Ivanete Chaves Sbruzzi

Estudo de marcadores polimórficos da região 7q11.23 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

Área de Concentração: Pediatria
Orientadora: Dra. Chong Ae Kim

São Paulo
2006

Aos meus queridos pais e irmãos, por todo amor e incentivo que me deram durante essa jornada.

As minhas tias, primas e sogra pelo apoio e em especial pelo auxílio e carinho com meu filho Lucas.

Ao meu esposo e filho pela compreensão
nos momentos ausentes.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e seus familiares que possibilitaram a realização deste estudo.

À Dra Chong Ae Kim pela confiança em mim depositada, motivação e disponibilidade durante a orientação, sempre com sutileza em compreender meus anseios e reverte-los da melhor forma possível para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger pela viabilização do estudo molecular em seu laboratório.

Ao Dr. Alexandre Pereira pela paciência e auxílio no estudo molecular.

A Presidente da Sociedade Brasileira da Síndrome de Williams – Jô Nunes, pela solicitude.

Ao Prof. Dr Cláudio Leone e ao Dr. Ulysses Dória Filho pelo auxílio na realização da análise estatística.

A Beatriz Vasconcelos pela amizade sincera, ajuda carinho e paciência em todos os momentos, o que foi determinante para a conclusão deste trabalho.

As amigas Agnes e Layra pelo apoio incondicional.

As médicas do grupo de genética do ICr pelos esclarecimentos prestados quanto aos termos médicos.

As biólogas Glória e Noely do laboratório de Biologia Molecular do Incor, pelo auxílio técnico meticuloso e também aos demais colegas Elena, Érica, Fernanda, Maúde, Arruda e Janilton.

A Sra. Mariza K.U. Yoshikawa e as demais funcionárias da da Biblioteca do ICr pela cortesia e colaboração quanto as referências bibliográficas.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca eDocumentação. Guia de apredentação 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. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1

1.1. Considerações históricas.....2

1.2. Incidência.....3

1.3. Aspectos clínicos.....3

1.4. Sistema de Pontuação para o diagnóstico da SWB.....13

1.5. Aspectos Genéticos.....14

1.5.1 Aspectos cromossômicos.....15

1.5.2 Aspectos moleculares.....17

1.6. Investigação da origem parental.....28

2. OBJETIVOS.....29

3. MÉTODOS.....31

3.1. Casuística.....32

3.2. Estudo Molecular…….....……32

3.3. Análise estatística.....37

4. RESULTADOS.....38

4.1. Aspectos Clínicos da Casuística.....39

4.2. Marcadores Polimórficos.....45

4.2.1 Informatividade dos Marcadores Polimórficos.....45

4.2.2 Não Informativos.....47

4.3. Origem parental da microdeleção.....48

4.4 Achados clínicos dos pacientes com e sem a

microdeleção.....48

5. DISCUSSÃO.....50

5.1 Aspectos clínicos.....51

5.2 Marcadores polimórficos.....60

5.2.1 Pacientes sem diagnóstico confirmado pelos marcadores polimórficos.....62

5.2.2 Origem parental da microdeleção.....63

6. CONCLUSÕES.....65

7. ANEXO.....67

8. REFERÊNCIAS.....71

RESUMO

Sbruzzi, IC**.** Estudo de marcadores polimórficos da região 7q11.23 para o diagnóstico da Síndrome de Williams-Beuren [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2006. 83p.

INTRODUÇÃO: A Síndrome de Williams-Beuren (SWB) resulta de uma deleção de aproximadamente 1.5 Mb na região 7q11.23. A haploinsuficiência ocasiona alterações do desenvolvimento neurológico assim como malformações em múltiplos sistemas.OBJETIVOS: Testar utilidade de marcadores polimórficos para o diagnóstico da síndrome, determinar a proporção de pacientes com microdeleção, comparar características clínicas entre pacientes com e sem microdeleção e investigar origem parental. MÉTODOS: Selecionamos 32 pacientes com avaliação clínica para SWB atendidas no ICr. Critérios de inclusão: presença de dismorfismo craniofacial acompanhado ou não de alterações cardiovasculares, comportamento característico ou hiperacusia. Para a genotipagem do trio - afetado, mãe e pai, utilizamos os marcadores D7S1870, Eln 17/éxon18 e Hei. Análise em gel de poliacrilamida à 7% com imagens digitalizadas. RESULTADOS: Os marcadores D7S1870, Hei e Eln17/éxon18 foram 78% informativos e 22% não informativos. O marcador mais informativo foi o D7S1870 69%, seguido do Hei 55% e ELN 17/éxon18 em 43%. Houve microdeleção em 56% e ausência em 22%. A origem parental da deleção foi 9 materna e 8 paterna. As alterações craniofaciais e cardiovasculares não tiveram diferenças estatisticamente significantes entre portadores e não portadores da microdeleção. O comportamento amigável resultou numa diferença estatística muito significante (p=0,006) onde 88% tinham e 28% não tinham microdeleção. A hiperacusia teve diferença estatística significante (p=0,020) presente em 55% dos pacientes com microdeleção. CONCLUSÃO: Os dados obtidos demonstraram que os marcadores utilizados são úteis no diagnóstico da SWB e acessível para utilização em serviço público.

Descritores: 1.SÍNDROME DE WILLIAMS/genética 2. SÍNDROME DE WILLIAMS/etiologia 3.ELASTINA/genética 4. ELASTINA/deficiência 5. REPETIÇÃO DE MICROSSATÉLITES 6.MARCADORES GENÉTICOS

SUMMARY

Sbruzzi, IC. Williams-Beuren syndrome: molecular diagnoses using polimorphic markers to 7q11.23 region. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;83p

INTRODUCTION: Williams-Beuren syndrome (WBS) results of ~1.5 Mb commonly deleted region chromosome 7q11.23 in 90-95% of all clinically typical cases. The clinical manifestations can be variable and is a developmental disorder with multisystem manifestations caused by haploinsufficiency for contiguous genes in this region. OBJECTIVE: Polimorphic markers were tested to determine the proportion of patients with and without microdeletion, to compare the clinical features and to establish the parental origin of the deletion. METHODS: 32 probands with WBS ascertained according to well-established diagnostic criteria. Genotyping using polimorphic markers D7S1870, Eln 17/éxon18 and Hei was performed on DNA from the patients and their available parents. RESULTS: The three markers were informative in 78% and non informative in 22%. The best marker was D7S1870 with 69%, followed by Hei in 55% and ELN 17/éxon18 in 43%.The microdeletion was present in 56% and absent in 22%. Craniofacial and cardiovascular alterations did not have significant statistical differences between probands with or without microdeletion. Two following characteristics (friendly personality and hyperacusia) were more frequent in the deleted group and these differences were statistical significant (p=0,006 and 0,02 respectively). CONCLUSIONS: Polimorphic markers used here demonstrated its viability and utility for the confirmation diagnosis of SWB in a public service.

Descriptors: 1. WILLIAMS SYNDROME/genetics. 2. WILLIAMS SYNDROME/etiology. 3. ELASTIN/genetics. 4. ELASTIN/deficiency. 5- MICROSATELLITE REPEATS 6.GENETIC MARKERS.

INTRODUÇÃO

1- Introdução

1.1 Considerações históricas

Williams et al.,1961 na Nova Zelândia, descreveram quatro pacientes com características peculiares, que não pertenciam a nenhuma das síndromes até então descritas. Esses pacientes apresentavam estenose supravalvar da aorta (EASV) associada à fácies peculiar e deficiência mental (DM). Posteriormente Beuren et al., 1962 na Alemanha, descreveram também quatro pacientes com estenose da artéria pulmonar, fácies típico, anomalias dentárias, estrabismo e comportamento amigável muito semelhante ao descrito por Williams et al., em 1961.

Esse conjunto de alterações clínicas citadas por Williams e Beuren, eram atribuídas anteriormente por diversos pesquisadores a hipercalcemia idiopática na lactância (HIL), inclusive Fanconi et al.,1952, já haviam publicado casos de pacientes com essas características atribuindo a HIL.

Atualmente essas alterações são conferidas a síndrome de Williams-Beuren (SWB), caracterizada pelo fácies típico, retardo mental com padrão de comportamento característico, anomalias cardiovasculares congênitas, hipercalcemia infantil, hipertensão arterial e acometimento de outros tecidos e órgãos, como rins, olhos, aparelho digestivo e sistema músculo-esquelético.

1.2. Incidência

A incidência da SWB é estimada entre 1:14.000 a 1:25.000 nascidos vivos, sendo que não há preferência por sexo, cor ou região geográfica (Bayés et al., 2003; Sugayama, 2001).

Na maioria dos casos a ocorrência é esporádica; pois os genitores são normais, embora raros casos familiais tenham sido descritos na literatura (Morris et al., 1993).

1.3. Aspectos clínicos

1.3.1 Achados craniofaciais

A aparência facial é distinta nesta síndrome, geralmente apresenta microcefalia, fronte alargada, nariz curto e arrebitado, narinas antevertidas, ponte nasal baixa, filtro nasal longo, hipoplasia malar, micrognatia, bochechas proeminentes, lábios espessos, má oclusão dentária, dentes pequenos e espaçados, edema supra-orbitário, estrabismo, erros de refração e padrão de íris estrelada (Õunap, et al.,1998; Donnai et al., 2000).

1.3.2 Achados oculares

O padrão de íris estrelado incide em 69-74% dos casos (Jones, Smith, 1975; Greenberg, Lewis, 1988), sendo a hipermetropia o erro de refração

mais comum e que normalmente é necessário o uso de lentes corretivas. O estrabismo é comum em 50% dos portadores desta síndrome (Donnai et al., 2000).

Os vasos retinianos podem exibir tortuosidades, sendo um achado ocular freqüente, no trabalho de Sugayama, 2001, 8/19 (42%) dos pacientes com SWB apresentaram esta alteração e 16/19 (84%) apresentaram opacificações puntiformes do cristalino.

1.3.3 Achados cardiovasculares

Alterações cardiovasculares são detectadas em aproximadamente 65% a 80% dos pacientes e o defeito mais comum observado é a estenose supravalvar da aorta–EASV, contudo, outras estenoses vasculares também são responsáveis pela elevação da morbidade e mortalidade, podendo observar-se morte súbita nos casos de obstrução do fluxo biventricular ou de estenose da artéria coronária, por isquemia miocárdica. Entretanto 21% a 26% dos pacientes com SWB não apresentam doença cardiovascular (Dridi et al., 1999, Wang et al., 1999b; Sadler et al., 2001.

Além das alterações cardíacas, a hipertensão arterial é um sintoma comum nos grupos afetados e deve ser considerada muito mais como manifestação de uma arteriopatia generalizada propriamente dita, do que uma hipoperfusão renal (Rose et al., 2001).

1.3.4 Achados gastrintestinais

Sintomas gastrintestinais estão presentes em todas as idades, como problemas recorrentes na infância, de vômitos por refluxo gastro esofágico, constipação intestinal e prolapso retal. Já na adolescência e na vida adulta, a úlcera péptica foi um achado mais freqüentemente observado (Morris et al., 1988).

1.3.5 Achados renais e urinários

Conforme revisão bibliográfica, os portadores da SWB apresentaram uma média de 18% de anomalias renais entre estruturais e funcionais (Borg et al.,1995; Kotzot et al.,1995; Brewer et al., 1996., Elçioglu et al., 1998; Sugayama,2001).

As seguintes alterações já foram relatadas:

a) estruturais – hipoplasia da aorta torácica, agenesia ou hipoplasia renal, estenose da artéria renal e estreitamento da aorta suprarenal, ectopia, rim em ferradura, hidronefrose e duplicidade pielocalicial;

b) funcionais: proteinúria, refluxo vesico-ureteral e disfunções vesicais (Pober et al., 1993; Rose et al., 2001).

A nefrocalcinose, também descrita nos portadores dessa síndrome, não foi relatada em afetados com níveis normais de calcemia (Coté et al.,1989).

Na idade adulta muitos apresentam uma bexiga urinária espessa e pouco elástica resultando numa sintomatologia miccional (Antonell et al.,2006).

Sammour em 2003, estudou distúrbios miccionais dos 28 pacientes com SWB encaminhados do ambulatório de Genética do Instituto da Criança (ICr). Os exames urodinâmicos estavam alterados na maioria dos pacientes (83%) e correlacionados aos sintomas do aumento da freqüência miccional e perdas urinárias diurnas e noturnas. Quanto às anormalidades estruturais do aparelho urinário estavam presentes em 16/28 (57%) dos pacientes, sendo os divertículos vesicais, o achado mais comum.

1.3.6 Achados músculo-esqueléticos

A presença de hérnias é comum ao nascimento, principalmente inguinais tornando-se necessário à intervenção cirúrgica já no primeiro ano de vida. Problemas ortopédicos são relativamente comuns, observando-se cifose, lordose, escoliose, contratura articulares e sinostose radio-ulnar. (Pankau et al., 2001; Donnai et al., 2000; Õunap et al.,1998). Pode haver uma hiper-elasticidade articular associada a uma discreta hipotonia de origem parcialmente miopática e em alguns casos ocorrem contracturas articulares, e curvaturas espinhais importantes (Antonell et al.,2006).

1.3.7 Alterações do crescimento e puberdade

O peso e estatura ao nascimento, em geral, estão abaixo da média e a hipotonia é um dado freqüente. O crescimento pós-natal é lento, principalmente na primeira infância e durante a puberdade (Antonell et al.,2006). Alguns autores consideram a deficiência de crescimento como o maior critério diagnóstico para esta síndrome, embora o crescimento não tenha sido sistematicamente analisado num número satisfatório de pacientes. Partsch et al., 1999 estudaram sobre crescimento nos portadores da SWB e a média encontrada no homem adulto foi de 165.2 +/- 10.9cm e 152.4 +/- 5.7cm nas mulheres, também relataram que a obesidade pode surgir na vida adulta.

Há relatos da ocorrência de uma puberdade precoce, embora a patogênese idiopática central ainda não seja muito conhecida. Tudo indica que fatores genéticos estão envolvidos, podendo também resultar na redução do tempo de vida do portador da SWB.

1.3. 8 Hipercalcemia

A hipercalcemia transitória pode ser reconhecida precocemente nos primeiros anos de vida dos pacientes com SWB em apenas na minoria dos casos, pela dificuldade desses portadores serem diagnosticados por exames laboratoriais durante esse período transitório.

Durante esse período os sintomas observados são vômitos, irritabilidade e constipação, com pico de hipercalcemia entre os cinco e oito meses de idade, tendendo a desaparecer no primeiro ano de vida. Um manejo dietético adequado evitando a administração de preparações contendo vitamina D, costuma ser eficaz (Donnai et al., 2000).

Embora a hipercalcemia seja uma patologia comum na infância, Cherniske et al., 2004 realizaram um estudo em 20 indivíduos adultos com idade acima de 30 anos portadores da SWB, relataram um paciente com hipercalcemia, demonstrando desta forma, que este sintoma não é restrito da infância.

1.3.9 Achados neurológicos

Estudos com neuroimagens são amplamente utilizados para tentar elucidar a compreensão do perfil cognitivo dos portadores da síndrome. Na SWB o cérebro é significantemente menor devido à diminuição da massa branca subcortical com aumento das pregas corticais e uma redução do volume da massa cinzenta nos sulcos parieto-occiptal. Esses achados neurológicos parecem ser responsáveis pelo déficit visuo-espacial nos portadores. O cerebelo é alargado comparado ao pequeno cerebelo, mas a estrutura límbica do lobo temporal incluindo a amigdala e girus Heschl´s no córtex auditório primário são preservados (Toga et al.,2006).

A função cerebral é modular com a existência de um funcionamento independente, naturalmente conhecido por módulos específicos, e suporta a

teoria que o aspecto cognitivo dos portadores da SWB, seja decorrente deste padrão fracionado. Outros estudos sugerem um modelo de desenvolvimento que ocorra normalmente desde as fases iniciais da vida e vá se especializando, porém algumas regiões permaneçam intactas. Isto sugere que por apresentarem uma trajetória diferente no desenvolvimento cerebral, os portadores da SWB apresentem uma melhor expressão da linguagem quando comparado a outras síndromes (Tassabejhi et al, 2003; Boddaert et al.,2005).

O atraso do desenvolvimento neuropsicomotor torna-se evidente no primeiro ano de vida. A deficiência mental (DM) é classificada entre leve a moderada, cujo coeficiente de inteligência varia de 51 a 70, resultando em maior dificuldade quanto ao: raciocínio lógico, resolução de problemas, aspectos cognitivos e aritméticos (Tassabejhi et al, 2003).

A habilidade motora mostra-se insatisfatória e a percepção visuo-espacial diminuída, provavelmente, pelo desenvolvimento anormal do córtex occipitoparietal (Wu et al., 1998, Bellugi et al., 1999; Donnai et al., 2000; Atkinson et al., 2001). Esse déficit visuo-espacial descrito nos paciente com SWB pode estar relacionado às anormalidades neuronais e a função visuo-espacial envolva principalmente o hemisfério direito enquanto o esquerdo envolva o reconhecimento visual de objetos (Tassabejhi et al, 2003).

1.3.9.1 - Comportamento característico

Durante o desenvolvimento das crianças com SWB são observadas características comportamentais e cognitivas complexas. A expressão facial, a linguagem, sociabilidade e sua interação com a música são bastante singulares. Apresentam hiperacusia, atraso motor, de linguagem e de cognição, principalmente na capacidade visuo-espacial, porém sua habilidade no relacionamento e comunicação é extremamente preservada (Jones, Smith,1975; Pankau et al.,2001; Tassabehji et al., 2003).

Esses portadores freqüentemente sofrem de ansiedade com diversos tipos de obsessões, angústias, medos e também são hiperativos, resultando numa freqüência muito maior de problemas emocionais do que os indivíduos normais (Blomberg et al., 2005).

Apesar de todas essas alterações a hipersociabilidade caracteriza o comportamento típico na maioria dos portadores da SWB, que embora sejam amigáveis na maioria dos casos, podem apresentar episódios de agressividade dependendo do nível da deficiência mental (DM).

Esse conjunto de características comportamentais, em alguns casos, necessita de uma intervenção psicoterapêutica e farmacológica para melhorar a qualidade de vida do portador e no âmbito familiar (Antonell et al.,2006).

Dykens et al., 2003 estudaram o medo num grupo de 120 portadores da SWB e concluíram que 35% apresentavam critérios para um diagnóstico específico de fobias em comparação a 1-2% no grupo com retardo mental de

causas heterogêneas. Neste estudo também foi concluído que esses medos aumentam com a idade e são mais freqüentes nos indivíduos do sexo feminino.

1.3.10 – Hiperacusia

Uma característica importante na SWB é a hiperacusia, essa hipersensibilidade aos sons que alguns pacientes manifestam e que vem acompanhada a uma forte atração pela música. Algumas pesquisas vem sendo realizadas relacionando esta característica com outros aspectos comportamentais da SWB.

Dykens et al., 2005 relataram a importância em explorar possíveis conexões entre as diferentes características dos pacientes com SWB (ansiedade, obsessões, angústias, medos e hiperatividade). Uma das hipóteses proposta neste trabalho é que a ansiedade e o medo, especialmente o medo relacionado a barulhos, possa estar associado com a alta prevalência de hiperacusia nos portadores da SWB; outra hipótese seria trabalhar com a musicalidade; que é um aspecto aflorado nesses pacientes, como um fator protetor e preventivo da ansiedade.

Conforme Anari et al.,1999 há dois tipos de hiperacusia: sensibilidade ao som ou a barulhos com volumes altos/fortes ou apenas a sons e barulhos específicos sem relação ao volume ser elevado/forte.

Os portadores da SWB que apresentam hiperacusia normalmente têm uma resposta emocional (atração ou aversão) intensificada e imediata a

determinados sons. Sabe-se que há uma conexão entre a sensibilidade aos sons com os diversos tipos de desordens psiquiátricas. Estudos neuroanatômico, estrutural e funcional demonstram diferenças significativas no processamento neuronal para músicas e barulhos, com ativação reduzida em regiões que amparam o processamento desses sons (lobo temporal) e com aumento da ativação do cerebelo e amigdala resultando na hipersensibilidade aos sons característico nos portadores. Pesquisas relatam que o processamento dos sons no cérebro de portadores de SWB ocorrem por um sistema neural diferente, o qual poderia explicar sua reação atípica ao som (Tassabehji et al.,2003).

Cerca de 85% a 95% dos portadores da SWB apresentam uma hipersensibilidade a determinados sons, que tende a melhorar com a idade, contudo, a audiometria costuma ser normal. A hiperacusia é um fenômeno que não esta associada a nenhum dano do ouvido interno, mas a ocorrência de otite média na infância é freqüente. Na população normal, é um evento raro, mas nos portadores da síndrome está quase sempre presente (Donnai et al., 2000; Borsel et al 1997).

Klein et al., 1990 realizaram um estudo da hiperacusia quanto à prevalência, a natureza e correlação com a otite média. Neste estudo um grupo de 65 portadores da SWB entre 1 e 28 anos de idade nos Estados Unidos, obteve uma prevalência de 95% de hiperacusia e 61% otites média.

1.4- Sistema de pontuação para o diagnóstico da SWB

O primeiro sistema de pontuação descrito na literatura para SWB, foi elaborado por Preus em 1984, que reuniu 50 características clínicas, entre elas análises dermatoglificas (Mari et al.,1995).

Um outro sistema de pontuação foi proposto por Lowery et al.,1995 que estudavam 110 afetados pela SWB com diagnóstico confirmado pelo método de *hibridização in situ por fluorescência* (FISH) e 4 casos sem a deleção (Tabela 1). Das características fenotípicas analisadas na casuística, considera-se SWB quando tiver um resultado maior ou igual a quatro podendo atingir até 10 pontos. Os casos duvidosos para SWB, são aqueles que estão entre zero a três pontos.

Os resultados quanto ao fácies típico, esteve presente em 100%, atraso de DNPM e retardo mental 88%, EASV 48%, cardiopatia que não a EASV 51%, hérnia inguinal 33% , e hipercalcemia 18%. Nos pacientes que não apresentavam a microdeleção 4 apresentavam fácies típico, 3 com atraso de DNPM e retardo mental, 3 com cardiopatia que não a EASV, 1 com hérnia inguinal e 2 com hipercalcemia.

Tabela 1 – Sistema de pontuação de Lowery et al 1995

Características Fenotípicas	Pontos
Fácies típico	3
Atraso DNPM/ retardo mental	1
EASV	2
Cardiopatia (que não EASV)	1
Hérnia Inguinal	1
Hipercalcemia	2
Total	10

O comitê de genética da Academia Americana de Pediatria elaborou uma pontuação para crianças com SWB, onde atribuíam 1 ponto para cada uma das 7 características clínico-laboratoriais; entre elas, dismorfismos craniofaciais, EASV, outros problemas cardíacos, crescimento, comportamento, alteração do tecido conjuntivo e hipercalcemia.

A obtenção de uma pontuação inferior a 3 é pouco provável de ser SWB, quando maior que 3 seria indicativo de realizar FISH (AAP, 2002).

1.5- Aspectos Genéticos

Na maioria dos casos 99%, a ocorrência é esporádica ocasionada por mutações novas, classificadas como deleções *de novo* na região 7q11.23 e o risco de recorrência é menor que 5%.

Em raros casos familiais o padrão de herança estabelecido foi o autossômico dominante com expressividade variável, correspondendo a um risco de recorrência de 50%. A primeira descrição clinicamente confirmada por este padrão de herança, foi realizada por Morris et al.,1993 que descreveram três famílias. Um caso o filho herdou a síndrome de seu pai e os outros dois casos a síndrome foi passada da mãe para as filhas. Vários estudos posteriores mostraram que deleções herdadas de cromossomos maternos e paternos ocorrem com igual freqüência não havendo relação com a idade dos genitores (Sadler et al., 1993, Franke et al., 1999; Peoples et al, 2000; Kirchoff et al., 2001; Sugayama 2001; Bayés et al.,2003; Hamoshi et al., 2005).

1.5.1 - Aspectos cromossômicos

A análise cromossômica realizada pela citogenética clássica com o bandamento G (Giemsa) é uma ferramenta muito útil para pesquisas de alterações que possam envolver os cromossomos, porém o nível de resolução desta técnica, é de 400 - 500 bandas conseguindo visualizar deleções da ordem de 5 -10 Mb. Com o uso de técnicas de cultura para pesquisar as células na prómetafase a resolução aumenta para 650 - 850 bandas chegando a visualizar deleções entre 2 - 5 Mb.

No caso da SWB, a microdeleção na região 7q11.23 está abaixo de 2Mb, portanto esta microdeleção não pode ser detectada pelo bandamento G e nem pelo bandamento de alta resolução, pois segundo Shaffer, 1995, a microdeleção é definida como uma deleção de tamanho igual ou inferior ao nível de resolução do microscópio óptico de luz, sendo necessário a utilização de métodos moleculares.

Alterações cromossômicas, ainda que não relacionadas com a causa da SWB, já foram relatadas na literatura em pacientes que apresentavam o fenótipo desta síndrome. Assim Menko e Stouthart (1992) relataram um caso com translocação envolvendo os cromossomos 13 e 18 e Jefferson et al.,1986 descreveram a ocorrência de uma deleção terminal do braço longo do cromossomo 4, em uma menina com suspeita da SWB, cujo cariótipo de seus pais mostrou-se normal tratando-se, portanto, de um evento *de novo*.

Tupler et al.,1992, também descreveram a presença de um rearranjo cromossômico *de novo* em uma menina com dismorfismos craniofaciais

bastante sugestivos de SWB, deficiência mental grave e tetralogia de Fallot. O cariótipo desta paciente apresentou 4 cromossomos derivativos (1,2,4 e 11) e monossomia da região 4q33-q35.1.

A SWB por ser uma doença vascular progressiva com comprometimento progressivo renal e demais órgãos como SNC, coração e pulmão deve ser diagnosticada o mais cedo possível, resultando desta forma em indicações e intervenções cirúrgicas; quando necessário, objetivando melhora na qualidade de vida destes pacientes.

Embora os portadores da SWB apresentem um perfil fenotípico bastante característico, o diagnóstico de certeza só é possível com a realização de testes moleculares apropriados (Meng et al., 1998a; Calamandrei et al., 2000; Peoples et al., 2000; Sadler et al., 2001). Pois as microdeleções são detectadas apenas por métodos moleculares com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) ou na hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) (Shaffer, 1995). Em torno de 2 a 10% dos casos de pacientes com fenótipo característico para SWB podem não apresentar a microdeleção no lócus do gene da elastina tanto pelos métodos de FISH quanto pelos demais métodos moleculares (Kotzot et al.,1995).

- **Citogenética molecular - FISH**

Com os avanços tecnológicos e moleculares a partir da década de 80, a citogenética clássica ampliou sua capacidade de resolução com para diagnósticos como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) capaz

detectar deleções inferiores a 5Mb. Na SWB o FISH é considerado o método de certeza para o diagnóstico, entretanto, apresenta um custo muito elevado assim como a necessidade de profissionais devidamente treinados para trabalhar com cultura celular e leitura de lâminas em citogenética o que dificulta sua utilização na rotina laboratorial em hospitais públicos.

Para a realização da técnica de FISH, a obtenção de uma metáfase (ou núcleo interfásico) de boa qualidade em lâmina faz-se necessário. Nesta lâmina o DNA será desnaturado e em seguida ocorrerá a hibridação com a sonda, que contém a seqüência de DNA do gene da elastina marcado com fluorocromo. Este se ligará especificamente a região cromossômica de interesse demonstrando a presença ou ausência da microdeleção. A análise será em microscópio próprio para leitura de amostras com material fluorescente.

Sugayama em 2001, testou FISH em 20 pacientes da unidade de Genética do ICr e obteve 17(85%) com microdeleção, resultado semelhante aos outros autores Borg et al (1995) e Elçioglu et al. (1998).

1.5.2 Aspectos Moleculares

A microdeleção na região 7q11.23 responsável pela SWB, apresenta um tamanho que pode variar de 1 a 2 megabases (Mb) envolvendo mais de 20 genes, sendo considerada portanto uma síndrome de genes contíguos

(Tabela 2) (Botta et al., 1999; Bayés et al., 2003, Hamoshi et al., 2005, Heller et al., 2005).

Um dos genes envolvidos é a elastina e sua haploinsuficiência pode ser responsável pelas características faciais e problemas cardiovasculares nos portadores da SWB (Baumer et al*.,* 1998).

Fazio et al.,1991 estudando a elastina determinaram sua localização no braço longo do cromossomo 7. Devido ao fato dos portadores da SWB apresentarem várias alterações que implicam o funcionamento da elastina, como: timbre de voz, problemas cardiovasculares como EAP e EASV, há muitos estudos em busca de uma correlação genótipo/fenótipo.

Portadores da SWB podem apresentar disrupções, deleções ou mutações na elastina ocasionando um defeito vascular da estenose supravalvar da aorta (EASV). Esta estenose vascular também pode ocorrer em outras localizações da aorta: torácica e abdominal, renais, coronárias, assim como nas artérias cerebrais (Lu et al.,1998; Soper et al.,1995; Zalstein et al., 1991; Osborne et al., 1996).

Com exceção da patologia vascular resultante da hemizigosidade do gene da elastina (ELN) e possivelmente dos divertículos intestinais e na vesícula, as demais características e outros problemas no tecido conectivo da SWB ainda não são atribuídos a genes específicos (Botta et al., 1999; Cairo et al.,2001; Donnai et al., 2000; Peoples et al*.*, 2000).

O gene LIM-Kinase 1 (LIMK1) é um outro gene envolvido na microdeleção, e é altamente expresso e essencial no desenvolvimento do cérebro. Alguns pesquisadores acreditam que sua ausência seja

responsável pela diminuição da integração visuo-espacial e pelo perfil cognitivo característico da SWB, no entanto, outros autores discordam desses dados (Botta et al.,1999; Wang et al.,199; Peoples et al., 2000; Doll et al., 2001, Somerville et al*.,* 2005). A identificação do LIMK2 exibe um padrão de expressão diferente do LIMK1, sugerindo que nesta subfamília de proteína kinase, cada membro tenha uma função específica e distinta tanto celular quanto tecidual.

Demais genes envolvidos na região 7q11.23, constam na tabela 3:

Tabela 3 - Genes deletados na SWB,com o produto protéico e a possível função.

Gene	Produto proteico	Possível função
NOL1R/WBSCR20	NOL 1 related	Homologia com a proteína nuclear proliferadora P120
TRIM50/WBSCR23	Tripartite motif protein 50	Fosfoproteína nuclear com dedos de zinco Implicada em ubicuitinização
FKBP6	FK-506 ligação com proteína 6	Membro da família das imunofilinas. Pode ter um papel na fertilidade masculina e pareamento dos cromossomos homólogos na meiose
FZD9	Frizzled 9	proteína atua como receptor para *Wnt* sinalização de proteínas, pode estar envolvida na polaridade tecidual e desenvolvimento
BAZ1B/WBSCR9/ WSTF	Drosophila Acf 1 homologa	pode ser um fator ativador transcricional
BCL7B	B-celllimfoma 7B	Autoantígeno relacionado com IgE e em dermatites atópicas

Tabela 3: continuação

TBL2/WS-ß TRP	Tranducina ß-like 2	Membro da família da ß-tranducinas, função desconhecida Pode ter um papel no sinal de transdução
WBSCR14/WS-bHLH	Proteína básica helix-loop-helix,se une ao elemento da resposta a carboidratos	Repressor transcricional que interage com o Mix, pode ter um papel na proliferação e ou diferenciação celular
WBSCR24	Proteína anteriormente citada	Homologia com a proteína *modifier rudmentary* (Mod(c))(*Drosophila melonogaster*
WBSCR18	proteína que apresenta um domínio DNAJ que envolve uma proteína truncada	União de proteínas por choque térmico - estrutura tridimensional
WBSCR22	Possível metiltransferases	Metiltransferase HUSSY-03. Pode estar envovido na metilação do DNA
STX1A	Syntaxin 1A	Proteína de membrana pré-sináptica, com transporte intracelular e liberação de neurotransmissores
WBSCR21	Abhydrolase domain contendo 11 isoformas 5	Actividad hidrolase
CLDN3 e CLDN4	Membros da família Claudin. Receptores de enteroxinas do *Clostridium perfringens*	Parte das estruturas que firmam as junções/barreiras paracelulares nos tecidos epiteliais
WBSCR27	Possível metiltransferase	UbiE/COQ5 família da metiltransferase
WBSCR28	Proteína anteriormente citada	Função desconhecida
ELN	elastina	Principal componente das fibras elásticas na matrix extracelular
E1F4H – WBSCR1	Fator de iniciação eucariótica eIF4H	Regulador positivo da iniciação da transdução
WBSCR5/LAB	Linker para ativação das células B isoformas 2	Ativação das células B
RFC2	Subunidade 2 do fator de replicação C	Extensão do DNA durante a replicação
CLYN2	Ligador de proteína - CLIP115 citoplasmática neural	União de estruturas do citoesqueleto através de microtubulos
WBSCR 23	Proteína hipotética LOC80113	Função desconhecida
GTF2IRD1/WBSCR11/GT3	GTF2I-related domain 1	Regulador transcricional, proteína ligadora de enhacer
GTF2I	TFII-I/BAP135/SPIN	Fator iniciador da transcriçãobasal e ativação
NCF1	Fator neutrofilico cistólico 1, p47-phox	Subunidade da oxidase NADPH fagocítica. Atividade antimicrobial
GTF2IRD2	GTF2I relacionado ao domínio 2	Pode ser um fator regulador de transcrição

Tabela modificada (Antonell et al., 2006, Donnai et al., 2000; Tassabejhi et al.,2003).

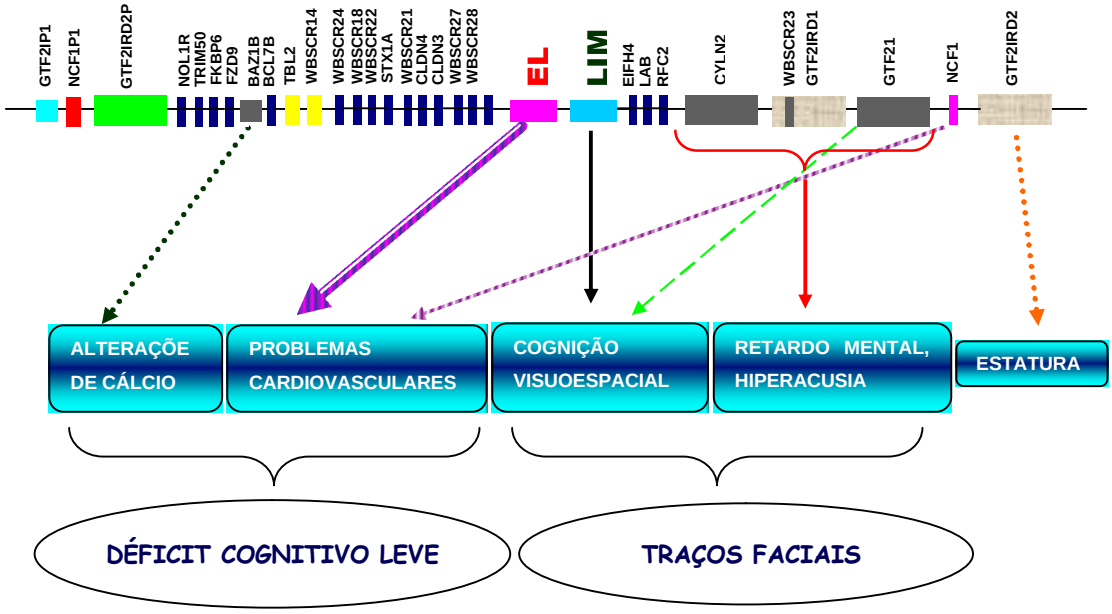


Figura 1- Mapa com os genes da região 7q11.23 que se perdem na deleção causando a síndrome de Williams e a relação das características mais relevantes do fenótipo. As setas contínuas indicam efeitos claramente confirmados, enquanto que as setas descontinuas indicam efeitos prováveis (Antonel et al.,2006).

- **Low copy repeats – LCR**

Rearranjos cromossômicos estruturais como as deleções recorrentes, duplicações e inversões ocorrem principalmente por recombinação não homóloga mediada por pequenas cópias repetidas (LCRs – low copy repeats), enquanto translocações recorrentes que podem causar SWB estão envolvidas em repetições ricas A-T, sítios frágeis e repetições específicas Alu (Portera et al.,2006).

As técnicas de sequenciamento em larga escala da região com todos os genes envolvidos na microdeleção da região 7q11.23, demonstram a

disposição dos LCRs como segmentos duplicados ou pequenas cópias de elementos repetidos (figura 2), dispostos em três amplas regiões específicas diferenciadas, chamadas “A”,”B” e “C” (centromérico, medial e telomérico) que flanqueiam a região comum da deleção (Bayés et al.,2003).

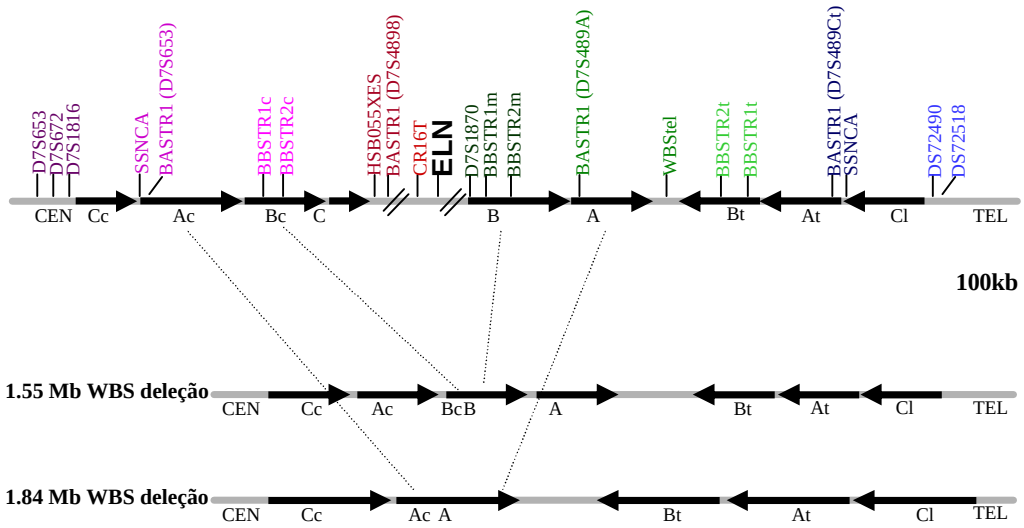


Figura 2: Representação esquemática da região 7q11.23 em um cromossomo normal (N) e cromossomo deletado para SWB. Os blocos A,B e C centromérico (c), medial (m) e telomérico (t). Os LCR são representados em setas pretas que indicam sua orientação relativa. A região de cópia única entre os LCR e externamente a eles estão representados em linhas cinza. O limite da região comum da deleção está entre 1.55-Mb e 1.84-Mb encontrada nos pacientes com SWB e indicadas por linhas pontilhadas (Bayés et al.,2003)

Os blocos de LCRs centroméricos e medial estão na mesma orientação apesar de apresentar uma ordem diferente, enquanto o terceiro segmento duplicado fica mais telomérico, com a mesma ordem que o LCR centromérico mas em orientação oposta. O bloco B contém três genes na posição medial (Bm) (GTF2I [MIM 601674] NCF1 [MIM 233700] e

GTF2IRD2) e o pseudogene putativo centromérico correspondente (Bc) (GTF2IP1, NCF1P1 e GTF2IRd2P1) e o bloco telomérico (Bt) (GTF2IP2, NCF1P2, e GTF2IRD2P2). Essas regiões LCRs pesquisadas quando há deleção para SWB são consideradas como um protótipo de doença genética causada por recombinações anormais entre os homólogos nessas regiões específicas que contribuem para uma instabilidade genômica.

1.5.2.1 Marcadores de microssatélites

Esses marcadores tem sido ferramenta importante no diagnóstico da SWB, pois além de apresentar um custo inferior ao método de FISH, não precisam de citogeneticistas devidamente treinados no preparo de culturas celulares assim como, leitura de lâminas.

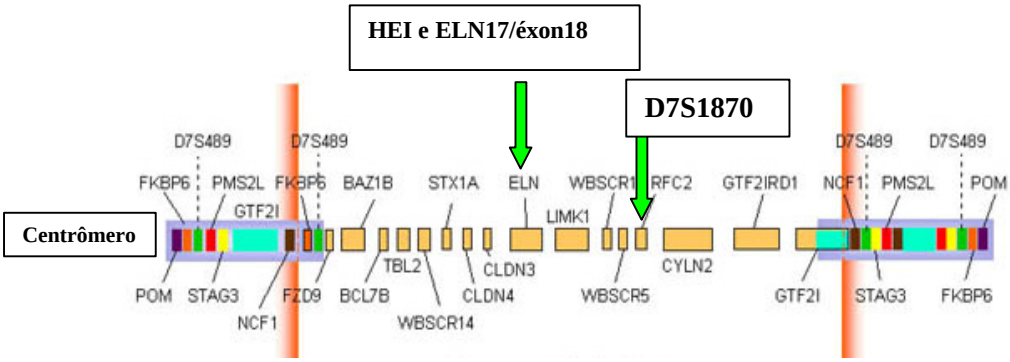
Vários autores (Tabela 4) descreveram o uso de marcadores microssatélites (seqüências curtas em tandem) de DNA para melhor entender o mecanismo da deleção na SWB. Para a utilização desta metodologia, é necessário à inclusão dos pais biológicos do afetado, assim como a escolha de marcadores polimórficos informativos.

Tabela 4 - Marcadores polimórficos mais utilizados

Autor (ano)	Marcadores polimórficos
Somerville et al.,2005	D7S1870, D7S653, D7S672, D7S2476, D7S3194, D7S2455
Bayés et al., 2003	D7S1870, D7S489, D7S653, D7S672, D7S1816, D7S2518
Botta et al., 1999	D7S1870, D7S489B
Montserrat et al.,1999	D7S1870, D7S653, D7S672, D7S489B, D7S2476, D7S489A
Perez-Jurado et al.,1998	D7S1870, D7S489
Urbán et al.,1997	HEI1.3S e Hei1.4A
Urbán et al., 1996	ELNi18, HEI1.3S e Hei1.4A

Baumer et al.(1998) utilizando marcadores altamente informativos, conseguiu demonstrar um crossing over desigual, evidenciando portanto, um rearranjo intersticial entre os cromossomos em 67% dos casos, o que explica, segundo os autores, o número elevado de deleções *de novo* nesta síndrome. Dessa forma, os marcadores polimórficos são capazes de detectar o polimorfismo que segrega juntamente com a região deletada, em uma freqüência expressiva de portadores de SWB.

Os marcadores utilizados no presente trabalho foram: D7S1870, ELN17/éxon18 e HEI, sendo os dois últimos intragênicos da elastina (Figura 3).



Região comum da deleção

Figura 3- Região 7q11.23 comumente deletada na SWB modificada de Antonell et al,2006 e Heller et al.,2005.

1.5.3 O gene da elastina

Dos genes envolvidos na microdeleção 7q11.23, a elastina é muito útil para estudo, pois encontra-se exatamente no meio, entre os dois pontos de quebra.

Ewart et al., 1993 estudando duas famílias com EASV mapearam o cromossomo 7 usando o estudo de ligação sugerindo a elastina como gene candidato. No mesmo ano Morris et al. estudaram uma família na qual a EASV segregava junto com uma translocação equilibrada t(6;7)(p21.2;q11.23) em 4 gerações de afetados. Este estudo mostrou que a EASV é resultado de uma mutação no gene da elastina que está na região 7q11.23, exatamente no meio, entre os dois pontos de quebra da microdeleção. Uma disrupção do gene da elastina (ELN) incapacita as artérias quanto à elasticidade resultando em uma desorganização das fibras elásticas e espessamento do músculo liso causando uma obstrução vascular (Ashkenas 1996; Smoot,1995).

Este gene, com aproximadamente 41.500 pb apresenta uma proporção de íntrons relativamente mais alta quando comparada aos éxons (19/1). Nos íntrons do gene da elastina a porção carboxila apresenta inúmeras seqüências repetitivas Alu - pseudogenes, o que pode ocasionar as mutações nesta região. Estas mutações podem resultar nas alterações vasculares como a EASV que é comum na SWB. Nesta síndrome há deleção de uma cópia completa do gene da elastina, enquanto nos casos não sindrômicos a EASV seja decorrente de mutações de ponto, translocações e deleção total do gene.

Há relatos da ocorrência de 41 mutações de ponto no gene ELN, incluindo splicing do sítio de mutação, frameshift, nonsense e missense, embora os eventos detalhados dessas mutações com a ocorrência da EASV ainda não esteja claramente definida (Rodriguez-Revenga et al., 2005).

A recombinação mediada pela seqüência Alu pode estar associada aos vários polimorfismos existentes neste gene na população humana (Smoot 1995, Robinson et al., 1996).

1.5.3 - 1 Marcadores de microssatélite HEI e ELN17/éxon

Os marcadores HEI e ELN 17/éxon18 são intragênicos da elastina, localizando-se nos íntrons 1 e 17 respectivamente.

1.5.4. Marcador microssatélite D7S1870

É um marcador localizado próximo ao gene da elastina, posicionado no sentido telomérico (Fig 1). A informatividade deste marcador foi de 75% no trabalho de Dussardier et al*.,* 1995 e de 87% no trabalho descrito por Urban et al 1997.

1.5.5 Mecanismos da origem da microdeleção

O mecanismo mutacional típico parece ser decorrente de uma recombinação desigual na meiose. Amplas repetições contendo genes e pseudogenes flanqueiam os pontos de quebras da deleção e acredita-se que a recombinação dos cromossomos homólogos entre essas regiões duplicadas (com amplas repetições altamente conservadas - LCRs) seja a causa provável da elevada incidência das deleções *de novo* observadas na síndrome (Donnai et al., 2000).

A recombinação não alélica na região dos LCRs entre os cromossomos homólogos 7- intercromossomal, representa 2/3 das deleções e a recombinação intracromossomal em 1/3 dos casos (Bayés et al., 2003). A ocorrência desses rearranjos na região 7q11.23 foram relatados por Osborne et al., 2001 em alguns dos genitores que transmitiram a SWB.

Teoricamente a duplicação deveria ocorrer na mesma freqüência da deleção que ocorre por recombinação não homóloga entre os cromossomos 7. Entretanto tal duplicação ainda não foi muito descrita, mesmo tendo havido muitas oportunidades de observar rearranjos em pacientes com SWB

estudados que não apresentavam deleção. Essas duplicações que não foram encontradas nesses pacientes sugerem que o efeito da duplicação do lócus da SWB ou é letal ou não tem conseqüência observável. Os casos que apresentam uma duplicação exata da região 7q11.23 possuem um atraso significativo e expressivo da linguagem, uma característica que normalmente não comum nos portadores da SWB (Somerville et al.,2005).

1.6 - Investigação da origem parental

Conforme a literatura, diversos trabalhos foram realizados no sentido de esclarecer se há uma preferência da ocorrência de deleção materna ou paterna e com isso analisar relação genótipo/ fenótipo quanto às características presentes. Mari et al., 1995 quanto à origem parental da microdeleção, relataram 53% de origem materna e 47% de origem paterna.

Wang et al.,1999 relataram numa casuística de 65 portadores da SWB, que 58% apresentavam uma deleção de origem materna e 42% de origem paterna, sem significância estatística entre a origem da deleção, com apenas uma forte tendência para a deleção materna.

Relatos demonstram a existência de rearranjos genômicos na região 7q11.23 em um dos genitores, o que pode resultar na SWB em seus descendentes. Esses rearranjos analisados pelo método de FISH – interfase revelam aproximadamente que 33% dos genitores são heterozigotos para uma inversão paracêntrica na região envolvida de aproximadamente 1.5 Mb da SWB, ocasionado por um pareamento cromossômico desigual na prófase da meiose I, predispondo a deleção para SWB (Osborne et al.,2001).

2. OBJETIVOS

Testar a utilidade de marcadores polimórficos para a região 7q11.23 no diagnóstico da SWB;

1. Determinar a proporção de pacientes com a microdeleção e investigar a origem parental da microdeleção.
2. Comparar as características clínicas entre os pacientes com microdeleção e sem microdeleção.

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram selecionados 32 pacientes atendidos na Unidade de Genética Clínica do Instituto da Criança (ICr) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Trata-se de um estudo retro e prospectivo e o projeto obteve a aprovação pela Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq sob protocolo de pesquisa nº 1080/02.

O critério de inclusão foi à presença de dismorfismo craniofacial característico de SWB, associado a uma das alterações: cardiovasculares, comportamento característico ou hiperacusia.

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos pelo protocolo (Anexo 1) e a concordância na participação da pesquisa, por pais ou responsáveis pelos afetados foi expressa conforme o termo de consentimento utilizado na unidade de genética do ICr .

3.2 Estudo Molecular

O estudo molecular com a utilização de marcadores de microssatélites para a região 7q11.23 foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto do Coração – InCor, sob a supervisão do Dr Alexandre da Costa Pereira.

3.2.1 Extração do DNA a partir de sangue total (Miller et al.,1988)

Para a extração do DNA genômico, foi coletada uma amostra de sangue periférico (5ml) num tubo com EDTA 5%, tanto dos pacientes como dos genitores, exceto nos cinco casos onde apenas a mãe participou do estudo.

O sangue total foi transferido para um tubo de 15ml, ao qual adicionou-se 6ml de uma solução de lise. O tubo foi agitado (vórtex), colocado na geladeira a 4ºC por 10 minutos para a obtenção da lise das membranas das hemácias e centrifugado a 4ºC por 10 minutos a 3000rpm.O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10ml de solução de lise através de agitação, colocado novamente na geladeira e centrifugado. O sobrenadante foi descartado novamente e ressuspendido com 1,5ml de uma solução tampão, 10ul de SDS 10% e 250ul de uma solução contendo proteinase K para a lise dos núcleos dos leucócitos. As amostras foram deixadas em uma estufa a 37ºC por 12 a 18 horas. No dia seguinte, foi adicionado 500ul de uma solução tampão de NaCl 6M, misturado vigorosamente e centrifugado a 4 ºC por 20 minutos a 3000rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15ml, ao qual adicionou-se um volume de etanol a 100%. O DNA foi assim obtido e transferido para um novo tubo que já continha 1ml de etanol a 70%. A amostra foi centrifugada a 4º C por 15 minutos a 1350 rpm, descartado o sobrenadante o tubo foi deixado à temperatura ambiente para secar bem. O DNA foi então

ressuspendido em 1ml de TE 1X (10mM Tris-HCL pH 8,0 1MM EDTA pH8,0).

3.2.2 Marcadores Polimórficos

Para a genotipagem foram utilizados três marcadores polimórficos diferentes para a região 7q11.23 comumente deletada na SWB (tabela 5).

Tabela 5 - As seqüências dos primers utilizados e o tamanho do produto de amplificação.

Marcador Polimórfico	Primer forward	Primer reverse	Prod.* Ampl.
D7S1870	TTCACTCAGGAAGTGGC	TGGTGATGTGCTTTACTACG	108pb
ELN17/éxon18	ATGAGACGTGGTCAAGGGTAT	GGGATCCCAGGTGCTGCGGTT	122pb
Hei 1.3/1.4	GCCCACATGGGCAGATTGCT	CCCTCATCCACAGACAGGTC	226pb

*Prod. Ampl –produto da amplificação; pb – pares de base

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR continha 1,0µl da amostra de DNA; 1,8µl um tampão com os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP,dCTP, dGTP e DTTP); 0,4µl de cada oligonucleotídeo P_F Forward (12,5 pmol/µl) e Reverse e P_R (12,5 pmol/µl); 0,5µl de DMSO; 5,9µl de água destilada e 0,06µl de enzima Easy taq DNAase (0,3U) apresentando um volume final de 10,0µl.

As reações foram realizadas em um termociclador nas seguintes condições: após a denaturação a 3 minutos por 92ºC, as reações foram submetidas a 30 ciclos de denaturação (3 segundos a 92,0ºC) anelamento

(1 minuto a 55,0ºC*) extensão (30 segundos a 72,0ºC). Após esses 29 ciclos, a reação completou a extensão por 10 minutos a 72ºC.

Conforme o marcador utilizado a temperatura de anelamento se modificava. O marcador D7S1870 a 55,0ºC, Eln17/éxon18 a 56,7ºC e Hei 1.3S e Hei 1.4.A a 53,4ºC.

3.2.4 Gel de agarose

Um gel de agarose a 3% foi utilizado para analisar o produto da amplificação da PCR. A agarose foi diluída em 150ml de TAE (160ml de TAE 50X, diluído em 8L de água deionizada, que após aquecimento adequado, foi adicionado 75ul de brometo de etídio. O TAE 50X consiste de Tris 242g , ácido acético 57,1ml e 100ml de EDTA 0,5 M pH=8,0 para solução de 1L. Após a polimerização do gel, foram aplicadas 5ul do produto da PCR, 5ul de TE 1x e 2ul de Lodding Buffer (glicerol 25%, azul de bromofenol 1%). O marcador de peso molecular utilizado foi de 100pb, diluindo 1ul de 100pb Ladder, 9ul de TE1X e 2ul de Lodding Buffer. Após eletroforese a 100V por aproximadamente 30 minutos, o gel foi colocado no aparelho Eagle eye e imagem processada no mesmo aparelho, para analisar o produto da amplificação.

3.2.5 Gel de poliacrilamida

Os produtos da PCR foram em seguida analisados em gel de poliacrilamida à 7% pois este gel denaturante evidencia fragmentos com diferenças de até dois pares de base, conforme protocolo modificado (Keene et al.,1994).

Para o preparo do gel foi adicionado 8,41g de uréia, 5,0ml de TBE 5X, 8,0 ml de formamida, 6,25ml de Bis-acrilamida, 200ml de APS-10% e 20ml de Temed. Esta solução foi colocada em placas de vidro próprias para cuba vertical para realizar a polimerização. Após o término, as placas foram para a cuba com a solução tampão para realizar uma pré-corrida de 30 minutos. Para o tampão de corrida foram adicionados 160ml de TBE 5X com 640ml de água milliQ, devidamente agitado. A fonte teve o set programado em 3000V, 300mA e 005W. Dos produtos da PCR foram retirados 5,0 µl e adicionados 10,0µl de Stop Buffer. Para o marcador de peso molecular, foi adicionado 1ul 100pb; 4,0ul TE e 10ul de Stop Buffer, Tanto as amostras quanto o marcador foram denaturadas a 100,0ºC por 10 minutos em banho seco. Após esse tempo, permaneceram em gelo até o momento da aplicação. Posteriormente foi realizado uma corrida de 5 horas nas mesmas condições da pré-corrida.

O gel foi retirado das placas e corado por 15 minutos com 1,5µl do corante Syber Gold (Stothard, et al., 1997) diluído em 15ml da solução tampão de corrida. Em seguida o excesso foi retirado e a análise das imagens foi realizada no aparelho Storm System, com o Software Image

Quant. A análise compreendeu numa comparação entre os fragmentos obtidos (pai, propósito, mãe). Esses fragmentos tiveram os diferentes alelos para cada polimorfismo classificados pela numeração 1 em diante conforme o tamanho encontrado.

3.3. Análise estatística

O teste exato de Fisher foi utilizado para a análise das características clinicas dos pacientes com e sem microdeleção. Um valor $p<0,050$ foi considerado estatisticamente significante gerado pelo programa GraphPad Instat.

4 - RESULTADOS

4. 1 - Aspectos clínicos da casuística

Dados Gerais

Dos 32 pacientes (19 eram do sexo masculino e 13 do sexo feminino). Ao primeiro atendimento tinham entre 1 a 16 anos e o diagnóstico clínico foi feito em média aproximadamente os 6 anos e 1 mês.

Dados ao Nascimento

A maioria nasceu a termo, com um peso adequado a idade gestacional, exceto em um caso que o nascimento foi de 34 4/7 semanas apresentando um peso de 1900g (tabela 6). O comprimento normal ao nascimento esteve presente na maioria. Sendo que em apenas seis casos (14,21,22,24,27,29) esteve entre 44 e 46cm .

Achados Clínicos

O fácies típico esteve presente em 100% da amostra, dos quais 16/32 (50%) apresentaram microcefalia.

A baixa estatura comum nos portadores da SWB foi diagnosticada em 23/32 (72%) dos pacientes.

Em nossa casuística a EASV ocorreu 22/32 (69%), seguida das outras alterações como a EAP, degeneração mixomatosa, coarctação da aorta, infiltração de Ca+ do endocárdio, CIA e EP, hipoplasia discreta da aorta descendente, sopro cardíaco e hipertensão arterial. Essas outras alterações na maioria vezes ocorreram concomitamente atingindo 21/32 (65%) da casuística.

Todos os casos apresentaram atraso de DNPM, embora somente 12/32 (37%) dos casos tenham relatado hipotonia ao nascimento.

O comportamento amigável, característico da SWB esteve presente em 25/32 (78%) da casuística. Em apenas dois casos, relatado pelas mães, o comportamento amigável eram acompanhados de curtos episódios de agitação e agressividade.

A hiperacusia esteve presente em 15/32 (47%) conforme o relato materno, pois não foi possível realizar o exame apropriado para o diagnóstico desta sintomatologia.

Tabela 6 – Principais características clínicas dos pacientes

	PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7	8
DADOS GERAIS	RG do HC	5063068D	6047522H	6077534G	5124680E	6034944E	5119631K	6054515F	6048510H
	Idade ao diagnóstico clínico	8a	8m	1a10m	9a7m	2a4m	8a3m	1a6m	1a11m
	Data de nascimento	21/9/86	21/7/93	1/7/97	1/12/86	31/5/91	14/9/82	9/9/93	7/2/94
	Sexo	M	M	M	M	F	M	F	M
DADOS AO NASC.	Idade gestacional	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m
	Peso ao nascimento (g)	2700	3905	3830	2750	2620	2850	3080	1900
	Comprimento ao nascimento (cm)	48	51	50	48	47	49	47	?
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS	Hipotonia	+	+	-	+	+	-	-	+
	Atraso DNPM	+	+	+	+	+	+	+	+
	Comportamento típico	-	+	+	+	+	+	+	+
	Hiperacusia	+	+	+	+	+	-	-	+
EXAME FÍSICO	Fácies típico	+	+	+	+	+	+	+	+
	Microcefalia	-	-	-	+	+	+	+	-
	Baixa estatura	+	+	+	+	+	+	-	+
ALTERAÇÕES CARDÍACAS	EASV	+	-	+	+	+	+	-	+
	EAP	+	+	-	-	-	+	-	-
	Degeneração mixomatosa	-	-	-	-	-	+	-	-
	Coarctação da aorta	-	-	-	-	-	-	-	-
	Infiltração de Ca+ endocárdio	-	-	-	-	-	-	-	-
	CIA e EP	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hipoplasia aorta descendente	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hipertensão arterial	-	-	-	-	-	+	-	-
EXAME LAB.	FISH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	MARCADORES POLIMÓRFICOS	Positivo	Inconc.	Positivo	Positivo	Positivo	Inconc.	Negativo	Positivo

+ :presença da característica,-: ausência da característica, ?: dado não disponível, NR: não realizado, Inconc: inconclusivo

Tabela 6: continuação

	PACIENTE	9	10	11	12	13	14	15	16
DADOS GERAIS	RG do HC	3182808C	6054824C	5021150A	2913799A	6016109E	6055308I	5165318A	6078631A
	Idade ao diagnóstico clínico	5a4m	1a6m	10a7m	1a6m	12a2m	3a8m	4a2m	8 a
	Data de nascimento	29/4/93	9/9/93	15/12/82	13/5/92	2/6/82	30/8/91	15/2/92	16/8/91
	Sexo	F	F	F	M	F	M	F	M
DADOS AO NASC.	Idade gestacional	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m
	Peso ao nascimento (g)	2500	3040	2700	2900	3130	2370	2750	2400
	Comprimento ao nascimento (cm)	48	48	47	48	47	45	48	48
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS	Hipotonia	+	+	-	+	-	+	-	-
	Atraso DNPM	+	+	+	+	+	+	+	+
	Comportamento típico	+	+	+	+	-	-	+	+
	Hiperacusia	+	+	+	-	-	+	+	+
EXAME FÍSICO	Fácies típico	+	+	+	+	+	+	+	+
	Microcefalia	+	+	+	+	+	+	+	+
	Baixa estatura	+	+	+	+	+	+	+	+
ALTERAÇÕES CARDÍACAS	EASV	-	+	-	+	-	+	+	+
	EAP	-	-	+	-	-	-	+	-
	Degeneração mixomatosa	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coarctação da aorta	-	+	+	-	-	-	-	+
	Infiltração de Ca+ endocárdio	-	-	-	-	-	-	-	-
	CIA e EP	-	-	-	-	-	-	+	-
	Hipoplasia aorta descendente	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hipertensão arterial	-	-	-	-	-	+	-	-
EXAME LAB.	FISH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	MARCADORES POLIMÓRFICOS	Positivo	positivo	Inconc.	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Inconc.

+ :presença da característica,-: ausência da característica, ?: dado não disponível, NR: não realizado, Inconc: inconclusivo

Tabela 6: continuação

	PACIENTE	17	18	19	20	21	22	23	24
DADOS GERAIS	RG do HC	6080420C	5287750G	55329864D	606077644K	5093875I	5263693F	6095909D	6091233E
	Idade ao diagnóstico clínico	7a3m	1a2m	3a	4 a	5 a 3m	16a	1a	2a10m
	Data de nascimento	18/2/95	24/3/99	10/9/93	22/6/92	24/3/96	4/12/84	20/1/00	21/3/98
	Sexo	M	M	F	F	M	M	M	M
DADOS AO NASC.	Idade gestacional	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m
	Peso ao nascimento (g)	3270	3300	3580	2800	3440	2600	2800	2590
	Comprimento ao nascimento (cm)	49	50	50	47	46	46	48	45
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS	Hipotonia	-	+	+	-	+	+	+	+
	Atraso DNPM	+	+	+	+	+	+	+	+
	Comportamento típico	+	+	+	+	-	+	-	+
	Hiperacusia	-	-	-	-	-	-	-	-
EXAME FÍSICO	Fácies típico	+	+	+	+	+	+	+	+
	Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	+
	Baixa estatura	-	-	-	-	-	+	-	+
ALTERAÇÕES CARDÍACAS	EASV	-	-	+	-	+	+	+	+
	• EAP	-	+	+	-	+	-	-	-
	• Degeneração mixomatosa	-	-	-	-	-	-	-	-
	• Coarctação da aorta	-	-	-	-	-	-	-	-
	• Infiltração de Ca+ endocárdio	-	-	-	-	-	-	-	-
	• CIA e EP	-	-	+	-	-	-	-	
	• Hipoplasia aorta descendente	-	-	-	-	-	-	-	-
	• Hipertensão arterial	-	-	-	-	-	-	-	-
EXAME LAB.	FISH	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	MARCADORES POLIMÓRFICOS	Inonc.	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

+ :presença da característica,-: ausência da característica, ?: dado não disponível, NR: não realizado, Inconc: inconclusivo

Tabela 6: continuação

	PACIENTE	25	26	27	28	29	30	31	32
DADOS GERAIS	RG do HC	5093875I	6066787C	3018403J	293869SE	50133808A	5095654C	52857444E	5299697I
	Idade ao diagnóstico clínico	3a	12a10m	6a5m	8 a	10 a	15a5m	2a	16a
	Data de nascimento	28/8/88	3/9/84	29/9/88	29/8/93	7/10/90	22/4/85	15/7/98	7/10/84
	Sexo	F	M	M	F	F	M	M	F
DADOS AO NASC.	Idade gestacional	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m	9m
	Peso ao nascimento (g)	3050	3350	2150	3070	2650	3100	3740	2700
	Comprimento ao nascimento (cm)	48	49	44	47	45	49	52	?
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS	Hipotonia	-	?	?	-	+	?	+	+
	Atraso DNPM	+	+	+	+	+	+	+	+
	Comportamento típico	+	+	+	-	+	+	+	+
	Hiperacusia	-	+	+	-	+	+	+	+
EXAM FISICO	Fácies típico	+	+	+	+	+	+	+	+
	Microcefalia	-	+	+	-	+	-	-	-
	Baixa estatura	+	+	+	-	+	+	-	+
ALTERAÇÕES CARDÍACAS	EASV	+	+	+	-	+	+	+	-
	• EAP	-	-	+	-	-	-	+	-
	• Degeneração mixomatosa	-	-	+	-	-	-	-	-
	• Coarctação da aorta	-	-	-	-	-	-	-	-
	• Infiltração de Ca^+ endocardio	-	-	-	-	-	-	-	-
	• CIA e EP	-	-	-	-	-	-	-	-
	• Hipoplasia aorta descendente	-	-	-	-	-	-	+	-
	• Hipertensão arterial	-	-	-	-	+	-	-	+
EXAME LAB.	FISH	NR	Negativo	Positivo	NR	NR	NR	NR	NR
	MARCADORES POLIMÓRFICOS	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Inconc.	Positivo	Inconc.

+ :presença da característica,-: ausência da característica, ?: dado não disponível, NR: não realizado, Inconc: inconclusivo

4.2. Marcadores Polimórficos

Os 3 marcadores altamente polimórficos da região 7q11.23 da microdeleção, foi realizada em todos da casuística e seus pais biológicos, exceto em 5 casos onde o pai não participou do estudo. Desta forma, os resultados obtidos com a presença da microdeleção, demonstraram a ocorrência de casos esporádicos.

Tabela 7 - Resultados dos Marcadores Polimórficos.

Marcadores	Informativos				Não informativos	
	com deleção	%	sem deleção	%	total	%
D7S1870	16/32	50	6/32	19	10/32	31
Eln17/éxon18	9/32	28	5/32	15	18/32	56
Hei 1.3S e Hei 1.4A	13/32	40	5/32	15	14/32	44
Conclusão	18/32	56	7/32	22	7/32	22

4.2.1 – Informatividade dos Marcadores Polimórficos

4.2.1.1 – Marcador D7S1870:

Este marcador foi informativo em 22/32 (69%) e capaz de detectar a deleção em 16/18 (89%). A ausência de deleção foi confirmada em 6/7 (86%) dos casos.

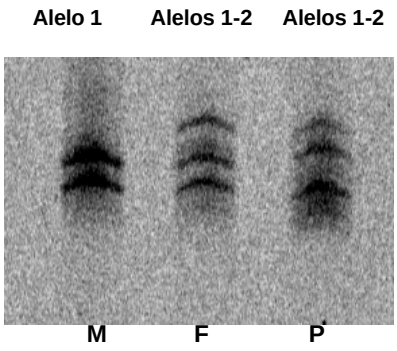


Figura 4: Resultado do marcador D7S1870 numa família em que o filho (F) recebeu o alelo 1 da mãe (M) e o alelo 2 do pai (P), evidenciando a ausência de deleção.

4.2.1.2 – Marcador ELN17/éxon 18:

Este marcador foi informativo em 14/32 (43%) e capaz de detectar a deleção em 9/18 (50%). A ausência de deleção foi confirmada em 5/7 (71%).

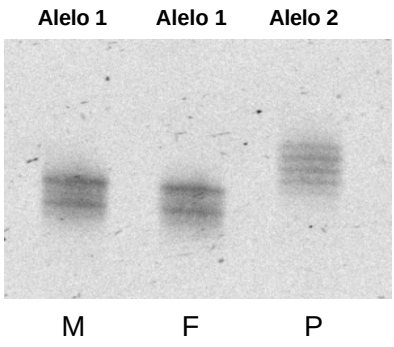


Figura 5: Resultado do marcador Eln17/18 em uma família em que o filho(F) recebeu o alelo 1 da mãe(M) e nenhum do pai (P), resultando em uma deleção paterna

4.2.1.3 – Marcador HEI :

O marcador HEI foi informativo em 18/32 (55%) dos casos e capaz de detectar a deleção em 13/18 (72%) 5/7 (71%) sem a microdeleção.

4.2.2 – Não Informativos

Os três marcadores juntos, não foram capazes de informar a presença ou ausência da microdeleção em 7/32 pacientes (22%), resultando num diagnóstico *inconclusivo* por esta metodologia.

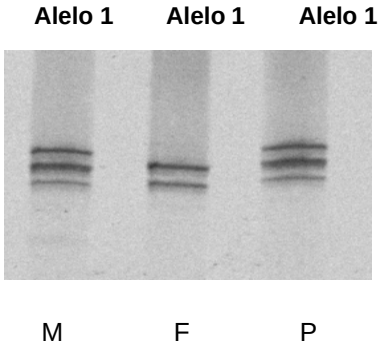


Figura 5: Resultado do marcador Hei, em uma família não informativa. O filho (F) pode ter recebido dois alelos iguais, um da mãe (M) e um do pai (P) e ser homozigoto ou pode ter recebido apenas um alelo de um dos genitores e assim ser hemizigoto.

4.3 Origem parental da deleção

A origem parental da microdeleção foi possível de ser analisada em 17 casos, demonstrando que 9 casos foi de origem materna e 8 de origem paterna.

4.4 – Achados clínicos dos pacientes com e sem a microdeleção 7q11.23

As características clínicas dos pacientes com e sem a microdeleção constam na tabela 8, sendo que em sete casos, o resultado molecular foi inconclusivo.

Tabela 8 - Achados clínicos nos pacientes com e sem microdeleção.

Achados clínicos	Com deleção		Sem deleção		p
	Nº de afetados/total	%	Nº de afetados/total	%	
Alterações craniofaciais	18/18	100	7/7	100	-
EASV	15/18	83	3/7	42	0,066
Outras alterações cardíacas	13/18	72	3/7	42	0,204
Comportamento característico	16/18	88	2/7	28	**0,006**
Hiperacusia	10/18	55	0/7	0	**0,020**

As outras alterações cardíacas também foram analisadas individualmente conforme a presença ou ausência da microdeleção (Tabela

9). Dentre estas alterações, 3 casos de EAP, 3 de arritmias cardíacas e 1 caso de hipertensão arterial estiveram presentes nos resultados inconclusivos pelos marcadores polimórficos.

Tabela 9 - Outras alterações cardíacas (não EASV) nos portadores e não portadores da microdeleção 7q11.23.

Outras alterações cardíacas	**Com deleção**		**Sem deleção**	
	Nº de afetados/total	**%**	**Nº de afetados/total**	**%**
EAP	3/18	16	1/7	14
Deg.mixomatosa - valva mitral	1/18	5	0/7	0
Coarctação da aorta	3/18	16	0/7	0
Infiltração de Ca^{+} endocárdio	1/18	5	0/7	0
CIA e EP	1/18	5	0/7	0
Hipoplasia discreta da aorta desc*	1/18	5	0/7	0
Hipertensão arterial	3/18	16	1/7	14

*desc: descendente.

5. Discussão

5.1 Aspectos clínicos

Estudamos 32 pacientes com características clínicas para SWB, pelo método de marcadores de microssatélites. Conforme a literatura, os portadores desta síndrome apresentam múltiplas alterações do desenvolvimento como retardo mental, dismorfismo facial, anomalias cardiovasculares, baixa estatura, perfil comportamental típico, hiperacusia e hipercalcemia infantil (Paperna et al.,1998; Hochenhull et al.,1999).

Em nossa casuística, todos os pacientes apresentaram o fácies típico associados a uma das alterações: cardíacas, comportamento característico ou hiperacusia. Pelo sistema de pontuação proposto por Lowery et al., 1995, todos preenchiam os critérios para o diagnostico da SWB.

- **Craniofacial**

Não demonstraram diferenças entre os portadores e não portadores da microdeleção o que foi semelhante à literatura (Lowery et al.,1995; Amenta et al.,2005). O fácie típico compreendeu microcefalia, fronte alargada, nariz curto e arrebitado, narinas antevertidas, ponte nasal baixa, filtro nasal longo, hipoplasia malar, micrognatia, bochechas proeminentes, lábios espessos, má oclusão dentária, edema supra-orbitário, estrabismo, erros de refração e padrão de íris estrelada.

- **Alterações cardiovasculares**

Essas alterações ocorreram em 72% da casuística com a microdeleção e em 42% sem a microdeleção.

A EASV esteve presente em 15/18 (83%) dos pacientes com a microdeleção e 3/7 (42%) nos não portadores. Esses resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significante (p=0,06).

Conforme vários pesquisadores (Dridi et al.,1999, Wang et al.,1999; Sadler et al., 2001, Pascual-Castroviejo et al., 2004), as anomalias cardiovasculares são detectadas em 80% a 85% dos pacientes portadores da SWB, embora 21% a 26% dos pacientes, possam não apresentar doença cardiovascular. Em crianças com esta síndrome a incidência de EASV foi de 60% a 64%.

Dois mecanismos para a patologia EASV foram propostos; um defeito quantitativo da elastina (a mutação produziria uma redução da quantidade da proteína e conseqüentemente uma haploinsuficiência para a elastina) ou um defeito qualitativo na síntese da proteína (trofoelastina alterada resultaria em fibras elásticas anômalas). A primeira hipótese parece ser mais atrativa, porque a hemizigosidade da elastina já está bem estabelecida como mecanismo da EASV nos pacientes com deleção parcial envolvendo o gene da ELN e em pacientes com SWB.

Realmente a maioria das mutações detectadas em casos isolados de EASV ocorrem por mutações que produzem sítios de terminação prematuros. Recentemente Urban et al., 2001, mostraram que muitas dessas

mutações produzem um transcrito de RNA mensageiro instável que é rapidamente degradado, resultando na haploinsuficiência da elastina em nível de RNA. Além disso, o mecanismo que envolve o desenvolvimento deste fenótipo vascular, provavelmente seja muito mais uma deficiência quantitativa da elastina do que um defeito qualitativo causado pelo produto de uma proteína mutante (Rodriguez-Revenga et al.,2005).

Diversos trabalhos relatam a ocorrência de mutações de ponto no gene da elastina, como pequenas deleções em matriz de leitura, *nonsense, missense* e duplicações nas regiões de seqüências repetitivas, resultando numa função anormal para a elastina. Este fato tem impulsionado pesquisas a fim de relacionar casos comuns de arteriopatia ao produto dessas proteínas variantes. Embora esses conhecimentos sejam importantes para caracterizar a possível etiologia da EASV, muitas pesquisas devem ser realizadas para delinear melhor essas patologias cardíacas (Urban et al., 2000; Rodriguez-Revenga et al.,2005).

Nos portadores da SWB quando há a haploinsuficiência da ELN, 75% apresentam a EASV, hérnias, envelhecimento prematuro, hiperestensibilidade articular das juntas e contraturas, voz rouca, divertículos no cólon/bexiga e dismorfismos faciais. O mecanismo genético – deleção, quando atingem os polimorfismos da ELN podem alterar o nível da expressão gênica. Embora essa alteração não seja significativa, é interessante salientar que o defeito cardiovascular quase sempre está associado com os polimorfismos da elastina (Mari et al, 1995; Wang et al., 1999).

Em nossa casuística, as outras alterações cardíacas, que não a EASV, ocorreram em 72% dos casos portadores da microdeleção e em 42% sem a microdeleção. Segundo Perez-Jurado et al., 1996, essas outras alterações como estenose periférica pulmonar (EPP), prolapso da valva mitral e demais alterações (defeito do septo ventricular ou atrial) juntas apresentaram uma freqüência de 43% numa casuística de 61 portadores da SWB.

A EAP no presente trabalho foi detectada em 3/18 (16%) dos pacientes com microdeleção e em 1/7(14%) nos casos sem a microdeleção. Os casos inconclusivos pela metodologia utilizada 3/7(42%), também apresentaram esta anomalia.

Conforme a literatura a EAP é a segunda alteração cardiovascular mais freqüente nos portadores da SWB (Brondum-Nielsen et al., 1997; Sylos et al., 2002). A EAP é uma condição que tende a melhorar com a idade, já a EASV tende a progredir com o passar dos anos, portanto essas condições raramente coexistem num portador da SWB.

Além da EAP (Tabela 9) as demais alterações como degeneração mixomatosa da valva mitral, infiltração de Ca+ no endocárdio, comunicação intra-ventricular/estenose pulmonar e hipoplasia discreta da aorta descendente estiveram presentes apenas nos pacientes com microdeleção 1/18 (5%). As arritmias cardíacas foram detectadas nos pacientes com microdeleção 3/18 (16%), sem a microdeleção 1/7 (14%) e nos casos inconclusivos 3/7 (43%). Essas outras alterações que ocorreram em 72% da

nossa casuística, nos trabalhos de Borg et al., 1995 e Elçioglu et al.,1998 ocorreram numa freqüência de 62,5% e 71,4% respectivamente.

A presença da hipertensão arterial nos portadores da microdeleção foi de 3/18 (16%) da casuística, e em apenas 1/7(14%) inconclusivo pela metodologia utilizada.

Segundo Rose et al., 2001 a hipertensão é considerada muito mais uma alteração cardiovascular do que uma hipoperfusão renal propriamente dita.

A hipertensão arterial ocorre em 1/3 dos casos, quando associada a coarctação da aorta, estenose de artéria renal, arteriopatia, nefrocalcionose e malformações renais, como aplasia renal, hipoplasia, distopia, duplicação renal, cistos e divertículos da bexiga (Daniel et al.,1985; Õunap et al., 1998).

Sylos et al., 2002 relataram o caso de um portador com SWB aos sete anos com hipertensão arterial sistêmica, porém com função renal e eletrolítica normais. Neste caso, foi observado estreitamento difuso da aorta e ramos, obstrução da artéria renal com diminuição de perfusão renal, além de comunicação intraventricular com ausência de EASV e de estenose de ramos periféricos pulmonares. Este caso demonstra a importância da investigação da hipertensão arterial sistêmica em portadores da SWB, o que normalmente não ocorre e nem é muito valorizado no acompanhamento destes pacientes.

Eronen et al., 2002 relataram num estudo prospectivo em 75 pacientes com SWB, alterações cardiovasculares estavam presentes em 35 pacientes (47%) ao nascimento. As anormalidades mais comuns foram as EASV em 73% e EAP 41%, já a hipertensão arterial ocorreu em 55% dos adultos.

- **Comportamento**

No presente estudo, o comportamento característico esteve em 88% nos portadores da microdeleção e em 28% dos pacientes sem a microdeleção (p=0,006), estatisticamente considerado muito significante e concordante com a literatura, pois Wang et al., 1999, relataram que 87% dos pacientes com SWB apresentavam comportamento característico.

Na casuística; conforme relato das mães, um caso (18) com microdeleção apresentava o comportamento característico (amigável), porém com curtos episódios de agitação. O comportamento típico também ocorreu em dois casos (7,24) onde a microdeleção não estava presente.

A correlação genótipo-fenótipo dos genes envolvidos na região 7q11.23 ainda não foram estabelecidas quanto ao comportamento e perfil cognitivo característico da SWB, embora a haploinsuficiência do gene LIMK1 associado a outros genes (GTF2IRD1 e GTF2I), sejam responsáveis pelo déficit cognitivo e retardo mental, assim como também poderia contribuir no fenótipo conforme pesquisas realizadas com camundongos. Já a haploinsuficiência do gene CYLN2 poderia comandar uma disfunção do hipocampo em particular, resultando num déficit da coordenação motora, análogo ao modelo em camundongos (Tassabehji et al., 2003).

O perfil cognitivo típico dos portadores da SWB tem sido motivo de muitas pesquisas com imagens de ressonância magnética e morfometria voxel - based cerebral. O conhecimento da diminuição da massa branca

subcortical com aumento das pregas corticais e a redução do volume da massa cinzenta nos sulcos parieto-occiptal, indicam que sejam responsáveis pelo o déficit visuo-espacial. Esses achados também foram observados em pacientes com SWB adultos, porém com inteligência normal.

Além dessa diminuição significante do volume da massa cinzenta um padrão anormal de giros na região occipital e parietal também foram encontrados e semelhantes aos achados nos estudos anátomo-patológico encontrados na região occipital postmortem. A profundidade dos sulcos intraparietal/occipito-parietal são concordantes com a diminuição do volume da massa cinzenta no que se refere como causa do déficit visuo-espacial dos portadores da SWB, visto que o sulco parieto-occipital é implicado na construção visuo-espacial (Boddaert et al.,2005; Meyer-Linderberg et al.,2004)

Esse déficit visuo-espacial é uma característica presente já na infância o que difere quando comparado as demais características cognitivas que costumam variar com a idade.

O déficit específico na cognição visuo-espacial é mais aparente quando testados juntamente com os portadores de síndrome de Down (SD). Tassabehji, 2003, mostrou que nas SD e SWB, ambas apresentaram déficit cognitivo em diferentes níveis, pois o portador de SD consegue desenhar a figura proposta sem dar ênfase aos detalhes, enquanto o portador da SWB consegue apenas focar os detalhes sem conseguir dar a forma real à figura.

Num estudo comportamental realizado por Doyle et al., 2004, com 64 portadores da SWB, 31 com SD e 27 crianças normais como grupo controle,

demonstraram que o comportamento social nos portadores da SWB era significantemente elevado em relação aos demais grupos. Também demonstraram que a hipersociabilidade é maior nos portadores mais jovens acometidos pela microdeleção 7q11.23. Os portadores de SWB adultos tendem executar tarefas que envolvam a linguagem com maior êxito do que tarefas que impliquem habilidades cognitivas visuo-espaciais.

A maioria das pesquisas existentes, relacionadas aos distúrbios comportamentais e cognitivos dos indivíduos com SWB, tem sido focalizadas em crianças ou em pacientes jovens, e por isso pouco se conhece da trajetória do período da vida adulta. Isso porque é muito difícil recrutar adultos com SWB, tanto pela baixa incidência como também, pelo fato da maioria dos casos não apresentar diagnóstico clínico para a SWB (Krinsky-McHale et al.,2005).

- **Hiperacusia**

A hiperacusia esteve presente em 10/18 (55%) dos pacientes com a microdeleção e em nenhum dos 7 pacientes sem a microdeleção, (p=0,020) um valor significante do ponto de vista estatístico.

Elçioglu et al.,1998 observaram a hiperacusia em 5/14 pacientes (35,7%) dos portadores sendo que a hiperacusia pode estar presente entre 85-95% dos portadores da microdeleção 7q11.23.

Conforme revisão da literatura, a hiperacusia melhora com a idade e há uma tendência maior de ocorrência no sexo feminino (Wang et al., 1999;

Donnai et al., 2000; Blomberg et al.,2005). Em nossa amostra o sexo feminino com microdeleção e hiperacusia, correspondeu a 7/10 casos (5,7,9,10,11,15,29), ou seja, apenas 3/10 dos casos (19,20,25) com a microdeleção não apresentaram essa alteração clínica. Nos resultados inconclusivos (30,32) a hiperacusia foi relatada pelos pais.

Atualmente pesquisas sugerem que os sintomas comuns nos portadores da SWB como a de ansiedade, obsessão, angústia, medo e hiperatividade, sejam estudados em conjunto, partindo da hipótese de que a hiperacusia possa ser uma resposta ao elevado nível de ansiedade e medo (barulhos fortes) que os portadores possuem. Outra hipótese que justificaria a presença da hiperacusia seria a sua conexão com um desequilíbrio nos níveis de serotonina e que esse desequilíbrio também seja responsável pela vulnerabilidade nesta psicopatologia (Blomberg et al.,2005).

A proposta de inserir a musicalidade na vida desses pacientes com SWB, a fim de auxiliar e melhorar a questão da ansiedade reside no fato de que durante o processo musical, um padrão de ativação amplamente distribuído nas estruturas cortical e subcortical, envolvendo, por exemplo, a amigdala e o pedúnculo cerebral - principalmente a amigdala; desempenhem um papel central nas reações de medo e ansiedade, assim como a ativação do sistema nervoso simpático, o que caracterizam credibilidade a esta proposta.

5.2 – Marcadores Polimórficos

Os marcadores D7S1870, Eln 17/éxon18 e Hei, foram previamente testados num estudo realizado no InCor, onde foram selecionadas 150 pessoas clinicamente normais. Os três marcadores juntos, demonstraram uma sensibilidade para detectar a heterozigosidade na região 7q11.23 em 98,2% dos casos.

No presente estudo, esses mesmos marcadores foram utilizados nos 32 pacientes inclusos no trabalho. Os 3 marcadores polimórficos utilizados foram informativos em 25/32 (78%) dos pacientes estudados e em 7/32 (22%) não foram informativos.

A microdeleção foi encontrada em 18/32 (56%) dos pacientes e em 7/32 (22%) pacientes não foi encontrada a microdeleção.

Quanto às análises realizadas por marcador, o D7S1870 foi o mais informativo em 16/18 (88%) dos pacientes portadores da microdeleção, o Hei foi informativo em 13/18 (72%) e o ELN17/éxon18 mostrou-se informativo em apenas 9/18 casos (50%).

O marcador D7S1870 geralmente é considerado como um dos melhores marcadores para detectar a deleção na maioria dos pacientes com SWB (Osborne et al., 1999).

Segundo Montserrat et al., 1999, em 80 pacientes com suspeita clínica de SWB o marcador D7S1870 mostrou-se informativo em 73%. Já Osborne et al.,1996 e Dussardier et al., 1995, o mesmo marcador foi informativo em

75%. Urbán et al. 1996 relatam uma informatividade de 74,2% do marcador D7S1870.

Dos 32 casos da nossa amostra, 18 já tinham sido previamente testados por Sugayama, 2001 pelo método de FISH. O método detectou 15 com deleção e 3 sem a deleção.

Comparando estes dois métodos utilizados, houve uma concordância nos resultados tanto nos positivos (com deleção) e negativos (sem deleção), com exceção de 4 casos que deram FISH positivo, mas inconclusivos pelos marcadores, pois não foram informativos (tabela 10).

Tabela 10 - Resultados pelos métodos de FISH e marcadores polimórficos.

Resultados	**FISH**	**Marcadores Polimórficos**
Positivo	15/18	11/18
Negativo	3/18	3/18
Inconclusivo	0	4/18

Wu et al., 1998 estudaram 63 pacientes utilizando as duas metodologias; marcadores polimórficos e FISH, detectando microdeleções em 51 pacientes em ambos os métodos.

Em nosso trabalho, o método de marcadores polimórficos apresentou uma utilidade de 78% para demonstrar a presença ou não da microdeleção 7q11.23 quando comparado ao método de FISH.

Monteserrat et al.,1999 utilizaram a metodologia de FISH (69 casos) e marcadores polimórficos (78 casos) para diagnosticar 80 pacientes com suspeita clínica da SWB. Neste estudo relataram que não há discordância entre o FISH e estudos com marcadores polimórficos. Essas técnicas possibilitaram um resultado para todos os casos analisados, exceto em 2,5% dos casos que não foram informativos (inconclusivos) pelos marcadores polimórficos e que não dispunham de material para realizar FISH.

5.2.1 – Pacientes sem diagnóstico confirmado pelos marcadores polimórficos

Dos três marcadores utilizados na casuística, 22% foram inconclusivos (7/32 pacientes).

Um resumo das características clínicas dos sete pacientes (2, 6,11,16,17,30,32) constam na tabela 1 e figura 3.

Dos 32 pacientes com suspeita clínica da SWB, 14 não puderam ser confirmados pelo diagnóstico, sendo 7 não informativo e 7 negativo pelos marcadores polimórficos. Entretanto, o diagnóstico clínico ainda não deve ser afastado, uma vez que há possibilidades da realização de estudos mais aprofundados tanto para os genes envolvidos quanto ao emprego de outras metodologias.

Embora a maioria dos portadores da SWB apresentem uma deleção de aproximadamente 1.5 Mb, há casos raros onde variantes de deleções possam ocorrer. Ao mesmo tempo, essas variantes podem auxiliar na

identificação dos genes envolvidos para se tentar uma correlação genótipo-fenótipo, mas que nem sempre é detectada pela técnica utilizada (Heller et al.,2003).

Em nossa casuística, todos os casos inconclusivos apresentaram fácies típico. A estatura que tende a ser abaixo da média comparada a população normal, só não esteve presente no caso 17 que também não apresentava alterações cardiovasculares nem hiperacusia, embora apresentasse um fácies extremamente peculiar para SWB.

Das alterações cardiovasculares encontradas a EASV e a EAP também estiveram presentes em 4 casos (6,16,30 e 32) e 2 casos (2, 11) respectivamente.

O comportamento amigável esteve presente em todos os casos inconclusivos pela metodologia utilizada, já a hiperacusia só não esteve presente em dois casos (6,17).

5.2.2 – Origem parental da microdeleção

Quanto ao estudo da origem parental da deleção em 17/18 pacientes, 9 foi de origem materna, 8 de origem paterna e 1 caso que não pode ser determinada.

Todas as 17 deleções encontradas foram de novo, pois os genitores eram normais, esses dados foram concordantes com a literatura, pois não demonstraram diferenças na origem parental (Dussardier et al.,1995).

A origem parental da deleção pode ter um papel no fenótipo da SWB. Isto resultaria em diferenças na expressão gênica devido à origem parental dos alelos, manifestando-se como uma diferença clínica sutil num fenômeno conhecido como "*imprinting*". Um exemplo bem conhecido disto é o que ocorre na região 15q11.2-q12, onde a deleção de origem paterna resulta na síndrome de Prader–Willi enquanto a deleção nesta região de origem materna, resulta na Síndrome de Angelmam. Na SWB, esta correlação quanto à origem parental da deleção ainda precisa ser elucidado (Wang et al.,1999).

Baumer et al., 1998, relataram que nos diversos trabalhos por eles analisados quanto à origem da deleção, os casos onde há um maior retardo do crescimento e presença de microcefalia, apresentavam deleção de origem materna, o que também foi descrito por Perez-Jurado et al., 1996.

6. Conclusões

- Os 3 marcadores polimórficos D7S1870, HEI e ELN17/éxon18 utilizados foram informativos em 25/32 (78%) dos pacientes estudados e não informativos em 7/32 (22%).
- O marcador D7S1870 foi o mais informativo (69%), seguido de HEI (55%) e ELN17/éxon18 (43%).
- A microdeleção da região 7q11.23 foi encontrada em 18/32 (56%) dos pacientes e ausente em 7/32 (22%) pacientes.
- As alterações craniofaciais e cardiovasculares não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com microdeleção e sem microdeleção.
- O comportamento característico foi um achado mais freqüente em 88% nos pacientes com microdeleção e 28% sem microdeleção com diferença estatisticamente significante (p=0,006).
- A hiperacusia esteve presente em 55% nos pacientes com microdeleção e em nenhum dos pacientes sem microdeleção com diferença estatisticamente significante (p=0,020).
- Não houve diferença da origem parental da microdeleção.
- Todas as deleções foram "*de novo*", exceto em um caso que não pôde ser determinado.
- O estudo dos marcadores polimórficos foi útil para a detecção da microdeleção na região 7q11.23, para a confirmação diagnóstica de SWB .

7. Anexo

Protocolo – Pacientes com SWB

Identificação

Data do 1º atendimento: **RG:**
Nome:
DN: **Sexo:** **Cor:**
Endereço:
Telefone:

Antecedentes Familiares

Gestações:
Abortos:
Irmãos:

Antecedentes Pessoais

Pré-natal:
Sangramento:
Dados de Nascimento: **IG:** **Tipo de parto:**
Sofrimento fetal:

Exame Físico

Idade: **P:** **E:** **PC:**
DNPM:
Fácies típico:

Alterações cardiovasculares:

EASV:
EAP:
Degeneração mixomatosa da valva mitral:
Hipertensão arterial:
Outros Achados:

Alterações esqueléticas

Alterações renais e do trato urinário

Alterações neurológicas
Comportamento característico
Hiperacusia

Outros achados

Exames moleculares

FISH:
Marcador polimórfico:
Origem parental da microdeleção: ( ) materna ( ) paterna

8. REFERÊNCIAS

Aarskog D, Aksnes L, Markestad T. Vitamin D metabolism in idiopathic infantile hypercalcemia. *Am J Dis Child*. 1981;35:1021-24.

American Academy of Pediatrics. Health Care Supervision for children with Williams syndrome. *Pediatr* 2001;107:1192-204.

Anari M, Axelsson A, Eliason A, Magnusson L. Hypersensivity to sound – questionnaire data, audiometry and classification. *Scand Audiol*. 1999;28:219-30.

Amenta, S, Sofocleous C, Kolialexi A, Thomaidis L, Giourous S, Karavakis E, Fryssira H. Clinical manifestations and molecular investigation of 50 patientes with Williams syndrome in the Greek population. *Pediatr Res*. 2005;57:789-95.

Andersson G, Linwall N, Hursti T, Carlbring P. Hypersensitivity to sound (hyperacusis): a prevalence study conducted via the Internet and post. *Int J Audiol*. 2002;41(8):545-54.

Antonell A, Del Campo am, Flores R, Campuzano V, Perez-Jurado LA. Síndrome de Williams: aspectos clínicos y bases moleculares. *Rev Neurol*. 2006;42(1):S69-75.

Atkinson J, Anker S, Braddiick O, Nokes L, Mason A, Braddick F. Visual and visuospacial development in young children with Williams syndrome. *Dev Med Child Neuro.* 2001;43:330-37.

Ashkenas J .Williams syndrome starts making sense. *Am J Hum Genet.* 1996;59(4):756-61.

Bayés M, MaganoLF, Rivera N, Flores R, Jurado AP. Mutational Mechanisms os Williams-Beuren Syndrome Deletions. *Am. J. Hum. Genet*. 2003;73:131-51.

Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tukel 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;7:887-94.

Bellugi U, Lichtenberg L, Mills D, Galaburda A, Korenberg JR. Brinding cognition, the brain and molecular genetics: evidence from Williams syndrome. *Trends Neurosci*. 1999;22:197-207.

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

Blomberg S, Rosander M, Andersson G. Fears, hyperacusis and musicality in Williams syndrome. Res Dev Disabil. 2005;30 oct 31. Available online on ScinceDirect (www.scincedirect.com).

Boddaert N, Mochel F, Meresse I, Seidenwurm D, Cachia A, Brunelle F, Lyonnet S, Zilbovicius M. Parieto-occipital grey matter abnormalities in children with Williams syndrome. *Neuroimage.* 2006;30(3):721-5.

Borg I, Delhanty J, Baraitser M: Dection of hemizigosi ty at the elastin locus by FISH analysis as a diagnostic test in both classical and atypical cases of Williams Syndrome. *J Med Gen*. 1995;32(9):692-6.

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

Botta A, Novelli G, Mari A, Novelli A, Sabani M, Korenberg J, Osborne LR, Digilio MC, Gianotti A, Dallapiccola B. Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. *Genomics*. 1999;62:525-8.

Brewer CM, Morrison N, Tolmie JL: Clinical and molecular cytogenetic (FISH) diagnosis of Williams Syndrome. *Arch Dis Child*. 1996;74:59-61.

Brondum-Nielsen K, Beck B, Gyftodimou J, Horlyk 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.

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 Mix transcription factor network. *Hum Mol Genet*. 2001;10:617- 27.

Calamandrei G, Alleva E, Cirulli F, Queyras A, Volterra V, Capirci O, Vicari S, Giannotti A, Turrini P, Aloe L. Serum NGF levels in children and adolescent with either Williams syndrome or Down syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 2000;42:746-50.

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.

Coté G, Jequier S, Kaplan P. Increased renal medullary echogenicity in patientes with Williams syndrome. *Pediatr Radiol.* 1989;19:481-3.

Daniels SR, Loggie JM, Sshwartz DC, Strife JL, Kaplan S. Systemic hypertension secondary to peripheral vascular anomalies in patients with Williams syndrome. *J Pediatric*. 1985;106:249-51.

Doll A, Grzeschik KH. Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Cytogenet Cell Genet*. 2001;95:20-7.

Donnai D, Karmiloff-Smith A. Williams syndrome: from genotype through to the cognitive phenotype. *Am J Med Genet*. 2000;97:164-71.

Doyle TF, Bellugi U, Korenberg JR, Graham J. "Everybody in the world is my friend" hypersociability in young children with Williams syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004;124:263-73.

Dridi SM, Ghomrasseni S, Bonnet D, Aggoun Y, Vabres P, Bodemer C, Lyonnet S, de Prost Y, Fraitag S, Pellat B, Sidi D, Godeau G. Skin elastic fibers in Williams syndrome. *Am J Med Genet*. 1999;87:134-8.

Dykens EM. Anxiety, fears, and phobias in persons with Williams syndrome. *Dev Neuropsychol*. 2003;23(1-2):291-316.

Dykens EM, Rosner BA, Ly T, Sagun J. Music and anxiety in Williams syndrome: a harmonious or discordant relationship? *Am J Ment Retard*. 2005;110(5):346-58.

Dussardier-Gilbert B, Bonneau D, Gicarel N, Le Merrer M, Bonnet D, Philip N, Serville F. et al. A novel microsatellite DNA marker at locus D7S1870 detectes hemizigosity in 75% of patients with William syndrome. *Am J Hum Genet*. 1995;56:542-4.

Elçioglu N, Mackie-Ogilvie C, Daker M, Berry AC. FISH analysis in patients with clinical diagnosis of Williams syndrome. *Acta Pediatric*. 1998;87:48-53.

Eronen M, Peippo M, Hiippala A, Raatikka M, Arvio M, Johansson R, Kahkonen M.Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome.*J Med Genet*. 2002;39(8):554-8

Ewart, AK, Morris C A, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock A D, Leppert M, Keating MT. Hemizygosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nature Genet*. 1993; 5:11-6.

Fanconi G, Girardet P: Chronische Hypercälcemia, kombiniert mit Osteosklerose, Hyperazotämie, Minderwuchs und kongenitalen mibbildungen. *Helv Paediat Acta*. 1952;7:314-334.

Fazio MJ, Mattei MG, Passage E, Chu ML, Black D, Solomon E, Davidson JM, Uitto J. Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet.* 1991;48(4):696-703.

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;86:296-304.

Greenberg F, Lewis RA: Williams syndrome: spectrum and significance of ocular features. *Ophtalmology.* 1988;95:1608-12.

Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and disorders genetic. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D514-7

Heller R, Rauch A, Luttgen S, Schroder B, Winterpacht A. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval Williams-Beuren syndrome. *J Med Genet*. 2003;40:99-doi: 10.1136/jmg.40.8 e99. on line Journal of Genetics go to: http://www.bmjjournals.com/subscriptions/

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.

Jefferson RD, Burn J, Gaunt KL, Hunter S, Davison, EV. A terminal deletion of the long arm of chromosome 4 [46,XX, del(4),(q33)] in an infant with phenotypic features of Williams syndrome. *J Med Genet*. 1986;23:474-80.

Jones KL, Smith DW. The Williams elfin facies syndrome: a new perspective. *J Pediat*. 1975;86:718-23.

Keene WE, JM McAnulty FC, Hesly L P, Wlliams K, Hedberg GL, Oxman TJ, Barrett MA, Pfaller y DW, Fleming. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by Escherichia coli O157:H7 and Shigella sonnei. N. Engl. J. Med. 1994;331:579- 84.

Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 2001;38:740- 4.

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.

Kotzot D, Bernasconi F, Brecevic L et cols: Phenotype of the Williams-Beuren syndrome associated with hemizygosi ty at the elastin locus. *Eur J Pediatr* 1995;154:477-82.

Krinsky-McHale SJ, Kittler P, Brown WT, Jenkins EC, Devenny DA. Repetition priming in adults with Williams syndrome: age-related dissociation between implicit and explicit memory. *Am J Ment Retard*. 2005;110(6):482-96.

Kruse K, Pankau R, Gosch A, Wohlfahrt K. Calcium metabolism in Williams-Beuren syndrome. *J Pediatr*. 1992;121:902-7.

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;57:49-53.

Lu X, Meng X, Morris CA, Keating MT. A novel Human Gene, WSTF, is deleted in Williams Syndrome. *Genomics.* 1998;54,241-9.

Mari A, Amanti F, Mingareli R, Giannot 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;96:444-8.

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*. 1998a;103:590-9.

Meng X, Lu X, Morris CA, Keating MT. A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. Genomics. 1998b;52, 130-7.

Menko FH, Stouthart PJ. Williams syndrome and chromosome 18. *J Med Genet.* 1992;29(9):679-80.

Meyer-Lindenberg A, Kohn P, Mervis CB, Kippenhan JS, Olsen RK, Morris CA, Berman KF. Neural basis of genetically determined visuospatial construction deficit in Williams syndrome. *Neuron.* 2004;43(5):623-31.

Monteserrat M, Carrió A, Sanchez A, Gomes D, Jiménez D, Estivill X, Ballesta F. Caracterización clínica y genética de síndrome de 80 pacientes con sospecha clínica de syndrome de Williams-Beuren. *Med Clin(Barc).* 1999;113:46-9.

Morris CA, Thomas IO, Greenberg F. Williams Syndrome: Autosomal Dominant Inheritance. *Am J Med Genet.* 1993;47:478-81.

Morris CA, Demsey SA, Dilts C, Blackburn BL. Natural history of Williams syndrome physical characteristics. *J Pediatr*. 1998;113:318-26.

Osborne L, Campbell T, Daradich A, Scherer SW, Tsui L. Identification of a putative transcription factor gene (WBSCR11) that is commonly deleted in Williams-Beuren Syndrome. *Genomics*. 1999:57:279-84.

Osborne L, Li M, Pober B, Chitayat D, Bordutha 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;29:321-5.

Osborne L, Scherer SW, Martindale D, Shi XM, Huizenga J, Heng HHQ, Costa T, Poper B, Lew L, Brinkman J, Rommens J, Koop B, Tsui L. Identification of genes from a 500 Kb region at 7q11.23 that is communly deleted in Williams syndrome patients*. Genomics*. 1996;36:328-36.

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

Pagon RA, Bennet FC, Laveck, B, Stewart OT, Johnson J. Williams Syndrome: Features in late childhood and adolescence. *Pediatrics.* 1987;80:85-91.

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;98:324-9.

Paperna T, Peoples R, Wang Y, Kaplan P, Francke U. Genes for the CPE Receptor (CPETR1) and the Human Homolog of RVP1 (CPETR2) Are Localized within the Williams-Beuren Syndrome Deletion. *Genomics.* 1998;54:453-9.

Pascual-Castroviejo I, Pascual-Pascual SI, Moreno Granado F, Garcia-Guereta L, Gracia-Bouthelier R, Navarro Torres M, Delicado Navarro A, Lopez-Pajares D, Palencia Luaces R. Síndrome de Williams-Beuren: presentación de 82 casos. *An Pediatr.* 2004;60:530-6.

Peoples R, Franke Y, Wang YK, Perez-Jurado L, Paperna T, Cisco M, Franke U. A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome-deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet*. 2000;66:47-68.

Pérez-Jurado LA, Wang YK, Peoples R, Coloma A, Cruces J, Francke U. A duplicated gene in breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum Mol Genet*. 1998;7:325-34.

Pober BR, Lacro RV, Rice C, Mandell V, Teele RL. Renal findings in 40 individuals with Williams syndrome. *Am J Med Genet*. 1993;46:272-4.

Portera G, Venturin M, Antonella P, Martinoli E, Riva P, Dalpra L. Characterization of a non-recurrent familial translocation t(7;9)(q11.23;p24.3) points to a recurrent involvent of the Williams Beuren syndrome region in chromosomal rearregements. *J Hum Genet. 2006*;51:68-75.

Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D, Schinzel A. Delineation 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.

Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Carrió A, Milá M. Elastina Mutation screening in a group of patients affected by vascular abnormalities. *Pediatr Cardiol.* 2005;26(6):827-31

Rose C, Wessel A, Pankau R, Partsch CJ, Bursch. Anomlies of the abdominal aorta in Williams-Beuren syndrome-another cause of arterial hypertension. *Eur J Pediatr*. 2001;160:655-8.

Sadler LS, Pober BR, Grandinetti A, Scheiber D, Fekete G, Sharma AN, Urán Z. Differences by Sex in cardiovascular disease in Williams syndrome. *J Pediatrics.* 2001;39:849-52.

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

Sammour ZM. Distúrbios miccionais na síndrome de Williams-Beurem [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2003.

Shaffer LG. Diagnosis of microdeletions syndromes by fluorescent in situ hybridization (FISH). In:Dracopoli NC(editor).current protocols human genetics. New York: John Wiley & Sons. 1995;pp 8.10-8.1-8.10.13.

Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-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;353:1694-701.

Smoot LB. Elastin gene deletions in Williams síndrome. [letter]. *Pediatrics.* 1995;7:698-701.

Soper R, Chaloupka JC, Fayad PB, Greally JM, Shaywitz BA, Awad IA, Puber BR. Ischemic stroke and intracranial multifocal arteriopathy in Williams syndrome. *J Pediatr*. 1995;126:945-8.

Stothard JR, Frame IA, Miles MA. Use of polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis methods for detection of sequence variation of ribosomal DNA of Trypanosoma cruzi. *Int J Parasitol*. 1997;(3):339-43.

Sylos C, Pereira AC, Azeka E, Miura N, Mesquita SM, Ebaid M. Arterial hypertension in a child with Williams-Beuren syndrome (7q11.23 chromosomal deletion). *Arq Bras cardiol*. 2002;79(2):173-80.

Sugayama, S. M.M. Estudo genético-clínico e citogenética molecular pela técnica da hibridização in situ por fluorescência (FISH) em pacientes com síndrome de Williams-Beuren [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Tassabehji M. Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 229-37.

Teo SH, Chan DKL, Yong MH, Ng ISL, Wong KY, Knight L, Ho LY. Williams Syndrome- *The Singapore Hospital Experience*. *Ann Acad Med Singapore*. 1997;26:360-4.

Toga AW, Thompson PM, Sowell ER. Mapping brain maturation. *Trends Neurosci.* 2006;29(3):148-59.

Tupler R, Maraschio P, Gerardo A, Mainieri R, Lanzi G, Tiepolo L. A complex chromosome rearrangement with 10 breakpoints: tentative assignment of the locus for Williams syndrome to 4q33-q35.1. *J Med Genet*. 1992;29:253-5.

Wang MS, Schinzel A, Kotzot D, Balmer D, Casey R, Chodirker BN, Gyftodimo J, Petersen MB, Lopez-Rangel E, Robinson WP. Molecular and Clinical Correlation study of Williams-Beuren Syndrome. *Am J Med Genet* 1999;86:34-43

Williams JCP, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation.* 1961;21:1311-8.

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;78:82-9.

Urban Z, Helms C, Fekete G, Csiszar 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, Csiszár K, Fekete G, Boyd CD. A Tetra nucleotide repeat polymorphism within the human elastin gene (ELNi1). *Clin Genet*. 1997;51:133-4.

Urban Z, Michels VV, Thibodeau SN, Davis EC, Bonnefont JP, Munnich A, Eyskens B, Gewillig M, Devriendt K, Boyd CD. Isolated supravalvular aortic stenosis: functional haploinsufficiency of the elastin gene as a result of nonsense-mediated decay*. Hum Genet*. 2000;106(6):577-88.

Urban Z, Zhang J, Davis EC, Maeda GK, Kumar A, Stalker H, Belmont JW, Boyd CD, Wallace MR. Supravalvular aortic stenosis: genetic and molecular dissection of a complex mutation in the elastin gene. *Hum Genet.* 2001;109(5):512-20.

Valero MC, de Luis O, Cruces J, Perez 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.

Zalzstein E, Moes CAF, Musewe NN, Freedom RM. Spectrum of cardiovascular anomalies in William-Beuren syndrome. *Pediatr Cardiol*. 1991;12:219-23.