ROBERTA LELIS DUTRA

Análise de marcadores moleculares para o diagnóstico da
Síndrome de Williams-Beuren

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Chong Ae Kim

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dutra, Roberta Lelis

Análise de marcadores moleculares para o diagnóstico da síndrome de
Williams-Beuren / Roberta Lelis Dutra. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Síndrome de Williams 2.Marcadores genéticos 3.Reação em cadeia
da polimerase

USP/FM/DBD-011/11

Dedicatória

Á todos os pacientes com a síndrome de Williams-Beuren e seus familiares, que contribuíram gentilmente, para a construção deste trabalho.

Agradecimientos

---

*Aos meus queridos pais Carlos e Luzia e á
minha adorável irmã Camila por estarem
sempre ao meu lado e me apoiando na vida
acadêmica. Minha eterna gratidão à esta
família linda que eu deixei há 7 meses para
formar a minha própria família.*

*Ao meu esposo e companheiro
Thiago que há muito tempo me
acompanha nessa jornada, pela sua
paciência e amor nos dias mais
difíceis*

*Á minha querida orientadora, Profa. Dra. Chong Ae Kim,
por depositar grande confiança no meu trabalho. E que, nestes
anos percorridos durante o mestrado, conheci uma pessoa
incrível no qual vou sempre agradecê-la por estar presente na
minha vida acadêmica e pessoal.*

À **Dra. Patrícia de Campos Pieri**, que durante os momentos mais difíceis da minha vida acadêmica no laboratório, esteve presente me ajudando na padronização dos métodos;

Aos coordenadores do Laboratório de Investigação em Pediatria Clínica (LIM36) **Profa. Dra. Magda Carneiro Sampaio** e **Prof. Dr. Carlos Moreira Filho**, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

À **Profa. Dra. Thelma Okay**, uma das primeiras pessoas a acreditar e confiar no meu trabalho desde o início desta jornada;

Às minhas grandes amigas **Fernanda, Carol, Thais, Keli, Natália, Marília, Aline, Joyce, Beatriz**, pelo apoio nos momentos mais difíceis e naqueles que foram tão felizes para mim. À essas grandes mulheres minha amizade e gratidão durante esse período.

Ao grande amigo, **Vagner** por seu auxílio e companheirismo desde o início do mestrado;

À **Rachel Honjo** pela dedicação aos pacientes atendidos no Ambulatório de SWB na Unidade de Genética – ICr e colaboração na construção deste trabalho;

À **Dra. Bébora Bertola** e aos médicos residentes Israel, Caio, Mariana e Guilherme, pelo apoio e incentivo.

À **Dra. Leslie Kulikowski**, que considero uma pessoa maravilhosa, por me auxiliar na parte molecular e na conclusão deste trabalho;

Ao **Dr. Ulysses Dória Filho**, quem eu tive o prazer de conhecer, por me ajudar tão gentilmente na análise estatística deste trabalho;

Aos **funcionários e alunos do LIM 36** que de alguma forma colaboraram com este trabalho e que me apoiaram na conclusão deste projeto;

À funcionária da biblioteca central da Faculdade de Medicina da USP, **Marinalva**, pela paciência e elaboração da ficha catalográfica deste trabalho;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro deste trabalho.

Enfim, **a todos** que de alguma maneira tornaram este trabalho possível e assim, contribuíram para a minha formação e para o meu crescimento profissional e pessoal.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia *de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

SUMÁRIO

1	Introdução	25
1.1	Aspectos históricos	25
1.2	Epidemiologia	25
1.3	Aspectos clínicos	26
1.3.1	Alterações craniofaciais	26
1.3.2	Alterações cardiovasculares	26
1.3.3	Aspectos neurológicos e comportamentais	27
1.3.4	Hiperacusia	27
1.3.5	Alterações oftalmológicas	28
1.3.6	Alterações geniturinárias	29
1.3.7	Alterações no crescimento	29
1.3.8	Alterações endocrinológicas	30
1.4	Aspectos genéticos	30
1.5	Aspectos cromossômicos	31
1.5.1	Variação no número de cópias e seqüências de repetições	32
1.5.2	Deleções	33
1.5.3	Duplicações	37
1.5.4	Inversões	39
1.6	Aspectos moleculares	40
1.6.1	Principais genes deletados na SWB	40
1.6.1.1	<i>Elastina (ELN)</i>	42
1.6.1.2	<i>LIM kinase 1 (LIMK1)</i>	43
1.6.1.3	<i>Fator de transcrição geral (GTF2IRD1)</i>	43
1.6.1.4	<i>Antígeno estromal ou estromalina (STAG3)</i>	44
1.6.1.5	<i>Região cromossômica 14 da Síndrome de Williams-Beuren (WBSCR14)</i>	44
1.6.2	Outros genes responsáveis pelo fenótipo na SWB	45
1.7	Origem parental da deleção	47
1.8	Métodos laboratoriais	48
1.8.1	FISH	48

1.8.2	Marcadores microssatélites	49
1.8.2.1	Marcador D7S1870	50
1.8.2.2	Marcadores D7S489 e D7S489A	50
1.8.2.3	Marcador D7S613	51
1.8.2.4	Marcador D7S2476	51
1.8.3	Outras técnicas moleculares	52
2	Objetivos	55
3	Casuística & Métodos	57
3.1	Casuística	57
3.2	Métodos para o estudo molecular	57
3.2.1	Coleta de sangue e extração de DNA genômico	58
3.2.2	Quantificação e diluição das amostras	59
3.2.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	60
3.2.4	Gel de agarose	62
3.2.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	62
3.2.6	Método de análise dos resultados	64
3.2.7	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	64
3.3	Análise estatística	65
4	Resultados	68
4.1	Casuística	68
4.2	Análise molecular	68
4.3	Achados clínicos e correlação molecular	71
5	Discussão	75
5.1	Marcadores microssatélites	75
5.1.1	Marcadores x FISH	76
5.1.2	Tamanho da deleção	76
5.1.3	Origem parental da deleção	77
5.2	Correlação de achados clínicos	78
5.2.1	Presença e ausência de deleção	78
5.2.2	Tamanho da deleção	78
5.2.3	Origem parental	79
5.2.4	Aconselhamento genético	79
6	Conclusão	82

Anexos

Anexo A	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa FMUSP	84
Anexo B	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
Anexo C	Ficha clínica dos pacientes com SWB	89
Anexo D	Artigo aceito para publicação	90
Anexo E	Artigo a ser enviado para publicação - <i>American Journal of Medical Genetics</i>	104
Referências		118
	Referências eletrônicas	134

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do cromossomo 7. A seta indica a região (7q11.23), deletada no braço longo para a SWB. 31

Figura 2 - Representação do mecanismo de deleção e duplicação responsáveis pela SWB. Os retângulos pretos são seqüências repetidas (LCR) que se rompem na região 7q11.23 e os retângulos azuis representam os genes deletados ou duplicados para a doença. 34

Figura 3 - Representação do processo evolutivo da região 7q11.23 para a SWB. ...35

Figura 4 - Representação esquemática da região 7q11.23. Os blocos A, B e C; centromérico (cen), intersticial (mid) e telomérico (tel). Os LCRs são representados em setas pretas, que indicam sua orientação relativa.....36

Figura 5 - Representação esquemática de uma recombinação homóloga não alélica (NAHR) entre os blocos de LCR (B centromérico e B mediano) resultando em uma duplicação. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6 - Representação esquemática dos casos de inversão decorrente de um alinhamento incorreto intracromátides entre os blocos de LCRs. Posteriormente pode ocorrer NAHR durante a meiose, entre os blocos de LCR de um cromossomo invertido e os blocos de LCR de outro cromossomo não invertido, resultando em deleção e duplicação recíproca..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 7 - Representação da região crítica para a SWB com a localização dos genes, o sentido de leitura e os principais marcadores microssatélites desta região. As barras à direita representam os tamanhos das deleções e o tamanho da sonda utilizada na técnica de FISH.....41

Figura 8 - Representação da região crítica para a SWB com os genes frequentemente deletados e a associação com as características fenotípicas nos pacientes com SWB. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 9 - Resultado obtido pela técnica de FISH. No lado esquerdo a fluorocromo vermelho em apenas um cromossomo indica que não há presença do gene ELN em um dos cromossomos. Já no lado direito conseguimos visualizar o gene ELN em ambos os cromossomos. O fluorocromo verde, visualizado em ambas as fotos, permite identificar o cromossomo 7.....48

Figura 10 - Representação da região em SWB e a localização dos marcadores microssatélites utilizados no estudo. As regiões A e B identificam as extremidades da região comumente deletada.....60

Figura 11 - Resultados dos marcadores microssatélites em gel desnaturante de Bis-acrilamida 7% e 7,5M de uréia. As bandas de DNA dos afetados aparecem sempre na primeira coluna de cada gel seguido pelo DNA da mãe e na última coluna o DNA do pai. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos aspectos clínicos em relação às alterações cromossômicas da região crítica para a SWB.....	38
Tabela 2 - Genes deletados na SWB.....	46
Tabela 3 - Marcadores microssatélites para a SWB, descritos na literatura.	50
Tabela 4 - As seqüências dos primers utilizados, o tamanho do produto de amplificação e as condições para a PCR	61
Tabela 5 - Resultados da análise de microdeleções pelos marcadores microssatélites.....	69
Tabela 6 - Resultados da origem parental da deleção para a SWB.	70
Tabela 7 - Resultados do tamanho da deleção em pacientes com SWB.	70
Tabela 8 - Resultados do tamanho da deleção em pacientes com SWB, associados à origem parental da deleção.	71
Tabela 9 - Aspectos clínicos dos pacientes com deleção e sem deleção.....	71
Tabela 10 - Aspectos clínicos com o tamanho da deleção.	72
Tabela 11 - Associação dos aspectos clínicos à origem parental da deleção.	73
Tabela 12 - Origem parental da deleção comparada aos diversos trabalhos na literatura.	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Reagentes para o preparo da solução de “Bloodlysisbuffer 10X”.	58
Quadro 2 - Reagentes para o preparo da solução de “Nucleolysisbuffer 10X”	58
Quadro 3 - Reagentes para o preparo da solução de TE 10:1 (Tris-EDTA).	59
Quadro 4 - Reagentes para o preparo da solução de TAE 50X (Tris-Ácido acético-EDTA).	62
Quadro 5 - Reagentes para o preparo da solução de TBE 10X (Tris-Ácido bórico-EDTA).	63
Quadro 6 - Reagentes para o preparo da solução desnaturante.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

array-CGH	<i>Array-based comparative genomic hybridization</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAP	Estenose da artéria pulmonar
EASV	Estenose aórtica supraválvular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELN	Elastina
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GTF2I	<i>Geral transcription factor 2 I</i>
HAD	Herança autossômica dominante
HC	Hospital das Clínicas
Icr	Instituto da Criança
Kb	Kilobase
KHCO ₃	Carbonato de potássio
LCR	<i>Low copy repeats</i>
LIM 36	Laboratório de Investigação em Pediatria Clínica - 36
LIMK 1	LIM kinase-1
M	Molar
Mb	Megabase
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
ml	Mililitro
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio

NAHR	Recombinação homóloga não alélica
ng	Nanograma
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
PB	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
QI	Quociente intelectual
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	PCR em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Solução salina concentrada
STAG 3	<i>estromal antigen 3</i>
SWB	Síndrome de Williams-Beuren
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano
μl	Microlitro
WBSCR	<i>Williams-Beuren syndrome chromosome region</i>
x ²	qui-quadrado

Resumo

Dutra, RL. *Análise de marcadores moleculares para o diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2011. 134f.

INTRODUÇÃO: A síndrome de Williams-Beuren (SWB; OMIM #194050) é causada por microdeleções em hemizigose de genes contíguos na região 7q11.23. Fácies típico, estenose aórtica supravalvar (EASV), deficiência intelectual, personalidade amigável e hiperacusia constituem as principais características da SWB. A deleção mais freqüente é de 1,55Mb, porém deleção de 1,84Mb também já foi descrita. Embora a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ser amplamente utilizada na detecção da deleção, os marcadores microssatélites são considerados altamente informativos e de fácil manejo. **OBJETIVOS:** Testar os marcadores microssatélites para o diagnóstico da SWB, determinar o tamanho e origem parental da microdeleção, comparar as características clínicas entre os pacientes com diferentes tamanhos da deleção e origem parental. **MÉTODOS:** Foram estudados 97 pacientes com diagnóstico clínico de SWB utilizando cinco marcadores microssatélites: D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476 e D7S489_A. A partir do DNA genômico dos probandos e de seus genitores, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (uréia, com 7,5 M) e os resultados visualizados com coloração de prata. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Com cinco marcadores juntos, o resultado foi informativo em todos os pacientes. O marcador mais informativo foi D7S1870 (78,4%), seguido por D7S613 (75,3%), D7S489 (70,1%) e D7S2476 (62,9%). A deleção foi encontrada em 84 (86,6%) pacientes e sua ausência em 13 (13,4%) pacientes. A deleção de 1,55 Mb foi observada em 76/84 pacientes (90,5%) e 1,84 Mb em 8/84 pacientes (9,5%). A origem parental da deleção foi materna em 44/84 pacientes (52,4%) e paterna em 40/84 pacientes (47,6%). Alterações oculares foram mais freqüentes em pacientes com deleção. Não houve diferença nos achados clínicos entre o tamanho ou a origem parental da deleção, exceto para EASV, presente em maior freqüência nos pacientes com deleção paterna. Os resultados por marcadores microssatélites foram concordantes com FISH positivos, no entanto, em dois pacientes com FISH negativos, a microdeleção foi detectada apenas pelos marcadores. **CONCLUSÃO:** O uso de cinco marcadores microssatélites selecionados foi informativo em todos os pacientes. Em dois casos, os marcadores foram mais eficientes que FISH, portanto pode ser considerado um método alternativo para o diagnóstico molecular da SWB.

Descritores: 1. Síndrome de Williams; 2. Marcadores genéticos; 3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Summary

Dutra, RL. *Analysis of microsatellite DNA markers in the diagnosis of Williams-Beuren syndrome* [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2011. 134f.

INTRODUCTION: Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050) is caused by hemizygous contiguous gene microdeletions at 7q11.23. Typical facies, supravalvular aortic stenosis (SVAS), mental retardation, overfriendliness and hiperacusis comprise typical symptoms in WBS. The most common deletion is 1.55 Mb, however 1.84 Mb deletion also has been described. Although fluorescence in situ hybridization (FISH) is widely used in the detection of deletion, microsatellite markers are considered highly informative and easily manageable. **PURPOSE:** Test the microsatellite markers for the diagnosis of WBS, to determine the size and parental origin of microdeletion, compare the clinical characteristics between patients with different sizes of the deletion and parental origin. **METHODS:** We studied 97 patients with clinical diagnosis of WBS using five microsatellite markers: D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476 and D7S489_A. From the genomic DNA of probands and their parents was performed polymerase chain reaction (PCR), followed by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gel (urea, 7.5 M) and the results visualized with silver staining. **RESULTS AND DISCUSSION:** Using five markers together, the result was informative in all patients. The most informative marker was D7S1870 (78.4%) followed by D7S613 (75.3%), D7S489 (70.1%) and D7S2476 (62.9%). The deletion was found in 84 (86.6%) patients and absent in 13 (13.4%) patients. The deletion of 1.55 Mb was observed in 76/84 patients (90.5%) and 1.84 Mb in 8 / 84 patients (9.5%). The parental origin was maternal in 44/84 patients (52.4%) and paternal in 40/84 patients (47.6%). Abnormalities ocular were more frequent in the patients with a deletion. There were no clinical differences in relation to either the size or parental origin of the deletion, except for SVAS, present in more frequency in the patients with paternal deletion. The results for microsatellite markers were concordant with FISH positive, however, in two patients with negative FISH, the microdeletion was detected only by the markers. **CONCLUSION:** Using these five selected microsatellite markers was informative in all patients. In two cases, the markers were more efficient than FISH, thus can be considered an alternative method for molecular diagnosis in SWB.

Descriptors: 1. Williams syndrome; 2. Genetic markers; 3. Polymerase chain reaction (PCR).

Introdução

---

1 Introdução

1.1 Aspectos históricos

Os primeiros relatos sobre a Síndrome de Williams–Beuren (SWB – MIM #194050) foram realizados por Fanconi (1951) e Sissman et al. (1959), no qual descreveram pacientes com sinais clínicos peculiares até então não pertencentes a nenhuma síndrome descrita, como hipercalcemia idiopática na lactância, estenose aórtica supralvar (EASV) e deficiência intelectual.

Posteriormente, Williams et al. (1961) estudaram quatro pacientes que, além de apresentarem os achados clínicos descritos anteriormente, manifestavam características físicas e comportamentais peculiares tais como fácies de elfo e personalidade amigável. No ano seguinte, Beuren et al. (1962) relataram pacientes que apresentavam características semelhantes às descritas por Williams et al. (1961), o que lhes valeu a atribuição, como autores, de uma nova síndrome.

Posteriormente, diversos autores contribuíram para a descrição da SWB que constitui por deficiência intelectual e déficit de crescimento, personalidade amigável, aspectos faciais peculiares como lábios grossos e anomalias dentárias e esqueléticas, hipercalcemia na infância e malformação cardiovascular congênita, principalmente EASV (Jones e Smith, 1975; Burn, 1986; Morris et al. 1988; Jones, 1990).

1.2 Epidemiologia

A incidência estimada para a SWB é de 1: 13.700 a 1: 25.000 (Grimm, Wesselhoeft, 1980; Udwin, 1990; Stromme et al., 2002). Não há muitos relatos epidemiológicos para a SWB, provavelmente devido ao amplo espectro das manifestações fenotípicas (Lopez-Rangel et al., 1992; Ashkenas, 1996). No Brasil, até o presente momento, não há trabalhos que indiquem a incidência da doença.

A maioria dos casos de SWB é de ocorrência esporádica, porém há relatos de raros casos familiares que apresentam um padrão de herança autossômica dominante (Cortada et al., 1980; Morris et al., 1993; Pankau et al., 2001).

1.3 Aspectos clínicos

1.3.1 Alterações craniofaciais

As características faciais peculiares na SWB incluem fácies semelhante a “elfos” ou “duendes”, com fronte alargada, depressão bitemporal, edema supraorbitário, ponte nasal baixa, nariz curto, arrebitado e filtro nasal longo. A boca e as bochechas são geralmente proeminentes, possuem hipoplasia malar, lábios grossos e leve micrognatia (Lopez-Rangel et al., 1992; Morris et al., 1990).

Outras características presente nestes pacientes são as malformações dentárias (10% na dentição primária e 40% na permanente), agenesia de dentes incisivos (10%), hipoplasia de esmalte (15%), dentes pequenos (95%) e espaçados (50%). Má oclusão é a complicação clínica mais significativa (85%) nos pacientes com SWB (Hertzberg et al., 1994).

1.3.2 Alterações cardiovasculares

As alterações cardiovasculares ocorrem em aproximadamente 80% dos casos de SWB, sendo a EASV a anomalia cardíaca mais freqüente, presente em 75% dos pacientes (Ewart et al., 1993; Conway et al., 1990; Zalstein et al., 1991; Kitchiner et al., 1996; Sugayama et al., 2003). A correção cirúrgica pode ser necessária em 30% dos pacientes com EASV (Kececioglu et al., 1993) .

Outras alterações cardiovasculares incluem estenose da artéria pulmonar (EAP) (25%), defeitos de septos ventriculares (10%) e prolapso da válvula mitral (15%) (Conway et al., 1990; Zalstein et al., 1991; Wessel et al., 1997a).

A hipertensão arterial é comumente observada em metade dos pacientes com SWB (50%) e o risco aumenta com a idade e constituem fatores de risco para a morte súbita ou acidente cerebrovascular (Wollack et al., 1996; Wessel et al., 1997b).

1.3.3 Aspectos neurológicos e comportamentais

Os pacientes com SWB apresentam deficiência intelectual entre leve e moderado com um quociente intelectual (QI) baixo quando comparado à população normal, variando entre 40 a 80 (Gosch, Pankau, 1997).

Portadores da síndrome possuem habilidades lingüísticas preservadas e um vocabulário relativamente fluido. As crianças apresentam boa memória visual e aceitável compreensão gramatical, que contrasta com os níveis reduzidos de coordenação motora dos membros superiores e inferiores (Bellugi et al., 1990).

Estes pacientes caracterizam-se por seu comportamento extremamente sociável (hipersociabilidade), revelam evidente simpatia e capacidade para relacionar-se com adultos, principalmente com indivíduos não familiarizados, porém suas habilidades sociais não ocorrem com frequência com crianças da mesma idade (Wang, Bellugi, 1994; Jones et al., 2000).

Insegurança emocional (ansiedade), déficit de atenção, hiperatividade e transtornos de comportamento são características também observadas em indivíduos com SWB (Udwin, Yule, 1991). Esses sinais típicos podem levar a problemas sérios, com necessidade de tratamento psicoterapêutico e/ou farmacológico em alguns casos (Antonell et al., 2006).

1.3.4 Hiperacusia

Uma das principais características atribuídas a SWB é a “hiperacusia”, ou seja, a elevada sensibilidade e/ou aversão a ruídos, ocorrendo 85-95% dos afetados

(Klein et al., 1990; Gosch, Pankau, 1997; Don et al., 2003; Levitin et al., 2005; Gothelf et al., 2006).

Esta aversão ao som geralmente é acompanhada por respostas comportamentais defensivas, na qual os pacientes reagem cobrindo as orelhas com as mãos, chorando, escondendo-se ou fazendo verbalizações para parar o som em questão (Klein et al., 1990; Gothelf et al., 2006). A maioria das descrições comportamentais em relação à sensibilidade sonora ocorre a partir de relatos dos pais e pode melhorar com a idade (Van Borsel et al., 1997; Levitin et al., 2005; Gothelf et al., 2006).

A etiologia da hiperacusia na SWB é ainda desconhecida, embora haja a possibilidade de distúrbio condutivo resultante da anormalidade do tecido conectivo ou anormalidades no processamento do estímulo auditivo com o sistema nervoso central (Miani et al., 2001).

1.3.5 Alterações oftalmológicas

As alterações oftalmológicas como estrabismo, mais comumente a esotropia, afetam aproximadamente 50% dos pacientes (Sadler et al., 1996). Outras alterações oftalmológicas incluem íris de padrão estrelado (70%) e tortuosidade dos vasos retinianos (20%) (Hotta et al., 1990; Winter et al., 1996).

Em estudo realizado por Sugayama et al., (2002) avaliando as alterações oculares em 20 pacientes com idade de 5 a 17 anos, atendidos na Unidade de Genética – Instituto da Criança (ICr), observaram alta frequência de opacidade puntiforme no cristalino, presente em 84% dos pacientes. A opacidade puntiforme do cristalino tinha sido relatada, anteriormente ao trabalho de Sugayama, apenas em alguns casos raros (Winter et al., 1996).

1.3.6 Alterações geniturinárias

As alterações renais estruturais (20%) foram observadas de 12 a 36 vezes maior em crianças portadoras da SWB quando comparadas à população normal, cuja detecção varia com o tipo de investigação (Pankau et al., 1996).

As anomalias do aparelho urinário nos pacientes com SWB incluem ectopia, agenesia e hipoplasia renal, rim em forma de ferradura e a nefrocalcinose presente em menos de 5% (Pober et al., 1993).

A estenose da artéria renal foi observada em 50% quando realizada angiografia renal. Já os divertículos de bexiga foram observados em 60% nas crianças e 75% nos adultos, o que pode levar à infecções de trato urinário recorrente (Babbitt et al., 1979; Morris et al., 1988).

No estudo de Sammour et al. (2006) foram avaliados distúrbios miccionais em 28 pacientes da Unidade de Genética - ICr, com idade entre 3 e 14 anos, utilizando os exames de ultrassonografia de aparelho urinário, cintilografia renal, uretrocistografia e urografia excretora. Neste estudo, foi encontrada elevada prevalência de anormalidade urológica (acima de 60%), distúrbios miccionais (50%) e urodinâmicos (81%) na SWB.

1.3.7 Alterações no crescimento

A baixa estatura é uma característica comum entre os pacientes com SWB observada desde a vida intrauterina (25-70%) e na fase pós-natal de forma mais lenta, principalmente nos primeiros anos de vida (Antonell et al., 2006). O crescimento estatural melhora durante a infância, no entanto a maioria dos pacientes permanece abaixo do percentil 3.

Essa redução no crescimento e no ganho de peso nos pacientes com SWB pode estar associada à dificuldade de alimentação (70%), cólicas prolongadas (70%) e complicações gastrointestinais que incluem refluxo gastroesofágico, constipação e prolapso retal (Morris et al., 1988; Kuijpers et al., 1999).

1.3.8 Alterações endocrinológicas

A hipercalcemia idiopática está presente em aproximadamente 15% dos lactantes, sendo considerada transitória e desaparece até o final do segundo ano de vida nos pacientes com SWB (Morris et al., 1988).

No entanto, as alterações no metabolismo do cálcio não se limitam à infância. Em alguns trabalhos na literatura, a hipercalcemia foi observada também em indivíduos adultos, verificando que esta alteração pode não está presente apenas na infância. Hipercalciúria ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes com SWB cuja etiologia ainda não está bem esclarecida (Morris et al., 1990; Cherniske et al., 2004).

Hipotireoidismo (10%) e diabetes mellitus (15%) foram observados tanto em crianças quanto em adultos com SWB (Morris et al., 1988; Pober et al., 2010a).

1.4 Aspectos genéticos

A Síndrome de Williams–Beuren (OMIM #194050) é causada por microdeleções de genes contíguos localizados no braço longo do cromossomo 7 na região 7q11.23 (Figura 1) (Ewart et al., 1993).

Na maioria dos casos, a ocorrência é esporádica, ocasionada por deleções *de novo* com um risco de recorrência menor que 5% (Cortada et al., 1980; Morris et al., 1993; Pankau et al., 2001).

Há raros casos familiares descritos de herança autossômica dominante (HAD). A primeira descrição clínica confirmada de HAD na SWB foi realizada por Morris et al. (1993), no qual participaram do estudo três famílias. Em um dos casos descritos por Morris e colaboradores, o filho herdou a síndrome do pai e nos outros dois casos, a síndrome foi transmitida da mãe para a filha.

Desde então, diversos autores também descreveram casos de transmissão familiar, baseado apenas em características clínicas, no qual os pais apresentavam expressividade clínica muito leve (Sadler et al., 1993; Ounap et al., 1998).

Figura 1 - Representação esquemática do cromossomo 7. A seta indica a região 7q11.23, freqüentemente deletada na SWB.

Posteriormente outros autores (Pankau et al., 2001; Metcalfe et al., 2005) puderam confirmar os casos familiares por diagnóstico molecular.

1.5 Aspectos cromossômicos

Inicialmente, Morris et al. (1993) ao estudarem uma família com EASV, observaram uma translocação equilibrada $t(6;7)(p21.2; q11.23)$ em quatro afetados, sugerindo assim, que a transmissão vertical da anomalia em quatro gerações teria ocorrido devido a uma mutação no gene da elastina (*ELN*) localizado na região 7q11.23.

Posteriormente, diversos autores verificaram que o gene *ELN* estava alterado não apenas nos pacientes com EASV, mas também nos pacientes que apresentavam as características para a SWB (Ewart et al., 1993; Lowery et al., 1995; Nickerson et al., 1995; Mari et al., 1995).

Desde então, a região 7q11.23 foi considerada responsável pela SWB e caracterizada por apresentar seqüências de repetições que favorecem às deleções, duplicações e inversões durante a meiose (Valero et al., 2000; Osborne et al., 2001; Somerville et al., 2005; Osborne, Mervis, 2007).

1.5.1 Variação no número de cópias e seqüências de repetições

O estudo da variação genômica tem ganhado cada vez mais espaço quando associado a rearranjos cromossômicos e às doenças genômicas.

As CNVs (*copy number variations*) são definidas como fragmentos de DNA, maiores do que um quilobase (1Kb), com um número variado de cópias em comparação com um genoma de referência (Freeman et al., 2006; Pinto et al., 2007; Christofolini et al., 2010).

O principal mecanismo para a formação da CNV é a recombinação homóloga não alélica (NAHR – *non-allelic homologous recombination*) sendo este tipo de rearranjo um dos principais fatores para ganho ou perda de seguimento de DNA.

A recombinação homóloga não-alélica ocorre em uma taxa acima de 10^{-4} por geração, taxa essa maior quando comparado ao surgimento de polimorfismos (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) no genoma (10^{-8} por geração) (Shaffer e Lupski, 2000; Henrichsen et al., 2009).

As CNV, aparentemente sem significado clínico podem mais tarde conferir susceptibilidade a uma doença ou mesmo uma doença com penetrância variável (Freeman et al., 2006; Christofolini, 2010). Merla et al. (2010), sugerem que o papel dos CNVs na região 7q11.23, seja importante na variação da expressividade fenotípica em pacientes com SWB.

Recentemente, alguns estudos verificaram a presença de elementos repetitivos em CNV, indicando que estas repetições podem estar associadas à formação dessa variação genômica (Korbel et al., 2007; Kim et al., 2007; de Smith et al., 2008).

Os “elementos repetitivos” podem ser descritos como seqüências pequenas (1 a 20 nucleotídeos) presentes em múltiplas cópias no genoma (Batzer, Deininger,

2002). Mais de 55% do genoma humano é composto por elementos repetitivos, e as seqüências Alu são as mais abundantes, presentes em mais de um milhão de cópias no genoma (Häsler, Strub, 2006).

O extenso número de seqüências Alu inseridas no genoma gera uma ampla oportunidade para a ocorrência de recombinação homóloga desigual, um dos principais fatores genéticos na SWB. Quando a recombinação ocorre entre duas seqüências Alu em um mesmo cromossomo, o resultado pode ser uma duplicação ou deleção entre essas seqüências (Deininger, Batzer, 1999).

A presença de elementos Alu na união dos blocos na região 7q11.23, indica que essas seqüências podem contribuir para a geração final de grandes segmentos duplicados (Antonell et al., 2005; Schubert, 2009). A presença de grandes quantidades de seqüências de repetição Alu e sua inserção próxima ao gene *ELN* também podem contribuir para o pareamento incorreto na SWB (Frangiskakis et al., 1996).

1.5.2 Deleções

A deleção é o principal mecanismo responsável pela SWB e origina-se por pareamento incorreto entre cromossomos homólogos ou entre cromátides-irmãs (intercromossômico) em 66%, enquanto 34% das deleções ocorrem por alinhamento incorreto dentro de um único cromossomo (intracromossômico) (Figura 2) (Antonell et al., 2006; Dutly, Schinzel, 1996; Thomas et al., 2006).

A região crítica para a SWB, é constituída por uma seqüência gênica de cópia única com tamanho aproximado de 1,2 Mb e por três grandes blocos de DNA ou seqüências de LCR (*low copy repeats* - repetições com números de cópias reduzido) denominadas como blocos "A", "B" e "C" (Antonell et al., 2006).

Os blocos, compostos por seqüências repetitivas e alta similaridade, possuem ainda, a representação de cada seqüência de LCR identificadas de acordo com sua posição no cromossomo (A-B-C centromérico; A-B-C intersticial e A-B-C telomérico) (Schubert, 2009).

Figura 2 - Representação do mecanismo de deleção e duplicação responsáveis pela SWB. Os retângulos pretos são seqüências repetidas (LCR) que se rompem na região 7q11.23 e os retângulos azuis representam os genes deletados ou duplicados para a doença (Modificado de Antonell et al., 2006).

A origem das seqüências de LCR na região da SWB ocorreu aproximadamente a 25 milhões de anos atrás após a separação dos primatas e homínídeos (DeSilva et al., 1999; Antonell et al., 2005). A partir de uma seqüência ortóloga, uma primeira inversão paracêntrica ocorreu entre 7q11 e 7q22, seguida de uma duplicação de um gene ancestral *STAG3* (bloco B), formando assim o bloco A.

A primeira duplicação nesta região ocorreu no bloco C, com os pontos de quebra entre e o gene *HIP1*. A segunda duplicação interferiu nos blocos A e B, através de um pareamento incorreto mediado pelas sequencias Alu. Assim, essas seqüências puderam ser diferenciadas pela sua posição no cromossomo (B, A e C teloméricos). Duas seguidas inversões (com presença de NAHR) ocorreram durante a evolução nesta região, até chegar a seqüência 7q11.23 descrita atualmente (Figura 3) (DeSilva et al., 1999; Antonell et al., 2005; Schubert, 2009).

Figura 3 - Representação do processo evolutivo da região 7q11.23 para a SWB (Modificado de Schubert, 2009).

Os blocos provenientes dos LCRs possuem seqüências que variam entre 100 a 400 Kb e apresentam homologia de até 99,6%, sendo possível diferenciá-los apenas por um único nucleotídeo (Osborne et al., 2001; Bayés et al., 2003).

Em função dessa grande homologia entre os LCRs, especialmente entre os blocos BcBm (99,6%) e AcAm (98,2%) pode ocorrer pareamento entre as

seqüências centromérica e medial e, conseqüentemente, haver a remoção da região crítica para a SWB.

O resultado da recombinação entre Bc e Bm gera uma deleção de 1,55 Mb e corresponde a aproximadamente 90% dos casos com SWB (Antonell et al., 2006). Quando a recombinação ocorre entre Ac e Am o resultado é uma deleção ainda maior (1,84 Mb) por estarem situados a maior distância relativa, representando apenas 8% dos casos de SWB (Figura 4) (Bayés et al., 2003; Osborne, Mervis, 2007).

Figura 4 - Representação esquemática da região 7q11.23. Os blocos A, B e C; centromérico (cen), mediano (mid) e telomérico (tel). Os LCRs são representados em setas pretas, que indicam sua orientação relativa (Modificado de Schubert, 2009).

As deleções atípicas menores, como de 950 Kb e 850 Kb também foram descritas nos pacientes com SWB, porém com características clínicas mais leves, incluindo EASV e boa verbalização (Heller et al., 2003; Karmiloff-Smith et al., 2003).

Assim como as deleções atípicas menores, as deleções maiores também puderam ser observadas em pacientes com SWB. Quando essas deleções possuem maior extensão telomérica, há presença de um fenótipo mais grave, com sério comprometimento da função cognitiva e crises convulsivas (Mizugishi et al., 1998; Wu et al., 1999).

Em 2008, Blyth et al. descreveram um menino com deleção de 2,43 Mb que apresentava fácies típico de SWB, alterações cardíacas com estenose aórtica supraválvular, estenose pulmonar, válvula aórtica bicúspide e personalidade amigável.

Ramocki et al. (2010), estudando 26 pacientes com SWB (10 famílias) com quadro clínico de epilepsia, dificuldade no aprendizado, déficit intelectual e/ou alterações neurocomportamentais, apresentavam também deleções que variavam de 120 Kb a 4,0 Mb, detectadas por array-CGH (*array-based comparative genomic hybridization*), que incluíam os genes *HIP1* (*Huntingtin-interacting protein 1*) e *YWHAG* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma*).

1.5.3 Duplicações

Outra variante genômica da região 7q11.23 são as duplicações envolvendo as regiões de LCRs. Esse mecanismo identificado recentemente ocorre em um processo similar ao das deleções a partir do pareamento desigual entre fragmentos de LCRs homólogos (Figura 5) (Antonell et al., 2006; Osborne, Mervis, 2007).

Figura 5 – Representação esquemática de uma recombinação homóloga não alélica (NAHR) entre os blocos de LCR (B centromérico e B mediano) resultando em uma duplicação (Modificado de Schubert, 2009).

O fenótipo nas duplicações em SWB tem emergido recentemente e o amplo espectro clínico ainda precisa ser bem delineado. No entanto, é evidente que as duplicações geram aspectos clínicos mais leves, e aspectos faciais menos distintos daqueles pacientes com características clínicas típicas na SWB (Depienne et al., 2007; Torniero et al., 2008; Merla et al., 2010).

Em um terço dos casos, a duplicação é herdada a partir de um dos pais causando assim, sinais e sintomas mais leves do que encontrados nos pacientes típicos para a SWB (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação dos aspectos clínicos em relação às alterações cromossômicas da região crítica para a SWB (Modificado de Merla et al., 2010).

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 congênitas
	Hipertensão	
Alterações no tecido conectivo	Frouxidão articular	Frouxidão articular
Alterações neurológicas	Hipotonia	Hipotonia
		Ansiedade
Alterações cognitivas	Alterações no cérebro ^a	Alterações no cérebro ^a
	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

^a Alterações não específicas detectadas por Ressonância Magnética

Um dos aspectos mais distintos nos pacientes que possuem duplicações da região 7q11.23 está associado à fala, sugerindo assim que genes específicos nesta região possam ser sensíveis às mudanças de dosagem (Merla et al., 2010). Essas alterações na fala e na linguagem expressiva contrastam com a característica freqüente de boa comunicação entre os indivíduos com deleções na SWB (Antonell et al., 2006).

Recentemente foi descrito o primeiro caso de triplicação na região crítica para a SWB pela metodologia de array-CGH em um paciente com deficiência intelectual, problemas comportamentais, dismorfismos faciais típicos para a SWB e um grave atraso de linguagem (Beunders et al., 2010).

1.5.4 Inversões

As inversões paracêntricas na região 7q11.23 podem ocorrer durante a meiose ou mitose quando há um pareamento incorreto entre os blocos LCR centromérico e telomérico (Osborne et al., 2001; Bayes et al., 2003, Turner et al., 2008).

Esses rearranjos são considerados benignos, já que a maioria não causa fenótipo alterado. Porém, na formação dos gametas, podem resultar em deleção ou duplicação da região crítica da SWB (Figura 6) (Osborne et al., 2001; Bayes et al., 2003; Scherer et al., 2005).

Apesar da herança de inversões na região 7q11.23 ser ainda controverso, Tam et al. (2008) verificaram que não houve diferenças significativas nos níveis de expressão gênica entre indivíduos com a inversão e sem a inversão, exceto para o gene *STX1A*, concluindo que esses rearranjos na região da SWB não interferem no quadro clínico.

Hobart et al. (2010) estudando os genitores de 257 pacientes com SWB por FISH (hibridização *in situ* por fluorescência), observaram a presença de inversões em 24,9%, enquanto que na população geral seria de 5,8%. Os autores calcularam que nos genitores com inversão, a chance de ter filho com SWB seria de 1:1.750, bem maior quando comparado aos genitores sem a inversão que seria de 1:9.500.

Figura 6 – Representação esquemática dos casos de inversão decorrente de um alinhamento incorreto intracromátides entre os blocos de LCRs. Posteriormente pode ocorrer NAHR durante a meiose, entre os blocos de LCR de um cromossomo invertido e os blocos de LCR de outro cromossomo não invertido, resultando em deleção e duplicação recíproca (Modificado de Schubert, 2009).

1.6 Aspectos moleculares

1.6.1 Principais genes deletados na SWB

Mais de 28 genes já foram identificados na região crítica para a SWB cuja deleção varia de 1,55 Mb a 1,84 Mb, incluindo *ELN* (Ewart et al., 1993; Brooke et al., 2003). A região apresenta numerosos outros genes tais como *LIM kinase-1 (LIMK1)* e *(CYLN2)* associados à regulação do citoesqueleto (Frangiskakis et al., 1996; Tassabehji et al., 1996; Hoogenraad et al., 1998), fatores de transcrição *GTF2I*, *GTF2IRD1* e *GTF2IRD2* (Pérez-Jurado et al., 2003; Antonell et al., 2006), *BAZ1* responsável por permitir a ativação do promotor do receptor da vitamina D (Kitagawa et al., 2003), entre outros (Figura 7).

Figura 7 – Representação da região crítica para a SWB com a localização dos genes, o sentido de leitura e os principais marcadores microssatélites desta região. As barras à direita representam os tamanhos das deleções e o tamanho da sonda utilizada na técnica de FISH. (Modificado de Schubert et al., 2009).

As atuais descobertas moleculares permitem que as características fenotípicas sejam correlacionadas com genes específicos e estão provavelmente relacionados à haploinsuficiência desses genes (Ewart et al., 1993).

Abaixo, estão descritos alguns principais genes envolvidos na SWB.

1.6.1.1   *Elastina (ELN)*

O primeiro gene a ser associado aos aspectos fenotípicos específicos foi o gene *elastina (ELN)*. Associado à EASV, este gene estava alterado em pacientes com histórico familiar de doenças cardíacas (Tassabehji et al., 1997).

A tropoelastina, produto do gene *ELN*, é um monômero solúvel, que após modificações pós traducionais é organizada em polímeros de elastina, principal componente das fibras elásticas contribuindo para a resistência e elasticidade dos tecidos da pele, pulmões e vasos sanguíneos (Chowdhury, Reardon, 1999; Urban et al., 2002; Brooke et al., 2003).

A haploinsuficiência da elastina sugere uma base biológica para as alterações fenotípicas observadas em pacientes com SWB. A maioria dos indivíduos com SWB possui a deleção para o gene da elastina juntamente com outros marcadores, levando a hemizigose de *ELN* (Lowery et al., 1995; Nickerson et al., 1995). A parede arterial, normalmente rica em elastina, torna-se frágil quando esta proteína é expressa em quantidades limitantes, levando ao espessamento da parede arterial (Ashkenas 1996; Brooke et al., 2003; Ewart et al., 1993).

A redução na expressão de *ELN* pode levar a outras alterações fenotípicas incluindo os dimorfismos faciais e alterações vocais, fraqueza articular, hérnias inguinais e divertículos de bexiga (Ewart et al., 1993; Ashkenas, 1996; Monaco, 1996).

1.6.1.2 LIM kinase 1 (LIMK1)

O gene *LIMK1* está localizado na região 7q11.23, próximo à *ELN* e a deleção de ambos os genes estão associados presença de EASV. Este gene exerce sua função na organização do citoesqueleto, fosforilando e inibindo a despolimerização de actina em microfilamentos (Weeber et al., 2002).

Verificou-se também que *LIMK1* é altamente expresso no período embrionário de camundongos, apresentando um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso (Cheng, Robertson, 1995; Pröschel et al., 1995). Já em experimentos *in vivo*, a proteína LIMK1 está localizada na sinapse neuromuscular, sugerindo assim, que esta proteína inicie um papel importante na formação sináptica em pacientes com SWB (Scott, Olson, 2007).

O gene *LIMK1* foi associado à diminuição cognitiva em pacientes com SWB. Esta implicação foi baseada em alguns trabalhos realizados com crianças que apresentavam EASV, deficit visoespacial e deleção parcial para região da SWB, no qual compreendiam apenas os genes *ELN* e *LIMK1* (Frangiskakis et al., 1996; Wang et al., 1998). No entanto, em outros trabalhos não verificaram a associação de *LIMK1* com redução cognitiva (Tassabehji et al., 1999; Smith et al., 2009).

1.6.1.3 Fator de transcrição geral (GTF2IRD1)

O gene *GTF2IRD1* pertence, juntamente com *GTF2I* e *GTF2IRD2* (localizados no bloco B) a uma família de fatores de transcrição *TFII-I* (*general transcription factor II, i*) e sua função envolve a regulação transcricional, transdução de sinal e remodelação da cromatina, além de participarem ativamente na regulação de proteínas específicas do ciclo celular (ciclins (CD) e ciclins dependentes de Kinase (CDKs)) (Desgranges et al., 2005; Desgranges, Roy, 2006; Schubert, 2009).

Em estudos com camundongos, *TFII-I* é altamente expresso durante a odontogenese, incluindo *Gtf2ird1* e *Gtfird2*, que foram observados em preamiloblastos e preodontoblastos (Ohazama e Sharpe, 2007; Chinge et al., 2008).

Esse trabalhos sugerem que a haploinsuficiência dos genes citados podem ser responsáveis pelas alterações dentárias em pacientes com SWB.

Os genes *GTF2IRD1* e *GTF2I*, localizados na porção telomérica da região 7q11.23, são considerados responsáveis por algumas das principais características fenotípicas na SWB, como alterações craniofaciais, déficit de construção visoespacial e hipersociabilidade (Hirota et al., 2003; Karmiloff-Smith et al., 2003; Makeyev e Bayarsaihan 2011).

1.6.1.4 Antígeno estromal ou estromalina (STAG3)

O gene *STAG3* (*estromal antigen 3*) é responsável por codificar uma proteína chamada estromalina 3, integrante de uma família de proteínas estruturais importantes na formação do complexo sinaptonêmico durante a meiose (Houmard et al., 2009).

O gene *STAG3* é considerado o ancestral de uma família de genes homólogos truncados, provavelmente originários de duplicações genômicas (Merla et al., 2010). Uma das primeiras duplicações para a formação da região crítica para a SWB ocorreu próximo à este gene, formando assim, suas isoformas *STAG3-like* (*STAG3L*) 1, 2 e 3 (Prieto et al., 2001; Antonell et al., 2006).

Por estar envolvido diretamente com os mecanismos da recombinação meiótica e rearranjos cromossômicos, o gene *STAG3* pode ser considerado um mediador na quebra da região 7q11.23 causando assim a SWB (Pezzi et al., 2000).

1.6.1.5 Região cromossômica 14 da Síndrome de Williams-Beuren (WBSCR14)

O gene *WBSCR14* (*Williams-Beuren syndrome chromosome region 14*) ou *MLXIPL* (*MLX interacting protein-like*) codifica um peptídeo básico, com uma região específica de zíper de leucina hélice-volta-hélice, encontrada também em outros fatores de transcrição. Sua principal função é regular a expressão de genes

envolvidos no crescimento celular (Meng et al., 1998; de Luis et al., 2000; Cairo et al., 2001).

A proteína WBSCR14 também desempenha a função no metabolismo, regulando a resposta à ingestão excessiva de carboidratos (Merla et al., 2004). Alguns autores sugerem que pacientes com SWB, possuem fenótipo diabético devido à hemizigose do gene *WBSCR14* e elevando a transcrição de genes lipogênicos. (Merla et al., 2004; Stoeckman et al., 2004).

1.6.2 Outros genes responsáveis pelo fenótipo na SWB

Dentro da região crítica para a SWB (7q11.23), alguns genes também são responsáveis pelo fenótipo na síndrome, porém, mesmo com diversos estudos *in vitro* com os produtos codificados dos genes inclusos na deleção e suas exatas funções dentro da célula, muitos produtos gênicos ainda não estão muito bem estabelecidos (Antonell et al., 2005). A tabela 2 ilustra resumidamente os genes freqüentemente deletados na SWB e suas possíveis funções.

Tabela 2 – Genes deletados na SWB.

Gene	Produto protéico	Possível função
<i>NOL1R/</i> <i>WBSCR20</i>	Relacionado à NOL1	Homóloga à proteína nuclear de proliferação P120
<i>TRIM50/</i> <i>WBSCR23</i>	Proteína de domínio triplo 50	Fosfoproteína nuclear com dedos de zinco. Integrante no processo de ubiquinação
<i>FKBP6</i>	FK-506 proteína de ligação 6	Membro da família das imunofilinas. Componente do sistema sinaptonêmico
<i>FZD9</i>	<i>Frizzled 9</i>	Receptores transmembrânicos para proteínas do tipo Wnt no desenvolvimento
<i>BAZ1/ WBSCR9/</i> <i>WSTF</i>	homóloga á Acf1 de <i>Drosophila</i>	Forma parte do complexo WINAC, responsável pelo enovelamento da cromatina.* Possível regulador da transcrição
<i>BCL 7B</i>	Células B linfóides 7B	Autoantígeno relacionado ao IgE nas dermatites Atópicas
<i>TBL2/WS- βTRP</i>	Transducina β-like 2	Membro da família das transducinas- β, de função desconhecida
<i>WBSCR24</i>		Homóloga à proteína Mod(r) (<i>do inglês modifier of rudimentary - Drosophila melanogaster</i>)
<i>WBSCR18</i>		União de proteínas por choque térmico - dobramento protéico
<i>WBSCR22</i>	Possível metiltransferase	Metiltransferase HUSSY-03
<i>STX1A</i>	Sintaxina 1A	Proteína de membrana presináptica. Envolvida na exocitose de vesículas com neurotransmissores
<i>CLDN3 e CLDN4</i>	Membros da família das claudinas	Parte de estruturas de junções, barreiras paracelulares em tecidos epiteliais
<i>WBSCR27</i>	Possível metiltransferase	Parte da família de metiltrasferases Ubi/COQ5
<i>WBSCR28</i>		Função desconhecida
<i>EIF4H/ WBSCR1</i>	Fator de iniciação eucariótico eIF4H	Regulador positivo na iniciação da tradução
<i>WBSCR5/ LAB</i>	Ativador de células B - isoforma 2	Ativação de células B
<i>RFC2</i>	Subunidade 2 do fator de replicação C	Elongação do DNA durante a replicação
<i>CYLN2</i>	Proteína neuronal citoplasmática CLIP-115	União de organelas do citoesqueleto através dos microtúbulos
<i>GTF2IRD1/</i> <i>WBSCR11/ GT3</i>	domínio 1 relacionado ao GTF2I	Regulador transcripcional, proteína ligadora
<i>NCF1</i>	Fator citosólico neutrofílico 1, p47-phox	Subunidade da oxidase NADPH fagocítica. Atividade antimicrobiana
<i>GTF2IRD2</i>	domínio 2 relacionado ao GTF2I	Fator regulador de transcrição

Modificada de Antonell et al., 2006; Francke, 1999; Merla et al., 2002; Hillier et al., 2003; Scherer et al., 2003; Kitagawa et al., 2003.

Até o momento, uma correlação genótipo-fenótipo não está totalmente esclarecida, porém a associação fenotípica com os genes alterados na região 7q11.23 pode ser agrupada em blocos como sugerido por Antonell et al. (2005) na figura 8.

Figura 8 – Representação da região crítica para a SWB com os genes frequentemente deletados e a associação com as características fenotípicas nos pacientes com SWB (Modificado de Antonell et al., 2005).

1.7 Origem parental da deleção

Embora as deleções na SWB ocorram espontaneamente durante a formação dos gametas tanto a partir do alelo materno quanto paterno em igual frequência, os efeitos fenotípicos da origem parental ainda não estão muito bem estabelecido (Ewart et al., 1993, Gilbert-Dussardier et al., 1995; Nickerson et al., 1995).

As deleções de origem materna e paterna ocorrem em uma frequência muito semelhante (Kotzot et al., 1995; Nickerson et al., 1995; Del Campo et al., 2006), porém, alguns autores observaram uma discreta tendência para deleção materna quanto ao efeito de *imprinting* genômico (Robinson et al., 1996; Pérez-Jurado et al., 1996; Brondum-Nielsen et al., 1997; Thomas et al., 2006).

1.8 Métodos laboratoriais

As microdeleções na SWB podem ser identificadas por diversos métodos laboratoriais tais como FISH, marcadores microssatélites, *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) e array-CGH.

1.8.1 FISH

A técnica de FISH é considerada uma metodologia “padrão-ouro”, permitindo identificar deleções superiores a 5 Mb (Nickerson et al., 1995; Fernández et al., 2005). Esta técnica, porém, possui custo elevado e necessita de profissionais experientes para a sua execução.

Para a realização da técnica de FISH, a obtenção de uma metástase (ou núcleo interfásico) de boa qualidade em lâminas faz-se necessário. Na lâmina, o DNA após desnaturado, passa por um processo de hibridização com a sonda que contém a sequência de DNA do gene *ELN* marcado com fluorocromo. Assim, a sequência se liga especificamente à região cromossômica de interesse. Com microscópio específico, é possível visualizar a presença ou ausência da deleção (Figura 9) (Poher, 2010b).

Figura 9 – Resultado obtido pela técnica de FISH. No lado esquerdo o fluorocromo vermelho em apenas um cromossomo indica que não há presença do gene *ELN* em um dos alelos. Já no lado direito conseguimos visualizar o gene *ELN* em ambos os alelos. O fluorocromo verde, visualizado em ambas as fotos, permite identificar o cromossomo 7.

1.8.2 Marcadores microssatélites

Os microssatélites, presentes em grande parte do genoma humano, são pequenas sequências de repetição (1 a 6 pares de base) e importantes reguladores da função gênica (Eckert, Hile, 2009).

Em investigações detalhadas dos microssatélites verificaram que repetições de mononucleotídeos, principalmente poli [A/T] são os microssatélites mais abundantes no genoma, seguido das repetições de dinucleotídeos ([GT/CA] e [AT/TA]) e repetições de tetranucleotídeos (Subramanian et al., 2003; Li et al., 2002).

Alguns microssatélites estão localizados em regiões promotoras, sendo considerados importantes reguladores de expressão gênica, influenciando na taxa de transcrição, estabilidade do RNA, eficiência no *splincing* e na interação entre RNA e proteína (Li et al., 2004).

Diversos microssatélites são altamente polimórficos na população humana, assim essas sequências são cada vez mais utilizadas como marcadores em diversas áreas como a investigação forense, oncologia e doenças genéticas. Assim, o uso destes marcadores possibilitou a observação de perdas de fragmentos alélicos entre os pais e os probandos (Nikitima et al., 2004; Ellegren et al., 2004).

A identificação molecular da SWB por marcadores microssatélites é uma técnica mais acessível, necessitando apenas de equipamentos básicos para a biologia molecular, além de apresentar baixo custo.

Na SWB, os marcadores microssatélites foram amplamente utilizados em diversos trabalhos e sua eficácia varia de acordo com diferentes tipos de marcadores (Tabela 3).

Além disso, os marcadores possibilitam também verificar o tamanho e a origem parental das deleções (Gilbert-Dussardier et al., 1995; Urban et al., 1996; Dutly, Schinzel 1996; Pérez-Jurado et al., 1996).

Os marcadores microssatélites são capazes de detectar deleções menores que 1,55 Mb (0,1 – 1,0 Mb) o que não seria possível utilizando a técnica de FISH (Heller et al., 2003; Morris 2006; Schubert 2009).

Tabela 3 – Marcadores microssatélites para a SWB, descritos na literatura.

Marcadores microssatélites	Autores
D7S1870; D7S489; ELN int. 17; ELN ex. 20	Brondum-Nielsen et al., 1997
D7S1870; D7S489, D7S1816; D7S613; D7S489A	Hockenhull et al., 1999
D7S489; D7S2476; D7S613; D7S2472	Wu et al., 1998
D7S1870; D7S489; D7S2476; D7S613; D7S2472	Pérez Jurado et al., 1996
D7S1870; D7S489; ELN	Robinson et al., 1996
D7S489; D7S1870; D7S2476; D7S613	Wang et al., 1999
D7S1870	Gilbert-Dussardier et al., 1995
D7S2476; D7S613	Metcalfe et al., 2000
D7S1870; D7S489, D7S613; D7S2476	Heller et al., 2003
D7S1870; D7S489, D7S613; D7S2476	Thomas et al., 2006
D7S1870; ELN 17/ex. 18; Hei 1.3/1.4	Sbruzzi et al., 2010
D7S1870; D7S489, D7S613; D7S2476; D7S489A	Presente estudo

1.8.2.1 Marcador D7S1870

Um dos marcadores microssatélites amplamente estudado e associado à SWB é o D7S1870 (também chamado de AFMa060xc9 ou HSa060xc9). Este marcador possui repetições de dinucleotídeos (CA)_n incluídas no gene *GTF2I* e está fortemente associado à deficiência intelectual e déficit visual-espacial em pacientes com diagnóstico da SWB (Gilbert-Dussardier et al., 1995; Pérez Jurado et al., 1996; Urban et al., 1996; Brondum-Nielsen et al., 1997;; Bayés et al., 2003; Morris et al., 2003).

1.8.2.2 Marcadores D7S489 e D7S489A

Os marcadores microssatélites D7S489 e D7S489_A (também chamados de AFM136xe3, HS136XE3 ou sWSS864), estão presentes na sequência de genes de

cópia única e região do bloco A respectivamente, possui sequências repetitivas de dinucleotídeos (CA)_n.

Estes marcadores, por estarem localizados no gene *STAG3* ou nas suas isoformas, podem interferir no pareamento durante a meiose na SWB (Baumer et al., 1998; Pezzi et al., 2000).

O marcador D7S489A é utilizado em diversos estudos para verificar o tamanho da deleção de 1,84 Mb, já que sua localização, próxima da parte telomérica do cromossomo 7, permite identificar deleções maiores que 1,55 Mb (Perez Jurado et al., 1996; Wang et al., 1999; Bayes et al., 2003).

1.8.2.3 Marcador D7S613

Outro marcador amplamente utilizado nos trabalhos da literatura é o D7S613, localizado no gene *EIF4H* (Pérez Jurado et al., 1996; Metcalfe et al., 2000; Heller et al., 2003; Thomas et al., 2006) e sua sequência consiste de repetições de tetranucleotídeos (AAAT)_n, sendo esse gene responsável por estimular o início da síntese protéica.

1.8.2.4 Marcador D7S2476

O marcador microssatélite D7S2476 (também identificado como AFMB018YF5, AFMb018yf5, B018YF5 GDB:609366 ou HSB018YF5) possui uma sequência repetitiva de (CA)_n localizada no íntron 7 do gene *WBSCR14*.

Alterações no gene *WBSCR14* podem alterar a regulação da expressão gênica e o metabolismo de carboidratos (Cairo et al., 2001; Merla et al., 2004).

1.8.3 Outras técnicas moleculares

A técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) é muito semelhante à PCR convencional, porém difere na utilização de sondas marcadas com fluoróforos, que emitem fluorescência durante as amplificações, promovendo uma análise quantitativa e qualitativa das amostras. Apesar de sua eficiência para detecção de monossomias, trissomias e supressão de genes (Wilke et al., 2000; Howald et al., 2005; Schubert e Laccone, 2006), a realização da RT-PCR, depende da escolha correta das sondas (taqMan® e SYBR® Green), além de utilizar termocicladores e programas de análise específicos (Novais e Pires-Alves, 2004).

A técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) também tem sido amplamente utilizada na detecção de microdeleções para a SWB, assim como para as síndromes de DiGeorge (MIM #188400), Rubinstein-Taybi (MIM #180849) entre outras (Fernández et al., 2005; Kriek et al., 2007).

Este método é capaz de fazer análises quantitativas de sequências-alvo específicas, baseado na hibridização simultânea e de um par de primers que seja capaz de amplificar 40 regiões de uma única vez em um período reduzido, quando comparado as técnicas de FISH e marcadores microsatélites (Schouten et al., 2002). Além dos equipamentos, já que o MLPA necessita de seqüenciadores automatizados e programas de análise específicos, a distribuição dos kits para o diagnóstico é realizada apenas pela empresa MRC-Holland MLPA®.

Recentemente, o array-CGH foi descrito como um método capaz de detectar milhões de sítios do genoma de um indivíduo de uma única vez, utilizando uma matriz de fragmentos genômicos dispostos em lâminas de vidro (Schaeffer et al., 2004; Vissers et al., 2005; Krepischi-Santos et al., 2006; Kriek et al., 2007). Utilizando equipamentos automáticos e “chip de DNA” para a análise de diversos sítios de alterações cromossômicas submicroscópicas, a técnica de array-CGH, pode ser considerada a união da biologia molecular com a citogenética convencional (Andrieux e Sheth, 2009).

Mesmo com todas essas técnicas atualmente utilizadas para o diagnóstico da SWB, alguns centros de diagnóstico não possuem os equipamentos adequados e licença de uso dos programas de computador (*software*) para a análise, já que essas técnicas mais avançadas possuem custo elevado.

Em resumo, a identificação molecular da SWB por marcadores microssatélites, é uma técnica mais acessível, necessitando apenas de equipamentos básicos para a biologia molecular tais como termociclador para PCR convencional e sistema de eletroforese. Os marcadores possibilitam também a detecção de microdeleções de diferente tamanhos e a origem parental da deleções por um baixo custo (Gilbert-Dussardier et al., 1995; Urban et al., 1996; Dutly, Schinzel, 1996; Pérez-Jurado et al., 1996).

Objetivos

---

2   Objetivos

- Testar a eficácia de diferentes marcadores microssatélites de DNA para a detecção de microdeleções na região 7q11.23 para diagnóstico da SWB.
- Determinar o tamanho e a origem parental das deleções dos pacientes com SWB.
- Correlacionar os achados clínicos com o resultado molecular, quanto à presença de microdeleções, tamanho das deleções e origem parental.
- Realizar aconselhamento genético nos pacientes.

Casuística e Métodos

---

3 Casuística & Métodos

3.1 Casuística

Para o estudo retro-prospectivo foram selecionados 105 pacientes atendidos na Unidade de Genética Clínica do Instituto da Criança (ICr) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Entre os pacientes que participaram do estudo, 90 foram acompanhados pela equipe de Genética desde março de 2004 e 15 pacientes foram incluídos no estudo durante o andamento do trabalho.

Devido à perda de seguimento no ambulatório de Genética, oito pacientes foram excluídos do estudo. No presente estudo foram analisados um total de 97 pacientes, sendo 36 do gênero feminino e 61 do gênero masculino.

O critério de inclusão foi à presença de dismorfismo craniofacial associado a outras alterações presentes na SWB: anomalias cardiovasculares ou comportamento característico ou hiperacusia.

A concordância na participação da pesquisa (Cappesq nº 0368/08) foi realizada conforme o termo de consentimento, assinado por pais ou responsáveis pelos afetados.

3.2 Métodos para o estudo molecular

O estudo molecular para a região 7q11.23 foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – LIM 36 do Instituto da Criança – ICr, sob a supervisão da Dra. Patrícia de Campos Pieri.

3.2.1 Coleta de sangue e extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, foi empregada a metodologia de “Salting out” descrito anteriormente por Miller et al. (1988), no qual o sangue coletado (5 ml) foi misturado a 35 ml de solução de lise celular “Bloodlysisbuffer 1X” (Quadro 1) em tubo cônico (50ml) e, em seguida homogeneizado por inversão e colocado no gelo por 30 minutos.

1550 mM Cloreto de Amônio – NH_4Cl	82,91g
100 mM Carbonato ácido de potássio – KHCO_3	10,01 g
10 mM EDTA, pH: 7,4	50 ml de EDTA 0,2 M; pH: 7,4
q.s.p. 1000 ml de Água Milli-Q	

Quadro 1 - Reagentes para o preparo da solução de “Bloodlysisbuffer 10X”.

Após esse período, o material sofreu uma centrifugação por 15 minutos a 1800 rpm em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi descartado. Logo após, 15 ml da mesma solução de lise de “Bloodlysisbuffer 1X” foi adicionado ao precipitado, e realizada uma nova centrifugação por 5 minutos a 1800 rpm sob refrigeração. Descartado o sobrenadante, foi adicionado 3 ml de solução de lise nuclear “Nucleolysisbuffer 1X” (Quadro 2) e agitado vigorosamente em vórtex.

100 mM Tris-HCl, pH: 8,0	10 ml Tris-HCl 1M, pH: 8,0
4 M Cloreto de sódio - NaCl	23,38 g
20mM EDTA, pH 8,2	40ml EDTA 0,5 M; pH: 8,2
q.s.p. 100 ml de Água Milli-Q	

Quadro 2 - Reagentes para o preparo da solução de “Nucleolysisbuffer 10X”.

Para a lise protéica, 5 μ L de proteinase K ([20 mg/ ml]) e 300 μ L de SDS 10% foram acrescentados à solução e incubada a 37°C por 16 horas. Após o período de incubação, 1 ml de NaCl (6 M) foi incluído à solução e homogeneizada vigorosamente por 15 segundos em vórtex, sendo centrifugada em seguida por 20 minutos a 2500 rpm em centrífuga refrigerada. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico (15 ml), e centrifugado novamente por 15 minutos a 2800 rpm em refrigeração. Após o processo de centrifugação, adicionaram-se ao sobrenadante, dois volumes de etanol absoluto em temperatura ambiente propiciando a precipitação do DNA, que foi içado e transferido para um tubo contendo 500 μ L de etanol 70%. A amostra foi centrifugada a 4 °C, por 15 minutos, a 13.500 rpm a 4 °C. O sobrenadante após ser descartado, permaneceu à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. Posteriormente, o DNA foi eluído com 300 μ L de TE 10:1 (Quadro 3).

10 mM Tris - HCl	1 ml Tris - 2 M, pH: 7,6
1 mM EDTA	1 ml EDTA 0,2 M; pH: 8,0
q.s.p. 200 ml de Água Milli-Q	

Quadro 3 - Reagentes para o preparo da solução de TE 10:1 (Tris-EDTA).

3.2.2 Quantificação e diluição das amostras

As amostras foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo e visualizado com transluminador UV. A determinação da concentração de cada amostra foi avaliada, por comparação, incluindo na corrida de eletroforese 2 μ l de um padrão de massa (*Low DNA mass Ladder*, Invitrogen, USA). Algumas amostras de DNA também foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop 1000® - Thermo Scientific) e analisadas em *software* específico para o equipamento. As alíquotas de DNA para uso ([25 ng]) foram mantidas na geladeira a -4 °C e as soluções estoque foram lacradas e armazenadas em *freezer* a -80 °C.

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os marcadores microssatélites foram selecionados D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476 e D7S489A a partir de sua maior informatividade em outros trabalhos da literatura, sendo o último marcador escolhido para identificação do tamanho da região deletada na SWB (Pérez-Jurado et al., 1996; Heller et al., 2003; Bayes et al., 2003; Thomas et al., 2006; Sbruzzi et al., 2010) (Figura 10).

Figura 10 - Representação da região em SWB e a localização dos marcadores microssatélites utilizados no estudo. As regiões A e B identificam as extremidades da região comumente deletada (Modificado de Pober et al., 2008; Schubert, 2009).

A genotipagem dos pacientes e de seus genitores foi realizada a partir da técnica de PCR, utilizando iniciadores (*primers*) específicos para cada marcador microssatélite localizados na região 7q11. 23, freqüentemente deletada na SWB.

Para as reações de PCR foram utilizados 2,0 µl (25 nM/µl) de DNA genômico; 2,0 µl de desoxirribonucleotídeos - dATP, dTTP, dCTP e dGTP (5 µM) (LGC Biotechnology, USA); 0,14 µl de enzima *Easy taq DNAase* (0,7 U/µl) (LGC Biotechnology, USA); 2,0 µl de cada oligonucleotídeo *Forward* (5,0 µM/µl) e *Reverse* (5,0 µM/µl) (Invitrogen, USA); completando com água ultrapura para um volume total

de solução de 25 µl. As concentrações de MgCl₂ e a temperatura de anelamento foram específicas para cada marcador microssatélite e estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – As seqüências dos *primers* utilizados, o tamanho do produto de amplificação e as condições para a PCR .

Marcador Polimórfico	Primer forward e reverse	Nº de acesso GenBank	Prod. Ampl.*	MgCl ₂	Tem. anelam.**
D7S1870	F: TTCACTCAGGAAGTGGC R: TGGTGATGTGCTTTACTACG	Z51768	108pb	2,0 mM	55° C
D7S489	F: CTGTTGACTTTCCACACTC R: GGCAACTCGAGACGTTAGTT	Z16646	140-158pb	1,5 mM	56° C
D7S613	F: CAGCCTGGGTAACAAAAGC R: CCTCCCTCCCTAATCCATG	L16300	85pb	1,4 mM	55° / 60°C
D7S2476	F: GGGCAACATAGCACGATT R: CAGGAGTCAGTTAGATAAGGTCAC	Z53107	128-160pb	2,0 mM	56° C
D7S489_A	F: GCACCTATGATCACAGCTTCTC R: ATGACATGAAGGTACTGGCCTT	BV097124	462pb	1,5 mM	60° C

* Prod. Ampl. – produto da amplificação; **Tem. Anelam. – Temperatura de anelamento

As condições para a PCR, realizadas no termociclador (Biômetra / T3000 - Alemanha) permitiram uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94,0 °C, seguida de duas etapas de ciclagem: a primeira etapa consistiu de 10 ciclos de desnaturação de 94,0 °C por 1 minuto, anelamento específico para cada iniciador durante 1 minuto e extensão por 1 minuto a 72,0 °C. A segunda etapa foi muito semelhante à primeira, consistindo de 25 ciclos restantes de desnaturação de 94,0 °C por 30 segundos, anelamento específico para cada iniciador durante 30 segundos e extensão por 30 segundos a 72,0 °C. Após os ciclos, a reação foi finalizada com uma extensão por 5 minutos a 72,0 °C.

3.2.4 Gel de agarose

Para a visualização dos produtos gerados pela amplificação da PCR, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando tampão de corrida TAE 1X (Quadro 4).

2 M Trizma base	242 g
5,7% Ácido acético glacial	57,1 ml
50 mM EDTA	250 ml EDTA 0,2 M; pH: 8,0
q.s.p. 1000 ml de Água Milli-Q	

Quadro 4 - Reagentes para o preparo da solução de TAE 50X (Tris-Ácido acético-EDTA).

Após a polimerização, 5 µl do produto amplificado juntamente com 1 µl de *Lodding Buffer* (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e glicerol 30%) foi aplicado ao gel de agarose. Uma solução com 1 µl de marcador de peso molecular “*Ladder*” de 50 pb diluído em 9 µl de TE 10:1 e 2 µl de *Lodding Buffer* foi incluída na corrida para a comparação dos fragmentos obtidos pela PCR. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Biometra/ Horizon 20X25 cm - Alemanha) com os parâmetros de corrida de 100V e 70mA por aproximadamente 30 minutos. Após a corrida, o gel de agarose foi submetido à coloração com brometo de etídio e visualizados em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech, USA).

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Confirmada a amplificação dos fragmentos desejados, as amostras foram posteriormente analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante a 7%. Para a preparação do gel foram utilizadas 2,33 ml de solução de poliacrilamida 30% (29 g de acrilamida juntamente com 1 g de N’N’N metilbisacrilamida), 1 ml de TBE 10X e 4,5 g de Uréia 7,5 M. A dissolução total da uréia só foi possível em um agitador

aquecido a 37°C. Para que houvesse a polimerização do gel, foram acrescentados 70 µl de APS 10%, 7 µl de Temed 100% e água destilada para um volume final de 10 ml. O gel foi polimerizado em placas de vidro com suporte compatível à cuba vertical (Mini Proteans Bio-Rad, USA). Após a polimerização, os poços foram lavados repetidamente com tampão TBE 1X (Quadro 5) para a total retirada da uréia e da poliacrilamida evitando interferência na corrida.

1 M Trizma base	121,14 g
0,9 M Ácido bórico	55,65 g
10 mM EDTA	50 ml EDTA 0,5 M; pH: 8,0
q.s.p. 1000 ml de Água Milli-Q	

Quadro 5 - Reagentes para o preparo da solução de TBE 10X (Tris-Ácido bórico-EDTA).

O gel foi submetido a uma pré-corrida em tampão de corrida TBE 1X, durante 30 minutos a 105V e 30mA. Enquanto isso, 4,5 µl do produto amplificado junto com 4,5 µl de solução de desnaturação (Quadro 6) foi levado ao termociclador por 10 minutos a 95 °C.

0,01% Azul de bromofenol (1%)	100 µl
0,01% Xilenocianol	100 µl
20 mM EDTA	40 µl EDTA 0,5 M; pH: 8,0
95% Formamida 99%	9,59 ml
q.s.p. 10 ml de glicerol	

Quadro 6 - Reagentes para o preparo da solução desnaturante.

As amostras desnaturadas permaneceram em gelo até o momento da aplicação no gel. Após a pré-corrida, os poços foram mais uma vez lavados com tampão TBE 1X e as amostras aplicadas no gel sendo um poço reservado para a aplicação do marcador de peso molecular. As condições de corrida foram as mesmas utilizadas na pré-corrida durante 2 horas.

A coloração do gel de poliacrilamida foi realizada pela técnica de coloração com Nitrato de Prata “Silver Staining”. O gel, depois de retirado das placas, foi fixado em etanol 10% por 30 minutos e em seguida deixado no ácido nítrico 1% durante 15 minutos no agitador. Na etapa de coloração o gel passou por uma lavagem com água destilada por 1 minuto e em seguida colocado em 250 ml de solução de nitrato de prata 0,1% com 375 µl de formaldeído 37% durante 30 minutos. Antes da etapa de revelação, o gel foi lavado 2 vezes com água destilada durante um minuto cada lavagem. Em seguida, uma solução de 250 ml de carbonato de sódio 30% e 185 µl de formaldeído 37% foi adicionado ao gel. A solução e o gel permanecem no agitador até o aparecimento das primeiras bandas. A solução foi desprezada e o gel foi colocado em uma solução de preservação contendo ácido acético 10% durante 15 minutos. Os géis foram visualizados no negatoscópio e fotografados com câmera digital (Canon Power Shot SD1000 – USA).

3.2.6 Método de análise dos resultados

As bandas correspondentes ao material genético dos pacientes com diagnóstico clínico da SWB foram visualizadas em gel de poliacrilamida, e foram assim comparados aos genitores. Os pacientes que herdaram os alelos maternos e os alelos paternos em tamanhos diferentes no gel foram considerados negativos para a deleção. Pacientes que apresentavam a falta de um dos alelos maternos ou paternos foram considerados positivos e aqueles que não foram possíveis diferenciar qual banda foi herdado de qual dos genitores foram considerados inconclusivos para a deleção.

3.2.7 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Dentre os pacientes presentes na casuística, 23 pacientes apresentavam deleção na região 7q11.23 detectada por FISH em um trabalho anterior realizado por Sugayama et al. (2003).

A técnica de FISH foi realizada em lâminas contendo células em interfase com sondas locus específica para a SWB marcada com o corante Spectrum Orange™ VYSIS® LSI Williams Syndrome Region. O locus, contém os genes da elastina, LIMK1 e D7S613, um marcador para a identificação do cromossomo 7. A sonda controle, marcada com o Spectrum Green™ incluída na solução, corresponde aos loci D7S486 e D7S522 localizado na banda 7q31.

O protocolo para as reações de FISH foi modificado a partir de Pinkel et al (1986a, b). As lâminas foram previamente estocadas a -20°C e descongeladas à temperatura ambiente no momento da realização do exame. As lâminas com os cromossomos na metáfase foram imersas em solução formamida 70%, 2 vezes em solução salina concentrada (SSC), pH7,0 durante 5 minutos, em banho-maria a 73°C para desnaturação do DNA. Sobre a lâmina, foi aplicada 1µl da sonda (anteriormente adicionada a 2µl de água destilada e a 7µl de tampão de hibridização (LSI Hybridization Buffer®)) em seguida coberta com a lamínula. O material foi incubado em câmara úmida a 37°C de 6 a 16 horas para ocorrer a hibridização. A lâmina, após ser retirada, foi lavada em 4 vezes em SSC/0, 3% NP40 à temperatura ambiente. A lâmina foi exposta ao ar para a secagem e em seguida adicionado 10µl do corante DAPI (VYSIS®).

As imagens digitais com os resultados das hibridações foram capturadas usando o microscópio AXIOSKOP Zeiss®, equipado com lâmpada 100W, por epi iluminação, e jogo de filtros Zeiss® Fluoresceína-iodeto de propídio FITC-PI, BP 450-490, FI 510 e BP 520 (Cat.# 487709) e pelo sistema ISIS (Metasystem®). A documentação foi realizada pela captura das células analisadas pelo sistema de imagem.

3.3 Análise estatística

O teste do χ^2 foi realizado para a análise dos achados clínicos juntamente com os resultados moleculares de microdeleção e o teste exato de Fisher foi utilizado quando apropriado. Os valores de $p \leq 0,050$ foram considerados

estatisticamente significantes, sendo esses dados gerados pelo programa GraphPad Prism 3.0.

Resultados

---

4 Resultados

4.1 Casuística

Participaram do estudo, 97 pacientes cuja idade variou de 4a 10m a 28a 8m com média de 15a 2m e mediana de 14a 2m. A idade do paciente ao diagnóstico variou de 10 meses a 16a 8m com média de idade de 6a 2m.

A idade materna variou entre 15 a 41 anos, com média de 24 anos e a idade paterna variou entre 19 a 54 anos com média de 27 anos. Em seis casos só foi possível obter a idade materna.

4.2 Análise molecular

Entre 97 pacientes, o material genético de seus genitores foi obtido em 82 famílias. Em 13 casos, a análise molecular foi realizada apenas com o DNA materno e para dois casos, o DNA genômico foi proveniente apenas do pai. O resultado dos marcadores microssatélites na eletroforese pode ser observado na figura 11.

Figura 11 - Resultados dos marcadores microssatélites em gel desnaturante de Bis-acrilamida 7% e 7,5 M de uréia. As bandas de DNA dos afetados aparecem sempre na primeira coluna de cada gel seguido pelo DNA da mãe e na última coluna o DNA do pai.

O diagnóstico molecular foi conclusivo em todos os 97 pacientes (100%), utilizando cinco marcadores em conjunto. Dos marcadores microssatélites estudados, D7S1870 foi o mais informativo (78,4%) seguido dos marcadores D7S613 (75,3%) e D7S489 (70,1%). O marcador D7S2476, revelou ser o menos informativo (62,9%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da análise de microdeleções pelos marcadores microssatélites.

	D7S1870	%	D7S613	%	D7S489	%	D7S2476	%
Positivo	65/ 97	67,1	66/ 97	68,1	58/ 97	59,8	56/ 97	57,7
Negativo	11/ 97	11,3	7/ 97	7,2	10/ 97	10,3	5/ 97	5,2
Inconclusivo	21/ 97	21,6	24/ 97	24,7	29/ 97	29,9	36/ 97	37,1
Informativos	76/ 97	78,4	73/ 97	75,3	68/ 97	70,1	61/ 97	62,9

Para aqueles que apresentavam deleção na região estudada (84 pacientes – 86,6%), foi verificada que 5 pacientes (5,9%) possuíam deleção em pelo menos um marcador microssatélite, 21 (25,0%) apresentavam deleção em dois marcadores, 33 (39,3%) possuíam a deleção em três marcadores e para 25 pacientes (29,8%) o diagnóstico molecular de deleção foi confirmado nos quatro marcadores estudados.

Os marcadores D7S1870 e D7S613 juntos mostraram-se mais eficientes na confirmação da deleção em 95/97 pacientes (97,6%). Analisando os marcadores mais informativos D7S1870, D7S613 e D7S489 juntos, o resultado das deleções foi possível em 94/ 95 (99%), já que apenas um paciente só apresentou a confirmação da deleção quando utilizado o marcador D7S2476.

Entre os pacientes estudados, 13 (13,4%) não apresentavam deleção em pelo menos um dos marcadores.

Em relação à origem parental da deleção, 44 pacientes (52,4%) possuíam a perda da região de origem materna e 40 pacientes (47,6%) apresentaram a deleção de origem paterna. Os resultados podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da origem parental da deleção para a SWB.

	nº de pacientes	%
Materno	44/ 84	52,4
Paterno	40/ 84	47,6

Utilizando o marcador microssatélite D7S489_A, localizado em uma região limítrofe entre as regiões comumente deletadas na SWB (1,55 Mb e 1,84 Mb), foi possível verificar o tamanho da deleção nos pacientes participantes do estudo. Para 13 pacientes que já possuíam resultado negativo para os outros marcadores inicialmente estudados, foi confirmado o resultado neste último marcador, não apresentando perda de fragmento.

Os pacientes que possuíam deleção para os marcadores (D7S1870, D7S489, D7S613 e D7S2476) puderam ter os resultados confirmados utilizando o marcador D7S489A. A presença de dois alelos para este marcador resultava em uma deleção com tamanho aproximado de 1,55 Mb.

A ausência de um dos alelos resultava em perda de uma fragmento maior que 1,55 Mb, já que o mesmo está localizado em uma região externa á região comumente deletada. Para esses pacientes a deleção apresentava tamanho aproximado de 1,84 Mb (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados do tamanho da deleção em pacientes com SWB.

	nº de pacientes	%
Deleção de 1,55Mb	76/84	90,5
Deleção de 1,83Mb	8/84	9,5

A origem parental também foi associada ao tamanho da deleção. A freqüência de pacientes que possuíam o tamanho da deleção de 1,55 Mb e de 1,84 Mb foram semelhantes tanto para as deleções de origem materna quanto paterna, não apresentando assim, diferenças estatisticamente significantes (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados do tamanho da deleção em pacientes com SWB, associados à origem parental da deleção.

Tamanho da deleção	Origem materna		Origem paterna		p
	nº pacientes/total	%	nº pacientes/total	%	
1,55Mb	40/44	90,9	36/40	90,0	1,0000*
1,84Mb	4/44	9,1	4/40	10,0	

4.3 Achados clínicos e correlação molecular

As principais alterações clínicas nos pacientes com deleção foram: fâcies típico (100%), deficiência intelectual (100%), personalidade amigável (86,2%), hiperacusia (81,9%), cardiopatia (77,5%), alterações oftalmológicas (65,2%), baixa estatura (51,2%), alterações urinárias (48,1%) e microcefalia (24,7%).

As características clínicas entre os pacientes com deleção e sem deleção foram semelhantes, não apresentando diferenças estatisticamente significantes exceto para as alterações oftalmológicas ($p=0,012$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Aspectos clínicos dos pacientes com deleção e sem deleção.

Aspectos clínicos	Com deleção		Sem deleção		p
	nº de pacientes	%	nº de pacientes	%	
Fâcies típico	84/84	100,0	13/13	100,0	--
Deficiência intelectual	76/76	100,0	10/10	100,0	--
Personalidade amigável	74/80	92,5	11/12	91,7	1,000
Cardiopatia	62/80	77,5	8/13	61,3	0,296
Hiperacusia	59/72	81,9	7/12	58,3	0,120
Alterações oftalmológicas	45/69	65,2	2/10	20,0	0,012
Baixa estatura	42/82	51,2	3/13	23,1	0,076
Alterações urinárias	38/79	48,1	2/12	16,7	0,060
Microcefalia	20/81	24,7	3/13	23,1	1,000

Os aspectos clínicos também foram analisados em relação ao tamanho da deleção, não apresentando diferenças estatisticamente significantes (Tabela 10).

Tabela 10 - Aspectos clínicos com o tamanho da deleção.

Aspectos clínicos	Tamanho da deleção				p
	1,55 Mb	%	1,84 Mb	%	
Fácie típico	76/76	100,0	8/8	100,0	--
Deficiência intelectual	68/68	100,0	8/8	100,0	--
Personalidade amigável	68/72	94,4	6/8	75,0	0,108
Hiperacusia	51/64	79,7	8/8	100,0	0,336
Baixa estatura	39/74	52,7	3/8	37,5	0,477
Microcefalia	17/73	23,3	3/8	37,5	0,401
Alterações cardiovasculares	54/72	75,0	8/8	100,0	0,188
EASV	23/54	42,6	4/8	50,0	0,719
EAP	10/54	18,5	2/8	25,0	0,645
EASV + EAP	9/54	16,7	--	--	--
Outras cardiopatias ^a	12/54	22,2	2/8	25,0	1,000
Alterações oculares	44/62	70,9	7/8	87,5	0,433
Alterações urinárias	34/71	47,9	4/8	50,0	1,000

^a Prolapso da válvula mitral, comunicação interventricular, insuficiência cardíaca, sopro cardíaco

As alterações oculares presentes nos pacientes com deleção incluíam estrabismo (46,7%), íris de padrão estrelado (35,6%) e opacidade puntiforme do cristalino (33,3%), além de alguns casos com glaucoma bilateral, pseudopapilidema e miopia.

Entre as alterações urinárias, a maioria dos pacientes apresentou enurese (78,9%), e em alguns casos houve presença de divertículos, rins assimétricos, estreitamento da artéria renal e microlitíase renal.

Quanto à origem parental, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os aspectos clínicos, exceto a EASV que esteve presente em maior frequência em pacientes com deleção de origem paterna ($p=0,013$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Associação dos aspectos clínicos à origem parental da deleção.

Aspectos clínicos	Origem da deleção		P
	Materno	Paterno	
Deficiência intelectual	44/44	40/40	--
Fácie típico	44/44	40/40	--
Personalidade amigável	39/42	35/38	1,000
Hiperacusia	34/39	25/33	0,235
Baixa estatura (<5%)	24/43	18/39	0,507
Microcefalia	10/42	10/39	1,000
Alterações cardiovasculares	33/44	29/36	0,601
EASV	11/44	16/29	0,013
EAP	5/44	7/29	0,200
EASV + EAP	7/44	2/29	0,303
Outros cardiopatias ^a	10/44	4/29	0,383
Alterações oculares	25/36	25/34	0,749
Alterações urinárias	22/43	16/36	0,653

^a Prolapso da válvula mitral, comunicação interventricular, insuficiência cardíaca, sopro cardíaco

Discussão

---

5 Discussão

5.1 Marcadores microsatélites

Os marcadores microsatélites utilizados em nosso estudo (D7S1870, D7S489B, D7S613, D7S2476, D7S489A) já foram testados separadamente em diferentes trabalhos na literatura para diagnóstico molecular da SWB (Gilbert-Dussardier et al., 1995; Pérez-Jurado et al., 1996; Robinson et al., 1996; Brondum-Nielsen et al., 1997; Wang et al., 1999; Wu et al., 1998; Bayés et al., 2003; Heller et al., 2003; Thomas et al., 2006).

Na literatura, a identificação da deleção varia de 57% a 87% (Brondum-Nielsen et al., 1997; Wu et al., 1998; Gilbert-Dussardier et al., 1995; Heller et al., 2003; Sbruzzi et al., 2010).

Sbruzzi et al (2010), realizado em 32 pacientes com a SWB da Unidade de Genética do Instituto da Criança, utilizando três marcadores (D7S1870, Eln17/éxon 18 e Hei), os resultados foram conclusivos em 78%.

No presente estudo, o uso de cinco marcadores permitiu identificar a presença ou ausência da microdeleção em todos os 97 pacientes (100%) estudados.

Entre os marcadores, D7S1870 foi o mais informativo (78,4%), seguido de outros dois marcadores (D7S613, D7S489) que apresentaram resultados conclusivos acima de 70% nos nossos pacientes. Já o marcador D7S2476 foi conclusivo em 62,9%. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura (Pérez-Jurado et al., 1996; Wu et al., 1998; Hockenhull et al., 1999; Gilbert-Dussardier et al., 1995; Urban et al., 1996; Brondum-Nielsen et al., 1997; Bayés et al., 2003; Sbruzzi et al., 2010).

O uso de cinco marcadores em conjunto, permitiu detectar a presença ou ausência de microdeleções em 100% dos pacientes. No entanto, o uso de três marcadores melhores informativos D7S1870, D7S613 e D7S489, permitiu verificar a deleção em quase todos, exceto em um paciente, no qual a confirmação da deleção foi possível apenas com outro marcador D7S2476.

5.1.1 Marcadores x FISH

Em estudo anterior (Sugayama et al., 2003), foi possível realizar a técnica de FISH em 23 pacientes. Comparando os nossos resultados obtidos por marcadores e aqueles obtidos por FISH, o resultado foi concordante em 21 FISH positivos. Porém, em dois pacientes com FISH negativo, foi possível detectar a microdeleção apenas pelos marcadores microssatélites.

Na literatura, são relatados também a eficiência do uso de marcadores na detecção da microdeleção em alguns casos de FISH negativo (Brøndum-Nielsen et al., 1997; Heller et al., 2003).

5.1.2 Tamanho da deleção

O marcador microssatélite D7S489_A foi eficaz para analisar o tamanho da deleção e também para confirmar a ausência da deleção.

Na SWB a deleção de 1,55 Mb ocorre na maioria dos pacientes e em uma frequência menor, as deleções de 1,84 Mb (Bayes et al., 2003; Edelmann et al., 2007).

Foi observada na nossa casuística, a deleção de 1,55 Mb em 76/ 84 (90,5%) pacientes e 1,84 Mb em 8/ 84 pacientes (9,5%). Os resultados são semelhantes aos da literatura, porém, Schubert e Laccone (2006) observaram a deleção de 1,84 Mb em 14% dos pacientes com SWB, frequência esta, um pouco maior quando comparado ao presente estudo.

As deleções atípicas de tamanhos variados também têm sido relatadas, tais como as deleções de 950 Kb e 850 Kb, no qual estão associadas às características clínicas mais leves, incluindo EASV e boa verbalização nos pacientes com SWB (Heller et al., 2003; Karmiloff-Smith et al., 2003) e deleções maiores de 2,43 Mb a 3,5 Mb associadas a uma fenótipo mais agressivo, afetando principalmente a função cognitiva acompanhada de espasmos (Mizugishi et al., 1998; Wu et al., 1999; Blyth et al., 2008; Ramocki et al., 2010).

5.1.3 Origem parental da deleção

Em relação à origem parental da deleção, 44/ 84 pacientes (52,4%) apresentavam deleção de origem materna, enquanto 40/ 84 pacientes (47,6%) possuíam deleção de origem paterna. A origem parental em relação ao tamanho da deleção não apresentou diferença semelhante aos trabalhos da literatura (Tabela 12).

Tabela 12 - Origem parental da deleção comparada aos diversos trabalhos na literatura.

Autor (ano)	n	materna	paterna
Kotzot et al., (1995)	19	53,0%	47,0%
Mari et al., (1995)	17	53,0%	47,0%
Nickerson et al., (1995)	13	39,0%	61,0%
Dutly e Schinzel, (1996)	15	53,3%	46,7%
Pérez-Jurado et al., (1996)	39	53,8%	46,2%
Robinson et al., (1996)	9	77,8%	22,2%
Milá et al., (1999)	26	50,0%	50,0%
Wang et al., (1999)	65	58,5%	41,5%
Brondum-Nielsen et al., (1998)	22	54,5%	45,5%
Wu et al., (1998)	51	56,8%	43,2%
Bayés et al., (2003)	67	44,8%	55,2%
Thomas et al., (2006)	27	44,4%	55,6%
Del Campo et al., (2006)	91	53,0%	47,0%
Sbruzzi et al, (2010)	36	52,9%	47,0%
Presente estudo	97	52,4%	47,6%

Embora a frequência entre a origem paterna e materna serem muito próximos, alguns autores sugerem uma discreta tendência para deleção materna devido ao efeito de *imprinting* genômico, quando todos os dados são combinados (Robinson et al., 1996; Brondum-Nielsen et al., 1997; Thomas et al., 2006).

5.2 Correlação de achados clínicos

5.2.1 Presença e ausência de deleção

Os aspectos clínicos foram semelhantes no grupo que apresentavam deleção e sem deleção pelos marcadores, exceto para alterações oftalmológicas ($p= 0,032$) tais como estrabismo, íris de padrão estrelado e opacidade puntiforme do cristalino.

Em trabalho realizado anteriormente em 32 pacientes com SWB (Unidade de Genética - ICr), Sbruzzi et al (2010), observaram que a presença de deleção estava associada à personalidade amigável e hiperacusia.

5.2.2 Tamanho da deleção

Não houve diferença entre o tamanho da deleção e as características clínicas, semelhante aos encontrados na literatura (Wang et al., 1999; Bayes et al., 2003).

No estudo realizado por Schubert e Laccone (2006) deleções de 200 Kb (próximos à *ELN*) resultaram apenas em EASV e deleções acima de 2,5 Mb encontraram deficiência intelectual severa, epilepsia na infância e comportamento agressivo.

Botta et al. (1999), encontraram em dois pacientes com alterações fenotípicas clássicas, deleção parcial da região crítica para a SWB de tamanho inferior a 1 Mb, possuindo essa região deletada, ausência dos genes *STX1A* e *FZD3* responsáveis pelas alterações neurológicas e cognitivas. Recentemente, Ferrero et al. (2010), estudando um paciente com leves aspectos físicos de SWB e QI normal, verificaram a presença de microdeleção de tamanho menor que 1 Mb, indicando assim que os genes *GTF2IRD1* e *GTF2I* podem estar envolvidos no dismorfismo facial e na redução cognitiva e motora.

5.2.3 Origem parental

Entre os 84 pacientes com deleção, 44 pacientes apresentava a deleção de origem materna e 40 de origem paterna e não houve diferença com os aspectos clínicos, exceto à EASV, que esteve associada a deleção paterna ($p=0,021$).

Na literatura, um dos primeiros autores a verificar associação da origem parental com achados clínicos foi Pérez-Jurado et al. (1996), no qual observaram a presença de microcefalia e retardo no crescimento em uma frequência maior nos pacientes com deleção de origem materna. A partir desses resultados, o mesmo grupo sugeriu que um ou diversos genes alterados pela deleção talvez tenham sido alvo de *imprinting* genômico.

Posteriormente, Ashley-Koch et al. (1999) também observaram uma associação da origem paterna com o risco de hipertensão e aspectos autistas em pacientes com SWB.

Em adição aos efeitos de *imprinting*, Collete et al. (2009), verificaram uma redução na expressão do gene *GTF2I*, importante para o desenvolvimento normal do cérebro, associada à deleção de origem paterna.

Por outro lado, Wang et al. (1999) não encontraram diferenças no quadro clínico de 85 pacientes quando associados à origem parental.

5.2.4 Aconselhamento genético

Nos pacientes que apresentavam deleção pelo método de marcadores micropssatélites, foi possível a confirmação diagnóstica de SWB.

No presente estudo, todos os casos foram esporádicos em 84 pacientes, no qual não foram verificadas as alterações fenotípicas nos pais. Na literatura, também a maioria dos casos é de ocorrência esporádica e raramente ocorrem casos famílias de HAD, apresentando nesses casos, um risco de recorrência para a futura prole de 5% (Cortada et al., 1980; Morris et al., 1993; Pankau et al., 2001).

Já os pacientes que não apresentaram deleção para a região 7q11.23 pelos marcadores microssatélites, a hipótese diagnóstica para a SWB não pode ser

desconsiderada, pois as deleções podem ser de tamanho menores que 1.55 Mb. Com isso, outras metodologias para melhorar a acurácia dos resultados são necessárias tais como PCR quantitativo, MLPA e *array*-CGH (Botta et al., 1999; Gagliardi et al., 2003).

Conclusão

---

6 Conclusão

- O método de marcadores moleculares (D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476) foi eficaz em 100% dos pacientes estudados.
- O marcador D7S1870 foi o mais informativo seguido de D7S613, D7S489 e D7S2476.
- Este método possibilitou a confirmação diagnóstica de SWB em 86,6% pacientes estudados, além de permitir a identificação do tamanho e origem parental da deleção.
- Os aspectos clínicos não apresentaram diferenças em relação à presença ou ausência de deleção, exceto para alterações oculares.
- Em relação ao tamanho da deleção não houve diferenças estatisticamente significantes quando associado ao quadro clínico.
- A origem parental da deleção não apresentou diferenças em relação aos achados clínicos, exceto para a EASV, mais frequente nas deleções de origem paterna.
- Em dois pacientes que apresentavam resultado negativo para a deleção pela técnica de FISH, foi possível a confirmação da deleção por marcadores.
- Nos pacientes sem deleção pelos marcadores microssatélites, outros métodos tais como MLPA e array-CGH poderão ser aplicados para a confirmação diagnóstica.

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0368/08**, intitulado: "**ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN**" apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Chong Ae Kim**

Pesquisador (a) Executante: **Roberta Lelis Dutra**

CAPPesq, 06 de Junho de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....>>>>.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : .....>..... SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE .....
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
 BAIRRO:..... CIDADE: .....
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Análise de marcadores moleculares para o diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren**
- PESQUISADOR: Chong Ae Kim
 CARGO/FUNÇÃO: Chefe da Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054
 UNIDADE DO HCFMUSP: Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐		RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Detectar a presença de uma alteração no material genético de pacientes com suspeita clínica de Síndrome de Williams para se firmar o diagnóstico dessa doença, a fim de fornecer um diagnóstico de certeza e realizar um seguimento mais adequando.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Serão realizados: uma entrevista com os familiares responsáveis para se coletar os dados do paciente e da família; um exame físico; e coletada uma amostra de sangue periférico de 5 ml (por uma punção venosa), do paciente e dos pais, cujo o risco é considerado baixo, para detectar alterações do material genético (DNA)

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: A coleta de sangue periférico será realizada por punção venosa do antebraço do paciente e dos pais.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Ao participar do estudo, seu filho (a) e os familiares correrão um risco praticamente desprezível e um leve desconforto apenas pelo procedimento de coleta de sangue por punção venosa.

5 – Benefícios para o participante: A metodologia empregada beneficiará o paciente fornecendo um diagnóstico de certeza, nos casos positivos.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Manejo preventivo (diagnóstico pré-natal) e terapêutico mais adequados.

7 – Garantia de acesso: Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para tirar qualquer dúvida. O principal investigador é a Dra. Chong Ae Kim que pode ser encontrado no endereço Rua: Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647 – 7º andar - Telefone(s) 3069-8671. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética

em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Não haverá dano pessoal. O participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Análise de marcadores moleculares para o diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren"

Eu discuti com a Dra. Chong Ae Kim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo   Data   /   /

Anexo C - Ficha Clínica dos pacientes com SWB

Nome: _____ RG _____ DN: ____ / ____ / ____

End.: _____

Tel: _____ Idade ao Diagnóstico: _____

Termo de consentimento: ☐ SIM ☐ NÃO Cons DNA ☐ Cons MLPA ☐

Aspectos clínicos:

	Sem descrição	Sim	Não	Duvidoso
Fácies típico	☐	☐	☐	☐
Cardiopatía	☐	☐	☐	Tipo: _____
Personalidade amigável	☐	☐	☐	
Hiperacusia	☐	☐	☐	
Alt Oftalmológicas	☐	☐	☐	Tipo: _____
Alterações urinárias	☐	☐	☐	Tipo: _____
Retardo mental	☐	☐	☐	QI: _____
Baixa estatura (< p5)	☐	☐	☐	
Microcefalia (< p2)	☐	☐	☐	

Resultados de Exames:

	Não realizado	Positivo	Negativo	
FISH	☐	☐	☐	Local: _____
D7S1870	☐	☐	☐	
D7S489	☐	☐	☐	
D7S613	☐	☐	☐	
D7S2476	☐	☐	☐	Tamanho: _____
D7S489_A	☐	☐	☐	Origem parental: _____
MLPA	☐	☐	☐	
Caso	☐	☐	☐	
Esporádico		Familiar		

Anexo D – Artigo aceito para publicação

Fator de impacto 1,596

CLINICS - Decision on Manuscript ID CLINICS-Jan-2011-OA-0076

onbehalf of +mrsilva36+hcnet.usp.br@manuscriptcentral.com

[onbehalf of +mrsilva36+hcnet.usp.br@manuscriptcentral.com] em nome de
mrsilva36@hcnet.usp.br [mrsilva36@hcnet.usp.br]

Enviado: segunda-feira, 21 de fevereiro de 2011 16:39

Para: Roberta Lelis Dutra; Chong Ae Kim

21-Feb-2011

Dear Dr Dutra:

Manuscript ID CLINICS-Jan-2011-OA-0076 entitled "Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers." which you submitted to CLINICS, has been reviewed.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication. I should also congratulate you, because it is a very rare event to see a paper accepted first time around, no objections.

However, I have checked recent publications in CLINICS and came across this one which seems quite an adequate cite for your excellent paper; as far as my ignorance goes, both Williams and DiGeorge are autosomal monosomic deletions. I hope you can agree with me.

Fomin AB, Pastorino AC, Kim CA, Pereira CA, Carneiro-Sampaio M, Abe-Jacob CM. DiGeorge Syndrome: a not so rare disease. Clinics. 2010;65:865-9.

To revise your manuscript, log into <http://mc.manuscriptcentral.com/clinics> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript ID number will be automatically appended to denote a revision, and the manuscript will move to the section [Revised Manuscripts in Draft].

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, please download the file [CLINICS-Jan-2011-OA-0076 RT.doc], save it and revise it using a word processing program. Please use this file [CLINICS-Jan-2011-OA-0076 RT.doc] which is a version of your original submission formatted expressly for CLINICS. Spelling and other trivial mistakes may also have been corrected.

Once the revision is ready, rename it [CLINICS-Jan-2011-OA-0076 R1.DOC] re-enter your Author Center, go to the same manuscript, and upload this new version.

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. We do keep copies of all these files in the Editorial Office. So please delete the previously submitted manuscript and any figures or tables replaced by revised versions.

Your revised manuscript should be uploaded within the next 30 days. If you need more time, please let us know and we will extend your deadline. However, after this deadline, if your article is accepted and published the resubmission date will be used as the submission date in the publication.

Please check and if necessary correct all the following FIVE items (ITEM 1, SPELL CHECK, IS NOT OPTIONAL):

1. SPELL CHECK. Run a spell check for ENGLISH USA through your entire text before re-submitting.
2. TITLE: Your title cannot contain abbreviations.
3. ABSTRACT: Your abstract must be structured into Objective; Method; Results; Conclusion. You may optionally include an introduction before the objective. Do not introduce a Discussion. Each segment must be one-paragraph long and free of abbreviations (except internationally accepted ones, such as weights and measures, chemical formulae, physical units, etc). It is also highly recommended that you remove all "p" values, because reading of your abstract becomes an unpleasant task. You should only declare here what is / what is not significant and leave the "p" values for the main text. Remember: maximum 250 words. The fewer the better!
4. CITATIONS IN TEXT. Citations in text are numbered consecutively (Arabic numerals) in order of appearance and must be superscripted, without parentheses or brackets, immediately AFTER THE PUNCTUATION MARK (,.;?!). Where no PUNCTUATION MARK occurs, insert citation immediately following the previous word, with no space.
5. REFERENCE LIST. CLINICS adopts the VANCOUVER CONVENTION. Please read our instructions to authors and check all your references for accuracy and adherence to the format. Briefly, for articles with six or less authors, list all; for articles with more than 6 authors, list first six followed by et al.

Once again, thank you for submitting your manuscript to CLINICS and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Dr. Mauricio Rocha e Silva
Editor, CLINICS
mrsilva36@hcnet.usp.br

Reviewers' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

O artigo é muito bom, com ótimo embasamento bibliográfico. Os sujeitos e métodos estão adequados. Os resultados são apresentados de forma clara, e proporcionam aos interessados uma forma mais barata para se obter a confirmação da microdeleção em questão.

Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers.

Dutra RL; Pieri PC; Teixeira ACD; Honjo RS; Bertola DR; Kim CA

Running title

Deletion detection in WBS by polymorphic markers

Abstract

INTRODUCTION: Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050) is caused by a hemizygous contiguous gene microdeletion at 7q11.23. Supravalvular aortic stenosis (SVAS), mental retardation, overfriendliness, and ocular and renal abnormalities comprise typical symptoms in WBS. Although fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is widely used for diagnostic confirmation, microsatellite DNA markers are considered highly informative and easily manageable.

OBJECTIVES: This study aimed to test the microsatellite markers for the diagnosis of WBS, to determine the size and parental origin of microdeletion, compare the clinical characteristics between patients with different sizes of the deletion and parental origin.

METHODS: We studied 97 patients with clinical diagnosis of WBS using five microsatellite markers: D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476 and D7S489_A.

RESULTS AND DISCUSSION: Using five markers together, the result was informative in all patients. The most informative marker was D7S1870 (78.4%), followed by D7S613 (75.3%), D7S489 (70.1%) and D7S2476 (62.9%). The microdeletion was present in 84 (86.6%) patients and absent in 13 (13.4%) patients. Maternal deletions were found in 52.4% of patients and paternal deletions in 47.6% of patients. The observed size of deletions was 1.55 Mb in 76/84 patients (90.5%) and 1.84 Mb in 8/84 patients (9.5%). SVAS as well as ocular and urinary abnormalities were more frequent in the patients with a deletion. There were no clinical differences in relation to either the size or parental origin of the deletion.

CONCLUSION: Using these five selected microsatellite markers was informative in all patients, thus can be considered an alternative method for molecular diagnosis in SWB.

Keywords: Williams-Beuren syndrome; microsatellite markers, parental origin; size deletion; molecular diagnosis.

Introduction

Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050) is a neurodevelopmental disorder described independently^{1,2} as a syndrome involving facial appearance characteristics, supravulvar aortic stenosis (SVAS) and mental retardation. In fact, WBS presents a wide collection of symptoms affecting blood vessels, growth, intelligence, and behavior. Children with this condition have distinctive “elfin” facial features, a hoarse voice associated with growth, mental retardation and an “engaging” personality^{3,4}; hyperacusis, infantile hypercalcemia, prematurely wrinkled skin and SVAS are also common symptoms.⁵⁻⁸

WBS is generally sporadic with an incidence of 1/13,700–1/25,000 live births with no ethnic or sex preference, although familial cases have been reported with apparent autosomal dominant inheritance.⁹⁻¹¹ Despite the consistency of the overall clinical features, the broad spectrum of anomalies and phenotypic variability frequently lead to a significant difference in the number of patients diagnosed.^{12,13}

The most common deletion, found in 90% to 95% of WBS patients, spans a genomic region of ~1.55 Mb and is the result of mispairing between the centromeric and medial LCR blocks B (Bcen and Bmid).¹⁴⁻¹⁶ In 5% to 10% of cases, the breakpoints are within the centromeric and medial LCR blocks A (Acen and Amid), leading to an ~1.84 Mb deletion.^{17,18} Atypical (~0.2 Mb to ~2.5 Mb) deletions may be the leading cause of the substantial phenotypic variability among WBS patients.

Duplication of the WBS region occurs at half the frequency of deletions with less distinctive and somehow opposite clinical features, such as deficits of social interaction and an autistic-like phenotype.¹⁹⁻²⁰ Autism was also described in an atypically large deletion (2.4 Mb to 3.4 Mb) telomeric to the WBS critical region.²¹ The presence of inversions in WBS patients has also been reported.^{22,18}

The origin of deletion occurs at the same frequency, and there is no clear-cut clinical association between parental imprinting and phenotype differences, except for hypertension and some aspects of growth, such as height, weight and head circumference.^{17, 13, 23, 24}

Although fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is widely used and considered the gold standard for WBS molecular diagnosis, the use of microsatellite DNA markers has also been widely used and is considered highly informative and easily manageable.^{15, 17, 25, 26, 27} Confirmation of clinical suspicion is essential for clinical monitoring of the patient and genetic counseling of the family.

In our previous study²⁸, we assessed the use of three microsatellite markers (D7S1870, Hei and ELN 17/ exon 18) in the confirmation of the diagnosis of 32 WBS patients. They were informative in 78% of patients and uninformative in 22%. The most informative marker was D7S1870. In the present study, we maintained only the D7S1870 marker and added four other microsatellite markers to determine the size and parental origin of the microdeletion in the 7q11.23 region.

Materials and Methods

Subjects

A total of 97 patients with a clinical diagnosis of WBS (61 boys and 36 girls) were ascertained through clinical evaluation by geneticists of the Unit of Clinical Genetics of the Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade (ICr-HC-FMUSP) de São Paulo, Brazil.

The clinical diagnosis was made between the ages of 1 and 16 years, with an average of 6 y 2 mo. The mean maternal and paternal ages were 24 y 2 mo and 27 y, respectively.

Methods

The study was approved by the Institutional Review Board, and written consent was obtained from all participants. The molecular study was performed in the Laboratório de Investigação Médica do Instituto da Criança (LIM-36).

Among the 97 patients, DNA from both parents was obtained in 82 cases; in 13 cases, the molecular analysis was performed only with maternal DNA and in two cases, only with paternal DNA.

DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using a salt precipitation technique²⁹ and quantified in a Nano Vue Plus spectrophotometer (GE, New Jersey, USA).

The five microsatellites markers used were D7S1870, D7S489, D7S613 and D7S2476 inside the common 1.55-Mb deletion; D7S489A was used to distinguish deletions of 1.84 Mb (Fig. 1).

Polymerase chain reaction

PCR reactions were carried out in a total volume of 25 μ L containing 50 ng of genomic DNA, 0.2 mM of dNTP mix, 0.4 μ M of the each oligonucleotide, and 0.7 units of EasyTaq DNA Polymerase (LGC, São Paulo, Brazil). Samples were initially denatured for 5 min at 94°C; followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at the specific annealing temperature of each primer pair and 1 min at 72°C; and a final extension step of 15 min at 72°C. Primer sequences and PCR conditions used in this study are given in table 1. To check PCR amplification, 4 μ L of the reaction products were analyzed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized by UV exposure in an Alphascreen HP (Alpha Innotech, Corp. San Leandro, CA).

Polyacrylamide gel

The PCR amplification product was mixed in an equal volume of denaturing solution (99% formamide, 0.01% bromophenol blue; 0.01% xlenecyanol and 10 mM EDTA), denatured for 10 min at 95°C and separated by electrophoresis in a 7% denaturing polyacrilamide gel with urea at a final concentration of 7.5 M. Electrophoresis was performed in a Mini-Proteans III Cell apparatus (Bio-Rad®). The electrophoresis conditions were 105 V, 25 mA, and 2 W for two hours for the markers D7S1870, D7S489, D7S613 and D7S2476 and 230 V, 60 mA, and 5 W for four hours for marker D7S489A. The gels were fixed in 10% ethanol, silver stained and stored in 10% acetic acid until they could be photographed and interpreted.

The patient genotypes were compared with their parents. Deletions were diagnosed as maternal when the proband presented with gel-bands representing the allele marker inherited only from the father. When, by chance, both parents have the same alleles, the monoallelic inheritance of the corresponding microsatellite marker by the proband indicated an uninformative result.

We first used a two-step algorithm to identify the most common 1.55-Mb deletion. We then tested the D7S489A marker either to identify the larger 1.84-Mb deletion (in those patients in which a deletion of at least one marker was detected in the first step) or to confirm the lack of a deletion.

Statistical Analysis

Pairwise comparisons between clinical features of WBS and the presence of deletion, clinical features and deletion size and clinical features and parental origin of deletion were tested for significance using two-tailed Fisher's exact test. A 2x2 contingency table was used to compare clinical features. P analysis was performed in SPSS 13.0 software and considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Results

Using five markers (D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476 and D7S489A) were informative in all patients. The most informative marker was D7S1870 (78.4%), followed by D7S613 (75.3%), D7S489 (70.1%) and D7S2476 (62.9%) (Table 2).

The microdeletion was present in 84/97 (86.6%) patients and absent in 13 (13.4%) patients. A prototypic acrylamide gel showing some of the results is shown in Figure 2.

All deletions were *de novo*, and none of the available parents had any clinical manifestation of WBS. It was also possible to determine the presence of a deletion for the 15 patients for whom DNA was available from only one of the parents.

There was no difference in clinical features found in patients with and without a deletion except SVAS as well as ocular and urinary abnormalities, more frequent

with statistically significant association with a deletion. Other cardiovascular diseases, such as pulmonary artery stenosis, mitral valve prolapse and ventricular septum defects, were similar between the two groups. Ocular abnormalities observed were strabismus, stellate irides, punctuate opacities in the lens, glaucoma and myopia. Urinary abnormalities present included enuresis, diverticulosis, asymmetric kidneys, narrowing of the renal artery and renal microlithiasis.

The observed size of deletions was 1.55 Mb in 76/84 patients (90.5%) and 1.84 Mb in 8/84 patients (9.5%). The parental origin of deletion was maternal in 44/84 patients (52.4%), and paternal deletions in 40/84 patients (47.6%). There was no clinical difference in relation to either the size of deletion or the parental origin of deletion.

Twenty-three patients were previously studied by FISH, and 21 proved to have a deletion (FISH positive); whereas 2 patients were FISH negative. Microsatellite marker analysis of these cases revealed microdeletions in all patients, including the two FISH negative patients.

Discussion

The five microsatellite markers (D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476, and D7S489A) used in our study were informative in all patients.

The D7S1870 microsatellite marker showed the highest power of detection, identifying 78.4% of the cases alone and confirming the results found by previous studies.^{17, 18, 26, 28, 34-37}

Another two markers (D7S613, D7S489) were also able to diagnose over 70% of our patients, while the D7S2476 marker showed the poorest results (62.9%). These results were similar to those found in the literature.^{17, 25, 26, 37}

The two best markers (D7S1870 and D7S613) in our study were informative in 97.6% to the detect deletion when used together. When the third marker, D7S489, was included informative detection increased to almost 99%. To increase the detection closer to 100%, additional useful markers will need to be chosen.^{28, 23, 35-37}

The microsatellite marker D7S489A was effective in the analysis of the size of the deletion and in the confirmation of the absence of fragments in the region critical for WBS. The 1.55-Mb deletion was found in 76/84 (90.5%) patients, and the 1.84-Mb deletion found in 8/84 patients (9.5%); these observed proportions are similar to those found in studies in the literature.^{18,21}

Clinical findings in our patients were similar in the groups with a deletion and without a deletion, except for SVAS and ocular and urinary abnormalities. There was also no relationship between the size of the deletion and observed clinical features. These results are similar to those found in literature^{23,33}, where the clinical features found in WBS patients were very similar with both the 1.55-Mb and 1.84-Mb deletions.

In the 13 cases without a deletion, there is the possibility of a deletion smaller than 1.0 Mb that is not detectable by microsatellite markers; thus, this diagnostic should not be ruled out.^{38, 39}

There was no significant difference between the frequencies of maternal and paternal deletions (52.4% and 47.6% respectively). The literature^{18, 23, 28, 36, 37, 40-42} is concordant with our findings, except for one study²⁵, where the maternal deletion was more frequent (77.8%) than the paternal deletion (22.2%).

Despite the frequency of the paternal and maternal deletions being very close, some authors have suggested a slight tendency for deletion due to the effect of maternal genomic imprinting, when all data are combined.^{25, 36, 42}

The phenotypic aspects between the groups of the patients with paternally (n= 44/84) and maternally derived (n= 40/84) deletions were similar. Some reports in the literature, however, suggest a parent-of-origin effect on microcephaly and growth retardation in WBS.^{17, 36}

The FISH technique is currently considered the "gold standard" for molecular diagnosis of WBS, but partial microdeletions can lead to false negative results depending on the sequence and composition of the probe used.^{25, 30, 38} In the present study, the results obtained by FISH were compared with microsatellite marker analysis. The results were concordant, except for two negative FISH.

Other techniques in molecular biology are also being used for the molecular diagnosis of WBS, such as quantitative real-time PCR, multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) and array comparative genomic hybridization (aCGH), however, many other factors should be considered in relation to the cost-benefit and practicality.⁴³⁻⁴⁵ In developed country, aCGH is currently the method of choice for genome-wide screening for chromosome, but in the developing country this technic is not in a disposal due to an expensive cost.^{46,47}

Conclusion

The diagnosis of WBS based on clinical assessments may be difficult because of the great variability of its manifestations. Laboratory tests to detect the microdeletion in 7q11.23 are essential to confirm the clinical diagnosis for WBS. Although fluorescence in situ hybridization (FISH) is widely used, microsatellite DNA markers are considered highly informative and easily manageable for diagnostic confirmation.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Ulysses Dória-Filho (Núcleo de Apoio Metodológico do Instituto da Criança - FMUSP) for his help with the statistical analysis. This work was supported by FAPESP 2008/55391-6.

References

1. Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation*. 1961;24:1311-1318.
2. Beuren AJ, Apitz J, Harmjanz D. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation*. 1962;26:1235-1240.
3. Preus M. The Williams syndrome: objective definition and diagnosis. *Clin Genet*. 1984;25:422-428.
4. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, et al. Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet*. 1993;5:11-16.
5. Martin ND, Snodgrass GJ, Cohen RD. Idiopathic infantile hypercalcemia: a continuing enigma. *Arch Dis Child*. 1984;59:605-613.
6. Burn J. Williams syndrome. *J Med Genet*. 1986;23:389-395.
7. Morris CA, Demsey SA, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr*. 1988; 113: 318-326.
8. Udwin O. A survey of adults with Williams syndrome and idiopathic infantile hypercalcaemia. *Dev Med Child Neurol*. 1990;32:129-141.
9. Morris CA, Thomas IT, Greenberg F. Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet*. 1993;47:478-481.
10. Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R. The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet*. 1993;47:468-470.
11. Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol*. 2002;17:269-271.
12. Lopez-Rangel E, Maurice M, McGillivray B, Friedman JM. Williams syndrome in adults. *Am J Med Genet*. 1992;44:720-729.
13. Ashkenas J. Williams syndrome starts making sense. *Am J Hum Genet*. 1996;59:756-761.
14. Meng X, Lu X, Li Z, Green ED, Massa H, Trask BJ, et al. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet*. 1998;103:590-599.
15. Peoples R, Franke Y, Wang YK, et al. (2000) A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome--deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet* 66:47-68.
16. Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Reymond A. Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet*. 2010;128:3-26.
17. Pérez Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, Francke U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am J Hum Genet*. 1996;59:781-792.
18. Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet*. 2003;73:131-151.

19. Berg JS, Brunetti-Pierri N, Peters SU, Kang SH, Fong CT, Salamone J, et al. Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. *Genet Med*. 2007;9:427-441.
20. Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, et al. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet*. 2009;52:94-100.
21. Edelmann L, Prosnitz A, Pardo S, Bhatt J, Cohen N, Lauriat T, et al. An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. *J Med Genet*. 2007;44:136-143.
22. Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, et al. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet*. 2001;29: 321-325.
23. Wang MS, Schinzel A, Kotzot D, Balmer D, Casey R, Chodirker BN, et al. Molecular and clinical correlation study of Williams-Beuren syndrome: No evidence of molecular factors in the deletion region or imprinting affecting clinical outcome. *Am J Med Genet*. 1999;86:34-43.
24. Collette JC, Chen XN, Mills DL, Galaburda AM, Reiss AL, Bellugi U, et al. William's syndrome: gene expression is related to parental origin and regional coordinate control. *J Hum Genet*. 2009;54:193-198.
25. Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D, et al. Delineation of 7q11.2 deletions associated with Williams-Beuren syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. *Genomics*. 1996;34:17-23.
26. Hockenhull EL, Carette MJ, Metcalfe K, Donnai D, Read AP, Tassabehji M. A complete physical contig and partial transcript map of the Williams syndrome critical region. *Genomics*. 1999;58:138-145.
27. Fomin AB, Pastorino AC, Kim CA, Pereira CA, Carneiro-Sampaio M, Abe-Jacob CM. DiGeorge Syndrome: a not so rare disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65:865-869.
28. Sbruzzi IC, Pereira AC, Vasconcelos B, Honjo RS, Krieger JE, Kim CA. Williams-Beuren Syndrome: Diagnosis by Polymorphic Markers. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010;14:209-214.
29. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:1215.
30. Heller R, Rauch A, Lüttgen S, Schröder B, Winterpacht A. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet*. 2003;40:e99.
31. Antonell A, Del Campo M, Flores R, Campuzano V, Perez-Jurado LA. Williams syndrome: its clinical aspects and molecular bases. *Rev Neurol*. 2006;1:S69-75.

32. Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:1178-1197.
33. Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med.* 2010;362:239-252.
34. Gilbert-Dussardier B, Bonneau D, Gigarel N, *et al.* (1995) A novel microsatellite DNA marker at locus D7S1870 detects hemizyosity in 75% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet* 56:542-544.
35. Urbán Z, Helms C, Fekete G, Le Merrer M, Bonnet D, Philip N, *et al.* 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet.* 1996;59:958-962.
36. Brøndum-Nielsen K, Beck B, Gyftodimou J, Hørlyk H, Liljenberg U, Petersen MB, *et al.* Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphisms. *Hum Genet.* 1997;99:56-61.
37. Wu YQ, Sutton VR, Nickerson E, Lupski JR, Potocki L, Korenberg JR, *et al.* Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am J Med Genet.* 1998;78:82-89.
38. Botta A, Novelli G, Mari A, Novelli A, Sabani M, Korenberg J, *et al.* Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. *J Med Genet.* 1999;36:478-480.
39. Gagliardi C, Bonaglia MC, Selicorni A, Borgatti R, Giorda R. Unusual cognitive and behavioural profile in a Williams syndrome patient with atypical 7q11.23 deletion. *J Med Genet.* 2003;40:526-530.
40. Del Campo M, Antonell A, Magano LF, Muñoz FJ, Flores R, Bayés M, *et al.* Hemizyosity at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension. *Am J Hum Genet.* 2006;78:533-542.
41. Milà M, Carrió A, Sánchez A, Gómez D, Jiménez D, Estivill X, *et al.* Caracterización clínica y genética de 80 pacientes con sospecha clínica de síndrome de Williams-Beuren. *Med Clin (Barc).* 1999;113:46-49.
42. Thomas NS, Durkie M, Potts G, Sandford R, Van Zyl B, Youings S, *et al.* Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:831-837.
43. Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, den Dunnen JT, van Ommen GJ, *et al.* Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. *Am J Med Genet.* 2007;143:610-614.
44. van Hagen JM, Eussen HJ, van Schooten R, van Der Geest JN, Lagers-van Haselen GC, Wouters CH, *et al.* Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Test.* 2007;11:321-327.
45. Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes:

multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. Korean J Lab Med. 2009;29:71-76.

46. Baris HN, Tan WH, Kimonis VE, Irons MB. Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization in a clinical setting. Am J Med Genet. 2007;143:2523-2533.
47. Pickering DL, Eudy JD, Olney AH, Dave BJ, Golden D, Stevens J, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. Genet Med. 2008;10:262-266.

Table 1 – Primers sequences, amplicon sizes and PCR conditions for the five microsatellites markers used.

Markers Chr. 7	Primers	Amplicon size	MgCl ₂	UniSTS Accession number *	AT*
D7S1870	F: TTCACTCAGGAAGTGGC R: TGGTGATGTGCTTTACTACG	108pb	2,0 mM	Z51768	55° C
D7S489	F: CTGTTGACTTTCCCACACTC R: GGCAACTCGAGACGTTAGTT	140-158pb	1,5 mM	Z16646	56° C
D7S613	F: CAGCCTGGGTAACAAAAGC R: CCTCCCTCCCTAATCCATG	85pb	1,4 mM	L16300	55° / 60°C
D7S2476	F: GGGCAACATAGCAGGATT R: CAGGAGTCAGTTAGATAAGGTCAC	128-160pb	2,0 mM	Z53107	56° C
D7S489_A	F: GCACCTATGATCACAGCTTCTC R: ATGACATGAAGGTACTGGCCTT	419pb	2,0mM	BV097124	56° C

48. *Accession number in the GeneBank; AT – anelling temperature; pb – pairs base.

Table 2. Results of the analysis of microdeletions by microsatellite markers

	D7S1870	%	D7S613	%	D7S489	%	D7S2476	%
Positive	65/97	67,1	66/97	68,1	58/97	59,8	56/97	57,7
Negative	11/97	11,3	7/97	7,2	10/97	10,3	5/97	5,2
Uninformative	21/97	21,6	24/97	24,7	29/97	29,9	36/97	37,1
Informative	76/97	78,4	73/97	75,3	68/97	70,1	61/97	62,9

Table 3. Clinical findings in patients with and without deletion.

Clinical Findings	With deletion	Without deletion	<i>p</i>
	Frequency %	Frequency %	
Typical facies	100.0	100.0	--
Mental retardation	100.0	100.0	--
Friendly personality	92.5	91.7	--
Hyperacusis	81.9	58.3	0.120
Height (<5%)	51.2	23.1	0.059
Microcephaly	24.7	23.1	--
Cardiovascular disease	77.5	61.5	0.297
SVAS	58.1	12.5	0.022
Ocular abnormalities	65.2	20.0	0.012
Urinary abnormalities	48.1	16.7	0.041

Figure 1. Idiogram of chromosome 7 (7q11.23) illustrating the commonly deleted region and the relative localization of the tested markers.²⁹⁻³²

Figure 2. Genotyping of the five microsatellites markers in WBS families. DNA fragments of those affected are always the first column of each gel followed by DNA from the mother and the last column the DNA of the father. Black arrows indicate allelic loss.

Anexo E - Artigo enviado para publicação - *American Journal of Medical Genetics*

Microsatellite Markers and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA): Diagnosis tests for Williams-Beuren syndrome

Roberta Lelis Dutra; Rachel Sayuri Honjo; Fernanda da Fonseca Macaferri; Patrícia de Campos Pieri; Débora Bertola; Leslie Domenici Kulikowski; Fernanda Jehee; Chong Ae Kim

Running title

Diagnostic Tests for WBS: STRs versus MLPA

Abstract

INTRODUCTION: Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050) is caused by a hemizygous contiguous gene microdeletion at 7q11.23. Supravalvular aortic stenosis (SVAS), mental retardation, overfriendliness, and ocular and renal abnormalities comprise typical symptoms in WBS. Although fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is considered the gold standard technique, the microsatellite DNA markers and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) are also used for diagnostic confirmation.

OBJECTIVES: This study aimed to compare two diagnostic laboratory tests, microsatellite markers and MLPA for the diagnosis of WBS.

METHODS: We studied 77 patients with clinical diagnosis of WBS using five microsatellite markers: D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476, D7S489_A and commercial MLPA kit (SALSA P029).

RESULTS: A total number of 77 patients were tested. Using five markers together, the result was informative in all patients. The most informative marker was D7S1870 (80.5%), followed by D7S613 (77.9%), D7S489 (75.3%) and D7S2476 (66.2%). The microdeletion was present in 64 (83.1%) patients and absent in 13 (16.9%) patients. Maternal deletions were found in 56.3% of patients and paternal deletions in 43.7% of patients. The size of deletions was 1.55 Mb in 57/64 patients (89.1%) and 1.84 Mb in 7/64 patients (10.9%). Using MLPA kit (P029), the results were concordant with microsatellite markers.

CONCLUSION: The microsatellite markers and MLPA method were important for diagnosis confirmation of WBS and the results were concordant. MLPA were considered a faster and economical method in a single assay. In other hand, the microsatellite markers could determine the size and the parental origin of the deletion in WBS.

Keywords: Williams-Beuren syndrome; microsatellite markers; MLPA; molecular diagnosis.

Introduction

Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050) is a neurodevelopmental disorder described independently ^{1, 2} as a syndrome involving facial appearance characteristics, supravalvular aortic stenosis (SVAS) and mental retardation. In fact, WBS presents a wide collection of symptoms affecting blood vessels, growth, intelligence, and behavior. Children with this condition have distinctive “elfin” facial features, a hoarse voice associated with growth, mental retardation and an overfriendliness personality ^{3,4}; hyperacusis, infantile hypercalcemia, prematurely wrinkled skin and SVAS are also common symptoms.⁵⁻⁸

WBS is generally sporadic with an incidence of 1/13,700–1/25,000 live births with no ethnic or sex preference, although familial cases have been reported with apparent autosomal dominant inheritance.⁹⁻¹¹ Despite the consistency of the overall clinical features, the broad spectrum of anomalies and phenotypic variability frequently lead to a significant difference in the number of patients diagnosed.^{12,13}

The most common deletion, found in 90% to 95% of WBS patients, spans a genomic region of ~1.55 Mb and is the result of mispairing between the centromeric and medial LCR blocks B (Bcen and Bmid).¹⁴⁻¹⁶ In 5% to 10% of cases, the breakpoints are within the centromeric and medial LCR blocks A (Acen and Amid), leading to an ~1.84 Mb deletion.^{17,18} Atypical (~0.2 Mb to ~2.5 Mb) deletions may be the leading cause of the substantial phenotypic variability among WBS patients^{19, 20, 21}

Confirmation of clinical suspicion is essential for clinical monitoring of the patient and genetic counseling of the family. Although fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is widely used and considered the gold standard for WBS molecular diagnosis, the use of microsatellite DNA markers has also been widely used and is considered highly informative and easily manageable.^{15, 17, 22, 23, 24}

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) has been introduced in the DNA diagnostic laboratories for the detection of deletions and/or duplications in several disease genes ²⁵⁻²⁸.

MLPA technique is a sample PCR based method for the relative quantification of around 45 nucleic acid sequence in a single reaction, it is sensitive and requires very small amount of DNA (40-100 ng/uL) ²⁹. For WBS, a MLPA kit is commercially

available and using this kit a more precise mapping of a deletion in the WS critical region is possible³⁰. In this study, the results obtained with microsatellite marker were compared with those obtained with MLPA.

It is argued that both techniques are extremely valuable tools for the diagnostic setting in WBS patients and the implantation of both methods should be considered.

Materials and Methods

Subjects

A total of 77 patients with a clinical diagnosis of WBS (48 boys and 29 girls) were ascertained through clinical evaluation by geneticists of the Unit of Clinical Genetics of the Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade (ICr-HC-FMUSP) de São Paulo, Brazil.

The clinical diagnosis was made between the ages of 1 and 16 years, with an average of 6 y 2 mo. The mean maternal and paternal ages were 24 y 2 mo and 27 y, respectively.

Methods

The study was approved by the Institutional Review Board, and written consent was obtained from all participants. The molecular study was performed in the Laboratório de Investigação Médica do Instituto da Criança (LIM-36).

For analysis of the microsatellites markers, DNA from both parents was obtained in 71 cases; in 6 cases, the molecular analysis was performed only with maternal DNA.

DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using a salt precipitation technique³¹ and quantified in a Nano Vue Plus spectrophotometer (GE, New Jersey, USA).

Microsatellite markers

The five microsatellites markers used were D7S1870, D7S489, D7S613 and D7S2476 inside the common 1.55-Mb deletion; D7S489A was used to distinguish deletions of 1.84 Mb.

PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µL containing 50 ng of genomic DNA, 0.2 mM of dNTP mix, 0.4 µM of the each oligonucleotide, and 0.7 units of EasyTaq DNA Polymerase (LGC, São Paulo, Brazil). Samples were initially denatured for 5 min at 94°C; followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at the specific annealing temperature of each primer pair and 1 min at 72°C; and a final extension step of 15 min at 72°C. Primer sequences and PCR conditions used in this study are given in table 1.

Table 1 – Primers sequences, amplicon sizes and PCR conditions for the five microsatellites markers used.

Markers Chr. 7	Primers	Amplicon size	MgCl ₂	UniSTS Accession number *	AT*
D7S1870	F: TTCACTCAGGAAGTGGC R: TGGTGATGTGCTTTACTACG	108pb	2,0 mM	Z51768	55° C
D7S489	F: CTGTTGACTTTCCCACACTC R: GGCAACTCGAGACGTTAGTT	140-158pb	1,5 mM	Z16646	56° C
D7S613	F: CAGCCTGGGTAACAAAAGC R: CCTCCCTCCCTAATCCATG	85pb	1,4 mM	L16300	55° / 60°C
D7S2476	F: GGGCAACATAGCACGATT R: CAGGAGTCAGTTAGATAAGGTCAC	128-160pb	2,0 mM	Z53107	56° C
D7S489_A	F: GCACCTATGATCACAGCTTCTC R: ATGACATGAAGGTAAGTGGCCTT	419pb	2,0mM	BV097124	56° C

49. *Accession number in the GeneBank; AT – anelling temperature; pb – pairs base.

The PCR amplification product was mixed in an equal volume of denaturing solution (99% formamide, 0.01% bromophenol blue; 0.01% xlenecyanol and 10 mM EDTA), denatured for 10 min at 95°C and separated by electrophoresis in a 7% denaturing polyacrilamide gel with urea at a final concentration of 7.5 M. Electrophoresis was performed in a Mini-Proteans III Cell apparatus (Bio-Rad®). The electrophoresis conditions were 105 V, 25 mA, and 2 W for two hours for the markers D7S1870, D7S489, D7S613 and D7S2476 and 230 V, 60 mA, and 5 W for four hours for marker D7S489A. The gels were fixed in 10% ethanol, silver stained and stored in 10% acetic acid until they could be photographed and interpreted.

The patient genotypes were compared with their parents. Deletions were diagnosed as maternal when the proband presented with gel-bands representing the allele marker inherited only from the father. When, by chance, both parents have the same alleles, the monoallelic inheritance of the corresponding microsatellite marker by the proband indicated an uninformative result.

We first used a two-step algorithm to identify the most common 1.55-Mb deletion. We then tested the D7S489A marker either to identify the larger 1.84-Mb deletion (in those patients in which a deletion of at least one marker was detected in the first step) or to confirm the lack of a deletion.

MLPA

The MLPA kit SALSA P029 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) containing probes for eight genes out of the Williams syndrome critical region (*FKBP6*, *FZD9*, *TBL2*, *STX1A*, *ELN*, *LIMK1*, *RFC2* and *CYLN2*) was used. For *ELN* and *CYLN2* probes for various exons are present in the kit. Denaturation, overnight hybridization, ligation and PCR were done according to the instruction of the supplier.

MLPA products were separated by on MegaBACE™ 1000 (GE Life Sciences) using MegaBACE ET SIZE Standards ET550-R (GE Life Sciences). Analysis was done using Genemarker, version 1.6 software (Softgenetics, State College, PA, USA). The ratio of the probes' peak heights was determined by comparing the probes' peak heights obtained on the patients samples to those obtained on the three normal control samples.

Results

A total number of 77 patients were tested. Using five markers (D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476 and D7S489A) were informative in all patients. The most informative marker was D7S1870 (80.5%), followed by D7S613 (77.9%), D7S489 (75.3%) and D7S2476 (66.2%) (Table 2).

Table 2. Results of the analysis of microdeletions by microsatellite markers

	D7S1870	%	D7S613	%	D7S489	%	D7S2476	%
Positive	51/77	66.2	53/77	68.8	48/77	62.3	46/77	59.7
Negative	11/77	14.3	7/77	9.1	10/77	12.9	5/77	6.5
Uninformative	15/77	19.5	17/77	22.1	19/77	24.7	26/77	33.8
Informative	62/77	80.5	60/77	77.9	58/77	75.3	51/77	66.2

The microdeletion was present in 64 (83.1%) patients and absent in 13 (16.9%) patients. A prototypic acrylamide gel showing some of the results is shown in Figure 1.

Figure 1. Genotyping of the five microsatellites markers in WBS families. DNA fragments of those affected are always the first column of each gel followed by DNA from the mother and the last column the DNA of the father. Black arrows indicate allelic loss.

None of the available parents had any clinical manifestation of WBS. It was also possible to determine the presence of a deletion for the 6 patients for whom DNA was available from only one of the parents.

Maternal deletions were found in 56.3% of patients and paternal deletions in 43.7% of patients. The observed size of deletions was 1.55 Mb in 57/64 patients (89.1%) and 1.84 Mb in 7/64 patients (10.9%).

The observed size of deletions was 1.55 Mb in 57/64 patients (89.1%) and 1.84 Mb in 7/64 patients (10.9%). The parental origin of deletion was maternal in 36/64 patients (56.3%), and paternal deletions in 28/64 patients (43.7%).

Using MLPA kit (P029), in all cases the results were concordant with the microsatellite markers' analysis (Figure 2).

Figure 2. Genotyping by MLPA technique using the software GeneMarker® for analysis.

No duplication of the WBS critical region was detected in the 77 patients analysis with MLPA.

Discussion

In our study, the five microsatellite markers (D7S1870, D7S489, D7S613, D7S2476, and D7S489A) were informative in all patients. By comparing microsatellite markers and MLPA methods for detection of deletions in the WBS critical region we did not find any discrepancies.

The D7S1870 microsatellite marker showed the highest power of detection, identifying 80.5% of the cases alone and confirming the results found by previous studies.^{17, 18, 23, 24, 32-35} The two best markers (D7S1870 and D7S613) in our study were informative in 97.6% to the detect deletion when used together. When the third marker, D7S489, was included informative detection increased to almost 99%. To

increase the detection closer to 100%, additional useful markers will need to be chosen.^{24, 33-35}

The microsatellite markers used in the present study, are located in different regions of the probes present in the P029 kit for SWB, as can be seen in the figure 3.

Figure 3. Representation of the 7q11.23 region and the genes commonly deleted in WBS, the location of the probes kit P029 and location of the markers tested. Patients 54 and 55 were represented in the figure to illustrate the size of the deletion and which were informative

In cases not informative for the microsatellite markers, detection of deletion can be confirmed with the MLPA technique. The same can occur for the negative results of MLPA, where the smaller deletions can be detected by specific markers present outside the region of the probes of the kit for the SWB.

Thus, the markers can be very informative for the detection of WBS, as seen in our results.

Since the MLPA technique was developed²⁵, MLPA has been tested as a diagnostic method in several diseases involving chromosomal disorders^{26, 27, 36-39}. In this study, using MLPA kit (P029), we observed the microdeletion in 64 (83.1%) patients and absent in 13 (16.9%) and this results were concordant with microsatellite markers.

The current MLPA kit Salsa P029 can be improved by adding the probes *GFT2IRD1*, *GTF2I*, *NCF1* and *GTF2IRD2* to the kit, because haploinsufficiency of the first three genes seems to be important for the WBS phenotype and a deletion of *GTF2IRD2* can be found in rare WBS cases with a 1,84 Mb deletion³¹. In our study, D7S489A was used to distinguish deletions of 1.84 Mb.

The microsatellite marker D7S489A was effective in the analysis of the size of the deletion. The 1.55-Mb deletion was found in 76/84 (90.5%) patients, and the 1.84-Mb deletion found in 8/84 patients (9.5%); these observed proportions are similar to those found in studies in the literature.¹⁸

The microsatellite markers were efficient in the detection of deletion for the SWB, when compared to the MLPA, they enable the detection of deletions larger than 1.55 MB and allow to detect the parental origin of deletion.

Using markers to identify the parental origin, we found no significant difference between the frequencies of maternal and paternal deletions (52.4% and 47.6% respectively) and the literature^{18, 24, 34, 35, 40 - 42} is concordant with our findings.

The microsatellite markers technique has greatly reduced cost and can be deployed in molecular biology laboratories that have basic equipment for conventional PCR reactions and vertical electrophoresis system.

For Kozlowski et al., in 2008, MLPA has revolutionized the detection of the larger genomic mutations in human disease genes and has rapidly become a standard tool of clinical DNA diagnostics laboratories around the world.

The most important advantages of MLPA are relative simplicity and low cost, rapid turnaround (2 days), ease of multiplexing to permit high confidence in results, high accuracy of copy number estimation, and the potential for a combination of copy number analysis with other applications such as methylation detection or SNP genotyping⁴³

The sensitivity of MLPA and the incidence of false negative results are not known³⁸. On the other hand, a potential problem with the MLPA technique is that polymorphisms that could be present in the probe annealing site might be interpreted as a deletion^{30, 44}

The most limitation is that the relative signal intensities obtained in the assay vary according to the characteristics of the input DNA, such the methods of DNA isolation, the solution in which the DNA has been stored, the degree of DNA degradation, and presence of various contaminants (isolation reagents, protein, RNA, salts, etc.)⁴³

Recent technological development, such as array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) screens the entire genome and accelerates the identification of novel cytogenetic abnormalities^{45, 46, 47}. However, the resolution of array CGH can vary depending on the format and design of the array⁴⁸. In addition, this method is relatively difficult, costly and requires a different set up so far as instrumentation is concerned²⁹.

In summary, both the methods are effective in detection of the deletion in WBS.

Conclusion

The diagnosis of WBS based on clinical assessments may be difficult because of the great variability of its manifestations. Laboratory tests to detect the microdeletion in 7q11.23 are essential to confirm the clinical diagnosis for WBS. Although fluorescence in situ hybridization (FISH) is widely used, microsatellite DNA markers are considered highly informative and easily manageable for diagnostic confirmation. The MLPA technique is an easy and rapid method for the diagnosis of the WBS.

References

1. Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation*. 1961; 24, 1311-1318.
2. Beuren AJ, Apitz J, Harmjanz D. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation*. 1962; 26, 1235-1240.
3. Preus M. The Williams syndrome: objective definition and diagnosis. *Clin Genet*. 1984; 25:422-428.
4. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, et al. Hemizygosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet*. 1993; 5:11-16.
5. Martin ND, Snodgrass GJ, Cohen RD. Idiopathic infantile hypercalcemia: a continuing enigma. *Arch Dis Child*. 1984; 59:605-613.
6. Burn J. Williams syndrome. *J Med Genet*. 1986; 23:389-395.
7. Morris CA, Demsey SA, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr*. 1988; 113: 318-326.
8. Udwin O. A survey of adults with Williams syndrome and idiopathic infantile hypercalcaemia. *Dev Med Child Neurol*. 1990;32:129-141.
9. Morris CA, Thomas IT, Greenberg F. Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet*. 1993;47:478-481.
10. Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R. The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet*. 1993;47:468-470.
11. Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol*. 2002;17:269-271.
12. Lopez-Rangel E, Maurice M, McGillivray B, Friedman JM. Williams syndrome in adults. *Am J Med Genet*. 1992;44:720-729.
13. Ashkenas J. Williams syndrome starts making sense. *Am J Hum Genet*. 1996;59:756-761.
14. Meng X, Lu X, Li Z, Green ED, Massa H, Trask BJ, et al. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet*. 1998;103:590-599.

15. Peoples R, Franke Y, Wang YK, *et al.* (2000) A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome--deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet* 66:47-68.
16. Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Reymond A. Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet.* 2010;128:3-26.
17. Pérez Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, Francke U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am J Hum Genet.* 1996;59:781-792.
18. Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet.* 2003;73:131-151.
19. Heller R, Rauch A, Lüttgen S, Schröder B, Winterpacht A. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet.* 2003;40:e99.
20. Karmiloff-Smith A, Grant J, Ewing S, Carette MJ, Metcalfe K, Donnai D, Read AP, Tassabehji M. Using case study comparisons to explore genotype-phenotype correlations in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet.* 2003; 40(2): 136-40.
21. Edelmann L, Prosnitz A, Pardo S, Bhatt J, Cohen N, Lauriat T, *et al.* An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. *J Med Genet.* 2007;44:136-143.
22. Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D, *et al.* Delineation of 7q11.2 deletions associated with Williams-Beuren syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. *Genomics.* 1996;34:17-23.
23. Hockenhull EL, Carette MJ, Metcalfe K, Donnai D, Read AP, Tassabehji M. A complete physical contig and partial transcript map of the Williams syndrome critical region. *Genomics.* 1999;58:138-145.
24. Sbruzzi IC, Pereira AC, Vasconcelos B, Honjo RS, Krieger JE, Kim CA. Williams-Beuren Syndrome: Diagnosis by Polymorphic Markers. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14:209-214.
25. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 15;30(12):e57.
26. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merks GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet.* 2004 Dec;41(12):892-9.
27. Vorstman JA, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat.* 2006 Aug;27(8):814-21.

28. Rusu C, Sireteanu A, Puiu M, Skrypnyk C, Tomescu E, Csep K, Creț V, Barbării L. MLPA technique--principles and use in practice. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2007 Oct-Dec;111(4):1001-4.
29. Mandal K, Boggula VR, Borkar M, Agarwal S, Phadke SR. Use of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) in screening of subtelomeric regions in children with idiopathic mental retardation. *Indian J Pediatr*. 2009 Oct;76(10):1027-31. Epub 2009 Nov 12.
30. van Hagen JM, Eussen HJ, van Schooten R, van Der Geest JN, Lagers-van Haselen GC, Wouters CH, et al. Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Test*. 2007;11:321-327.
31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:1215.
32. Gilbert-Dussardier B, Bonneau D, Gigarel N, et al. (1995) A novel microsatellite DNA marker at locus D7S1870 detects hemizyosity in 75% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet* 56:542-544.
33. Urbán Z, Helms C, Fekete G, Le Merrer M, Bonnet D, Philip N, et al. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet*. 1996;59:958-962.
34. Brøndum-Nielsen K, Beck B, Gyftodimou J, Hørlyk H, Liljenberg U, Petersen MB, et al. Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphisms. *Hum Genet*. 1997;99:56-61.
35. Wu YQ, Sutton VR, Nickerson E, Lupski JR, Potocki L, Korenberg JR, et al. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am J Med Genet*. 1998;78:82-89.
36. Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, den Dunnen JT, van Ommen GJ, et al. Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. *Am J Med Genet*. 2007;143:610-614.
37. Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *Korean J Lab Med*. 2009;29:71-76.
38. Christofolini DM, de Paula Ramos MA, Kulikowski LD, da Silva Bellucco FT, Belangero SI, Brunoni D, Melaragno MI. Subtelomeric rearrangements and copy number variations in people with intellectual disabilities. *J Intellect Disabil Res*. 2010; 54(10): 938-42.
39. Hills A, Ahn JW, Donaghue C, Thomas H, Mann K, Ogilvie CM. MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. *Mol Cytogenet*. 2010 Oct 13;3:19.
40. Wang MS, Schinzel A, Kotzot D, Balmer D, Casey R, Chodirker BN, et al. Molecular and clinical correlation study of Williams-Beuren syndrome: No

- evidence of molecular factors in the deletion region or imprinting affecting clinical outcome. *Am J Med Genet.* 1999;86:34-43.
41. Milà M, Carrió A, Sánchez A, Gómez D, Jiménez D, Estivill X, et al. Caracterización clínica y genética de 80 pacientes con sospecha clínica de síndrome de Williams-Beuren. *Med Clin (Barc).* 1999;113:46-49.
  42. Thomas NS, Durkie M, Potts G, Sandford R, Van Zyl B, Youings S, et al. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:831-837.
  43. Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis.* 2008 Dec;29(23):4627-36.
  44. Wehner M, Mangold E, Sengteller M, Friedrichs N, Aretz S, Friedl W, Propping P, Pagenstecher C. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in MSH2 and MLH1 genes. *Eur J Hum Genet.* 2005 Aug;13(8):983-6.
  45. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11.
  46. Antonarakis SE. BACKing up the promises. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):230-2.
  47. Snijders AM, Nowak N, Seagraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):263-4.
  48. Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update.* 2004 May-Jun;10(3):221-6.

Referências

Referências

- Andrieux J, Sheth F. Comparative genomic hybridization array study and its utility in detection of constitutional and acquired anomalies. *Indian J Exp Biol.* 2009; 47(10): 779-91.
- Antonell A, de Luis O, Domingo-Roura X, Pérez-Jurado LA. Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res.* 2005; 15(9): 1179-88.
- Antonell A, Del Campo M, Flores R, Campuzano V, Perez-Jurado LA. Williams syndrome: its clinical aspects and molecular bases. *Rev Neurol.* 2006; 42 Suppl 1: S69-75.
- Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, Zaeem L, Basu S, Donnelly SL, Ravan SA, Powell CM, Qumsiyeh MB, Aylsworth AS, Vance JM, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, DeLong GR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics.* 1999; 61(3): 227-36.
- Ashkenas J. Williams syndrome starts making sense. *Am J Hum Genet.* 1996; 59(4): 756-61.
- Babbitt DP, Dobbs J, Boedecker RA. Multiple bladder diverticula in Williams "Elfin-Facies" syndrome. *Pediatr Radiol.* 1979; 8(1): 29-31.
- Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(5): 370-9.
- Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11. 2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet.* 1998; 7(5): 887-94.
- Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(1): 131-51.
- Bellugi U, Bihrlé A, Jernigan T, Trauner D, Doherty S. Neuropsychological, neurological, and neuroanatomical profile of Williams syndrome. *Am J Med Genet.* 1990; 6: 115-25.

Beunders G, van de Kamp JM, Veenhoven RH, van Hagen JM, Nieuwint AW, Sistermans EA. A triplication of the Williams-Beuren syndrome region in a patient with mental retardation, a severe expressive language delay, behavioural problems and dysmorphisms. *J Med Genet.* 2010; 47(4): 271-5.

Beuren AJ, Apitz J, Harmjanz D. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation.* 1962; 26: 1235-40.

Blyth M, Beal S, Huang S, Crolla J, Foulds N. A novel 2.43 Mb deletion of 7q11.22-q11.23. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A(24): 3206-10.

Botta A, Novelli G, Mari A, Novelli A, Sabani M, Korenberg J, Osborne LR, Digilio MC, Giannotti A, Dallapiccola B. Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. *J Med Genet.* 1999; 36(6): 478-80.

Brøndum-Nielsen K, Beck B, Gyftodimou J, Hørlyk H, Liljenberg U, Petersen MB, Pedersen W, Petersen MB, Sand A, Skovby F, Stafanger G, Zetterqvist P, Tommerup N. Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphisms. *Hum Genet.* 1997; 99(1): 56-61.

Brooke BS, Bayes-Genis A, Li DY. New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(5): 176-81.

Burn J. Williams syndrome. *J Med Genet.* 1986; 23(5): 389-95.

Cairo S, Merla G, Urbinati F, Ballabio A, Reymond A. WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(6): 617-27.

Cheng AK, Robertson EJ. The murine LIM-kinase gene (limk) encodes a novel serine threonine kinase expressed predominantly in trophoblast giant cells and the developing nervous system. *Mech Dev.* 1995; 52(2-3): 187-97.

Cherniske EM, Carpenter TO, Klaiman C, Young E, Bregman J, Insogna K, Schultz RT, Pober BR. Multisystem study of 20 older adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet A.* 2004; 131(3): 255-64.

Chimge NO, Makeyev AV, Ruddle FH, Bayarsaihan D. Identification of the TFII-I family target genes in the vertebrate genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(26): 9006-10.

Chowdhury T, Reardon W. Elastin mutation and cardiac disease. *Pediatr Cardiol*. 1999; 20(2): 103-7.

Christofolini DM, de Paula Ramos MA, Kulikowski LD, da Silva Bellucco FT, Belangero SI, Brunoni D, Melaragno MI. Subtelomeric rearrangements and copy number variations in people with intellectual disabilities. *J Intellect Disabil Res*. 2010; 54(10): 938-42.

Collette JC, Chen XN, Mills DL, Galaburda AM, Reiss AL, Bellugi U, Korenberg JR. William's syndrome: gene expression is related to parental origin and regional coordinate control. *J Hum Genet*. 2009; 54(4): 193-8.

Conway EE Jr, Noonan J, Marion RW, Steeg CN. Myocardial infarction leading to sudden death in the Williams syndrome: report of three cases. *J Pediatr*. 1990; 117(4): 593-5.

Cortada X, Taysi K, Hartmann AF. Familial Williams syndrome. *Clin Genet*. 1980; 18(3): 173-6.

de Luis O, Valero MC, Jurado LA. WBSCR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8(3): 215-22.

De Silva U, Massa H, Trask BJ, Green ED. Comparative mapping of the region of human chromosome 7 deleted in Williams syndrome. *Genome Res*. 1999; 9(5): 428-36.

de Smith AJ, Walters RG, Froguel P, Blakemore AI. Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease. *Cytogenet Genome Res*. 2008; 123(1-4): 17-26.

Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab*. 1999; 67(3): 183-93.

Del Campo M, Antonell A, Magano LF, Muñoz FJ, Flores R, Bayés M, Pérez Jurado LA. Hemizyosity at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension. *Am J Hum Genet.* 2006; 78(4): 533-42.

Depienne C, Heron D, Betancur C, Benyahia B, Trouillard O, Bouteiller D, Verloes A, LeGuern E, Leboyer M, Brice A. Autism, language delay and mental retardation in a patient with 7q11 duplication. *J Med Genet.* 2007; 44(7): 452-8.

Desgranges ZP, Ahn J, Lazebnik MB, Ashworth T, Lee C, Pestell RC, Rosenberg N, Prives C, Roy AL. Inhibition of TFII-I-dependent cell cycle regulation by p53. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(24): 10940-52.

Desgranges ZP, Roy AL. TFII-I: connecting mitogenic signals to cell cycle regulation. *Cell Cycle.* 2006; 5(4): 356-9.

Don AJ, Schellenberg EG, Reber AS, DiGirolamo KM, Wang PP. Implicit learning in children and adults with Williams syndrome. *Dev Neuropsychol.* 2003; 23(1-2): 201-25.

Dutly F, Schinzel A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(12): 1893-8.

Eckert KA, Hile SE. Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Mol Carcinog.* 2009; 48(4): 379-88.

Edelmann L, Prosnitz A, Pardo S, Bhatt J, Cohen N, Lauriat T, Ouchanov L, González PJ, Manghi ER, Bondy P, Esquivel M, Monge S, Delgado MF, Splendore A, Francke U, Burton BK, McInnes LA. An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. *J Med Genet.* 2007; 44(2): 136-43.

Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(6): 435-445.

Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet.* 1993; 5(1): 11-6.

Fanconi G. Chronic disorders of calcium and phosphate metabolism in children. *Schweiz Med Wochenschr.* 1951; 81(38): 908-13.

Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, García-Alix A, Delicado A. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet.* 2005; 68(4): 373-8.

Ferrero GB, Howald C, Micale L, Biamino E, Augello B, Fusco C, Turturo MG, Forzano S, Raymond A, Merla G. An atypical 7q11.23 deletion in a normal IQ Williams-Beuren syndrome patient. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(1): 33-8.

Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, Klein BP, Ensing GJ, Everett LA, Green ED, Pröschel C, Gutowski NJ, Noble M, Atkinson DL, Odelberg SJ, Keating MT. LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell.* 1996; 86(1): 59-69.

Franke Y, Peoples RJ, Francke U. Identification of GTF2IRD1, a putative transcription factor within the Williams-Beuren syndrome deletion at 7q11.23. *Cytogenet Cell Genet.* 1999; 86(3-4): 296-304.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res.* 2006; 16(8): 949-61.

Gagliardi C, Bonaglia MC, Selicorni A, Borgatti R, Giorda R. Unusual cognitive and behavioural profile in a Williams syndrome patient with atypical 7q11.23 deletion. *J Med Genet.* 2003; 40(7): 526-30.

Gilbert-Dussardier B, Bonneau D, Gigarel N, Le Merrer M, Bonnet D, Philip N, Serville F, Verloes A, Rossi A, Aymé S, et al. A novel microsatellite DNA marker at locus D7S1870 detects hemizyosity in 75% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(2): 542-4.

Gosch A, Pankau R. Personality characteristics and behaviour problems in individuals of different ages with Williams syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 1997; 39(8): 527-33.

Gothelf D, Farber N, Raveh E, Apter A, Attias J. Hyperacusis in Williams syndrome: characteristics and associated neuroaudiologic abnormalities. *Neurology.* 2006; 66(3): 390-5.

Grimm T, Wesselhoeft H. The genetic aspects of Williams-Beuren syndrome and the isolated form of the supravalvular aortic stenosis. Investigation of 128 families. *Z Kardiol*. 1980; 69(3): 168-72.

Häsler J, Strub K. Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(19): 5491-7.

Heller R, Rauch A, Lüttgen S, Schröder B, Winterpacht A. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet*. 2003; 40(8): e99.

Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(R1): R1-8.

Hertzberg J, Nakisbendi L, Neddleman HL, Pober B. Williams syndrome – oral presentation of 45 cases. *Pediatr dent*. 1994; 16: 262-267.

Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, et al., The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature*. 2003; 424(6945): 157-64.

Hirota H, Matsuoka R, Chen XN, Salandanan LS, Lincoln A, Rose FE, Sunahara M, Osawa M, Bellugi U, Korenberg JR. Williams syndrome deficits in visual spatial processing linked to GTF2IRD1 and GTF2I on chromosome 7q11.23. *Genet Med*. 2003; 5(4): 311-21.

Hobart HH, Morris CA, Mervis CB, Pani AM, Kistler DJ, Rios CM, Kimberley KW, Gregg RG, Bray-Ward P. Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010; 154C(2): 220-8.

Hockenhull EL, Carette MJ, Metcalfe K, Donnai D, Read AP, Tassabehji M. A complete physical contig and partial transcript map of the Williams syndrome critical region. *Genomics*. 1999; 58(2): 138-45.

Hoogenraad CC, Eussen BH, Langeveld A, van Haperen R, Winterberg S, Wouters CH, Grosveld F, De Zeeuw CI, Galjart N. The murine CYLN2 gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 Williams syndrome critical region. *Genomics*. 1998; 53(3): 348-58.

Hotta Y, Kishishita H, Wakita M, Inagaki Y, Momose T, Kato K. Ocular findings of Williams' syndrome. *Acta Paediatr Scand*. 1990; 79(8-9): 869-70.

Houmard B, Small C, Yang L, Naluai-Cecchini T, Cheng E, Hassold T, Griswold M. Global gene expression in the human fetal testis and ovary. *Biol Reprod*. 2009; 81(2): 438-43.

Howald C, Merla G, Digilio MC, Amenta S, Lyle R, Deutsch S, Choudhury U, Bottani A, Antonarakis SE, Fryssira H, Dallapiccola B, Reymond A. Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions. *J Med Genet*. 2006; 43(3): 266-73.

Jones KL, Smith DW. The Williams elfin facies syndrome. A new perspective. *J Pediatr*. 1975; 86(5): 718-23.

Jones KL. Williams syndrome: an historical perspective of its evolution, natural history, and etiology. *Am J Med Genet Suppl*. 1990; 6: 89-96.

Jones W, Bellugi U, Lai Z, Chiles M, Reilly J, Lincoln A, Adolphs R. II. Hypersociability in Williams Syndrome. *J Cogn Neurosci*. 2000; 12 Suppl 1: 30-46.

Karmiloff-Smith A, Grant J, Ewing S, Carette MJ, Metcalfe K, Donnai D, Read AP, Tassabehji M. Using case study comparisons to explore genotype-phenotype correlations in Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet*. 2003; 40(2): 136-40.

Kececioglu D, Kotthoff S, Vogt J. Williams-Beuren syndrome: A 30-year follow-up of natural and postoperative course. *Eur Heart J*. 1993; 14: 1458-1464.

Kim TM, Chung YJ, Rhyu MG, Jung MH. Germline methylation patterns inferred from local nucleotide frequency of repetitive sequences in the human genome. *Mamm Genome*. 2007; 18(4): 277-85.

Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S. The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell*. 2003; 113(7): 905-17.

Kitchiner D, Jackson M, Walsh K, Peart I, Arnold R. Prognosis of supravalve aortic stenosis in 81 patients in Liverpool (1960-1993). *Heart*. 1996; 75(4): 396-402.

Klein AJ, Armstrong BL, Greer MK, Brown FR 3rd. Hyperacusis and otitis media in individuals with Williams syndrome. *J Speech Hear Disord*. 1990; 55(2): 339-44.

Korbel JO, Urban AE, Grubert F, Du J, Royce TE, Starr P, Zhong G, Emanuel BS, Weissman SM, Snyder M, Gerstein MB. Systematic prediction and validation of breakpoints associated with copy-number variants in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(24): 10110-5.

Kotzot D, Bernasconi F, Brecevic L, Robinson WP, Kiss P, Kosztolanyi G, Lurie IW, Superti-Furga A, Schinzel A. Phenotype of the Williams-Beuren syndrome associated with hemizyosity at the elastin locus. *Eur J Pediatr*. 1995; 154(6): 477-82.

Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai K, Sloos W, Mazzeu JF, Kok F, Cheroki C, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Varela M, Koiffmann C, Kim CA, Bertola DR, Pearson PL, Rosenberg C. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res*. 2006; 115(3-4): 254-61.

Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Tanke HJ, Breuning MH, Szuhai K. Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. *Am J Med Genet A*. 2007; 143(6): 610-4.

Kuijpers GM, De Vroede M, Knol HE, Jansen M. Growth hormone treatment in a child with Williams-Beuren syndrome: a case report. *Eur J Pediatr*. 1999; 158(6): 451-4.

Levitin DJ, Cole K, Lincoln A, Bellugi U. Aversion, awareness, and attraction: investigating claims of hyperacusis in the Williams syndrome phenotype. *J Child Psychol Psychiatry*. 2005; 46(5): 514-23.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*. 2002;11:2453–2465.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol*. 2004; 21: 991–1007.

Lopez-Rangel E, Maurice M, McGillivray B, Friedman JM. Williams syndrome in adults. *Am J Med Genet*. 1992; 44(6): 720-9.

Lowery MC, Morris CA, Ewart A, Brothman LJ, Zhu XL, Leonard CO, Carey JC, Keating M, Brothman AR. Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *Am J Hum Genet.* 1995; 57(1): 49-53.

Makeyev A, Bayarsaihan D. Molecular Basis of Williams-Beuren Syndrome: TFII-I Regulated Targets Involved in the Craniofacial Development. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011; 48(1): 109-16.

Mari A, Amati F, Mingarelli R, Giannotti A, Sebastio G, Colloridi V, Novelli G, Dallapiccola B. Analysis of the elastin gene in 60 patients with clinical diagnosis of Williams syndrome. *Hum Genet.* 1995; 96(4): 444-8.

Meng X, Lu X, Li Z, Green ED, Massa H, Trask BJ, Morris CA, Keating MT. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet.* 1998; 103(5): 590-9.

Merla G, Ucla C, Guipponi M, Reymond A. Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. *Hum Genet.* 2002; 110(5): 429-38.

Merla G, Howald C, Antonarakis SE, Reymond A. The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(14): 1505-14.

Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Fusco C. Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet.* 2010; 128(1): 3-26.

Metcalf K, Rucka AK, Smoot L, Hofstadler G, Tuzler G, McKeown P, Siu V, Rauch A, Dean J, Dennis N, Ellis I, Reardon W, Cytrynbaum C, Osborne L, Yates JR, Read AP, Donnai D, Tassabehji M. Elastin: mutational spectrum in supravalvular aortic stenosis. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8(12): 955-63.

Metcalf K, Simeonov E, Beckett W, Donnai D, Tassabehji M. Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clin Dysmorphol.* 2005; 14(2): 61-5.

Miani C, Passon P, Bracale AM, Barotti A, Panzoli N. Treatment of hyperacusis in Williams syndrome with bilateral conductive hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2001; 258(7): 341-4.

Milà M, Carrió A, Sánchez A, Gómez D, Jiménez D, Estivill X, Ballesta F. Clinical characterization, molecular and FISH studies in 80 patients with clinical suspicion of Williams-Beuren syndrome. *Med Clin (Barc)*. 1999; 113(2): 46-9.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. *Nuc A Res*. 1988; 16: 1215.

Mizugishi K, Yamanaka K, Kuwajima K, Kondo I. Interstitial deletion of chromosome 7q in a patient with Williams syndrome and infantile spasms. *J Hum Genet*. 1998; 43(3): 178-81.

Monaco AP. Human genetics: dissecting Williams syndrome. *Curr Biol*. 1996; 6(11): 1396-8.

Morris CA, Demsey SA, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr*. 1988; 113(2): 318-26.

Morris CA, Leonard CO, Dilts C, Demsey SA. Adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet Suppl*. 1990; 6: 102-7.

Morris CA, Thomas IT, Greenberg F. Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet*. 1993; 47(4): 478-81.

Morris CA, Mervis CB, Hobart HH, Gregg RG, Bertrand J, Ensing GJ, Sommer A, Moore CA, Hopkin RJ, Spallone PA, Keating MT, Osborne L, Kimberley KW, Stock AD. GTF2I hemizyosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. *Am J Med Genet A*. 2003; 123A(1): 45-59.

Morris CA. Introduction: Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010; 154C(2): 203-8.

Nickerson E, Greenberg F, Keating MT, McCaskill C, Shaffer LG. Deletions of the elastin gene at 7q11.23 occur in approximately 90% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet*. 1995; 56(5): 1156-61.

Nikitina TV, Nazarenko SA. Human microsatellites: mutation and evolution. *Russian Journal of Genetics*. 2004; 40: 1064–1079.

Novais CM, Pires-Alves M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2004; 33: 10-13.

Ohazama A, Sharpe PT. TFII-I gene family during tooth development: candidate genes for tooth anomalies in Williams syndrome. *Dev Dyn*. 2007; 236(10): 2884-8.

Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC, Scherer SW. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet*. 2001; 29(3): 321-5.

Osborne LR, Mervis CB. Rearrangements of the Williams-Beuren syndrome locus: molecular basis and implications for speech and language development. *Expert Rev Mol Med*. 2007; 9(15): 1-16.

Ounap K, Laidre P, Bartsch O, Rein R, Lipping-Sitska M. Familial Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet*. 1998; 80(5): 491-3.

Pankau R, Partsch CJ, Winter M, Gosch A, Wessel A. Incidence and spectrum of renal abnormalities in Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet*. 1996; 63(1): 301-4.

Pankau R, Siebert R, Kautza M, Schneppenheim R, Gosch A, Wessel A, Partsch CJ. Familial Williams-Beuren syndrome showing varying clinical expression. *Am J Med Genet*. 2001; 98(4): 324-9.

Pérez-Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, 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(4): 781-92.

Pérez-Jurado AL. Williams-Beuren syndrome: a model of recurrent genomic mutation. *Horm Res*. 2003; 59 Suppl 1: 106-13.

Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Pérez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez-A C, Barbero JL. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J*. 2000; 14(3): 581-92.

Pinkel D, Gray JW, Track B, Van Den Engh G, Fuscoe J, Can Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; 51: 151-7 a.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:2934-8 b.

Pinto D, Marshall C, Feuk L, Scherer SW. Copy-number variation in control population cohorts. *Hum Mol Genet*. 2007; 16 Spec No. 2: R168-73.

Pober BR, Lacro RV, Rice C, Mandell V, Teele RL. Renal findings in 40 individuals with Williams syndrome. *Am J Med Genet*. 1993; 46(3): 271-4.

Pober B, Johnson M, Urban Z. Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *J. Clin. Invest*. 2008; 118(5): 1606-1615.

Pober BR, Wang E, Caprio S, Petersen KF, Brandt C, Stanley T, Osborne LR, Dzuria J, Gulanski B. High prevalence of diabetes and pre-diabetes in adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010; 154C(2): 291-8 a.

Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med*. 2010; 362(3): 239-52 b.

Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez-A C, Rufas JS, Barbero JL. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(8): 761-6.

Pröschel C, Blouin MJ, Gutowski NJ, Ludwig R, Noble M. Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro. *Oncogene*. 1995; 11(7): 1271-81.

Ramocki MB, Bartnik M, Szafranski P, Kołodziejska KE, Xia Z, Bravo J, et al. Recurrent distal 7q11.23 deletion including HIP1 and YWHAG identified in patients with intellectual disabilities, epilepsy, and neurobehavioral problems. *Am J Hum Genet*. 2010; 87(6): 857-65.

Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D, Schinzel A. Delineation of 7q11.2 deletions associated with Williams-Beuren syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. *Genomics*. 1996; 34(1): 17-23.

Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R. The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet*. 1993; 47(4): 468-70.

Sadler LS, Olitsky SE, Reynolds JD. Reduced stereoacuity in Williams syndrome. *Am J Med Genet.* 1996; 66(3): 287-8.

Sammour ZM, Gomes CM, Duarte RJ, Trigo-Rocha FE, Srougi M. Voiding dysfunction and the Williams-Beuren syndrome: a clinical and urodynamic investigation. *J Urol.* 2006; 175(4): 1472-6.

Sbruzzi IC, Pereira AC, Vasconcelos B, Honjo RS, Krieger JE, Kim CA. Williams-Beuren Syndrome: Diagnosis by Polymorphic Markers. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010; 14(2): 1-6.

Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Martin CL. Comparative Genomic Hybridization–Array Analysis Enhances the Detection of Aneuploidies and Submicroscopic Imbalances in Spontaneous Miscarriages. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(6): 1168–1174.

Scherer SW, Cheung J, MacDonald JR, Osborne LR, Nakabayashi K, Herbrick JA, et al. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science.* 2003; 300(5620): 767-72.

Scherer SW, Gripp KW, Lucena J, Nicholson L, Bonnefont JP, Pérez-Jurado LA, Osborne LR. Observation of a parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children. *Hum Genet.* 2005;117(4):383-8.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(12): e57.

Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(7): 1178-97.

Schubert C, Laccone F. Williams-Beuren syndrome: determination of deletion size using quantitative real-time PCR. *Int J Mol Med.* 2006; 18(5): 799-806.

Scott RW, Olson MF. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med.* 2007; 85(6): 555-68.

Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet.* 2000; 34: 297-329.

Sissman NJ, Neill CA, Spencer FC, Taussig HB: Congenital aortic stenosis. *Circulation*. 1959; 19(3): 458-68.

Smith AD, Gilchrist ID, Hood B, Tassabehji M, Karmiloff-Smith A. Inefficient search of large-scale space in Williams syndrome: further insights on the role of LIMK1 deletion in deficits of spatial cognition. *Perception*. 2009; 38(5): 694-701.

Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Pérez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR. Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med*. 2005; 353(16): 1694-701.

Stoeckman AK, Ma L, Towle HC. Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*. 2004; 279(15): 15662-9.

Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol*. 2002; 17(4): 269-71.

Sugayama SMM, Ferreira de Sá LC, Abe CJ, Leone C, Chauffaille ML, Kim CA. Anormalidades oculares em 20 pacientes com síndrome de Williams-Beuren. *Pediatrics (São Paulo)*. 2002; 24(3/4): 98-104.

Sugayama SM, Moisés RL, Wagénfur J, Ikari NM, Abe KT, Leone C, da Silva CA, Lopes Ferrari Chauffaille Mde L, Kim CA. Williams-Beuren syndrome: cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 81(5): 462-73.

Sugayama SM, Koch VH, Furusawa EA, Leone C, Kim CA. Renal and urinary findings in 20 patients with Williams-Beuren syndrome diagnosed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004; 59(5): 266-72.

Subramanian S, Mishra RK, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol* 2003; 4: R13.

Tam E, Young EJ, Morris CA, Marshall CR, Loo W, Scherer SW, Mervis CB, Osborne LR. The common inversion of the Williams-Beuren syndrome region at 7q11.23 does not cause clinical symptoms. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(14): 1797-806.

Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, Hurst J, Reardon W, Burch M, Read AP. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(7): 1029-36.

Tassabehji M, Metcalfe K, Fergusson WD, Carette MJ, Dore JK, Donnai D, Read AP, Pröschel C, Gutowski NJ, Mao X, Sheer D. LIM-kinase deleted in Williams syndrome. *Nat Genet.* 1996; 13(3): 272-3.

Tassabehji M, Metcalfe K, Karmiloff-Smith A, Carette MJ, Grant J, Dennis N, Reardon W, Splitt M, Read AP, Donnai D. Williams syndrome: use of chromosomal microdeletions as a tool to dissect cognitive and physical phenotypes. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(1): 118-25.

Thomas NS, Durkie M, Potts G, Sandford R, Van Zyl B, Youings S, Dennis NR, Jacobs PA. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14(7): 831-7.

Torniero C, Dalla Bernardina B, Novara F, Cerini R, Bonaglia C, Pramparo T, Ciccone R, Guerrini R, Zuffardi O. Dysmorphic features, simplified gyral pattern and 7q11.23 duplication reciprocal to the Williams-Beuren deletion. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16(8): 880-7.

Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet.* 2008; 40(1): 90-5.

Udwin O. A survey of adults with Williams syndrome and idiopathic infantile hypercalcaemia. *Dev Med Child Neurol.* 1990; 32(2): 129-41.

Udwin O, Yule W. A cognitive and behavioural phenotype in Williams syndrome. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1991; 13(2): 232-44.

Urbán Z, Helms C, Fekete G, Csiszár K, Bonnet D, Munnich A, Donis-Keller H, Boyd CD. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet.* 1996; 59(4): 958-62.

Urbán Z, Riazi S, Seidl TL, Katahira J, Smoot LB, Chitayat D, Boyd CD, Hinek A. Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(1): 30-44.

Valero MC, de Luis O, Cruces J, Pérez Jurado LA. Fine-scale comparative mapping of the human 7q11.23 region and the orthologous region on mouse chromosome 5G: the low-copy repeats that flank the Williams-Beuren syndrome deletion arose at breakpoint sites of an evolutionary inversion(s). *Genomics*. 2000; 69(1): 1-13.

Van Borsel J, Curfs LM, Fryns JP. Hyperacusis in Williams syndrome: a sample survey study. *Genet Couns*. 1997; 8(2): 121-6.

Vissers LELM, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Human Molecular Genetics*, 2005; 14(R2): R215–R223.

Wang PP, Bellugi U. Evidence from two genetic syndromes for a dissociation between verbal and visual-spatial short-term memory. *J Clin Exp Neuropsychol*. 1994; 16(2): 317-22.

Wang JY, Frenzel KE, Wen D, Falls DL. Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J Biol Chem*. 1998; 273(32): 20525-34.

Wang MS, Schinzel A, Kotzot D, Balmer D, Casey R, Chodirker BN, Gyftodimou J, Petersen MB, Lopez-Rangel E, Robinson WP. Molecular and clinical correlation study of Williams-Beuren syndrome: No evidence of molecular factors in the deletion region or imprinting affecting clinical outcome. *Am J Med Genet*. 1999; 86(1): 34-43.

Weeber EJ, Levenson JM, Sweatt JD. Molecular genetics of human cognition. *Mol Interv*. 2002; 2(6): 376-91.

Wessel A, Pankau R, Berdau W, Löns P. Aortic stiffness with the Williams-Beuren syndrome. *Pediatr Cardiol*. 1997; 18(3): 244 a.

Wessel A, Motz R, Pankau R, Bürsch JH. Arterial hypertension and blood pressure profile in patients with Williams-Beuren syndrome. *Z Kardiol*. 1997; 86(4): 251-7 b.

Wilke K, Duman B, Horst J. Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR. *Hum Mutat*. 2000;16(5):431-6.
Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB: Supravalvular aortic stenosis. *Circulation*. 1961; 24: 1311-8.

Winter M, Pankau R, Amm M, Gosch A, Wessel A. The spectrum of ocular features in the Williams-Beuren syndrome. *Clin Genet*. 1996; 49(1): 28-31.

Wollack JB, Kaifer M, LaMonte MP, Rothman M. Stroke in Williams syndrome. *Stroke*. 1996; 27(1): 143-6.

Wu YQ, Sutton VR, Nickerson E, Lupski JR, Potocki L, Korenberg JR, Greenberg F, Tassabehji M, Shaffer LG. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am J Med Genet*. 1998; 78(1): 82-9.

Zalzstein E, Moes CA, Musewe NN, Freedom RM. Spectrum of cardiovascular anomalies in Williams-Beuren syndrome. *Pediatr Cardiol*. 1991; 12(4): 219-23.

Referências eletrônicas

NCBI - National Center for Biotechnology Information, disponível em:
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=limk1>

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man, disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&itool=-toolbar;>

UniSTS – Integrating Markers and Maps, disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>

Gene – Genes and mapped phenotypes, disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene;>