

## DETECCIÓN DE UN CASO DE SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN POR MLPA

SERGIO LAURITO<sup>1</sup>, TERESITA BRANHAM<sup>1</sup>, GUSTAVO HERRERO<sup>2</sup>, SILVANA MARSA<sup>3</sup>,  
FERNANDA GARRO<sup>2</sup>, MARÍA ROQUÉ<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratorio de Alteraciones Genéticas y Epigenéticas en Patologías Humanas  
IHEM-CCT-CONICET-Mendoza, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza;<sup>2</sup>Pediátrica San Luis Centro Médico Privado, San Luis; <sup>3</sup>GENES, San Luis

**Resumen** El síndrome de Williams-Beuren (WBS) es un trastorno del desarrollo neurológico que incluye diferentes manifestaciones clínicas como estenosis aórtica supra valvular, lesiones cerebrovasculares, retraso en el crecimiento, rasgos faciales “élficos” y retraso mental. Es causado por una microdelección heterocigótica de genes contiguos en la banda cromosómica 7q11.23, generando un cambio en el número de copias (CNV) de esta región crítica. Los pacientes presentan una amplia manifestación clínica y variada expresión fenotípica. La confirmación de la sospecha clínica es esencial para el seguimiento clínico del paciente y el asesoramiento genético de la familia. La técnica estándar para la detección de WBS es la hibridización fluorescente *in situ*. En los últimos años la metodología MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*) ha sido incorporada a los laboratorios diagnósticos para la detección de CNV relacionados con distintas enfermedades, incluyendo WBS. El objetivo de este trabajo fue confirmar el diagnóstico clínico de WBS en un niño, utilizando la técnica de MLPA. Los ensayos por MLPA permitieron detectar la *delección* de los genes CYLN2, FZD9, STX1A, ELN, LIMK1 y RFC2. En regiones geográficas donde la determinación por FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) no está disponible para esta enfermedad, la metodología MLPA ha permitido confirmar el diagnóstico clínico y detectar los genes involucrados en la alteración. Hasta nuestro conocimiento no hay otros casos publicados sobre síndrome de WB detectado por la técnica MLPA en la Argentina.

**Palabras clave:** síndrome de Williams Beuren, MLPA

**Abstract** *Detection of a Williams Beuren syndrome case by MLPA.* Williams-Beuren syndrome (WBS) is a rare developmental disorder characterized by distinctive facial, neurobehavioral, and cardiovascular features. WBS is caused by a heterozygous contiguous gene microdeletion of the WBS critical region on chromosome 7q11.23. Confirmation of clinical suspicion is essential for clinical monitoring of the patient and genetic counseling of the family. Fluorescence in situ hybridization (FISH) is considered the gold standard technique for detecting WBS. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) has been introduced into DNA diagnostic laboratories for the detection of copy number variations in several diseases including WBS. The objective of this study was to confirm, by MLPA, the clinical diagnosis of WBS in a pediatric patient. This technique allowed to detect the deletion of CYLN2, FZD9, STX1A, ELN, LIMK1 and RFC2 genes. In geographic regions where the detection by FISH is not available for this disease, the MLPA methodology allowed to confirm the clinic diagnostic of WBS. To our knowledge this is the first report demonstrating the confirmation of WBS by MLPA in Argentina.

**Key words:** Williams Beuren syndrome, MLPA

El síndrome de Williams-Beuren (WBS; OMIM 194050) es un trastorno del desarrollo neurológico que incluye diferentes manifestaciones clínicas como estenosis aórtica supra valvular, lesiones cerebrovasculares, retraso en el crecimiento, rasgos faciales “élficos” y retraso mental.

Además, en esta enfermedad se han comunicado trastornos en el metabolismo de la vitamina D e hipercalcemia<sup>1</sup>. Los pacientes con WBS presentan frecuentemente hipercalcemia, personalidad amigable y la aparición precoz de arrugas en la piel. La frecuencia varía según los informes entre 1:7 000 y 1:20 000 nacimientos vivos<sup>1</sup>, sin presentar diferencias entre razas ni sexos.

El síndrome WB es causado en el 90-95% de los pacientes, por una microdelección heterocigótica de genes contiguos en la banda cromosómica 7q11.23, llamada región crítica de WBS. Esta región abarca de 1.5 a 1.8 Mb y contiene al menos 25 genes (Tabla 1). Flanqueando la región crítica se encuentran 2 regiones

Recibido: 16-IV-2012

Aceptado: 24-VIII-2012

**Dirección postal:** Dra. María Roqué, Laboratorio de Alteraciones Genéticas y Epigenéticas en Patologías Humanas, IHEM-CCT-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Parque General San Martín, 5500 Mendoza, Argentina  
Teléfono (54-261) 4494117 e-mail: mroque@mendoza-conicet.gob.ar

repetitivas (LCRs) con homología cercana al 97%. Son estas regiones LCR las que pueden provocar una recombinación no-homóloga durante la meiosis, generando como consecuencia un cambio en el número de copias (CNV) (*delección o duplicación*) de la región crítica en los pacientes WBS. La *delección* de esta región es la alteración más frecuentemente relacionada con WBS.

Si bien el síndrome cuenta con rasgos específicos, los pacientes presentan una amplia manifestación clínica y expresión fenotípica variada. La confirmación de la sospecha clínica es esencial para el seguimiento clínico del paciente y el asesoramiento genético de la familia. Un diagnóstico certero y precoz es fundamental para evitar pasos innecesarios y planificar las medidas óptimas de tratamiento.

Desde que se conoció la causa genética de WBS en 1993, el diagnóstico es confirmado por la técnica de FISH<sup>2</sup> (*Fluorescence In Situ Hybridization*) mediante una sonda que detecta la *delección* del gen de la elastina (ELN) y/o

por análisis de marcadores microsatelitales ubicados dentro de la región crítica de WBS. En los últimos años la metodología MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*) ha sido incorporada a los laboratorios de diagnóstico para la detección de CNVs relacionados con distintas enfermedades, incluyendo WBS.

El objetivo de este trabajo fue confirmar el diagnóstico clínico de síndrome de WB en un niño, utilizando la técnica de MLPA. Esta metodología permite la detección de variaciones en el número de copias de hasta 50 regiones genómicas diferentes de manera simultánea. La detección tanto de *delección* como *duplicación* de estas regiones es detectada por una PCR fluorescente semicuantitativa a partir de sondas específicas que son previamente hibridadas en cada región a estudiar. La cantidad de producto de PCR fluorescente es indicativa del número de copias de los genes estudiados ([www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)). La metodología es sensible, rápida, requiere de poca cantidad de ADN y sus sondas están diseñadas en sentido 5'→3' evitando de esta manera cualquier posible interferencia del RNAm. A su vez, respecto de FISH, es menos laboriosa y tiene un costo sustancialmente menor, siendo postulada por algunos como la metodología diagnóstica ideal para países en desarrollo<sup>1</sup>. Los ensayos por MLPA permitieron confirmar el diagnóstico clínico e identificar los genes afectados en el caso clínico comunicado.

TABLA 1.– Genes de la región crítica de WBS, 7q11.23

Gen	Descripción (en inglés)
ABHD11	abhydrolase domain containing 11
BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B
BCL7B	B cell lymphoma 7 gene related
CLDN4	claudin 4
CYLN2**	CAP-GLY domain containing linker protein 2
CPETR1	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor 1
CPETR2	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor 2
CPETR2	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor 2
DNAJC30	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 30
E1F4H	Eukaryotic translation initiator factor 4H
ELN*	Elastin
FKBP6	FK506 binding protein 6
FZD9*	frizzled family receptor 9
GTF2I	general transcription factor Iii
GTF2IRD1	GTF2I repeat domain containing 1
GTF2IRD2B	GTF2I repeat domain containing 2B
LAT2	linker for activation of T cells family, member 2
LIMK1*	LIM domain kinase 1
MLXIPL	MLX interacting protein-like
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1
NSUN5	NOP2/Sun domain family, member 5
RFC2*	Replication factor C, subunit 2
STX1A*	Sintaxin 1A
TBL2	transducin (beta)-like 2
VPS37D	vacuolar protein sorting 37 homolog D ( <i>S. cerevisiae</i> )

\*Indica los genes detectados por las sondas de MLPA (kit P064);

\*\*indica que dos sondas reconocen el mismo gen

## Caso clínico

Se presenta el caso de un niño de 2 años de edad, varón, con sospecha clínica de síndrome de WB. Los antecedentes obstétricos revelaron episodios reiterados de infecciones urinarias, toxoplasmosis materna previa al embarazo y un nacimiento por parto normal. El peso al nacer fue 2200 g (p3) y el apgar en 6/7. Post-parto, el paciente estuvo internado en neonatología por 25 días debido a un cuadro de sepsis. Por presentar un soplo cardíaco se realizó ecocardiografía *doppler* color y se diagnosticó estenosis aórtica supraavalvular con un gradiente de 40, e insuficiencia leve de la válvula tricúspide.

A la fecha presenta retraso psicomotriz, lenguaje bisilábico y movimientos permanentes de descarga. El examen físico revela un peso 10.63 kg (p10), talla 85.5 cm (p25) y perímetro cefálico 47 cm (p15). Los rasgos faciales se definen por boca entreabierta permanente, labios prominentes que dan aspecto de macroglosia, mejillas sobresalientes, orejas grandes no en punta, línea media del labio superior larga, cabello normal, puente nasal deprimido y tejido celular subcutáneo aumentado en la región peri-orbitaria.

Se detecta soplo sistólico 4/6 en todo el tórax, pulsos débiles, presión arterial 120/60 mmHg, con leve cianosis con el llanto, saturación 93-94%.

Se realizó estudio genético para CNV de la región 7q11 por MLPA mediante 7 sondas específicas para la región crítica de WBS, incluyendo controles para otros cromosomas. El diseño de las sondas incluidas en el *kit* comercial P064 permite abarcar la región crítica de WBS completa, basándose en lo informado en la literatura<sup>1</sup>. El procedimiento se basó en las indicaciones de MRC-Holland, incorporando algunas modificaciones introducidas por nuestro grupo<sup>3,4</sup>. Las 7 sondas reve-

laron una *delección* heterocigota de los genes CYLN2, FZD9, STX1A, ELN, LIMK1 y RFC2 en sangre periférica del paciente.

**Discusión**

El estudio por MLPA permitió confirmar el diagnóstico clínico del síndrome de WB.

Para evaluar la presencia de CNV se realizó un análisis de regresión entre los resultados de una muestra control y la muestra de ADN del paciente. Las siete sondas revelaron en el paciente una *delección* significativa de una de las copias alélicas abarcando una región de 0.96 Mb (Fig. 1). Las 7 sondas hibridan en los genes contiguos CYLN2, FZD9, STX1A, ELN, LIMK1, RFC2, *delecionados* en 90-95% de los pacientes con SWB<sup>5</sup>.

Es sabido que la haploinsuficiencia del gen ELN tiene un claro efecto sobre las anomalías cardíacas. Este gen codifica para una proteína llamada elastina y su disfunción está asociada con estenosis supravascular aórtica y con anomalías del tejido conectivo. Todos los pacientes con síndrome WB presentan alterado el gen ELN y su rol

en el desarrollo de la enfermedad ha sido ya comunicado por otros autores<sup>6, 7</sup>.

Sin embargo, aun no es clara la contribución del resto de los genes localizados en la región crítica. En el caso presentado, además del gen ELN se detectan 5 genes *delecionados*. El gen CYLN2 codifica para una proteína expresada principalmente en cerebro y se ha propuesto su participación en la interacción entre organelas específicas y los microtúbulos, relacionándola con la estructura y función normal de las células nerviosas. La *delección* de este gen podría contribuir a la insuficiencia neurológica y cognitiva de los pacientes con síndrome WB<sup>6</sup>. El gen FZD9 codifica para un receptor de la vía de señalización Wnt1, inhibiendo  $\beta$ -catenina; se expresa principalmente en cerebro, testículo, ojo, músculo esquelético y riñón<sup>7</sup>. Se postula que el gen FDZ9 tiene un rol en el desarrollo del hipocampo, siendo el responsable de los rasgos comportamentales de WBS. El gen STX1A codifica para un miembro de la superfamilia de las syntaxinas. Las syntaxinas son proteínas específicas del cerebro que participan en el anclaje de las vesículas a la membrana

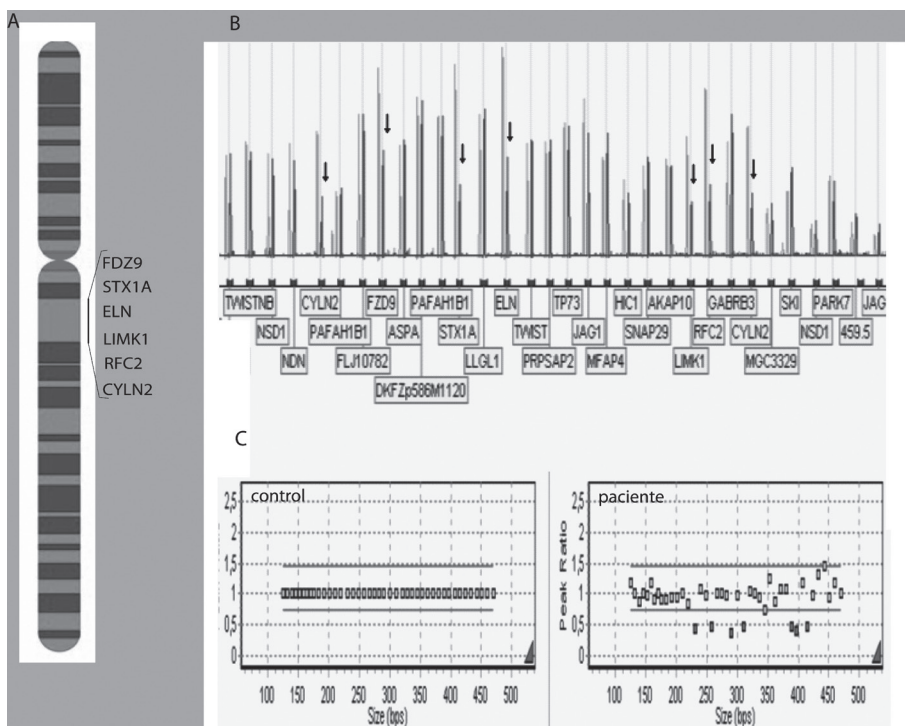


Fig. 1.– A. Representación del cromosoma 7 y localización de los genes detectados por las sondas del kit de MLPA P064. B. Electroferograma obtenido usando el software GenMarker® v1.75. Cada pico corresponde a una región estudiada, los picos grises representan la muestra control y los picos negros la muestra del paciente. Las flechas indican CNV en 7 de las regiones estudiadas. C. Análisis de Ratios para el número de copias del paciente respecto del control (error estándar 0.04). Cada punto representa una región estudiada, los puntos entre ambas líneas horizontales se encuentran dentro del desvío aceptado. Los puntos por debajo de la línea horizontal inferior se encuentran alrededor de un ratio de 0.5, infiriéndose una *delección* heterocigota de estas regiones.

presináptica. Tienen un rol importante en la exocitosis de neurotransmisores. Se sugiere que los desórdenes neurológicos del síndrome de WB se deben a la *deleción* de este gen<sup>8</sup>. El gen RFC2 codifica para la subunidad 2 del factor de replicación, participando en la elongación de la hebra de ADN durante la replicación. Según Francke y col., la *deleción* del gen RFC2 podría afectar la eficiencia de la replicación del ADN y en consecuencia contribuir a defectos durante el desarrollo y crecimiento<sup>7</sup>. El gen LIMK1 codifica para una quinasa serina/treonina, que regula la polimerización de actina vía fosforilación e inactivación del factor de unión cofilina. Esta proteína se expresa de manera ubicua durante el desarrollo y participa en diversos procesos celulares asociados con la estructura del citoesqueleto. Esta proteína también estimula el crecimiento axonal y podría tener un rol durante el desarrollo del cerebro. La *deleción* de LIMK1 se postula implicada en el impedimento de las habilidades visuo-espaciales en pacientes con WB<sup>9</sup>.

El caso presentado muestra la sensibilidad y efectividad del diagnóstico de WBS basado en MLPA. En regiones de Argentina como Cuyo, donde la determinación por FISH no está disponible para esta enfermedad, la metodología MLPA ha permitido confirmar el diagnóstico clínico y detectar los genes involucrados en la alteración.

Hasta nuestro conocimiento, esta es la primera confirmación de diagnóstico del síndrome de WB por la técnica de MLPA en la Argentina.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## Bibliografía

1. Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, et al. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Res Notes* 2012; 5: 13.
2. Osborne LR, Joseph-George AM, Scherer SW. Williams-Beuren syndrome diagnosis using fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Med* 2006; 126: 113-28.
3. Gomez LC, Marzese DM, Adi J, et al. MLPA mutation detection in Argentine HNPCC and FAP families. *Fam Cancer* 2009; 8: 67-73.
4. Marzese DM, Mampel A, Gomez LC, et al. Detection of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene by the molecular method MLPA in the first Argentine affected families. *Genet Mol Res* 2008; 7: 223-33.
5. Dutra RL, Pieri PC, Teixeira AC, Honjo RS, Bertola DR, Kim CA. Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66: 959-64.
6. van Hagen JM, van Der Geest JN, van der Giessen RS, et al. Contribution of CYLN2 and GTF2IRD1 to neurological and cognitive symptoms in Williams Syndrome. *Neurobiol Dis* 2007 April; 26: 112-24.
7. Francke U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1947-54.
8. Nakayama T, Matsuoka R, Kimura M, et al. Hemizygous deletion of the HPC-1/syntaxin 1A gene (STX1A) in patients with Williams syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 82: 49-51.
9. Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, et al. LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 1996 July 12; 86: 59-69.

- - - -

*Creo que la mentira es muy necesaria por razones de cortesía, de buena educación y de reserva también. Yo, al cabo de un día, con palabras o callándome, habré mentido constantemente, y eso que me considero un hombre ético.*

Maria Esther Vázquez. Frases y Anécdotas de Borges. En: *Borges. Sus días y su tiempo*. Buenos Aires: Ediciones Fundación Victoria Ocampo, 2007. p 324