004 a 2014, com indicação clínica para a SWB. Ainda fez parte deste estudo, um único paciente com indicação clínica para DI e diagnosticado por CMA com uma microduplicação na região 7q11.23.

Dos 10 pacientes encaminhados ao NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO, apenas um caso obteve o diagnóstico positivo para a SWB, pela técnica de FISH, demonstrando a deleção de 7q11.23. Outro paciente foi diagnosticado, pela técnica da CMA, com a Síndrome da duplicação na região de Williams-Beuren, apresentando uma microduplicação na região 7q11.23. Dos 8 pacientes restantes, em apenas dois casos obteve-se êxito na comunicação e posterior concordância em participar deste estudo. Destes pacientes, um exibiu resultados do cariótipo, FISH e CMA normais e o outro paciente exibiu os resultados do cariótipo e FISH normais e resultado de CMA com regiões ricas em longos trechos contínuos de homozigose (LCSH). No conjunto de 6 pacientes restantes com suspeita de SWB com cariótipo e FISH normais, não foi possível a realização da segunda coleta de sangue para a realização do CMA, pois não conseguimos efetuar a comunicação. Observamos que os dados de telefone e endereço dos pacientes mudam constantemente, o que dificultou bastante a tentativa de comunicação com os seus responsáveis. Na Tabela 5 estão organizadas as características gerais dos pacientes que fizeram parte deste estudo.

Tabela 5. Características gerais dos pacientes participantes deste estudo.

Casos	Sexo	Idade	Cariótipo	FISH	CMA
Paciente 1	F	5a7m	sem alteração	Deleção em 7q11.23	-
Paciente 2	M	16a	sem alteração	sem alteração	microduplicação em 7q11.23
Paciente 3	F	17a7m	sem alteração	sem alteração	regiões de LCSH
Paciente 4	M	10a3m	sem alteração	sem alteração	sem alteração

Na tentativa de investigar as possíveis causas que poderiam esclarecer a relação genótipo- fenótipo dos indivíduos participantes deste estudo, a tecnologia de alta densidade do CMA foi utilizada para detectar CNVs, microduplicações e microdeleções. A Figura 8 (Anexo VI) demonstra a interface do Software Chas® contendo os resultados genômicos destes pacientes. Os 4 casos foram apresentados na forma de relato de caso.

Paciente 1

Criança do sexo feminino. Filha de casal não consanguíneo, com 5 anos e 7 meses quando atendida no LaGene e o TCLE assinado. Apresentava peso de 18,2 Kg e altura 1,11 m. Encaminhada pela médica por indicação clínica para a síndrome de Williams-Beuren. A mãe relatou que a paciente não fazia uso de medicamento. Família sem história médica relevante. Os pais declararam não serem tabagistas nem etilistas. A Figura 9 apresenta as características da face e mão da paciente 1 e as imagens dos resultados de cariótipo e FISH.

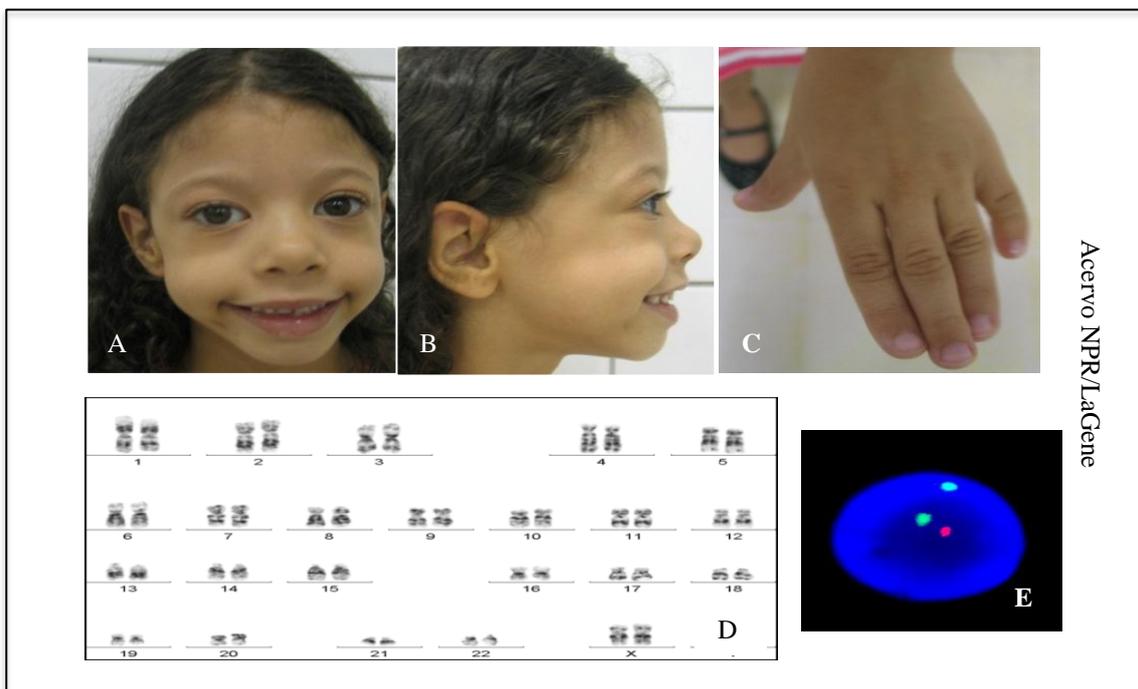


Figura 9. Paciente 1 atendida no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação para SWB. [A] Aspecto facial caracterizado pela presença de bochechas proeminentes, filtro nasal longo e boca grande com lábios volumosos, má formação da arcada dentária; [B] Baixa implantação da orelha; [C] Alterações musculoesqueléticas na mão esquerda; [D] Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; [E] resultado de FISH indicando a presença de dois sinais verdes para a sonda controle de hibridação e um sinal vermelho caracterizando a deleção em 7q11.23.

Na interpretação dos resultados do FISH a presença de somente um sinal fluorescente vermelho em 7q11.23 e dois sinais fluorescentes verdes (controle para cromossomo 7) indica a deleção do gene da elastina em um dos cromossomos 7, confirmando o diagnóstico de síndrome de Williams-Beuren.

A insuficiência ou anormalidade do gene da elastina (*ELN*) tipicamente resulta em estenose aórtica supravalvular (EASV), o que pode ocorrer como um traço isolado de dominância autossômica, ou como parte de um padrão principal de problemas, como na SWB. Estudos genéticos mostraram que a estenose aórtica supravalvular isolada associa-se a mutações intragênicas no gene da elastina, enquanto que a SWB envolve deleção do gene da elastina na sua totalidade. Indivíduos com EASV isolada podem ter envelhecimento precoce da pele e características faciais similares às daquelas dos pacientes com SWB, mas não apresentam as anormalidades comportamentais e do desenvolvimento neurológico associadas com a síndrome (SCHUBERT, 2009; SOUZA, 2013).

Estudo realizado com uma família com EASV de caráter autossômico dominante, identificou uma translocação t(6;7)(p21.1;q11.23) que causava a ruptura do gene da elastina, diminuindo a expressão da proteína no tecido vascular, influenciando a elasticidade dos vasos sanguíneos, pulmões, intestino e pele (MEDINA, 2014).

Li e colaboradores (2015) em estudo por CMA, encontraram deleções do gene *ELN* em 7 pacientes (dos 10 estudados), e entre eles, 5 pacientes apresentaram deleções típicas SWB (1,40-1,55 Mb), e os outros 2 pacientes apresentaram deleções atípicas maiores (4,16 Mb e 9,88 Mb). Sete de 10 indivíduos afetados demonstraram características típicas da SWB, incluindo SVAS, fâcies distintas e atraso no desenvolvimento.

Anomalias dentárias são freqüentes nos pacientes com SWB, principalmente nos com microdeleção. Compatível com a literatura, estudo relatado por Souza (2003) demonstrou que as anomalias dentárias estiveram presentes na maioria dos pacientes com microdeleção (10/15) e sem microdeleção (2/3), sendo representada principalmente por má-oclusão de arcada dentária.

Sugayama e colaboradores (2003) desenvolveram um estudo com 20 pacientes com SWB, diagnosticados por FISH, que apresentou achados semelhantes aos encontrados na Paciente 1, como fronte alargada, ponte nasal baixa, nariz curto e arrebitado, filtro nasal longo, bochechas proeminentes, lábios espessos, boca grande e queixo pequeno, dentes

pequenos ou ausência de alguns, mau fechamento da arcada dentária, hipoplasia do esmalte e alterações na posição dos dentes.

A importância da técnica de FISH no diagnóstico da SWB, confirmando a microdeleção foi destacada no trabalho de Lowery et al., (1995), um dos clássicos da literatura. Os autores estudaram 235 pacientes subdivididos em 4 grupos. A microdeleção foi observada em 96% (110/114) dos pacientes com fenótipo clássico da SWB, 8% (3/39) dos pacientes com quadro atípico, 60% (25/42) dos que não tinham informação clínica e 38% (15/25) dos pacientes com suspeita citogenética.

O gene da elastina expressa-se em tecido conjuntivo, pode explicar a ocorrência de hérnias, envelhecimento de pele e alguns dimorfismos faciais na SWB, mas não é o único responsável pelas manifestações da SWB, que é considerada uma síndrome de genes contíguos (LI et al., 2015, SOUZA, 2003). Foram propostas possíveis contribuições fenotípicas da hemizigose de outros seis genes da região crítica da SWB (genes *LIMK1*, *CYLN2*, *GTF2I*, *GTF2IRD1*, *RFC2* e *STX1A*), apesar de ainda não ser clara essa relação (POBER, 2010). Até o momento, não há estudos que indiquem as contribuições dos outros genes envolvidos na deleção típica desta síndrome (TOPÁZIO, 2013).

O gene *LIMK1* pertence a uma família de proteína quinase envolvida no desenvolvimento do cérebro, sendo o segundo gene mais frequentemente deletado nos pacientes com SWB. Estudos *in vivo* demonstraram que a *LIMK1* está localizada na sinapse neuromuscular, sugerindo que *LIMK1* pode desempenhar um papel na formação e manutenção da sinapse (MEDINA, 2014). A criança com SWB tem incapacidade de reproduzir visualmente objetos, pois apresenta deficiência de cognição construtiva visuo-espacial e suspeita-se que *LIMK1* contribui para esta característica, com bases em relatos de crianças afetadas por EASV isolada e deleção parcial da região de SWB compreendendo apenas os genes *ELN* e *LIMK1* (SCHUBERT, 2009).

A deleção do gene *LIMK1* tem sido implicada na deficiência de integração visual-espacial, que é uma característica marcante na SWB, mas atualmente esta possibilidade é questionada, pois foram identificados vários casos de deleção do *LIMK1* sem deficiência visual-espacial e assim considera-se mais provável que a função visual-espacial não dependa de um único gene e sim de combinações gênicas específicas (SOUZA, 2013).

O gene *CLIP2/CYLN2* codifica uma proteína de ligação intracelular (CLIP-170), também chamada de restina, que é abundantemente expressa no cérebro e media interações entre organelas celulares e microtúbulos (POBER, 2010). A haploinsuficiência desse gene pode explicar as disfunções cerebelares e hipocampais envolvendo as características motoras e cognitivas em pacientes com SWB. Pacientes com deleções parciais da região SWB que não incluem o gene *CLIP2* exibem deficiência leve no aspecto visual-espacial e coordenação motora (SOUZA, 2013).

Vanderweyer et al.,(2012) relatou o caso de dois irmãos que apresentavam a deleção hemizigótica do gene *CLIP2*, sendo que um dos irmãos possuía adicionalmente uma microduplicação 16p11.2. Os fenótipos clínicos apresentados por este paciente como desenvolvimento do atraso global, microcefalia, fissuras palpebrais longas, uma ponte nasal alta e um proeminente lábio inferior invertido foram posteriormente explicados pela presença da microduplicação *de novo* 16p11.2. Este estudo sugere que apenas a haploinsuficiência de *CLIP2* não pode ocasionar a patologia e o perfil cognitivo observado na SWB. Os autores em concordância com os resultados da literatura sugerem que a deleção de *CLIP2* contribui para a manifestação clínica da SWB quando associada com um ou mais genes adicionais, como *GTF2I* e *GTF2IRD1* que são relacionados com aspectos visuais-espaciais e déficit cognitivo na SWB.

Os genes *GTF2IRD1* e *GTF2I* pertencem à família do fator de transcrição TFII-I que se liga aos elementos dos genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação. O gene *GTF2I* é o mais telomérico da região crítica da SWB e codifica o TFII-I, um fator de transcrição que está envolvido na desacetilação de histonas e remodelamento da estrutura da cromatina. TFII-I é amplamente expresso, mas sua função pode ser sensível a dosagem em certos tecidos tais como o cérebro.

Palmer et al., (2010) demonstraram a existência de um mecanismo autorregulador negativo que controla o nível de transcrição de *GTF2IRD1* através de ligação direta da proteína GTF2IRD1 a uma região altamente conservada do promotor *GTF2IRD1*, sugerindo que o comportamento cinético de genes envolvidos na regulação da transcrição representa uma consideração importante para a compreensão de redes de genes de regulação, e ainda, pode revelar-se uma parte essencial da função de *GTF2IRD1*.

O gene *GTF2IRD1* durante o desenvolvimento é predominantemente expresso nos tecidos musculoesqueléticos e craniofaciais (SCHUBERT, 2009; POBER, 2010). Análises de fenótipos dos pacientes com deleções parciais da região SWB sugerem que *GTF2IRD1* e *GTF2I* têm sobreposição nas suas funções e podem contribuir para algumas das características craniofaciais, incluindo déficit intelectual e perfil cognitivo comportamental, como as habilidades visual-espaciais, cognição e hipersociabilidade (ANTONELL et al, 2010; SOUZA, 2013).

Dai et al., (2009) analisaram o comportamento genético, cognitivo e social em um indivíduo com características da SWB (defeitos cardíacos, deficiência visual-espacial, baixa estatura e fâcias dismórficas) que possuía uma deleção atípica de um conjunto de genes que inclui *GTF2IRD1*, mas não *GTF2I*. Os resultados combinam com dados da literatura em que microdeleções contendo *GTF2IRD1* estão associadas com defeitos visuais-espaciais e fâcias dismórficas, e que *GTF2I* pode contribuir para o fenótipo hipersocial e defeitos cognitivos gerais da SWB. Resultados semelhantes foram descritos por Howard et al., (2012), onde a insuficiência da proteína GTF2IRD1 contribuiu para o desenvolvimento de anormalidades faciais, transtornos comportamentais específicas e ainda deficiência na função motora.

Crespi & Hurd (2014) genotiparam 488 indivíduos saudáveis para dois SNPs no gene *GTF2I*, associando este gene ao desenvolvimento de fenótipos sociais da SWB já relatados na literatura. Esta descoberta implica a importância do gene *GTF2I* na base neurogenética da comunicação e ansiedade social, tanto na Síndrome de Williams-Beuren como entre os indivíduos saudáveis.

A hemizigidade de *STX1A* (gene da syntaxina 1A), que codifica uma proteína específica do cérebro essencial para a liberação dos neurotransmissores das vesículas sinápticas, pode contribuir com a memória auditiva aprimorada documentada em alguns indivíduos com SWB. Outra possível contribuição fenotípica desse gene são os prejuízos de tolerância a glicose, vistos em casos de SWB (POBER, 2010; TOPÁZIO, 2013). Um estudo realizado em 65 pacientes com SWB demonstraram que uma variação nos níveis de transcrição do gene *STX1A* pode estar relacionada significativamente com a determinação de inteligência desses pacientes (SOUZA, 2013).

Subunidade do fator de replicação C, *RFC2* desempenha função essencial na replicação dos cromossomos em células eucarióticas. Quando ligado ao DNA, o complexo RFC organiza várias proteínas envolvidas na replicação, reparação, modificação do DNA e modelagem da cromatina. A linhagem celular derivada dos pacientes com SWB exibem um defeito na sinalização da ATR (*ataxia telangiectasia e RAD3*) ativas, similar a outras síndromes com defeito a resposta de reparo do DNA. As características clínicas desse grupo de doenças incluem microcefalia, déficit de crescimento, as quais são comuns na SWB. Desta forma, um defeito na sinalização da ATR na SWB pode ser responsável pela microcefalia e deficiência de crescimento, os quais são tipicamente vistos na resposta aos danos e reparos do DNA em síndromes de deficiência (SOUZA, 2013; TOPÁZIO, 2013).

Paciente 2

Adolescente do sexo masculino, com 16 anos de idade quando da assinatura do TCLE pelo seu responsável. Segundo relato do responsável, o paciente é filho de pais não consanguíneos, possui uma irmã mais jovem que não manifesta sinais clínicos de SWB e de nenhuma outra condição resultante de alterações genéticas.

O paciente apresenta dismorfismos faciais leves, atraso no desenvolvimento motor, na fala e problemas de linguagem expressiva, conforme indicado na Figura 10. Apresenta 1,69 metros de altura e peso de 83 Kg.

Para o encaminhamento ao NPR/PUC Goiás e LaGene/LACEN/SES-GO, o médico relatou a indicação clínica para deficiência intelectual (DI) moderado. Na entrevista os responsáveis informaram o uso do medicamento anticonvulsivante Topiramato pelo paciente. A mãe do paciente apresenta alteração morfológica congênita nos pés, é diabética insulina-dependente (Diabetes tipo I) e possui hipotireoidismo.

A gestação durou 36 semanas, em que a mãe fez uso do medicamento Buscopan para enjoo, do 6º mês em diante. O parto foi por cesariana, pois teve pré-eclâmpsia. O paciente nasceu com 3,45 Kg, medindo 49 cm, apresentando choro e sucção normais e um princípio de icterícia. Os progenitores relataram não serem etilistas, nem tabagistas e não fazerem uso de drogas ilícitas.

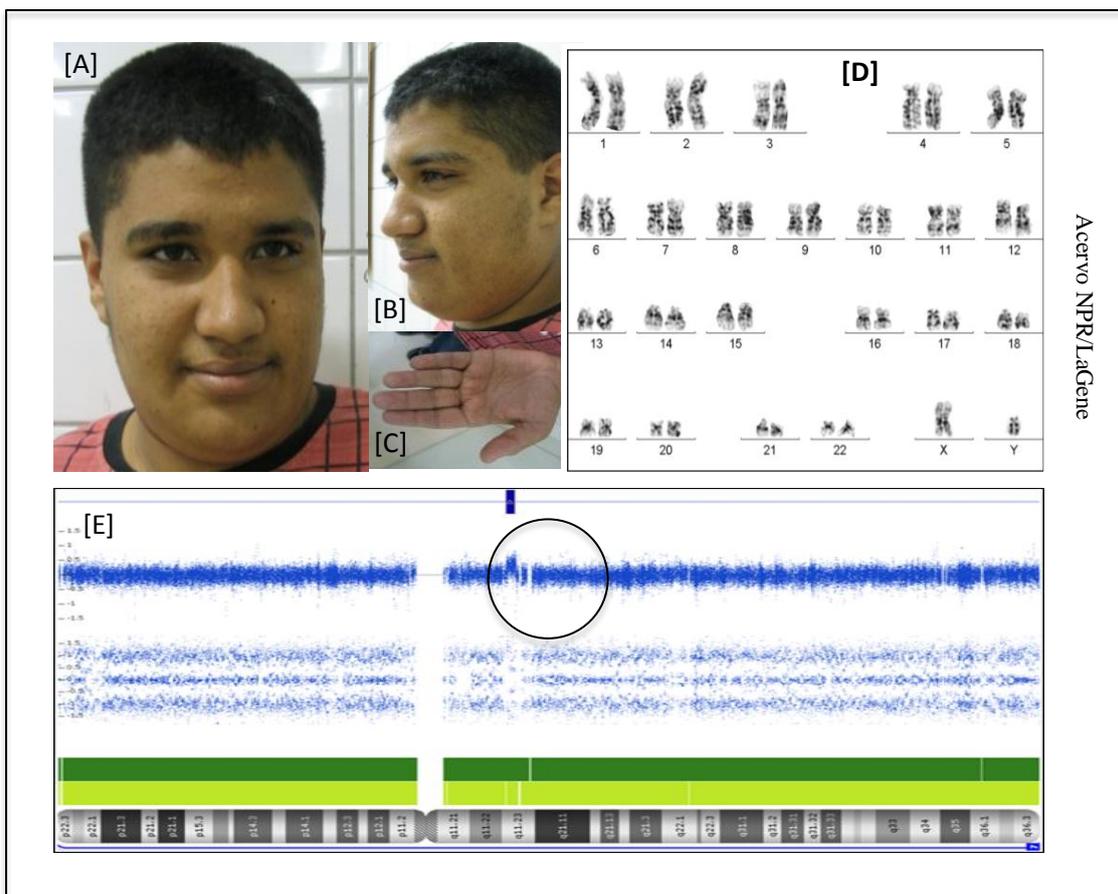


Figura 10: Paciente 2. Atendido no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação clínica de DI. [A] e [B]: Aspectos faciais; dismorfismos faciais suaves com testa larga, nariz alto e largo, filtro curto, sobrancelhas retas; [C] Mão comprida com dedos longos; [D] Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; [E] imagem da CMA mostrando a duplicação da região 7q11.23 (destaque no círculo).

A CMA detectou um desequilíbrio genômico que corresponde a Síndrome da Duplicação na região de Williams-Beuren (OMIN 609757), uma microduplicação *de novo*, sem mosaicismo, de 1,428.9 Kpb envolvendo a região 7q11.23. Esta região cromossômica abrange mais de 28 genes descritos (*NSUN5*, *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9*, *BAZ1B*, *BCL7B*, *TBL2*, *MLXIPL*, *VPS37D*, *DNAJC30*, *WBSCR22*, *STX1A*, *MIR4284*, *ABHD11-AS1*, *ABHD11*, *CLDN3*, *CLDN4*, *WBSC*, *R27*, *WBSCR28*, *ELN*, *LIMK1*, *EIF4H*, *MIR590*, *LAT2*, *RFC2*, *CLIP2*, *GTF2IRD1*, *GTF2I*), mas que apresentam a relação genótipo-fenótipo para SWB não totalmente esclarecida.

A duplicação na região 7q11.23 está associada a alterações neurocognitivas e comprometimento comportamental, especificamente, deficiência intelectual. Muitos pacientes têm déficit cognitivo variando de retardo mental leve ao autismo, embora alguns

possam ter habilidades cognitivas normais. Este transtorno do desenvolvimento em particular mostra manifestações clínicas variáveis atraso da fala e anomalias craniofaciais leves. Este caso foi relatado por Pinto e colaboradores (2015).

O fenótipo dos pacientes com SWB que possuem duplicação ou deleção é bastante variável. A literatura sugere que casos de duplicação apresentam fenótipos mais leves, menos severos que nas deleções. Estudo desenvolvido por Guemann et al., (2015) relatou uma triplicação 7q11.23 familiar (11/17) incluindo os genes *ELN* e *LIMK1*. As variáveis fenotípicas incluíram esclerose tuberosa (2/17), encefalopatia severa (1/17) e aneurisma aórtico supra-avalvular (10/17). A haploinsuficiência de *ELN* está associada com fenótipo mais grave do que na duplicação da região 7q11.23, enquanto que *LIM*-quinase desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso, o que o relaciona a explicar a hipersensibilidade a sons, hiperacusia e fonofobia observada na SWB. Neste estudo sugeriu-se que o excesso de elastina pode ser responsável por perda da resistência das fibras elásticas ao estresse hemodinâmico. Analisando a importância da pressão arterial poderia explicar a recorrência dos aneurismas da aorta nesta família.

A presença de somente uma cópia, de cada gene da região cromossômica da SWB deve reduzir a expressão das proteínas codificadas pela metade. Embora dados empíricos confirmem que isso ocorre com a maioria dos genes, existem exceções tecido-específicas, tais como o gene *GTF2IRD1*. Além disso, muitos genes não deletados que flanqueiam a região cromossômica da SWB, inesperadamente, exibem expressão diminuída, possivelmente devido a efeito de posição (POBER, 2010; TOPÁZIO, 2013). Uma expressão alterada de genes também foi observada num estudo com pacientes que apresentavam duplicações dentro da região crítica SWB. A análise da expressão gênica revelou um aumento para *GTF2I*, *LIMK1*, *EIF4H*, *RFC2*, *BAZ1B*, exceto para *LAT2* (SCHUBERT, 2009).

Sanders e colaboradores (2011) relataram em seu estudo uma importante associação das Desordens do Espectro Autista (ASD) com duplicações *de novo* da região 7q11.23. Foram analisadas as CNVs de 4.457 indivíduos (1174 famílias). Os resultados mostraram uma associação significativa de ASD com duplicações *de novo* na região 7q11.23, onde a deleção recíproca causa a síndrome de Williams-Beuren, com uma personalidade altamente social.

A prevalência de microduplicações é apenas metade de microdeleções (DUTRA et al., 2012). Fenótipos encontrados em pacientes com microduplicações 7q11.23 são mais leves, mais variáveis, e afetam o paciente de formas diferentes, como um nariz largo, com filtro curto, atraso na fala e déficits na capacidade de interação social. As características de microduplicação na SWB são tão variáveis que a doença muitas vezes não é diagnosticada (LI et al., 2015).

O primeiro caso de microduplicação da região 7q11.23, foi relatado por Somerville et al. (2005) em que o fenótipo mais marcante foi um atraso grave em linguagem expressiva, em contraste com a articulação normal e linguagem fluente e expressiva observada em pessoas com SWB. Os resultados sugerem que os genes específicos em 7q11.23 são extremamente sensíveis a alterações na dosagem, originadas por deleções ou duplicações e que podem influenciar o desenvolvimento da linguagem humana e da capacidade visuo-espacial.

Van Der e colaboradores (2009) apresentaram 14 casos de microduplicações 7q11.23, sendo 9 herdadas e 5 *de novo*, em que o retardo mental idiopático (RMI) demonstrou-se marcante entre os pacientes. A detecção foi pela técnica MLPA baseada em Arrays. Os resultados demonstraram associação com o autismo em cinco pacientes e em um pai que também carrega a duplicação. Houve um aumento da incidência de hipotonia e anomalias congênitas como defeitos cardíacos, hérnia diafragmática, criptorquidia e anormalidades cerebrais não específicas sobre RMI. Características dismórficas específicas foram observadas, incluindo filtro curto, lábios finos e sobrancelhas retas. Estes achados demonstram que a microduplicação 7q11.23 está relacionada a atraso de linguagem, anomalias congênitas e características faciais reconhecíveis.

Em geral, a duplicação parece ser menos prejudicial do que a deleção, porque a duplicação de um gameta resulta em desequilíbrio cromossômico (trissomia parcial), e porque as quebras cromossômicas geradas podem perturbar genes, muitas vezes levando a alguma anormalidade fenotípica (JACKSON, 2002).

Paciente 3

Adolescente do sexo feminino com 17 anos e 7 meses quando assinado o TCLE (Figura 11). Filha de casal não consanguíneo, possuía 1,54 m de altura e pesava 35 Kg. Família com história médica relevante; do lado materno, um tio com glaucoma e outro com surdez adquirida na adolescência e um primo com 12 anos de idade que possui atraso na fala. Do lado paterno, uma prima com transtorno mental. Gestação foi tranquila, apenas no 8º mês a mãe sofreu uma queda. Parto normal de 37 semanas, ao nascer a paciente teve sopro no coração e sintomas de icterícia. Foi relatado pela mãe que a pediatra não solicitou o exame “Teste do pezinho”. O sopro no coração foi tratado aos 2 anos de idade, desde então não teve mais sintomas. A paciente teve atraso no desenvolvimento motor e da fala, sentou com 1 ano e 7 meses e falou com quase 2 anos. Atualmente a paciente é acompanhada por psicóloga, faz uso do medicamento antidepressivo Certraline e frequenta a instituição APAE (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais) duas vezes por semana para auxiliar no desenvolvimento físico. Os pais não são etilistas, entretanto o pai foi tabagista por mais de dez anos.

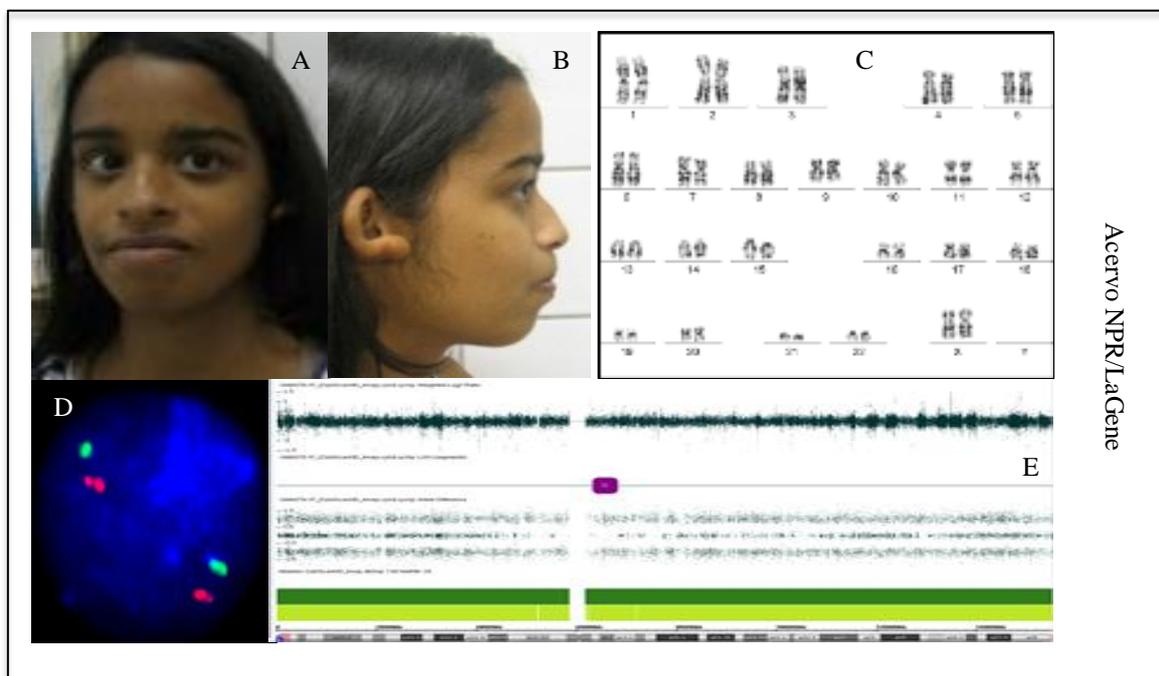


Figura 11: Paciente 3: Atendida no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação clínica para SWB. A: aspectos faciais com testa curta, ponte nasal larga, sobrancelhas retas; B: baixa implantação da orelha; C: Notação cariotípica 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; D: resultado de FISH demonstrando a presença de dois sinais verdes para a sonda controle de hibridação e dois sinais vermelhos para o gene *ELN* caracterizando FISH negativo para SWB; E: imagem da CMA mostrando as LSCS no cromossomo X (em roxo).

A análise da CMA mostrou longos trechos contínuos de homozigose (LCSH) de significado clínico incerto, contendo 6.526,46 Kbp e localizada na região Xq11.1q13.1. Neste intervalo estão os genes *SPIN4*, *LOC92249*, *MIR1468*, *AMER1*, *ASB12*, *MTMR8*, *ZC3HT2B*, *LAS1L*, *FRMD8P1*, *MSN*, *MIR223*, *VSIG4*, *HEPH*, *EDA2R*, *AR*, *YIPF6*, *STARD8*, *EFNB1*, *PJAI*, *ARHGEF9*, *ZC4H2*, *OPHN1*.

Regiões de LCSH não são reportadas como uma variação comum na população em geral, desta forma, o resultado do diagnóstico não é totalmente conclusivo. Uma pesquisa na literatura relata que alguns dos genes envolvidos nesta região da LCSH estão relacionados com epilepsia, ansiedade, perfil agressivo e retardo mental (KALSCHEUER et al., 2009, SHIMOJIMA et al., 2011; LESCA et al., 2011). Outros autores citam o retardo mental ligado ao cromossomo X (AL-OWAIN et al., 2011; BARRESI et al., 2014).

Num estudo desenvolvido por Zilina e colaboradores (2014), foram encontrados em seus resultados trechos de homozigose maiores que 5 Mb, caracterizando regiões de LCSH que foram classificadas como significado clínico incerto. Bareto e colaboradores (2015) selecionaram seus casos para o estudo excluindo pacientes que apresentaram resultados contendo regiões de LOH (longos trechos de homozigose) devido às incertezas que envolvem esta região. Enfatizando que resultados contendo LOH necessitam da realização de outros testes moleculares (sequenciamento gênico, principalmente), para confirmar a maioria das hipóteses geralmente relacionadas a presença de mutação pontual recessiva em algum gene crítico da região homozigota.

Paciente 4

Paciente do sexo masculino, com 10 anos e 3 meses quando assinado o TCLE (Figura 12). Filho único de pais não consanguíneos, não foi relatado seu peso e altura. História familiar relevante: o paciente possui duas tias por parte de pai que são epiléticas e uma prima que nasceu com hidrocefalia. A gestação durou 9 meses e ocorreu sem intercorrências. O paciente nasceu com 2,8 Kg e medindo 49 cm. A mãe relatou que o paciente fez uso de medicação anticonvulsivante até os 6 anos de idade e que apresentava constantemente muita febre. Atualmente realiza atividades físicas para o fortalecimento muscular, pois o mesmo reclamava de dores nas pernas. Ortopedista diagnosticou estrutura

óssea normal, mas com pouca massa muscular. Os pais não são tabagistas mas consomem bebida alcoólica eventualmente.

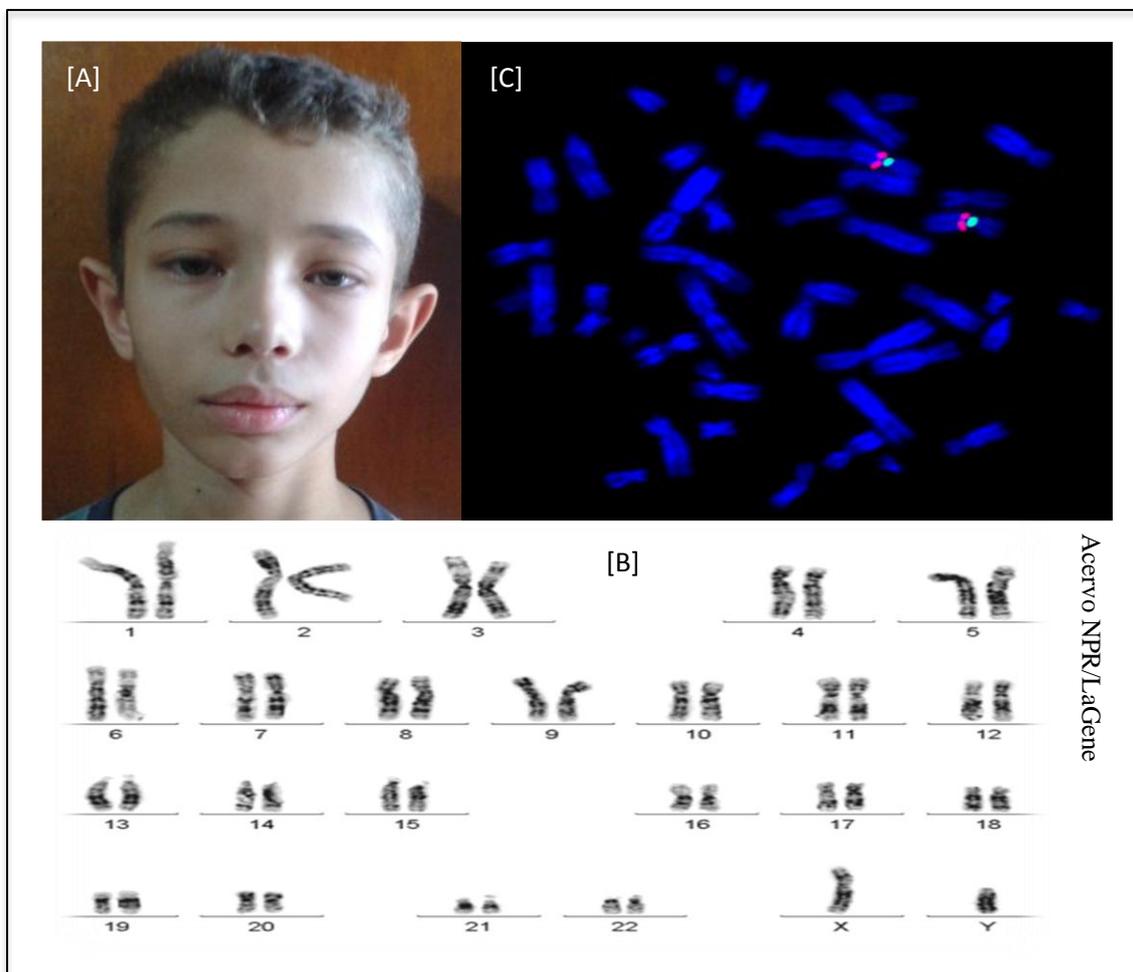


Figura 12: Paciente 4. Atendido no NPR/PUC e LaGene/LACEN/SES-GO com indicação clínica para SWB. [A] aspectos faciais com testa pequena, ponte nasal fina, queixo alongado, orelhas com otoplastia; [B] Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfases analisadas; [C] resultado de FISH demonstrando a presença de dois sinais fluorescentes verdes - sonda controle de hibridização no cromossomo 7 e dois sinais fluorescentes vermelhos (7q11.23) caracterizando FISH negativo para SWB.

A CMA deste paciente não revelou nenhuma CNV (microduplicação e/ou microdeleção) ou grandes regiões de homozigose clinicamente relevantes encontradas na população em geral. Dos quatro casos analisados neste estudo, este paciente foi o que apresentou a maior discordância entre a hipótese clínica e o resultado diagnóstico.

Com o uso das técnicas citomoleculares de FISH e CMA foi possível identificar alterações genéticas em $\approx 50\%$ (2/4) dos pacientes pertencentes a este estudo. Foi encontrado um caso de SWB, pela haploinsuficiência do gene da elastina e um caso de

microduplicação na região 7q11.23. Os outros resultados demonstraram longos trechos de homozigose (LCSH) de significado clínico incerto e ainda a ausência de CNVs de significado clínico relevantes.

Estudos recentes têm sugerido que, associados aos genes deletados, vários fatores, tais como os efeitos do tamanho e da posição relacionados à CNV, variações nos alelos não deletados, mecanismos epigenéticos e sequências reguladoras podem ser importantes para determinar a expressividade variável de fenótipos das CNVs encontradas em 7q11.23 (LI et al., 2015).

Atualmente a SWB é considerada um dos transtornos que serve como modelo para o estudo da relação entre indicadores comportamentais e alterações genéticas. Nas últimas décadas o trabalho de diversos laboratórios de pesquisa associado ao Projeto Genoma têm reunido dados sobre diversos genes incluídos no intervalo deletado e manifestações fenotípicas clínicas, cognitivas e comportamentais associadas (SERACENI et al., 2010).

É classicamente relatado na literatura a dificuldade no diagnóstico precoce na SWB. Devido à sua manifestação progressiva e assim, as características específicas dificilmente são reconhecidas nos primeiros meses de vida, principalmente se o paciente não apresentar EASV ou HII (hipercalcemia idiopática infantil) que são características típicas da síndrome. Segundo estudos, a maioria dos pacientes com SWB apresentam características craniofaciais distinguíveis ao redor de 4 meses, e fácies típico aos 18 meses (SOUZA, 2003).

A região da deleção mais comum na SWB, com aproximadamente 1.5 Mb, está abaixo do limiar de detecção da técnica de citogenética clássica por bandamento G, que é capaz de detectar apenas deleções maiores que 10 Mb. Mesmo a técnica de bandamento de alta resolução, capaz de identificar alterações de 3 a 5 Mb, dificilmente permite detectar a microdeleção em 7q11.23 (SHAFFER & BEJJANI, 2004). Abaixo desse tamanho, as deleções só podem ser identificadas por métodos moleculares baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase) ou FISH (SOUZA, 2003). Portanto, torna-se importante a aplicação de técnicas citomoleculares para o diagnóstico genético da SWB (DUTRA et al., 2012; TOPÁZIO, 2013)

No Brasil, o uso da FISH tem sido divulgado como recurso diagnóstico associado ao estudo das características clínicas da SWB, com a finalidade de estabelecer parâmetros

para a solicitação deste exame pelo geneticista (SUGAYAMA et.al., 2003; SOUZA, 2003; ROSSI et al., 2006), tendo em vista que essa técnica aumenta substancialmente a capacidade de detecção de anormalidades cromossômicas, pois fundamenta-se no uso de uma sequência de bases (sonda) complementar ao DNA que se pretende estudar (TICIANELLI et al., 2011).

A detecção de alterações cromossômicas submicroscópicas em pacientes com DI tem permitido uma melhora significativa na delimitação das regiões do genoma que estão associadas com o desenvolvimento e a função do cérebro. No entanto, as regiões cromossômicas identificadas, geralmente, contêm vários genes e elementos reguladores, que dificulta a compreensão das correlações genótipo-fenótipo (CUNHA, 2015).

Apesar dos avanços genéticos, a variabilidade fenotípica observada entre os pacientes com SWB permanece em constante elucidação. Especulações de que a variação no tamanho da deleção seria responsável pela variabilidade foram contrariadas. As prováveis explicações incluíram os polimorfismos nas cópias das regiões não deletadas da SWB que afetariam as funções das proteínas ou seu nível de expressão, efeitos variados das deleções nos genes vizinhos à região cromossômica da SWB ou o efeito de genes modificadores, incluindo-se alterações epigenéticas em qualquer lugar do genoma (POBER, 2010; OLIVEIRA, 2013).

A ocorrência de falhas no estabelecimento ou manutenção das marcas epigenéticas podem resultar na ativação ou inibição imprópria de vários genes e alterar a fisiologia celular normal, levando ao desenvolvimento de patologias (DE OLIVEIRA, 2012). A hipometilação do DNA global é geralmente associado com instabilidade cromossômica, a reativação de elementos retrotransponíveis, e expressão de genes que seriam normalmente silenciados pela metilação (BOLLATI et al., 2010). O mecanismo mais simples de como a metilação do DNA pode atuar no controle da expressão gênica é por meio do bloqueio do sítio promotor ao acesso de fatores de transcrição, havendo silenciamento do alelo metilado, ou seja, a metilação do DNA interfere diretamente na sequência de ligação de fatores (DE OLIVEIRA, 2012).

Disfunções cognitivas relacionadas a mudanças no perfil epigenético já foram descritas em síndromes como de Rubinstein-Taybi, Rett, X-frágil e em doenças como de Alzheimer, Huntington, autismo, esquizofrenia, além de já descritas em outras desordens

nerológicas como esclerose múltipla, epilepsia, Parkinson, depressão e outras (DE OLIVEIRA, 2012).

Em estudo desenvolvido por Storniolo e colaboradores (2011) em dois pacientes não aparentados, portadores de DI grave, suspeitou-se de DI ligada ao cromossomo X. Nesses pacientes, a pesquisa do sítio frágil do cromossomo X, através do estudo citogenético FISH não teve o êxito esperado, resultando em negativo. Entretanto, sabe-se que alguns homens e principalmente as mulheres, com a Síndrome do X-frágil não expressam esse sítio nas culturas citogenéticas, limitando o valor diagnóstico desse exame que, idealmente, deve ser substituído por outro, fundamentado em técnicas de biologia molecular, como por exemplo a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Jacobs (2014) relatou em seu estudo que para determinar a origem dos pequenos rearranjos estruturais não equilibrados utilizou a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e a hibridação genômica comparativa (aCGH), demonstrando que a origem de muitas das mais comuns síndromes de microdeleções e microduplicações, como as síndromes de DiGeorge e Williams são igualmente suscetíveis de ser materna ou paterna, não havendo nenhum efeito da idade dos pais.

Estudo realizado por Pinto e colaboradores (2014) com o uso da CMA permitiu a identificação de rearranjos genômicos em uma menina gravemente afetada com deficiência intelectual, anomalias congênitas múltiplas e dismorfologia intensa, apesar de seu cariótipo normal. Seus pais também apresentaram cariótipo sem alterações. CMA detectou quatro desequilíbrios genômicos no genoma da paciente, que corresponde a uma microdeleção *de novo* em 18p11.32 com 30% de mosaicismo, uma trissomia 18q parcial com 40% de mosaicismo, uma microdeleção herdada em 7q31.1 e uma microduplicação *de novo* na região Xp22.33p21.3.

Chong e colaboradores (2014) realizaram o primeiro estudo que descreve a utilização da CMA em uma coorte de pacientes chineses com DD/DI, anomalias congênitas múltiplas e autismo referidos para testes clínicos genéticos. A plataforma da CMA foi utilizada em pacientes com achados citogenéticos e moleculares anormais conhecidos. Desequilíbrios cromossômicos microscópicos ou submicroscópicos foram detectados com precisão por CMA. A superioridade desta técnica sobre a cariotipagem também foi demonstrada em diversos casos. Em geral, as limitações de CMA incluindo a

sua incapacidade para detectar baixo nível de mosaicismo, aberrações heterocromáticas, inversões e translocações equilibradas, não afetaram este ensaio.

Bareto (2015) analisou CNVs em 109 indivíduos com DI, pela técnica de aCGH. Dentre os vários resultados encontrados destacamos para este estudo a presença de duas microduplicações na região crítica da SWB, contendo 10 CNVs patogênicas, das quais 4 são CNVs raras.

Na última década, a CMA tem sido recomendada como teste de diagnóstico de primeira linha para pacientes com DD/DI, DSA e anomalias congênicas múltiplas (Miller et al. 2010). A capacidade de detectar anormalidades cromossômicas ultrapassou rapidamente a capacidade de compreendermos o seu papel na doença. Geralmente, os desequilíbrios cromossômicos associados a síndromes de microdeleção ou microduplicação não são motivo de preocupação, enquanto as anormalidades identificadas em regiões genômicas que não foram associados com doenças humanas ainda podem apresentar algumas dificuldades. Desta forma, a interpretação dos resultados da CMA continua a ser uma tarefa bastante difícil, que requer uma estreita colaboração entre clínicos e citogeneticistas (ZILINA et al., 2014). Principalmente devido aos efeitos nocivos provocados por pequenas variações genômicas, tais como mutações pontuais, ainda influenciadas por penetrância reduzida, expressividade variável e dosagem do gene (PEREIRA et al., 2014).

A presença de um serviço de genética em centros médico-hospitalares, além de minimizar as manifestações clínicas dos portadores de distúrbios genéticos, também melhora a sua qualidade de vida, bem como a de seus familiares (ALBANO, 2000). Neste contexto torna-se extremamente importante que a avaliação clínica dos pacientes realizadas pelos médicos seja cuidadosa e bastante criteriosa, a fim de se evitar erros de encaminhamento além de ansiedade nos pacientes e familiares.

Em todos os casos diagnosticados de alterações cromossômicas, é fundamental o encaminhamento das famílias ao aconselhamento genético. Este procedimento é adotado para informar a ocorrência ou risco de recorrência de uma doença genética, além de fornecer detalhes aos indivíduos afetados e seus familiares sobre a origem hereditária da doença, possível tratamento, cuidados necessários e planejamento reprodutivo (PEREIRA et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

Os resultados previamente apresentados e discutidos nesta dissertação permitem concluir que:

- A detecção das alterações genômicas que ocasionam a Síndrome de Williams-Beuren pode ser realizada por várias técnicas citogenômicas, dentre as quais destacamos FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente) e CMA (Análise Cromossômica por Microarranjos);
- A porcentagem de detecção das alterações genéticas para esse estudo foi $\approx 50\%$ (2/4);
- Entre os casos relatados foi apresentado um paciente com a síndrome de Williams-Beuren, que teve sua elucidação diagnóstica pela técnica de FISH;
- Um caso de microduplicação na região 7q11.23 (Síndrome da duplicação na região de Williams-Beuren), foi detectado pela técnica da CMA;
- Os resultados destes dois pacientes corroboram com relatos da literatura que citam a importância das técnicas de FISH e CMA para o diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren;
- No presente estudo foram identificados vários genes que podem contribuir com os fenótipos dos pacientes, e que merecem estudos detalhados acerca de suas estruturas genômica e funcional;
- *NSUN5*, *TRIM50*, *FKBP6*, *FZD9*, *BAZ1B*, *BCL7B*, *TBL2*, *MLXIPL*, *VPS37D*, *DNAJC30*, *WBSCR22*, *MIR4284*, *ABHD11-AS1*, *ABHD11*, *CLDN3*, *CLDN4*, *WBSCR27*, *WBSCR28*, *EIF4H*, *MIR590*, *LAT2*, localizados na região 7q11.23 que apresentou a duplicação;
- *SPIN4*, *LOC92249*, *MIR1468*, *AMER1*, *ASB12*, *MTMR8*, *ZC3HT2B*, *LAS1L*, *FRMD8P1*, *MSN*, *MIR223*, *VSIG4*, *HEPH*, *EDA2R*, *AR*, *YIPF6*, *STARD8*, *EFNB1*, *PJAI* localizados na região Xq11.1q13.1 que apresentou longos trechos contínuos de homozigose (LCSH).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANO, L.M.J. Importância da genética no serviço público: relato da extinção de um setor de genética no município de São Paulo, Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2000; 7 (1), 29-34.
- AL-OWAIN, M.; KAYA, N.; AL-ZAIDAN, H.; AL-HASHMI, N.; AL-BAKHEET, A.; AL-MUHAIZEA, M.; CHEDRAWI, A.; BASRAN, R. K.; MILUNSKY, A. Novel intragenic deletion in *OPHN1* in a family causing XLMR with cerebellar hypoplasia and distinctive facial appearance. *Clin Genet*. 2011; 79(4),363–70.
- AMARAL, V.A.A.S.; NUNES, N.N.; RONJO, N.S.; DUTRA, R.L.; JUNIOR, F.B.A.; HIM, C.A. Estresse em crianças e adolescentes com Síndrome de Williams-Beuren em idade escolar. *Revista Semestral da Associação Brasileira de Psicologia Escolar e Educacional*, São Paulo. 2013; v. 17, n. 1, p.105-112.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Health care supervision for children with Williams syndrome. *Pediatrics*. 2001; Feb,109(2), 329.
- ANTONELL, A.; DEL CAMPO, M.; MAGANO, L.F.; KAUFMANN, L.; MARTÍNEZ DE LA IGLESIA, J.; GALLASTEGUI, F.; FLORES, R.; SCHWEIGMANN, U.; FAUTH, C.; KOTZOT, D.; PÉREZ-JURADO, L.A. Partial 7q11.23 deletions further implicate *GTF2I* and *GTF2IRD1* as the main genes responsible for the Williams-Beuren syndrome neurocognitive profile. *J. Med. Genet.*. 2010; v. 47, p. 312-320.
- ASHWORTH, A.; HILL, C. M.; KARMILOFF-SMITH, A.; DIMITRIOU, D. Cross syndrome comparison of sleep problems in children with Down syndrome and Williams syndrome. *Research in Developmental Disabilities*. 2013; v. 34, p. 1572-1580.
- BARETTO, N. Análise de CNVs e indicação clínica em indivíduos com deficiência intelectual e outros distúrbios do desenvolvimento diagnosticados por CGH array. Dissertação de mestrado-Universidade Estadual de Santa Catarina. 2015.
- BARRESI, S.; TOMASELLI, S.; ATHANASIADIS, A.; GALEANO, F.; LOCATELLI, F.; BERTINI, E.; ZANNI, G.; GALLO, A. Oligophrenin-1 (*OPHN1*), a Gene Involved in X-Linked Intellectual Disability, Undergoes RNA Editing and Alternative Splicing during Human Brain Development. Ed. Barbara Bardoni. 2014.
- BAYÉS, M.; MAGANO, L.F.; RIVERA, N.; FLORES, R.; PÉREZ JURADO, L.A. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *American Journal of Human Genetics*. 2003; v.73, n.1, p.131-151.

- BOLLATI, V.; BACCARELLI, A.; SARTORI, S.; TARANTINI, L.; MOTTA, V.; ROTA, F.; Costa, G. Epigenetics effects of shiftwork on blood DNA methylation. *Chronobiology international*. 2010. 27(5), 1093-1104.
- CANDEIAS, C.I. F. Alterações dos Cromossomas Sexuais em Mulheres com Suspeita Clínica de Cromossomopatia. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Ciências Universidade do Porto. 2012.
- CHAVES, T.F.; NICOLAU, L.S. Citogenética e cariotipagem humana. *Revista Saúde e Desenvolvimento*. 2013; v. 4, 20-25.
- CHONG, W.W.; LO, I.F.; LAM, S.T.; WANG, C.C.; LUK, H.M.; LEUNG, T.Y, CHOY, K.W. Performance of chromosomal microarray for patients with intellectual disabilities/developmental delay, autism, and multiple congenital anomalies in a Chinese cohort. *Mol Cytogenet*. 2014; v.7, p. 34.
- COSTA, E. O. A. Aumento da taxa de mutações germinativas observado na prole de pessoas expostas acidentalmente a baixas doses de radiação ionizante de Césio-137: Uso potencial de CNVs *de novo* como biomarcadores de exposição parental. 2016. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2016.
- CRESPI, B. J.; HURD, P. L. Cognitive-Behavioral Phenotypes of Williams Syndrome Are Associated with Genetic Variation in the *GTF2I* Gene, in a Healthy Population. *BMC Neuroscience*. 2014; v. 15, p. 127.
- CUNHA, D. M. C. Análise cromossômica por microarranjos em probandos com indicação clínica de Síndrome de Down sem alterações cariotípicas. Dissertação de mestrado – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética, 2015.
- CUSCÓ, I.; COROMINAS, R.; BAYÉS, M.; FLORES, R.; RIVERA - BRUGUÉS, N.; CAMPUZANO, V.; PÉREZ-JURADO, L. A. Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Research*. 2008; 18(5), 683–694.
- DAI, L.; BELLUGI, U.; CHEN, X. N.; PULST-KORENBERG, A. M.; JARVINEN-PASLEY, A.; TIROSH-WAGNER, T.; EIS, P. S.; MILLS, D.; SEARCY, Y.; KORENBERG, J. R. Is It Williams Syndrome? *GTF2IRD1* Implicated in Visual-Spatial Construction and *GTF2I* in Sociability Revealed by High Resolution Arrays. *American journal of medical genetics*. 2009; Part A 149A.3: 302–314.
- DE CAMARGO, C. F.; DA SILVA, P. R.Q. Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular. Coordenação de Pós-Graduação Lato Sensu - Universidade Católica de Goiás. 2014.

- DE OLIVEIRA, J. C. Epigenética e doenças humanas. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2012; v. 33, n. 1, p. 21-34.
- DE OLIVEIRA JÚNIOR, G. P.; DE LIMA LINS, T. C. Utilização da Epigenética na ciência forense. *Coordenação de Pós-Graduação Lato Sensu - Universidade Católica de Goiás*. 2012.
- DUTRA, R. L. Análise de marcadores moleculares para o diagnóstico da síndrome de Williams-Beuren. *Dissertação de Mestrado em Pediatria - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - São Paulo*. 2011.
- DUTRA, R.L.; HONJO, R.S.; KULIKOWSKI, L.D.; FONSECA, F.M.; PIERI, P.C.; JEHEE, F.S.; BERTOLA, D.R.; KIM, C.A. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Research Notes*. 2012; vol. 5:13.
- FERNANDEZ, A. F.; ASSENOV, Y.; MARTIN-SUBERO, J.I.; BALINT, B.; SIEBERT, R.; TANIGUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; HIDALGO, M.; TAN, A.; GALM, O.; FERRER, I.; SANVCHEZ-CESPEDES, M.; VILLANUEVA, A.; CARMONA, J.; SANCHEZ-MUT, J.V.; BERDASCO, M.; MORENO, V.; CAPELLA, G.; MONK, D.; BALLESTAR, B.; ROPER, S.; MARTINEZ, R.; SANCHEZ-CARBAYO, M.; PROSPER, F.; AGIRRE, X.; FRAGA, M.F.; GRANÁ, O.; PEREZ-JURADO, L.; MORA, J.; PUIG, S.; PRAT, J.; BADIMON, L.; PUCA, A.A.; ELTZER, S.J.; LENGAUER, T.; BRIDGEWATER, T.; BOCK, C.; ESTELLER, M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res*. 2012; v. 22, n. 2, p. 407-19.
- GUEMANN, A.S.; ANDRIEUX, J.; PETIT, F.; HALIMI, E.; BOUQUILLON, S.; MANOUVRIER-HANU, S.; VAN DE KAMP, J.; BOILEAU, C.; HANNA, N.; JONDEAU, G.; VAKSMANN, G.; HOUFFLIN-DEBARGE, V.; HOLDER-ESPINASSE, M. *ELN* gene triplication responsible for familial supravalvular aortic aneurysm. *Cardiology in the Young*. 2015; v. 25, n. 04, p. 712-717.
- GUITART-FELIUBADALÓ, M.; BRUNET-VEGA, A.; VILLATORO-GÓMEZ S.; BAENA-DÍEZ, N.; GABAU-VILA, E. Causas cromosómicas que originan el retraso mental: alteraciones cromosômicas diagnosticables en el paciente. *Revista de Neurologia*. 2006; 41(Supl 1):S21-26.
- HOWARD, M. L.; PALMER, S.J.; TAYLOR, K.M.; ARTHURSON, G.J.; SPITZER, M.W.; DU, X.; PANG, T.Y.; RENOIR, T.; HARDEMAN, E.C.; HANNAN, A.J. Mutation of *Gtf2ird1* from the Williams-Beuren syndrome critical region results in facial dysplasia, motor dysfunction, and altered vocalisations. *Neurobiology of disease*. 2012; v. 45, n. 3, p. 913-922.
- JACKSON L. Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2002; 45(3):622-639.

- JACOBS, P.A. An Opportune Life: 50 Years in Human Cytogenetics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2014; 15: 29-46.
- KALSCHUEUR, V.M.; MUSANTE, L.; FRANG, C.; HOFFMANN, K.; FUCHS, C.; CARTA, E.; DEAS, E.; VENKATESWARLU, K.; MENZEL, C.; ULLMANN, R.; TOMMERUP, M.; DALPRÀ, L.; TZSCHACH, A.; SELICORNI, A.; LUSCHER, B.; ROPERS, H.H.; HARVEY, K.; HARVEY, J.R. A Balanced Chromosomal Translocation Disrupting *ARHGEF9* Is Associated With Epilepsy, Anxiety, Aggression, and Mental Retardation. *Human mutation*. 2009; 30(1), 61–68.
- LESCA, G.; TILL, M.; LABALME, A.; VALLEE, D.; HUGONENQ, C.; PHILIP, N.; EDERY, P.; SANLAVILLE, D. De novo Xq11.11 microdeletion including *ARHGEF9* in a boy with mental retardation, epilepsy, macrosomia, and dysmorphic features. *Am J Med Genet*. 2011; 155:1706–1711.
- LEME, D.E.S.; SOUZA, D.H.; MERCADO, G.; PASTENE, E.; DIAS, A.; MORETTI-FERREIRA, D. Assessment of clinical scoring systems for the diagnosis of Williams-Beuren syndrome. *Genetics and Molecular Research*. 2013; v. 12, n. 3, p. 3407-3411.
- LI, L.; HUANG, L.; LUO, Y.; HUANG, X.; LIN, S.; FANQ, Q. Differing Microdeletion Sizes and Breakpoints in Chromosome 7q11.23 in Williams-Beuren Syndrome Detected by Chromosomal Microarray Analysis. *Mol Syndromol*. 2015; v.6, 268-275.
- LOWERY, M.C.; MORRIS, C.A.; EWART, A.; BROTHMAN, L.J.; ZHU, X.L.; LEONARD, C.O.; CAREY, J.C.; KEATING, M.; BROTHMAN, A.R. Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *American journal of human genetics*. 1995; v. 57, n. 1, p. 49.
- MACHADO, A.; SCARTON, F., OLIVEIRA, N., ANTUNES, P., DAZZI, P. Síndrome de Williams: uma revisão bibliográfica. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas. Porto Alegre, 2001.
- MANNING, M.; HUDGINS, L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities *Genetics in Medicine*. 2010; 12(11):742-745.
- MASCENA, J.R. Estudos citogenéticos realizados no Hospital Universitário da UFSC no período de 2003 a 2008. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.
- MEDINA, J.D.L. Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de

portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Brasil. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. 2014.

- MENDES, A. K. S. O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) e o aCGH (array Comparative Genomic Hybridization) no diagnóstico de alterações cromossômicas. Dissertação de Mestrado, Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro – Vila Real. 2012.
- MERVIS, C.B.; VELLEMAN, S.L. Children with Williams Syndrome: Language, Cognitive, and Behavioral Characteristics and their Implications for Intervention. Perspectives on language learning and education. 2011; 18(3):98-107.
- MILLER, D.T.; ADAM, M.P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L.G.; BROTHMAN, A.R.; CARTER, N.P.; CHURCH, D.M.; CROLLA, J.A.; EICHLER, E.E.; EPSTEIN, C.J.; FAUCETT, W.A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J.M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E.B.; KOK, K.; KRANTZ, I.D.; KUHN, R.M.; LEE, C.; OSTELL, J.M.; ROSENBERG, C.; SCHERER, S.W.; SPINNER, N.B.; STAVROPOULOS, D.J.; TEPPERBERG, J.H.; THORLAND, E.C.; VERMEESCH, J.R.; WAGGONER, D.J.; WATSON, M.S.; MARTIN, C.L.; LEDBETTER, D.H. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. American Journal of Medical Genetics. 2010; 86:749-764.
- MINASI, L. B.; PINTO, I.P.; DE ALMEIDA, J.G.; DE MELO, A.V.; CUNHA, D.M.C.; RIBEIRO, C.L.; SILVA, G.P.; BRASIL, M.G.; SILVA, D.M.; DA SILVA, C.C.; DA CRUZ, A.D. Postnatal diagnosis of constitutive ring chromosome 13 using both conventional and molecular cytogenetic approaches. Genetics and molecular research: GMR. 2015; v. 14, n. 1, p. 1692.
- MORRIS, C.A. Williams Syndrome. GeneReviews® [Internet]. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1249/>. Acesso em 25 de março de 2016.
- NUNES, M.M. Avaliação do funcionamento cognitivo de pacientes com Síndrome de Williams-Beuren. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2010.
- OLIVEIRA, M.W. Associação entre déficit de elastina e retrações da membrana timpânica: um estudo transversal e comparado em pacientes portadores de Síndrome de Williams. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <https://omim.org/entry/194050>. Acesso em: 26 de abril de 2016.

- PALMER, S.J.; SANTUCCI, N.; WIDADGO, J.; BONTEMPO, S.J.; TAYLOR, K.M.; TAY, E. S. E.; HOOK, J.; LEMCKERT, F.; GUNNING, P.W.; HARDEMAN, E. C. Negative Autoregulation of GTF2IRD1 in Williams-Beuren Syndrome via a Novel DNA Binding Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; v. 285, n.7, 4715–4724.
- PASTERNAK, J.J. *Genética Molecular Humana.: Mecanismos das Doenças Hereditárias*, 1ed, Editora Manole, 2002, p. 137-140.
- PEREIRA, R.R.; PINTO, I.P.; MINASI, L.B.; DE MELO, A.V.; CUNHA, D.M.C.; CRUZ, A.S.; RIBEIRO, C.L.; DA SILVA, C.C.; SILVA, D.M.; DA CRUZ, A.D. Screening for intellectual disability using high-resolution CMA technology in a retrospective cohort from Central Brazil. *PLoS One*. 2014; 9 (7).
- PEREIRA, T. M.; DE OLIVEIRA, R.L.C.P.; TEIXEIRA, A.C.Z.; DE JESUS, A.N.; RODRIGUES, M.G.; AGOSTINHO, M.A.DE B.; RODINI, E.S.DE O. Frequência das anomalias cromossômicas: Importância para o diagnóstico citogenético. *Arq. Ciênc. Saúde. Bauru*, 2009; 16 (1):13-33.
- PÉREZ-JURADO, L.A.; PEOPLES, R.; KAPLAN, P.; HAMEL, B.C.; FRANCKE, U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59, p. 781 – 792.
- PINTO, I.P. A importância dos resultados do CMA no aconselhamento genético das famílias com probandos apresentando deficiência intelectual. 10/02/2015. 64 p. Dissertação de Mestrado – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia 10/02//2015, Mestrado em Genética, 2015.
- PINTO, I.P.; MINASI, L.B.; DA CRUZ, A.S.; MELO, A.V.; CUNHA, D.M.C.; PEREIRA, R.R.; RIBEIRO, C.L.; DA SILVA, C.C.; SILVA, D.M.; DA CRUZ, A.D. A non-syndromic intellectual disability associated with a de novo microdeletion at 7q and 18p, microduplication at Xp, and 18q partial trisomy detected using chromosomal microarray analysis approach. *Molecular Cytogenetics*. 2014 ;7:44.
- PINTO, I. P.; MINASI, L.B.; MELO, A.V.; CUNHA, D.M.C.; RIBEIRO, C.L.; DA SILVA, C.C.; SILVA, D.M.; DA CRUZ, A.D. Diagnostic of Chromosome 7Q11, 23 Duplication Syndrome-a case report. *Estudos*. 2015; v. 41, p. 47-53.
- PINTO, D.; MARSHALL, C.; FEUK, L.; SCHERER, S.W. Copy-number variation in control population cohorts. *Human molecular genetics*. Oct, 2007; v. 16, n. 2, p. 168-173.
- POBER, B. R. Williams–Beuren Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2010; v. 362, n. 3, p. 239-252.

- PREZZI, J.A.; DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). PUBVET, Londrina. 2010; v. 4, n. 18, Ed. 123, Art. 831.
- ROSSI, N.F. Caracterização do fenótipo comportamental e de linguagem na síndrome de Williams-Beuren. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Botucatu, São Paulo, 2010.
- ROSSI, N. F.; MORETTI-FERREIRA, D.; GIACHETI, C. M. Genética e linguagem na síndrome de Williams-Beuren: uma condição neuro-cognitiva peculiar. Pró-Fono Revista de Atualização Científica, Barueri (SP). 2006; v. 18, n. 3, p.331-338.
- ROSSI, N. F.; MORETTI-FERREIRA, D.; GIACHETI, C. M. Perfil comunicativo de indivíduos com a síndrome de Williams-Beuren. Rev Soc Bras Fonoaudiol. 2007;12(1):1-9.
- ROSSI, N. F.; SOUZA, D.H.; MORETTI-FERREIRA, D.; GIACHETI, C. M. Perfil da fluência da fala na síndrome de Williams-Beuren: estudo preliminar. Pró-Fono Revista de Atualização Científica. 2009 abr-jun; 21(2): 107-12.
- SANDERS, S. J.; ERCAN-SENCICEK, A.G.; HUS, V.; LUO, R.; MURTHA, M.T.; MORENO-DE-LUCA, D.; et al. Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. Neuron. 2011; v. 70, p. 863-885.
- SANTORO, S.D. Correlações entre sono-vigília, memória e melatonina em Síndrome de Williams-Beuren. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista. 2014.
- SANTORO, S.D.; PINATO, L. Sono-vigília, aspectos de memória e melatonina em Síndrome de Williams-Beuren: uma revisão de literatura. Rev. CEFAC, São Paulo . 2014; v. 16, n. 6, p. 1980-1989.
- SANTOS, J. M. Síndrome de Williams-Beuren: Alterações musculoesqueléticas em joelhos, tornozelos e pés. 2009. Disponível em: swbrasil.org.br. Acesso em: 18 de novembro de 2015.
- SBRUZZI, I.C. Estudo de marcadores polimórficos da região 7q11.23 para o diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo; São Paulo. 2006.
- SCHOUTEN, J.P., MCELGUNN, C.J., WAAIJER, R., ZWIJNENBURG, D., DIEPVENS, F., PALS, G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Research. 2002; v.30, n.12.

- SCHUBERT, C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66:1178–97.
- SERACENI, M. F. F., HAYASHIUCHI, A. Y., LIMA, S. F. B., RIMÉRIO, R. C., MARIANI, M. M. C., BARALDI, G. S., TEIXEIRA, M. C. T. V. Indicadores de problemas de comportamento em crianças e adolescentes com síndrome de Williams: Dados preliminares. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento*, São Paulo. 2010; v.10, n.1, p.37-48.
- SHAFFER, L.G.; BEJJANI, B.A. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum. Reprod. Update.* 2004; v. 10, p. 221-226.
- SHAFFER, L.G.; TOMMERUP, N. (Org). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature.* 6ed. Basel, Karger, 2005, 130 p.
- SHIMOJIMA, K.; SUGAWARA, M.; SHICHIJI, M.; MUKAIDA, S.; TAKAYAMA, R.; IMAI, K.; YAMAMOTO, T. Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *Journal of human genetics.* 2011; v. 56, n. 8, p. 561-565.
- SILVA, J. A. P. Estudo citogenético em neoplasias e lesões proliferativas ósseas. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.
- SINISCALCO, D.; CIRILLO, A.; BRADSTREET, J.J.; ANTONUCCI, N. Epigenetic findings in autism: new perspectives for therapy. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 ;10:4261–4273.
- SOMERVILLE, M. J.; CARILYN, B.; MERVIS,.; YOUNG, E.J.; SEO, E.J.; DEL CAMPO, M.; BANFORTH, S.; PEREGRINE, E.; LOO, W.; LILLEY, M.; PÉREZ-JURADO, L.A.; MORRIS, C.A.; SCHERER, S.W.; OSBOENE, L.R. Severe Expressive-Language Delay Related to Duplication of the Williams–Beuren Locus. *The New England journal of medicine.* 2005; v.353, n.16, p.1694–1701.
- SOUTO, A.P. Comportamento Citogenético Anômalo em Indivíduos Portadores da Doença de Darier. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará. 2012.
- SOUZA, D.H. Estudo citogenético da região 7q11.23 – A Síndrome de Williams-Beuren. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Botucatu. 2003.

- SOUZA, D.H. A síndrome de Williams-Beuren: contribuições à avaliação clínica e genômica. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. 2013.
- SOUZA, D. H.; MORETTI-FERREIRA, D.; RUGOLO, L.M.S.S. Fluorescent in situ hybridization (FISH) as a diagnostic tool for Williams-Beuren syndrome. *Genet. Mol. Biol.*, São Paulo. 2007; v. 30, n. 1, p. 17-20.
- SOUZA, J. C. M.; SOLAREWICS, M.M.; MORDASKI, R.Y.M.; PASSONI, C.R.M.S.; PEREIRA-FERRARI, L.; MIKAMI, L.R. Síndromes Cromossômicas: uma revisão. *Cadernos das Escolas de Saúde, Curitiba*. 2010; v.12 n.3.
- STORNILO, L.M.A.; GIMENES, P.V.S.; COSTA, A.R.; MELO, D.G. Aconselhamento genético de famílias de pacientes com deficiência intelectual da APAE de São Carlos, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Coletiva*. 2011; 19 (3):375-83.
- SUGAYAMA, S. M. M.; MOISÉS, R.L.; WAGENFUR, J.; IKARI, N.M.; ABE, K.T.; LEONE, C.; DA SILVA, C.A.A.; CHAUFFAILLE, M. DE L.L.F.; KIMET, C.A. Síndrome de Williams-Beuren. Anomalias cardiovasculares em 20 pacientes diagnosticados pela hibridização in situ por fluorescência. *Arq Bras Cardiol*. 2003; v. 81, n. 5, p. 462-7.
- SUGAYAMA, S. M. M.; LEONE, C.; CHAUFFAILLE, M. DE L.L.F ; OKAY, T.S.; KIM, C.A.. Williams syndrome. development of a new scoring system for clinical diagnosis. *Clinics*. 2007; 62(2):159-66.
- TEIXEIRA, M.C.T.V.; MONTEIRO, C.R.C.; VELLOSO, R.L.; KIM, C.A.; CARREIRO, L.R.R. Fenótipo comportamental e cognitivo de crianças e adolescentes com Síndrome de Williams- Beuren. *Pró-Fono Revista de Atualização Científica*. 2010 jul-set; 22(3):215-20.
- THOMAS, N. S.; DURKIE, M.; POTTS, G.; SANDFORD, R.; ZY, B.V.; YOUINGS, S.; DENNIS, N.R.; JACOBS, P.A. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23,15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet*. 2006; v. 14, p. 831-837.
- TICIANELLI, J. S.; OLIVEIRA, B.M.M.; ZOGNO, M.A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Intersexo e outras anomalias do desenvolvimento do aparelho reprodutor nos animais domésticos e o auxílio da citogenética para o diagnóstico. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte. Jan/mar 2011; v.35, n.1, p.26-32.
- TOPÁZIO, B.A. Aspectos Clínicos e Genéticos da Síndrome de Williams-Beuren: Revisão de Literatura. Trabalho de conclusão de curso - Instituto de Biologia da Universidade Federal Bahia – Salvador. 2013.

- VAN DER, A.A.N.; ROOMS, L.; VANDEWEYER, G.; VAN DEN ENDE, L.; REYNIERS, E.; FICHERA, M.; ROMANO, C. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 2009; 52, 94–100.
- VANDERWEYER, G.; VAN DER AA, N.; REYNIERS, E.; KOOY, R.F. The Contribution of CLIP2 Haploinsufficiency to the Clinical Manifestations of the Williams-Beuren Syndrome. *American Journal of Human Genetics.* Jun, 2012; 1071–1078.
- VERMA, R.S. ; BABU, A. *Human Chromosomes: Principles & Techniques*, 2ed, Ram McGraw-Hill Inc., New York, 1995, 419 p.
- ZAHIR, F.; FRIEDMAN, J.M. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clinical Genetics.* 2007; 72(4):271-287.
- ZILINA, O.; TEEK, R.; TAMMUR, P.; KUUSE, K.; YAKOREVA, M.; VAIDLA, E.; MÖLTER-VÄÄR, T.; REIMAND, T.; KURG, A.; OUNAP, K. Chromosomal microarray analysis as a first-tier clinical diagnostic test: Estonian experience. *Molecular Genetics and Genomic Medicine.* 2014; 2(2):166-175.

8. APÊNDICE

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Dados da Identificação

Título do Projeto: Investigação das Causas Genéticas e Genômicas do Retardo Mental Autossômico

Pesquisador Responsável: Dr. Aparecido Divino da Cruz

Nome (sujeito da pesquisa): _____,

RG nº _____, Naturalidade _____, Idade _____,

Endereço _____,

Neste ato representado por mim:

Nome dos representantes legais:

Pai _____ Naturalidade

_____, Idade _____, Estado Civil _____,

Profissão _____, Endereço _____

Mãe _____

Naturalidade _____, Idade _____, Estado Civil

_____, Profissão _____,

Endereço _____

Está sendo convidado(a) a participar de um estudo intitulado: Investigação das Causas Genéticas e Genômicas do Retardo Mental Autossômico cujos objetivos e justificativas são: propor a investigação genética do paciente com indicação clínica de retardo mental, visto que o diagnóstico de um paciente com essa síndrome estabelece uma oportunidade valiosa de fazer estudos na família, identificando outros afetados e portadores, e de realizar um aconselhamento genético eficiente permitindo a prevenção de novos casos, possibilitando assim, um tratamento específico, diminuindo o impacto econômico, social e pessoal que esta síndrome acarreta.

Os critérios de inclusão são: pacientes encaminhados ao Núcleo de Pesquisas Replicon e LaGene com indicação clínica de retardo mental, acompanhados dos pais biológicos que concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os critérios de exclusão são: indivíduos maiores de 18 anos, com indicação clínica de retardo mental, que não concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, ou menores, cujos pais biológicos não aceitarem a participação do(a) filho(a) neste estudo, ou que não assinarem o TCLE, ou ainda, pacientes que apresentarem outras doenças genéticas já diagnosticadas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir a doação voluntária de uma amostra de sangue de meu(minha) filho(a) biológico(a) para colaborar com o diagnóstico do retardo mental, juntamente com uma amostra, doada voluntariamente, de meu sangue para comparação com a finalidade de determinar causas genéticas e sua hereditariedade.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: a confirmação da causa do retardo mental (quando tiver uma etiologia genética). Estou ciente ainda, que a técnica proposta já foi realizada em outros estudos e é reprodutiva, evitando assim possíveis riscos.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Durante a coleta do sangue, você poderá sentir uma dor leve a moderado, em decorrência da aplicação da agulha. Podem, também, ocorrer a formação de hematomas que não são comuns, e caso isso ocorra, você será imediatamente encaminhado(a) ao Serviço Médico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Estou ciente de que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado, ou elemento, que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

O pesquisador responsável, envolvido com o referido projeto é: Aparecido Divino da Cruz, e com ele poderei manter contato pelos telefones: (62)3946-1443/3946-1086.

É assegurada a minha assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Tenho sido orientado ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, autorizo a participação de (nome do sujeito da pesquisa) _____ na referida pesquisa, e manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou pagar.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Goiânia, ____ de _____ de 201__.

(nome e assinatura do Pai)

(nome e assinatura da Mãe)

Pesquisador Dr. Aparecido Divino da Cruz

ANEXO II

PROTOCOLO PARA EXECUÇÃO DA CULTURA CELULAR

Procedimentos

1. Reagentes e materiais

1. Meio de cultura RPMI 1640 (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47);
2. 100µL de L-Glutamina 1640 (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47);
3. 100µL de Fitohemaglutinina (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47);
4. 1mL de Meio Completo para Medula óssea 1640 (Geladeira Boch Glass Line refrigerador 47) ;
5. Micropipetas automáticas 200 e 1000 µL ou de 10mL;
6. Tubos de 15 mL;
7. Garrafa de Cultura;
8. KCl.(gaveta G18), acrescentar o KCl á água deionizada em proporção pré-determinada conforme quantidade que se deseja preparar.
9. Carnoy, proporção 3 X 1: 3mL de metanol e 1 mL de acido acético
10. Racks ou suporte para os tubos.

2. Equipamentos

1. Estufa CO2 Sample port, modelo 150-400
2. Agitador de Tubos
3. Centrifuga Beckman Gpr
4. Capela de fluxo laminar câmara de fluxo laminar da Veco

3. Amostras

1. As amostras de sangue após coletadas com heparina são transferidas para as garrafas de culturas já enriquecidas com os meios de cultura importantes para o crescimento e multiplicação celular. O meio de cultura é composto por: 4 ml RPMI 1640, 1 mL de soro fetal bovino, 100 µL de Fitohemaglutinina e 100 µL de L- Glutamina, sendo 1,5 mL das amostras de sangue acrescentadas em seguida. Após preparar as amostras identificar sempre a parte lateral do frasco com o número de identificação e iniciais do paciente e colocar na estufa de CO2 Sample port, modelo 150-400 por 47h.

4. Hipotonização e lavagem do material

1. 47 horas depois, retirar os frascos de garrafas de cultura da estufa de CO₂ Sample port, modelo 150-400 e colocar 75µL de Colchicina em cada frasco, ressuspender o material e devolver à estufa por 30 min;

2. Retirar os frascos de garrafa de cultura da estufa, ressuspender o material e verter seu conteúdo num tubo falcon de 15mL;

3. Centrifugar a 1000 rpm na centrífuga Beckman Gpr por 10 min;

Depois de centrifugar, aspirar o sobrenadante com um pipeta de pasteur (deixar 1 mL) e acrescentar 10mL de solução hipotônica (KCl 0,75M) com um pipeta de pasteur (ate a marca de 11mL do tubo);

4. Levar para a estufa de CO₂ Sample port, modelo 150-400, por 35 min;

Passados os 35min, retirar o tubo (falcon de 15mL) da estufa e acrescentar solução fixadora (carnoy 3:1) até completar 14mL do frasco de falcon de 15mL;

4. Aguardar 10min a temperatura ambiente;

5. Centrifugar a 1000rpm por 10 min na centrífuga Beckman Gpr;

6. Aspirar ao sobrenadante com a pipeta de pasteur (deixa cerca de 1mL), adicionar lentamente pela parede do frasco (falcon de 15mL) 10mL de solução fixadora (desmanchar os grumos), levar à centrífuga Beckman Gpr novamente. As lavagens deverão ser realizadas ate a solução ficar transparente (mínimo 3X);

7. Guardar em Geladeira (Boch Glass Line refrigerador 47) até fazer as lâminas.

5. Preparação de lâminas

1. Deve-se limpar muito bem pelo menos cinco lâminas com solução álcool etílico a 70%;

2. Identifica-las com o código correspondente a cada caso, no momento do uso, molhar as lâminas com água destilada e coloca-las em banho-maria a 37°C.

3. Homogeneizar a solução de células e gotejar 3 gotas usando a micropipeta de 250 µL sobre a lâmina em banho-maria.

4. Secar a lâmina em temperatura ambiente e observar no microscópio investido se há a presença de metáfases.

ANEXO III

PROTOCOLO PARA EXECUÇÃO DE FISH (HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE)

1ª Etapa: Preparação da lâmina para co-denaturação

- 1-Escolhe-se uma região na lâmina (já preparada conforme citogenética convencional), onde se encontre material apropriado para a reação, preferencialmente regiões onde se encontre vários núcleos interfásicos e com metáfase.
 - 2-Marca-se a região escolhida no mapa. Armazena as lâminas em geladeira (2-8°C) overnight.
 - 3-Efetuar desidratação da lâmina, passando-a pelas seguintes soluções:
 - a.Alcool 70% por 1 minuto
 - b.Alcool 85% por 1 minuto
 - c.Alcool 100% por 1 minuto
 - 4-Deixa a lâmina secar.
 - 5-Aplicar a sonda na região demarcada anteriormente (2ul).
 - 6-Cobre-se a sonda com lamínula 24x24m, limpa e desengordurada. A partir da aplicação da sonda a lâmina deve ficar protegida da luz.
 - 7-Hibridação: coloca-se a lâmina no hibridizador (Hybrite) obedecendo a seguinte programação:
 - a.Desnaturação por 3 minutos a 75°C
 - b.Anelamento por 22 horas a 37°C
- Obs: colocar água nas laterais do Hybrite.

2ª Etapa: Lavagem e aplicação da contra-coloração (DAPI)

- 1-Preparar as soluções de lavagem.
- 2-Ajustar a temperatura do banho-maria em 72°C e colocar as soluções de lavagem em um Falcon 50ml.
- 3-Retirar a lâmina do hibridizador ao abrigo da luz.
- 4-Retira-se a lamínula arrastando-a com a pinça e mergulha na solução 1 por 2 minutos.
- 5-Retira-se a lâmina, deixa escorrer o excesso e então mergulha na solução 2 por 1 minuto.
- 6-Deixa secar a lâmina.
- 7-Aplicar 10ul do contraste (DAPI).
- 8-Cobrir a gota com lamínula evitando o aparecimento de bolhas.
- 9-Aguardar por 10 minutos.
- 10-Capturar as imagens.

ANEXO IV

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE 50 – 300 µL DE SANGUE TOTAL – Illustra™ GE Healthcare:

*** PROCEDIMENTO:**

1. Pipetar 20 µL de PROTEINASE K no fundo de um tubo de microcentrifuga (eppendorf) de 1,5 mL;

2. Adicionar até 300 µL de sangue total ao eppendorf (ideal 200 µL);

Este protocolo é adequado para 50 – 300 µL de sangue total, tampão leucocitário e células da medula óssea. A performance ótima é obtida com 200 µL de sangue total. Quando o volume for menos do que 200 µL, fazer o volume da amostra ficar até 200 µL com PBS.

3. Adicionar 400 µL de Tampão de Lise tipo 10 ao tubo com amostra. Misturar bem no vórtex por 15 segundos.

Para assegurar eficiente lise, é essencial que a amostra e o tampão AL sejam misturados completamente para produzir uma solução homogênea.

4. Incubar à temperatura ambiente por 10 minutos com intermitentes misturas no vórtex para auxiliar a lise.

No final deste estágio a cor da reação terá mudado de vermelho para marrom escuro.

5. Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 no banho-maria à 70 °C.

6. Centrifugar brevemente o eppendorf de 1,5 mL para remover gotas de dentro da tampa.

7. Aplicar, cuidadosamente, a amostra no centro da mini coluna com um tubo coletor fornecido, usando uma pipeta, sem molhar a borda. Feche a tampa da coluna e centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido).

8. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 µL de Tampão de Lise tipo 10 à coluna. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido).

Este passo assegura a completa lise das células e desnatura qualquer resíduo de proteína.

9. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 µL de Tampão de Lavagem tipo 6 à coluna. Centrifugar por 3 minutos à 12.000 rpm. Descartar o tubo coletor contendo o filtrado. Colocar a mini coluna em outro tubo coletor (não fornecido) e centrifugar novamente por 1 minuto à 12.000 rpm.

Se qualquer solução de lavagem vem a ter contato com a coluna, re-centrifugar por 1 minuto. A presença de etanol no DNA genômico eluído pode afetar muitas aplicações. O DNA genômico preso à matrix de sílica está altamente purificado e pronto para a eluição.

10. Colocar a mini coluna em um eppendorf de 1,5 mL (não fornecido). Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 200 µL de Tampão de Eluição tipo 5, pré-aquecido, diretamente no centro da coluna.

Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 à 70 °C ante do uso. O volume atual recuperado será de 80 – 100 % do volume do tampão aplicado na coluna. Mude de ponteira entre as amostras, para reduzir a variação de volume das amostras eluídas.

11. Incubar a coluna por 1 minuto à temperatura ambiente.

Não incubar muito mais do que 1 minuto, para obter um DNA genômico de boa qualidade.

12. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm para recuperar o DNA genômico. Armazenar o DNA genômico purificado à – 20 °C. 98

ANEXO V

Chromosomal Microarray (CMA) CytoScan™ HD Affymetrix®:

O CMA consiste de 2.696.550 de marcadores genéticos dando cobertura ao genoma humano. Aproximadamente 743.304 dessas sondas são de SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) e 1.953.246 são de sondas de CNV (sondas únicas não polimórficas). O protocolo de CMA CytoScan™ HD Affymetrix® é otimizado para processar de 8 a 24 amostras ao mesmo tempo, para obtenção de informação da variação do número de cópias (CNV) e SNP.

Digestão:

- Ligar o termociclador.
- Descongelar os reagentes Tampão NspI 10x, BSA 100x e água livre de nuclease à temperatura ambiente. Fazer um vórtex e um spin e colocar no gelo.
- Manter a enzima NspI à – 20°C pronta para uso.
- Adicionar 5 µL de DNA da amostra (concentração de 50ng/µL) na placa (de 1 a 6), realizando 2 trios por vez.
- Adicionar 5 µL de DNA genômico (7), fornecido pelo kit como controle positivo.
- Adicionar 5 µL de água livre de nuclease (8), como controle negativo.
- Preparar o máster mix de Digestão, de acordo com a tabela a seguir:

Reagentes	Para 8 amostras
Água livre de nuclease	110,9 µL
Tampão Nspl 10X	19,2 µL
BSA 100X	1,9 µL
Nspl	9,6 µL
Volume total	141,6 µL

Manter no gelo

- Fazer um vórtex do máster mix de digestão em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.

- Adicionar 14,75 μL de máster mix de digestão em cada amostra colocada na placa, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
DNA genômico (50 ng/ μL)	5,0 μL (250 ng)
Master mix de digestão	14,75 μL
Volume total	19,75 μL

Manter no gelo

- Selar a placa com filme adesivo.
- Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor.
- Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Digestão CytoScan*:

Temperatura	Tempo
37 °C	2 horas
65 °C	20 minutos
4 °C	manter

- Retirar a placa do termociclador, fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto. Proceder para ligação.

Ligação:

- Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.
- Descongelar os reagentes Tampão T4 DNA ligase 10x e Adaptador NspI 50 μM à temperatura ambiente. Fazer um vórtex para assegurar que qualquer precipitado seja ressuscitado e o tampão fique claro, e um spin e colocar no gelo.
- Manter a enzima T4 DNA ligase à -20°C pronta para uso.
- Preparar o máster mix de Ligação, de acordo com a tabela a seguir:

Reagentes	Para 8 amostras
Tampão T4 DNA ligase	25 μL
Adaptador Nspl 50 μM	7,5 μL
T4 DNA ligase	20 μL
Volume total	52,5 μL

Manter no gelo

- Fazer um vórtex do máster mix de ligação em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.
- Adicionar 5,25 μL de máster mix de ligação em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostra Nspl digerida	19,75 μL
Master mix de ligação	5,25 μL
Volume total	25 μL

Manter no gelo

- Selar a placa com filme adesivo.
- Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor.
- Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Ligação CytoScan*:

Temperatura	Tempo
16 °C	3 horas
70 °C	20 minutos
4 °C	overnight

- Retirar a placa do termociclador, fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto. Congelar as amostras à -20°C para no outro dia proceder para a PCR.

PCR:

- Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.
- Descongelar as amostras. Assegurar que a placa de ligação está selada. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Diluir as amostras ligadas, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostras ligadas	25 µL
Água livre de nuclease	75 µL
Volume total	100 µL

Manter no gelo

- Selar a placa com fita adesiva.
- Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Transferir 10 µL de cada amostra diluída para quatro pocinhos na placa de PCR.
- Descongelar os reagentes: Tampão de PCR Taq TITANIUM™ 10x, mistura de dNTP, Primer 2 de PCR à temperatura ambiente. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e colocar imediatamente no gelo.
- Manter o reagente GC-Melt e a água livre de nuclease no gelo.
- Deixar a enzima DNA Taq Polimerase TITANIUM™ 50x à – 20°C pronta para uso.
- Preparar o máster mix de PCR em um tubo de 15 mL, de acordo com a tabela a seguir:

Reagentes	Para 8 amostras
Água livre de nuclease	1453,6 µL
Tampão de PCR Taq TITANIUM™ 10x	368,0 µL

Manter no gelo

Reagente GC-Melt	736,0 μL
Mistura de dNTP (2,5 mM cada)	515,2 μL
Primer 002 de PCR	165,6 μL
DNA Taq Polimerase TITANIUM™ 50x	73,6 μL
Volume total	3312,0 μL

- Fazer um vórtex do máster mix de PCR em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.
- Adicionar 90,0 μL de máster mix de PCR em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostra ligada diluída	10 μL
Master mix de PCR	90 μL
Volume total	100 μL

Manter no gelo

- Selar a placa com filme adesivo.
- Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.
- Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *PCR CytoScan*:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	3 minutos	_____
94 °C	30 segundos	30
60 °C	45 segundos	30
68 °C	15 segundos	30
68 °C	7 minutos	_____
4 °C	manter	_____

- Proceder para a checagem do produto de PCR.

Checagem do produto de PCR:

- Preparar um gel de agarose a 2%.
- Misturar 3 μL de cada amostra com 5 μL de loading (corante).
- Aplicar no primeiro poço do gel 6 μL do ladder de 50-2000 pb, no segundo ao nono poço o volume total da amostra com o corante e no décimo poço 6 μL do ladder de 50-2000 pb.
- Correr o gel à 120 V (5V/cm) por 1 hora.
- A maioria do produto de PCR deverá estar entre 150 a 2000 pb.
- Enquanto o gel está correndo, começar a purificação do produto da PCR.

Purificação do produto da PCR:

- Transferir o pool dos 4 produtos de PCR de cada amostra, com exceção do controle negativo, para um microtubo de 1,5 mL. Conferir se todo o volume de cada amostra foi transferido.
- Homogeneizar completamente as Beads de Purificação por inversão, até a mistura ficar homogênea.
- Adicionar 720 μL da beads de Purificação em cada pool de amostra.
- Misturar bem por 10 inversões os tubos.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas pra cima, por 3 minutos à 12.000 rpm.
- Colocar os tubos na raque magnética (MagnaRack™). Deixar os tubos na raque até que o pelete tenha subido completamente. Pipetar o sobrenadante sem encostar-se ao pelete e descartar o sobrenadante.
- Adicionar 1000 μL de Tampão de lavagem de Purificação em cada tudo.
- Colocar os tubos no adaptador do vórtex e fazer o vórtex por no máximo 2 minutos.
- Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas para cima, por 3 minutos à 12.000 rpm.

- Colocar os tubos na raque magnética e deixar os tubos na raque até que o pelete tenha subido completamente. Pipetar o sobrenadante sem encostar-se ao pelete e descarta o sobrenadante.
- Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas para cima, por 30 segundos à 12.000 rpm.
- Colocar os tubos na raque magnética e deixar os tubos na raque até que o pelete tenha subido completamente. Com uma micropipeta P20, remover qualquer sobrenadante do tampão de lavagem de purificação de cada tubo.
- Colocar os tubos fora da raque magnética, com as tampas abertas, em temperatura ambiente por 10 minutos, para permitir que evapore qualquer remanescente do tampão de lavagem de purificação.
- Adicionar 52 μL de Tampão de eluição em cada tubo, dispensando diretamente nas beads.
- Colocar os tubos no adaptador do vórtex e fazer o vórtex em alta velocidade por 10 minutos para ressuspender as beads. Se as beads não estiverem totalmente ressuspendidas, fazer o vórtex de cada tubo por mais 2 minutos.
- Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas para cima, por 4 minutos à 12.000 rpm.
- Colocar os tubos na raque magnética, por 10 minutos, até que todo o pelete tenha subido completamente.
- Transferir 47 μL da amostra eluída para cada pocinho da placa.
- Selar a placa, fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor e fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Proceder para a quantificação do produto de PCR purificado.

Quantificação do produto de PCR purificado:

- Aliquotar 18 μL de água livre de nuclease em sete microtubos de PCR.
- Transferir 2 μL de cada amostra purificada para cada um dos sete microtubos de PCR.
- Fazer um vórtex e um spin de cada tubo.

- Fazer o branco do NanoDrop® usando água livre de nuclease.
- Quantificar as amostras no equipamento Nanodrop®.
- Após a quantificação, calcular a concentração não diluída de cada amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$:
- $(\text{concentração em ng}/\mu\text{L} \times 10) / 1000$
- Congelar as amostras à -20°C para no outro dia proceder para a Fragmentação.

Fragmentação:

- Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.
- Assegurar que a centrífuga de placa esteja mantendo a temperatura de 4°C , antes de proceder ao passo da fragmentação.
- Descongelar as amostras de produto de PCR purificado. Assegurar que a placa de ligação está selada. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto. Colocar a placa no *cooling block* que está no gelo e deixar esfriar 10 minutos antes do uso.
- Colocar os reagentes da fragmentação: água livre de nuclease, tampão de fragmentação 10x no gelo. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e voltar imediatamente para o gelo.
- Deixar o reagente de fragmentação (enzima DNase) à -20°C pronta para uso.
- Preparar o máster mix de fragmentação de acordo com a concentração do reagente de fragmentação de uso:

Reagentes	2.0 ^{U/μL}	2.25 ^{U/μL}	2.5 ^{U/μL}	2.75 ^{U/μL}	3.0 ^{U/μL}
Água livre de nuclease	122.4 μL	123.2 μL	123.8 μL	124.4 μL	124.8 μL
Tampão de fragmentação 10X	158.4 μL	158.4 μL	158.4 μL	158.4 μL	158.4 μL
Reagente de fragmentação (DNase)	7.2 μL	6.4 μL	5.8 μL	5.2 μL	4.8 μL
Volume total	288 μL	288 μL	288 μL	288 μL	288 μL

- A concentração da enzima de uso é 2.5 U/ μL.

Manter no gelo

- Fazer um vórtex do máster mix de fragmentação em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.
- Adicionar 10,0 μL de máster mix de fragmentação em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras		Volume/amostra
Amostra	produto de PCR	45,0 μL
purificado		
Master mix de fragmentação		10,0 μL
Volume total		55,0 μL

Manter no gelo

- Selar a placa com filme adesivo.
- Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.
- Levar a placa até a centrífuga no gelo. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto, na centrífuga mantida na temperatura de 4 °C.
- Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Fragmentação CytoScan*:

Temperatura	Tempo
37 °C	35 minutos
95 °C	15 minutos
4 °C	manter

- Proceder imediatamente para a checagem no gel da fragmentação.

Checagem da fragmentação:

- Preparar um gel de agarose a 4%.

- Fazer uma diluição em um tubo de strip com 4 μL de cada amostra e 28 μL de água livre nuclease. Fazer um vórtex e um spin nas amostras diluídas nos strips.
- Misturar 8 μL de cada amostra diluída com 5 μL de loading (corante).
- Aplicar no primeiro poço do gel 6 μL do ladder de 25 pb, no segundo ao oitavo poço o volume total da amostra com o corante e no nono poço 6 μL do ladder de 25-125 pb.
- Correr o gel à 120 V (5V/cm) por 1 hora.
- A maioria da amostra fragmentação deverá estar entre 25 a 125 pb.
- Enquanto o gel está correndo, começar a marcação.

Marcação (labeling):

- Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.
- Descongelar os reagentes da marcação: tampão TdT 5x e Reagente de marcação de DNA 30 mM (biotina) à temperatura ambiente e colocar no gelo. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e voltar para o gelo.
- Deixar a enzima TdT à -20°C pronta para uso.
- Preparar o máster mix de marcação de acordo com a tabela:

Reagentes	Para 8 amostras
Tampão TdT 5X	134,4 μL
Reagente de marcação de DNA 30 mM	19,2 μL
TdT	33,6 μL
Volume total	187,2 μL

Manter no gelo

- Fazer um vórtex do máster mix de marcação em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.
- Adicionar 19,5 μL de máster mix de marcação em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostra DNA fragmentado	51,0 μL
Master mix de marcação	19,5 μL
Volume total	70,5 μL

- Selar a placa com filme adesivo.
- Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.
- Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Label CytoScan*:

Temperatura	Tempo
37 °C	4 horas
95 °C	15 minutos
4 °C	manter

- Proceder para a hibridização.

Hibridização:

- Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.
- Desembrulhar os chips e permitir que cheguem à temperatura ambiente para uso. Identificar os chips de cada amostra.
- Pré-aquecer o forno de hibridização por pelo menos 1 hora à 50 °C com a rotação ligada.
- Fazer o registro dos chips no programa: Quick registration → Inserir código da amostra e o seu respectivo código de barras.
- Pegar os reagentes de hibridização na geladeira e colocar no gelo. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e voltar para o gelo.

- Preparar o máster mix de hibridização em um tubo de 15 mL de acordo com a tabela:

Reagentes	Para 8 amostras
Tampão Hyb parte 1	1584,0 μL
Tampão Hyb parte 2	144,0 μL
Tampão Hyb parte 3	67,2 μL
Tampão Hyb parte 4	9,6 μL
Reagente oligo controle 0100	19,2 μL
Volume total	1824,0 μL

Manter no gelo

- Fazer um vórtex do máster mix de hibridização em alta velocidade por 3 vezes (3 segundos cada vez).
- Adicionar 190 μL de máster mix de hibridização em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostra DNA marcado	70,5 μL
Master mix de hibridização	190,0 μL
Volume total	260,5 μL

- Selar a placa com filme adesivo.
- Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.
- Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
- Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Hyb CytoScan*:

Temperatura	Tempo
95 °C	10 minutos
4 °C	manter

- Permitir que as amostras fiquem incubadas à 49 °C por pelo menos 1 minuto antes de aplicar no chip.
- Deixar as amostras no termociclador, aplicar 200 µL de cada amostra em seu respectivo chip.
- Tampar os septos do chip com Tough-Spots® e pressionar firmemente.
- Imediatamente após a aplicação das amostras no chip, levá-las para o forno de hibridização, quatro de cada vez.
- Hibridizar os chips por 16 a 18 horas à 50 °C e 60 rpm de rotação.

Lavagem, Stain e Scaneamento:

- Fazer o prime da estação de lavagem (PRIME 450) uns 40 minutos antes de começar a lavagem.
- Aliquotar em microtubos de 1,5 mL os seguintes reagentes para cada chip:
 - 500 µL solução de Stain Buffer 1 em microtubo âmbar;
 - 500 µL solução de Stain Buffer 2 em microtubo claro;
 - 800 µL tampão de Array Holding em microtubo claro;
- Lavagem dos chips:
- Carregar a estação fluídica com os tampões de lavagem (Wash A e Wash B), com água miliQ e com as soluções de stain. Selecionar o protocolo fluídico: *CytoScanHD_Array_450*.
- Iniciar o protocolo fluídico e deixar os as alavancas do cartucho para baixo na posição de ejetar.
- Remover as Tough-Spots® de cada chip.
- Carregar os chips na estação fluídica.
- Antes do scaneamento:

- Quando acabar a lavagem, retirar os chips e verificar se não há bolhas. Se houver bolhas, voltar os chips para estação de lavagem para a retirada de bolhas.
- Tampar os septos do chip com Tough-Spots® e colocar o chip no scanner.
- Scanear os chips de acordo com o *Manual Usuário do Ensaio CytoScan™* (PN703038).
- Verificar os controles de qualidade de cada chip:
 - mapD < 0.25 108
 - SNPQC > 15
 - Waviness < 0.12
- Após o scaneamento, fazer as análises de cada amostra no software Chromosome Analysis Suite (ChAS) Affymetrix®.

ANEXO VI

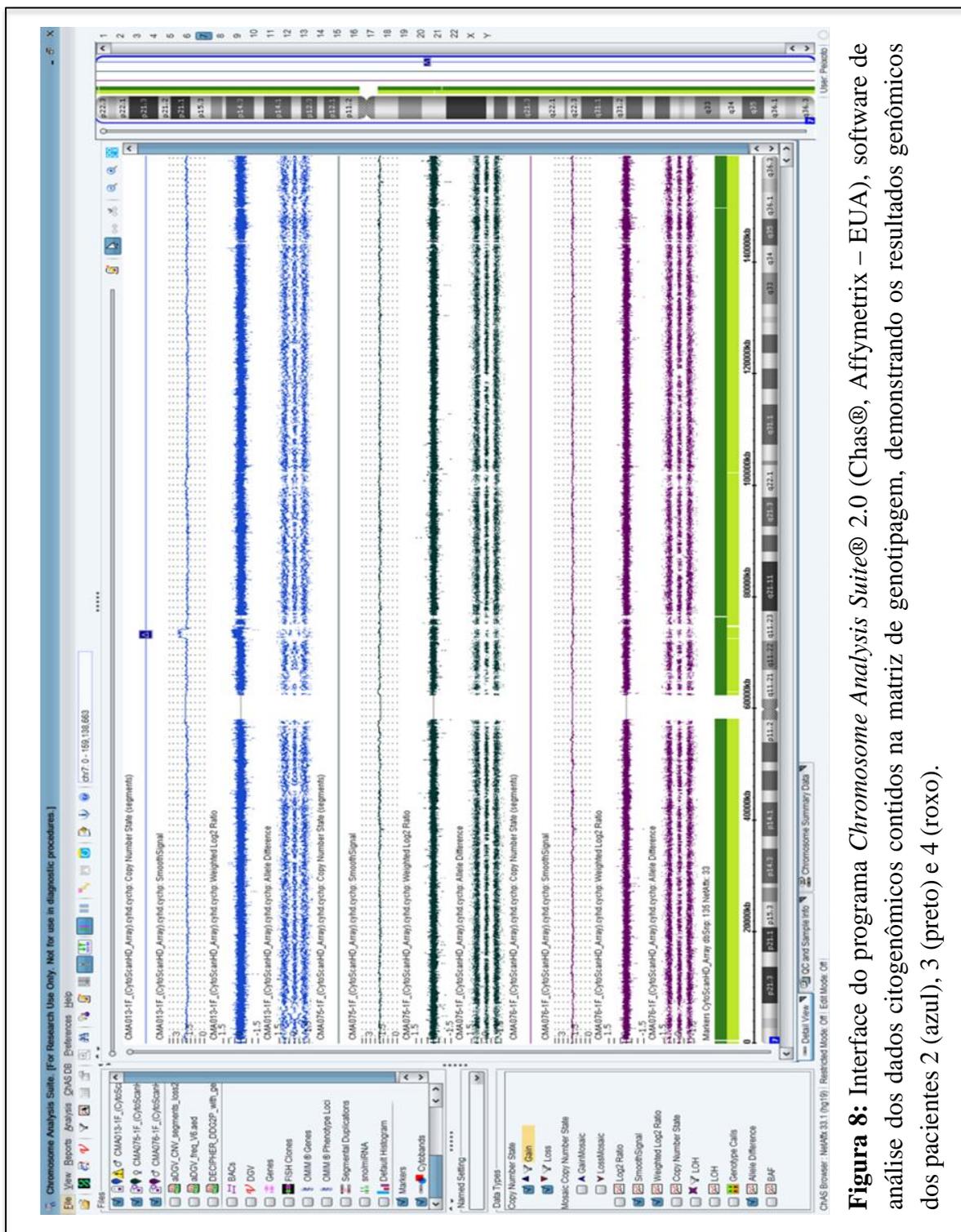


Figura 8: Interface do programa *Chromosome Analysis Suite*® 2.0 (Chas®, Affymetrix – EUA), software de análise dos dados citogenômicos contidos na matriz de genotipagem, demonstrando os resultados genômicos dos pacientes 2 (azul), 3 (preto) e 4 (roxo).