

Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Brasil.

Juan Diego Loaiza Medina

**Botucatu – SP
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**"Julio de Mesquita Filho"****INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Brasil.

Juan Diego Loaiza Medina

Orientador:

Prof. DR. Danilo Moretti-Ferreira

Co-orientador:

DRA Deise Helena de Souza

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em ciências biológicas área de concentração genética do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP como pré-requisito para o exame de qualificação.

Botucatu – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Loaiza Medina, Juan Diego.

Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Brasil / Juan Diego Loaiza Medina. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira

Coorientador: Deise Helena de Souza

Capes: 20205007

1. Williams, Síndrome de. 2. Pais e filhos. 3. Citogenética humana. 4. Hibridização in situ. 5. Aconselhamento genético.

Palavras-chave: Citogenética; FISH; SWBinv-1.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas e siglas	III
Lista de imagens	IV
Lista de tabelas	VI
Resumo	VII
Abstract	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	5
1.2. Genética e Etiologia	7
1.3. Inversão SWBinv-1	12
2. OBJETIVO	15
3. JUSTIFICATIVA	16
4. MATERIAL E MÉTODO	17
4.1. Casuística	17
4.2. Ética	17
4.3. Análises da SWBinv-1	18
4.3.1. Sequência na preparação da lâmina de extensão sanguínea (Esfregaço de sangue), técnica de Leishman.	18
4.4. Sequência pré-FISH	18
4.5. Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	19
4.6. Análise Citogenética Molecular	20
4.7. Cultura temporária de linfócitos de sangue periférico	21
4.8. Obtenção de DNA genômico	21
4.9. Análise Estatística	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Análise das células interfásicas	22
5.1.1. Grupo amostral	22
5.1.2. Grupo controle	27
5.2. Tratamento pré-FISH	29
5.3. Cultura temporária de linfócitos de sangue periférico	29

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	34
7. BIBLIOGRAFIA	36
8. ANEXOS	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Devido ao grande número de genes listados neste estudo, os mesmos não serão relacionados nesta lista. Foram considerados os símbolos oficiais dos genes conforme recomendações do Guidelines for Human Gene Nomenclature.

SWB	Síndrome de Williams-Beuren
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
EASV	Estenose aórtica supravalvar
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
SWBinv-1	Inversão na região cromossômica SWB
EAP	Estenose da artéria pulmonar
HII	Hipercalcemia idiopática infantil
QI	Quociente de inteligência
Mb	Megabase
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas de ligação
aCGH	Hibridização genômica comparativa em arrays
HAD	Herança autossômica dominante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LCRs	<i>Low Copy Repeats</i>
NAHR	Recombinações homólogas não – alélica
WBSRC	Região crítica síndrome Williams-Beuren
ABSW	Associação Brasileira de Síndrome de Williams
SAG	Serviço de Aconselhamento Genético
pH	potencial hidrogeniônico
ml	Mililitro
PCR	Reação em cadeia por polimerase

LISTA FIGURAS

Figura 1. A) Tipos de NAHRs: Intra-cromátide, inter-cromátide e inter-crossomial α , β e γ , respectivamente. B) As NAHRs intra-cromátide geram uma deleção e uma molécula de DNA circular, que tem ausente o centrômero e porém não pode se segregar na divisão celular. C) NAHRs entre cromátides ou entre cromossomos produz deleções e duplicações recíprocas. (TURNER et al., 2008).

Figura 2. Esquema estrutural genômico do locus SWB (7q11.23), incluindo as LCRs, centromérico (C), medial (M), telomérico (T) junto com os blocos (A, B, C) e genes que o compõem (Modificada de SCHUBERT et al., 2010).

Figura 3. Deleção atípica de 1,84 Mb entre os blocos Ac e Am. CEN: Centrômero, TEL: Telômero. Imagem modificada de Bayes et al., 2003.

Figura 4. (a) Mecanismo para a origem da inversão polimórfica. Durante o pareamento cromossômico na divisão celular, os grandes duplicons de orientação invertida, contendo os blocos teloméricos e centroméricos, A, B e C, podem favorecer o redobrimento parcial de um cromossomo, permitindo uma sinapse intra-cromossômica ou desigual entre cromátides irmãs. Uma recombinação homóloga não-alélica (X preto) pode ocorrer no bloco C, A, ou B, resultando numa inversão paracêntrica. (b) Mecanismo de geração da deleção SWB em pais heterozigóticos pela inversão polimórfica. A sinapse na região invertida promove o dobramento de ambos os cromossomos, para tentar um emparelhamento de sequências homólogas. Note-se que duplicons centroméricos e teloméricos são idênticos em comprimento nos blocos C e A, mas o bloco Bc é 38 kb mais curto do que bloco Bt, que é idêntico ao Bm. O cromossomo responsável pela SWB é o resultado de crossing-over desigual (X preto) entre o bloco Bt do cromossomo invertido e Bm do normal (tipo 1) ou entre o bloco Bm do alelo invertido e o bloco Bt do normal (tipo 2). Eventos de recombinação em qualquer outro local, dentro dos laços resultaria em ambos os cromossomos acêntricos ou dicêntricos 7 (provavelmente não viáveis). N: cromossomo normal, I: cromossomo invertido. (BAYÉS et al., 2003).

Figura 5. Esquema e interpretação da fluorescência da sonda de fusão simples LIVE® SWBinv-1. A inversão produz que os dois sinais fiquem mais perto, apreciando-se como fusionadas ou adjacentes de cor amarelada.

Figura 6. Esquema sonda de fusão simples: alternativa 1 LIVE® SWBinv-1. A inversão produz que os dois sinais fiquem mais perto, apreciando-se como fusionadas ou adjacentes de cor amarelada.

Figura 7. Detecção da inversão polimórfica em famílias com filhos SWB pela FISH em núcleos interfásicos. A, B) Núcleos interfásico de indivíduos do grupo amostral que não apresentam a inversão (CS002H, CS003M). C, D) A inversão esta presente num dos dois cromossomos 7 do indivíduo (CS0012M, CS049H). A sequência da sonda ao longo do cromossomo 7 está acima. (os sinais negros representam os duplicons). Os sinais superpostos indicam a inversão da região. Em quanto os sinais separados marcam o cromossomo normal.

Figura 8. Comparação de tamanho dos núcleos numa escala 10µm. A) núcleo interfásico após o tratamento pré-FISH. B) núcleo interfásico sem tratamento pré-FISH.

Figura 9. Mosaico cromossômico do indivíduo CS048 M. A) Metáfase e núcleos em interfase mostrando a SWBinv-1 em um dos cromossomos 7 junto com o esquema de interpretação da sonda de fusão simples LIVE® SWBinv-1. B) Núcleos em interfase mostrando os dois cromossomos 7 normais. C) Núcleos em interfase onde um dos cromossomos 7 apresenta a SWBinv-1.

Figura 10. Fluxograma resultados grupo amostral x grupo controle

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Achados clínicos relacionados com a síndrome de Williams Beuren (SWB) de crianças com e sem a deleção 7q11.23 comparado com os dados da literatura. Tomado de Souza et al., (2007).

Tabela 2. Genes deletados da região crítica SWB 7q11.23 identificados até a data.

Tabela 3. Dados grupo amostral

Tabela 4. Dados grupo controle

Tabela 5. Dados comparativos dos resultados esfregaço x cultura de linfócito, grupo amostral.

Tabela 6. Numero de núcleos mosaico esperados segundo Hook (1977).

Tabela 7. Dados comparativos dos resultados esfregaços x cultura de linfócitos, grupo controle.

RESUMO

A síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma rara afecção genética, caracterizada por várias anormalidades físicas, incluindo dismorfismos faciais, anomalias cardiovasculares, deficiência intelectual e de crescimento, perfil cognitivo característico e ocasionalmente, hipercalcemia infantil transitória, com prevalência de 1/7500. A etiologia da SWB é uma deleção hemizigótica de genes contíguos na região cromossômica 7q11.23. Os tamanhos das deleções mais comuns são de 1,5 e 1,8 Mb e abrangem 28 genes. O mecanismo de deleção está diretamente ligado a regiões cromossômicas repetitivas, denominadas *Low Copy Repeats* (LCR). Estas regiões repetitivas estão distribuídas por todo o genoma, constituindo cerca de 5% de seu total e são o substrato para as recombinações cromossômicas (*crossing-over*) durante o processo meiótico. Em algumas ocasiões o processo de recombinação pode ocorrer de maneira desigual entre homólogos não alélicos (*nonallelic homologous recombination – NAHR*), o que pode resultar na deleção, duplicação ou inversão de um gene ou mais genes. Inversões balanceadas podem acarretar em um polimorfismo hemizigótico, tendo sido verificado que a região crítica para SWB está invertida (SWBinv-1) com maior frequência entre genitores de indivíduos com SWB. Dados da literatura sugerem que indivíduos portadores da inversão SWBinv-1 têm uma probabilidade de 22-25% de terem um filho com SWB, comparado com a população geral (5,8%). Nós desenvolvimos uma estratégia para triagem de possíveis portadores de SWBinv-1, dentre os genitores de indivíduos com SWB, para podermos verificar a frequência desta inversão tanto em pais de crianças com SWB como entre pais de crianças sem SWB no Brasil. Desta forma foram realizadas análises de núcleos interfásicos em esfregaço de sangue pela técnica de hibridação "in situ" por fluorescência (FISH) e comparamos com análises de interfásicos e metáfases de cultura de linfócitos. Fizemos parte do grupo amostral 38 casais e do grupo controle 20 casais. Dos 38 casais do grupo amostral apenas 26 casais deram continuidade a pesquisa. E do grupo controle 19 casais. Foram analisadas 32 culturas de linfócitos do grupo amostral onde obtivemos 8 casais com mosaicismos (SWBinv-1) e do grupo controle os 19 casais foram negativos para SWBinv-1.

ABSTRACT

The Williams-Beuren syndrome (WBS) is a rare genetic disorder characterized by various physical abnormalities, including facial dimorphisms, cardiovascular abnormalities, intellectual disability and growth characteristic cognitive profile and occasionally transient infantile hypercalcemia, with a prevalence of 1/7500 . The etiology of SWB is a hemizygous deletion of contiguous genes at chromosome region 7q11.23. The most common sizes of deletions are 1.5 and 1.8 Mb and encompass 28 genes. The mechanism of deletion is directly linked to repetitive chromosomal regions, called Low Copy Repeats (LCR). These repetitive regions are distributed throughout the genome, constituting about 5% of its total and are the substrate for chromosomal recombination (crossing-over) during the meiotic process. In some instances the process of recombination can occur unevenly among homologous non-allelic (homologous recombination nonallelic - NAHR), which can result in deletion, duplication or inversion of a gene or more genes. Balanced inversions can result in a hemizygous polymorphism has been found that the critical region for this inverted SWB (SWBinv-1) with greater frequency among parents of individuals with WBS. Published data suggest that individuals inversion SWBinv-1 has a 22-25% chance of having a child with SWB, compared with the general population (5.8%). We we developed a strategy for screening potential carriers SWBinv-1, among the parents of individuals with WBS, so we can check the frequency of this inversion in both parents of children with SWB as between parents of children without SWB in Brazil. Thus analyzes of interphase nuclei were performed on blood smear by technique hybridization "*in situ*" by fluorescence (FISH) analysis and compared to metaphase and interphase lymphocyte culture. Were part of the sample group and 38 couples in the control group 20 couples. Of the 38 couples in the sample group only 26 couples have continued the search. And 19 couples in the control group. 32 cultures of lymphocytes obtained from the sample group where 8 couples with mosaicism (SWBinv-1) and the control group were analyzed 19 couples were negative for SWBinv-1.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma afecção do grupo das anomalias múltiplas e deficiência intelectual, que foi descrita independentemente por Williams et al., (1961) e Beuren et al., (1962)¹. Esta síndrome é caracterizada por várias anormalidades físicas e de desenvolvimento, incluindo fácies dismórficas que estão sempre presentes, anomalias cardiovasculares congênitas, deficiência intelectual e de crescimento, perfil cognitivo característico, que são muito freqüentes, e ocasionalmente hipercalcemia infantil transitória (AAP, 2001). Outras características clínicas podem estar presentes como: hérnia inguinal e umbilical, íris estrelada, característica vocal rouca, otite média recorrente, alterações dentárias, atraso no crescimento intra-uterino, baixa estatura e baixo peso ao nascimento (SOUZA et al., 2007). Os principais sinais clínicos e suas frequências podem ser observados na tabela 1.

O perfil cognitivo da síndrome de Williams-Beuren é conhecido pelo prejuízo nas habilidades visuo-espaciais e não-verbais (manipulação com números, motricidade e resolução de problemas) que contrasta com o desempenho favorável para as habilidades verbais, as quais têm sido correlacionadas às facilidades para a memória auditiva. Este contraste sustenta a hipótese de dissociação das habilidades de linguagem e cognição, conferindo a esta síndrome um quadro neurocognitivo peculiar (ROSSI et al., 2006). Também apresentam frequentemente hiperacusia, hiperatividade, desinibição social, amabilidade excessiva, insegurança, e baixa capacidade de concentração, características que prejudicam o relacionamento e adaptação social, bem como a aprendizagem (WILLIAMS et al., 1961; BEUREN et al., 1962; BELLUGI et al., 1990; LASHKARI et al., 1999; BELLUGI et al., 2000; SOUZA et al., 2007).

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referência – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

Tabela 1. Achados clínicos relacionados com a síndrome de Williams Beuren (SWB) de crianças com e sem a deleção 7q11.23 comparado com os dados da literatura(). (SOUZA et al., 2007).

Características clínicas	Deleção - positiva		Deleção - negativa	
	Estudo	Lit*	Estudo	Lit*
	(n = 15)	(n = 379) %	(n = 3)	(n = 138) %
Testa larga	15	93	3	38
Boca grande	15	93	3	40
Lábios proeminentes	15	94	3	42
Edema periorbital	13	93	3	36
Filtro nasal longo	12	91	1	36
Hipoplásia malar	12	100	2	92
Ponte nasal baixa	11	91	3	90
Anomalias dentárias	10	64	2	32
Bochechas proeminentes	10	87	3	44
Estreitamento bitemporal	8	88	2	32
Estrabismo	8	51	1	7
Orelhas em abano	7	-	1	-
Microcefalia	6	45	1	38
Mandíbula pequena	6	89	2	43
Iris estrelado	3	39	0	23
Clinodactilia do quinto dígito	13	56	0	43
Deficiência intelectual	15	86	3	66
Sociabilidade excessiva	13	83	3	35
Pequeno para idade gestacional	8	69	0	17
Estatura	7	65	0	40
Peso	4	50	0	35
Dificuldades de alimentação	11	73	1	23
Constipação crônica	12	57	2	24
Hiperatividade	11	75	3	44
Hérnia Inguinal/ umbilical	9	34	2	18
Loquacidade	9	54	0	14
Voz roca	8	74	2	26
Baixa estatura	9	57	0	43

Hipotonia	7	72	1	57
Problemas respiratórios	7	-	2	-
Estenose aórtica supravalvar	6	60	0	10
Outras cardiopatias	3	43	0	32
Vômitos	5	73	1	23
Otite média crônica	4	29	0	0
Problemas renais	4	18	0	8

A SWB é causada por uma microdeleção hemizigótica de 28 genes (tabela 2) do braço longo do cromossomo 7 (7q11.23), alguns destes genes codificam proteínas estruturais, fatores de transcrição (reguladores da expressão de outros genes), receptores de membrana e outras proteínas implicadas na transdução do sinal intracelular.

Aproximadamente 96% dos casos com diagnóstico clínico positivo para SWB, apresentam o gene da elastina (*ELN*) deletado. O gene *ELN* tem um tamanho aproximado de 45 Kb e codifica um mRNA de 3,5 Kb. Possui 34 éxons com uma proporção íntron: éxon 19:1 (NICKERSON et al., 1995).

Tabela 2. Genes deletados da região crítica SWB 7q11.23.

GENE	DESCRIÇÃO
POM121	Proteína que controla o tráfego bidirecional de macromolecular na membrana celular (POWERS et al., 1999). Componente do complexo de poros nucleares (NPCs). Os NPCs também influenciam a expressão gênica, organização da cromatina, e herança (MITCHELL et al., 2010).
NSUN5/WBSCR20	Pertence à superfamília metiltransferase. Família RSMB / NOP. Detectada na placenta, no rim e músculo esquelético (DOLL e GRZESCHIK, 2001).
FKBP6	Gene que tem homologia com a proteína de ligação Fk-560 da classe das imunofilinas. Pode estar associado à hipercalcemia e atraso de crescimento na síndrome (MENG et al., 1998a). Desempenha um papel no emparelhamento homólogo dos cromossomos na meiose e a fertilidade masculina em modelos de rato (METCALFE et al., 2005).
FZD9	Gene que codifica um receptor trans-membrana humano homólogo ao gene receptor para a proteína wg (asa vestigial) da <i>Drosophila</i> (WANG et al., 1997).
WBSCR9/WSTF	Transcrito que codifica um coativador transcricional (LU et al., 1998; PEOPLES et al., 2000).
BCL7B	Sequência relacionada ao gene identificado na linhagem celular do linfoma de Burkitt (JADAYEL et al., 1998; MENG et al., 1998b).
TBL2/WS-bTRP	Membro da família de genes b-transducina (PEREZ-JURADO et al., 1999).
WBSCR14/WB-bHLH	Codifica o fator de transcrição da superfamília Myc/Max/Mad (MENG et al., 1998b).
VPS37D/WBSCR24	Proteína vacuolar. Expresso normalmente no cérebro, rins, e no músculo esquelético (MICALE et al., 2008).
DNAJC30/WBSCR18	Proteína de 226 aminoácidos que contém um domínio J, envolvido no dobramento de proteínas. Expresso no cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, baço, estômago e do testículo (MERLA et al., 2002).
WBSCR22	Proteína com <i>motif</i> de ligação Sadenosil-L-metionina. Pode estar envolvida com metilação do DNA. Expresso no rim, baço, fígado, pulmão (MERLA et al., 2002).
STX1A	Gene da syntaxina 1A, envolvido na liberação de neurotransmissores nas vesículas

	sinápticas (ZHANG et al., 1995).
ABHD11/WBSCR21	WBSCR21 codifica uma proteína putativa de 315 e 307 resíduos, com 84% semelhanças e de domínio - β hidrólise (MERLA et al., 2002).
CLDN3	Família das claudinas, receptor de enterotoxinas. Parte das estruturas de união entre células/barreras entre tecidos epiteliais (COYNE et al., 2003).
CLDN4	Família das claudinas, receptor de enterotoxinas. Parte das estruturas de união entre células/barreras entre tecidos epiteliais (COYNE et al., 2003).
WBSCR27	Função desconhecida
WBSCR28	Função desconhecida
ELN	Proteína estrutural, componente de fibras elásticas (ROSEMBLOMM et al., 1984). Cardiopatia, característica vocal rouca, envelhecimento precoce, hérnias, frouxidão das articulações (EWART et al., 1993; DUBA et al., 2002; CURRAN et al., 1993)
LIM-quinase 1 (LIMK1)	É o segundo gene mais frequentemente deletado nos pacientes com SWB. Seu produto gênico a tirosina quinase está implicada no crescimento de axônios. LIMK1 é um forte candidato para as características neurológicas não explicadas da síndrome de Williams-Beuren (TASSABEHJI et al., 1996).
WSCR1/EIF4H	Fator de translação-iniciação semelhante ao transcrito parcial do gene WSCR1 (OSBORNE et al., 1996).
WBSCR15/LAT2	Proteína expressada nos leucócitos do sangue periférico, placenta, pulmão e, com menor expressão no baço, coração, cérebro, fígado e pâncreas (DOYLE et al., 2000)
RFC2	Subunidade 2 do complexo fator de replicação C. Reaparo e alongação do DNA durante a replicação (WANG et al., 2000)
CYLN2/CLIP-115	Codifica uma proteína de ligação intracelular semelhante aos transcritos parciais dos genes WSCR3 e WSCR4 (HOOGENRAAD et al., 1998).
WBSCR11/GTF3 /GTF2IRD1	Regulador transcricional, proteína ligadora. Envolvida no desenvolvimento craniofacial e cognitiva de mamíferos (TASSABEHJI et al., 2005). A haploinsuficiência do gene GTF3 pode ser a causa do cansaço muscular anormal que é característica da síndrome de Williams (TASSABEHJI et al., 1999).
GTF2I/BAP135/SPIN	Codifica o fator de transcrição TFIIII/ SPIN/BAP-135 Fator iniciador da transcrição implicada na transcrição basal e ativada (PEREZ-JURADO et al., 1998).
NCF1	Fator citosólico dos neutrófilos, também conhecida como p47-phox (por fagócitos oxidase), é um componente do complexo de NADPH-oxidase (VOLPP et al., 1989)
FZD3	Gene envolvido no neurodesenvolvimento rostro-caudal e na diferenciação celular (SCHMITT, 2001).
CPETR1	Receptor de enterotoxina expresso no rim, pulmão, intestino e tireóide (SCHMITT, 2001).

Uma translocação recíproca t(6;7)(p21.1; q11.23) familiar associou a disrupção do gene *ELN* com a estenose aórtica supravalvar (EASV) principal característica fenotípica descrita da síndrome. A EASV esta presente em aproximadamente em 65% dos casos com SWB. A partir desta descrição o estudo foi replicado nos casos com EASV, sendo confirmada a mutação do gene *ELN* na região 7q11.23 (MORRIS et al., 1993; CURRAN et al., 1993)

Outras características importantes, como a hipercalcemia, o perfil neuropsicológico e a deficiência intelectual não são decorrentes da deleção no gene da elastina.

Apesar da correlação genótipo-fenótipo do gene *ELN* estar bem caracterizada, a haploinsuficiência para outros genes ainda não esta clara, principalmente, em relação ao fenótipo neurocognitivo, mas se sabe que o gene *LIMK 1* é preferencialmente expresso em

alguns núcleos do sistema neuromotor, e desempenha papéis na diferenciação das populações de células neuronais (MORI et al., 1997).

O diagnóstico clínico da SWB é feita por avaliação clínica, geralmente durante a infância, quando as características faciais típicas são mais evidentes, tornando-se reconhecível desde os 4 meses de idade (MORRIS et al., 1988). Entretanto, a grande variabilidade fenotípica nesta síndrome, muitas vezes dificulta e atrasa o diagnóstico clínico. Assim, a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) tem sido usada para confirmar o diagnóstico clínico e demonstrar a microdeleção da banda 7q11.23 no cromossomo 7 (LOWERY et al., 1995; SOUZA et al., 2007).

Outros critérios para o diagnóstico da SWB consistem em hérnias umbilicais e inguinais, contraturas articulares, sinostose radioulnar e estrabismo (MORRIS et al., 1998; LASHKARI et al., 1999).

Estudos prévios, Osborne et al., (2001); Bayes et al., (2003); Frohnauer et al., (2010) e Hobart et al., (2010) verificaram que uma inversão na região crítica 7q11.23 (SWBinv-1) presente em 24,9% dos genitores de pacientes com a SWB pode causar o mal pareamento do cromossomo 7 e levar a uma deleção ou duplicação. A frequência deste poliformismo é bastante alta comparada com a população geral (5,8%).

1.1 Histórico

A SWB foi inicialmente descrita por Williams et al., (1961) na Nova Zelândia. As quatro crianças que foram avaliadas neste estudo apresentavam EASV, deficiência intelectual, alterações no crescimento e aspectos faciais distintos. Independentemente, um ano após, Beuren et al, (1962) na Alemanha, descreveram 4 pacientes com estenose da artéria pulmonar (EAP), estrabismo, anomalias dentárias e crianças de natureza amigável, além das característica já mencionadas anteriormente.

Apesar das primeiras descrições detalhadas da síndrome terem sido atribuídas à Williams e Beuren, existem relatos prévios na literatura de pacientes com hipercalcemia idiopática infantil (HII) tipo Fanconi que apresentavam características semelhantes às da SWB (BLACK e BONHAM-CARTER, 1964).

Os sinais clínicos como fácies característica, atraso de crescimento, dificuldades na alimentação, vômitos persistentes, irritabilidade, constipação, hipotonia, alterações renais, sopro cardíaco e deficiência intelectual caracterizavam a HII tipo Fanconi (FANCONI et al., 1952; MARTIN et al., 1984).

A síndrome de Williams-Beuren tem sido relacionada com o incremento dos níveis de cálcio na infância, assim como uma alteração na produção do hormônio calcitonina (SOTILLO e NAVARRO, 1998).

Outras pesquisas deram ênfase aos traços faciais existentes entre crianças com SWB e HII, além do sopro cardíaco. Tomando como referência este ponto, propuseram que o sopro cardíaco da HII poderia estar relacionada com lesões estenóticas evidenciadas na SWB. Uma segunda comparação seria uma hipercalcemia não diagnosticada que se resolvia espontaneamente em crianças com SWB. Martin e Cohen (1984) sugeriram que a variabilidade fenotípica entre SWB e HII podia representar uma alteração genética comum.

O vínculo entre as duas doenças ficou claramente estabelecido quando Garcia et al., (1964) descreveram um recém nascido que apresentou hipercalcemia, EASV e EAP, tendo evoluído com fácies característica e deficiência intelectual.

O fenótipo intelectual e cognitivo é específico para crianças com SWB. Em um estudo comparativo (idade, sexo, classe social e inteligência), as crianças com SWB mostraram diferenças em aspectos emocionais e de conduta, quando comparado com o grupo controle, particularmente em relação à concentração e ansiedade, também apresentavam uma pobre capacidade visuo-espacial e motora, mas, estes déficits não afetavam as capacidades não verbais. A capacidade de memória visual em SWB era tão boa como os controles e exibiam um melhor rendimento no reconhecimento facial (UDWIN e YULE, 1991).

Outros autores observaram que as crianças com SWB embora parecessem inseguras e ansiosas, comportavam-se com desinibição e loquacidade, distinguindo-se por sua grande habilidade verbal apesar de baixo quociente de inteligência (QI) (BELLUGI et al., 2000). Considerasse que até 90% de crianças e adultos com SWB são hipersensíveis a uma variedade de sons, incluindo os produzidos por máquinas de lavar, aspiradores ou de menor intensidade como trovões repentinos (UDWIN e YULE, 1991).

O perfil neuropsicológico de um grupo de indivíduos com SWB foi avaliado da infância até a vida adulta, e apresentaram algumas características como: amabilidade excessiva, baixa estatura e microcefalia (JONES e SMITH, 1975).

A EASV tem sido descrita como doença infrequente, causada por deleção no cromossomo 7q11.23, provocando uma deficiência na produção do precursor da elastina, a tropoelastina, o que desencadeia a perda da elasticidade da parede dos vasos (BONINI et al., 2010). A relação entre EASV e SWB foi comprovada em um estudo molecular (marcadores de DNA no braço longo do cromossomo 7 D7S371, D7S395, D7S448 e *ELN*) em duas famílias com EASV. Os resultados demonstraram que a perda do gene da *ELN* no braço longo

do cromossomo 7, pode ser responsável pela EASV e pode explicar as anormalidades cardíacas nos indivíduos (EWART et al., 1993).

Outro estudo, com uma família com EASV de caráter autossômico dominante, foi identificada uma translocação t(6;7)(p21.1;q11.23) que causava a ruptura do gene da elastina, diminuindo a expressão da proteína no tecido vascular, influenciando a elasticidade dos vasos sanguíneos, pulmões, intestino e pele (MORRIS et al., 1993).

A citogenética clássica pelo bandeamento G (Giemsa) é útil para identificar translocações, deleções, inversões e outros tipos de rearranjos cromossômicos, mas o nível de resolução não possibilita as análises da microdeleção 7q11.23. No entanto, a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) detecta deleções inferiores a 5 Mb e é considerada “padrão-ouro” para a confirmação do diagnóstico laboratorial (HOOVERS et al., 1999; SOUZA et al., 2007).

Esta técnica baseia-se na ligação de sondas de DNA marcadas com fluorocromo que se liga ao gene da *ELN*. A marcação cromossomo-específica é visualizada como pontos fluorescentes de cores diferentes, mostrando a presença de um alelo da *ELN* em vez de dois alelos (MALUF; RIEGEL, 2011).

Vários pesquisadores utilizaram e comprovaram a eficácia da técnica da FISH em pacientes com diagnóstico clínico da SWB, com uma fidelidade (FISH positivo) entre 85% e 100% (BORG et al., 1995, HIROTA et al., 1996, BREWER et al., 1996, ELÇIOGLU et al., 1998, SUGAYAMA, 2001 e SOUZA et al., 2007). Mesmo sendo o método “padrão-ouro” para o diagnóstico da SWB os custos limita o uso da mesma. Atualmente os testes diagnósticos para detecção da deleção podem ser realizados pela FISH, amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA) ou hibridização genômica comparativa em microarranjos aCGH (MORRIS, 2000). Estas técnicas permitem o diagnóstico laboratorial e assim melhoram a abordagem terapêutica, a prevenção das complicações e o aconselhamento genético adequado.

1.2 Genética e Etiologia

A SWB é considerada uma síndrome de deleção de genes contíguos da região 7q.11.23, afetando mulheres e homens em igual proporção, de qualquer etnia e com padrão de herança autossômica dominante (HAD). Morris et al., (1993) relataram 3 famílias onde pais e filhos foram diagnosticados com SWB, seguindo este padrão. Outros raros casos familiares

reportados tem sido de transmissão mãe-filho (MORRIS et al., 1993; SADLER et al., 1993) ou de gêmeos idênticos (CASTORINA et al., 1997).

A maioria dos casos é de origem *de novo*, com uma prevalência entre 1/7.500 a 1/20.000 nascimentos (STROMME et al., 2002), considerada uma entidade rara pela maioria dos autores (LASHKARI et al., 1999). Como a síndrome é de HAD, os afetados têm 50% de probabilidade de transmitir a deleção para seus descendentes. Quando os pais não são afetados o risco de recorrência é geralmente baixo.

Um rearranjo intercromossômico desigual (pareamento incorreto) entre os cromossomos na meiose seria a causa ou a origem da deleção, que pode ocorrer em uma região contendo sequência repetidas de DNA, como a região da SWB 7q11.23 (SCHUBERT, 2009).

Estas regiões repetitivas são chamadas “repetições com baixo número de cópias”, LCRs (*Low Copy Repeats*), que consistem geralmente de blocos de DNA de ~10-400 Kb com uma identidade > 97%. As LCRs podem conter genes, fragmentos de genes ou pseudogenes. Em contraste com outras repetições, as LCRs frequentemente parecem se localizar preferencialmente perto dos centrômeros ou telômeros de cromossomos humanos. O tamanho, a orientação e disposição relativa das LCRs afetam a arquitetura do genoma de tal forma que eles resultam em regiões genômicas que são instáveis e propensas a recombinações homólogas não - alélicas (NAHRs). A combinação desta arquitetura particular e NAHRs podem resultar em rearranjos de cromossomos incluindo deleções, duplicações, inversões e translocações (LUPSKY, 1998; STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002).

As NAHRs (Intra-cromática, inter-cromática e inter-crossomica) (Figura 1) entre LCRs desalinhadas é o mecanismo mais recorrente para gerar a duplicação ou deleção da SWB a qual é quase idêntica na maioria dos casos. Quando estes desalinhamentos ocorrem em LCRs orientados no mesmo sentido causam, deleções e duplicações, ou inversões quando o pareamento ocorre em LCRs com orientação invertida.

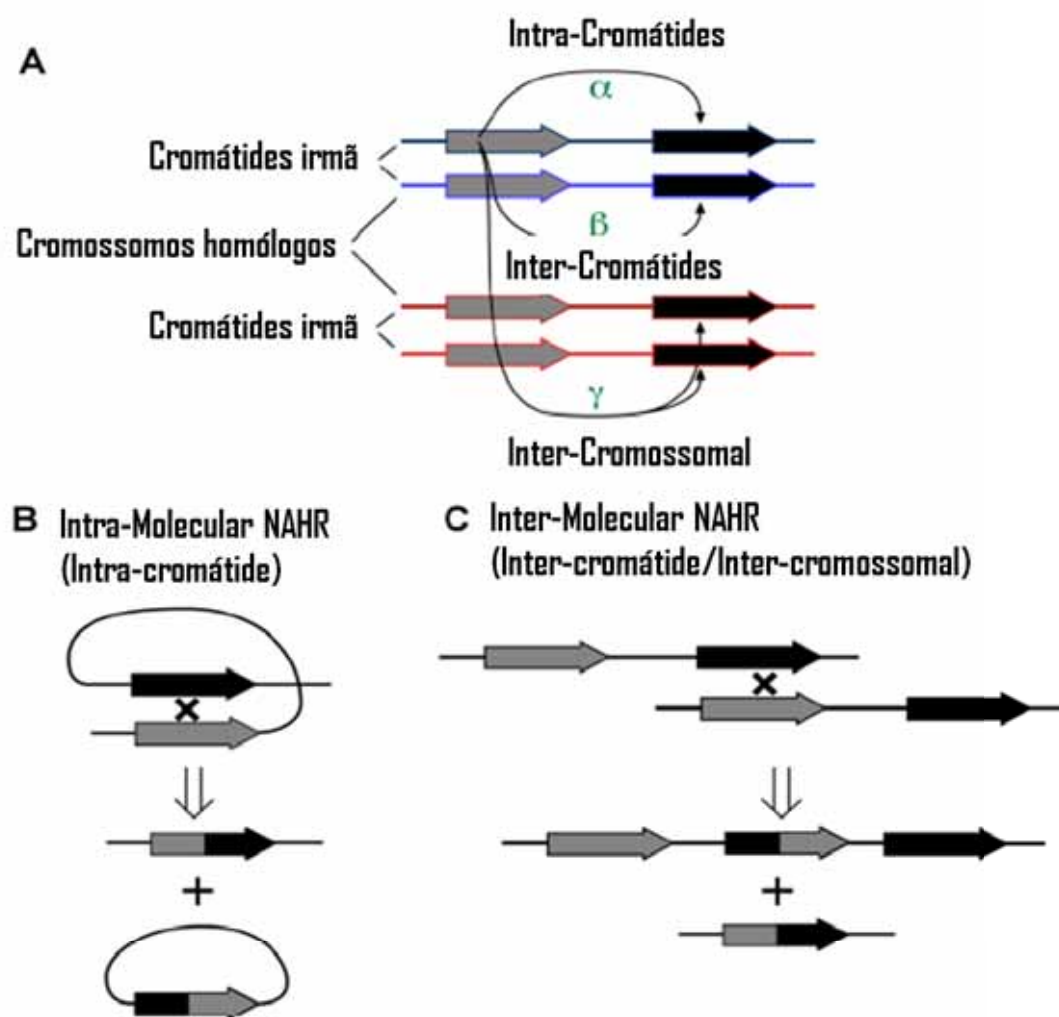


Figura 1. A) Tipos de NAHRs: Intra-cromática, inter-cromática e inter-crossomica α , β e γ , respectivamente. B) As NAHRs intra-cromáticas geram uma deleção e uma molécula de DNA circular, que tem ausente o centrômero e assim não pode se segregar na divisão celular. C) NAHRs entre cromátides ou entre cromossomos produz deleções e duplicações recíprocas. (Modificada de TURNER et al., 2008).

Análises de haplótipos com marcadores polimórficos têm demonstrado que as NAHRs intercromossômicas são a causa de 2/3 dos cromossomos deletados, entretanto as NAHRs intracromossômicas entre cromátides irmãs, tem como resultado 1/3 das deleções nos cromossomos (DUTLY e SCHINZEL, 1996; BAUMER et al., 1998, URBAN et al., 1996; THOMAS et al., 2006).

Existe um segundo tipo de evento que conduzem as NAHRs e são as sequências *Alu* (pequenos transposons no genoma humano de mais ou menos 300 pb). Os mecanismos de

mutação das sequências *Alu* vão desde interromper um gene (alternando sua expressão), alteração de um sítio de *splicing* ou induzindo recombinação homóloga não alélica, gerando duplicações e deleções. O gene *ELN* possui grandes sequência *Alu* repetitivas na sua extremidade 3' (MORRIS et al., 1998). Ewart et al., 1994, cita que nem sempre este tipo de elementos repetitivos estão envolvido nos mecanismos das mutações (deleções), mas são relacionados com as mutações geradoras de EASV (NICKERSON et al., 1995), mas nem todos os autores estão de acordo que este mecanismo leva a uma deleção.

A região crítica para a síndrome de Williams-Beuren (RCSWB), é flanqueada por três grandes LCRs ou duplicons, cada um composto por três blocos diferenciados, denominados A, B e C (sequências repetitivas de alta similaridade), os quais estão localizados na região centromérica (cen), medial (mid) e telomérica (tel) do locus da SWB (A, B, C cen, A, B, C mid e A, B, C tel) (SCHUBERT, 2009; HOBART et al., 2010; BAYES et al., 2003). (Figura 2).

As origens das sequências LCRs na região da SWB ocorreram aproximadamente há 25 milhões de anos atrás após a separação dos primatas e hominídeos. A partir de uma sequência ortóloga, uma primeira inversão paracêntrica ocorreu entre 7q11 e 7q22, seguida de uma duplicação de um gene ancestral *STAG3* (bloco B), formando assim o bloco A (SHUBERT, 2009).

Os blocos das LCRs centromérica e medial estão na mesma orientação, embora de forma diferente. A terceira LCR encontra-se mais distante, na região telomérica, com a mesma ordem da LCR centromérica, mas em orientação oposta (Figura 3). A região genômica do Bloco A está composto por quatro pseudogenes diferentes: *STAG3*, *PMS2*, *GATS* e o fragmento *WBSCR19*. Estes genes são principalmente duplicações segmentares de outras regiões no cromossoma 7. O gene ancestral do *GATS* e *STAG3* estão localizados na região 7q22, o gene *PMS2* transcricionalmente ativo está posicionado no braço curto do cromossoma 7 (7p22) (SCHERER et al., 2003).

O Bloco B é composto por três genes: *GTF2I*, *GTF2IRD2* e *NCF1*. A cópia transcricionalmente ativa do *GTF2I* codifica um fator de transcrição (membro do fator de transcrição da família TFII-I), está localizada na parte medial do bloco B. As cópias do gene de *GTF2I* na parte centromérica e telomérica são transcritos como proteínas truncadas. O gene *GTF2IRD2*, que também é um membro da família TFII-I, parece ser totalmente transcrito em paralelo pelas cópias medial e telomérica do bloco B, a cópia de *GTF2IRD2* centromérico não é expressa, por falta dos exons 1 e 2. Um terceiro membro desta família de gene é o gene *GTF2IRD1*, o qual é um locus de cópia única, localizado na cópia medial deste

bloco LCR (PEREZ-JURADO et al., 1998; WANG et al., 1998; KORENBERG et al., 2000). Enquanto o Bloco C está composto por quatro genes: POM121, NSUN5, TRIM50 e FKBP6 (HOCKENHULL et al., 1999; FUNAKOSHI et al., 2007; MICALE et al., 2008; ANTONELL et al., 2005).

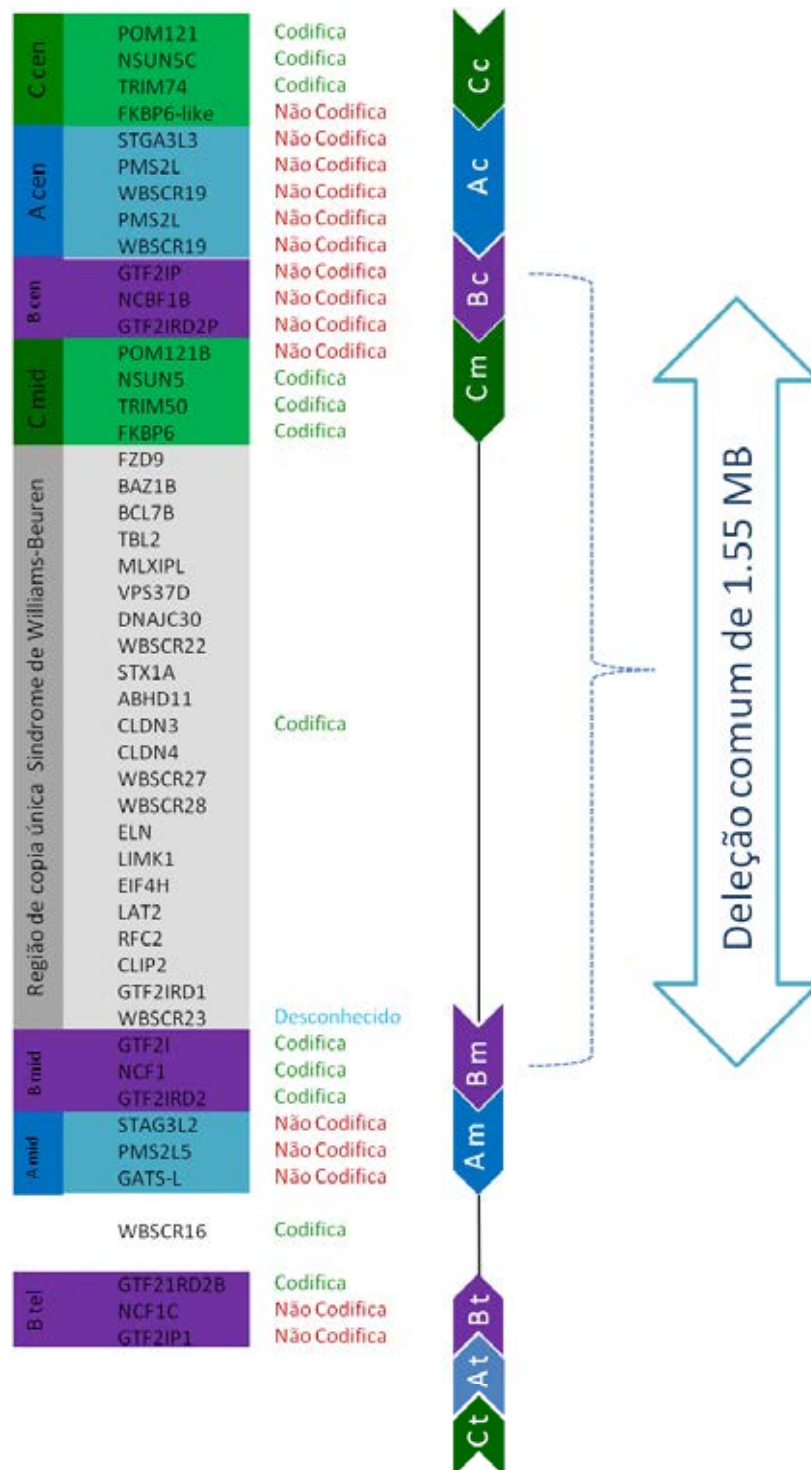


Figura 2. Esquema estrutural genômico do locus SWB (7q11.23), incluindo as LCRs, centromérico (C), medial (M), telomérico (T) junto com os blocos (A, B, C) e genes que o compõem. (Modificada de SCHUBERT et al., 2010).

A deleção comum de 1,55 Mb contém 28 genes de cópia única na WBSRC, esta perda ocorre pela recombinação desigual entre os segmentos centroméricos e medial do Bloco B (presente em 96% dos casos), que se encontram na mesma orientação (OSBORNE et al., 1996; PEOPLES et al., 2000; OSBORNE et al., 2001; SCHUBERT et al., 2009).

O resultado da recombinação entre os Blocos Ac e Am (Figura 3) é uma deleção maior (1,84 Mb) da região, devido a distância entre elas, porém um fenótipo mais grave, só aparece em 5-8% de todos os casos SWB (WU et al., 1999). Outras deleções atípicas menores (950 Kb e 850 Kb) já foram descritas, mesmo com diagnóstico clínico menos característico, mas que incluem EASV e deficiência intelectual (HELLET et al., 2003).

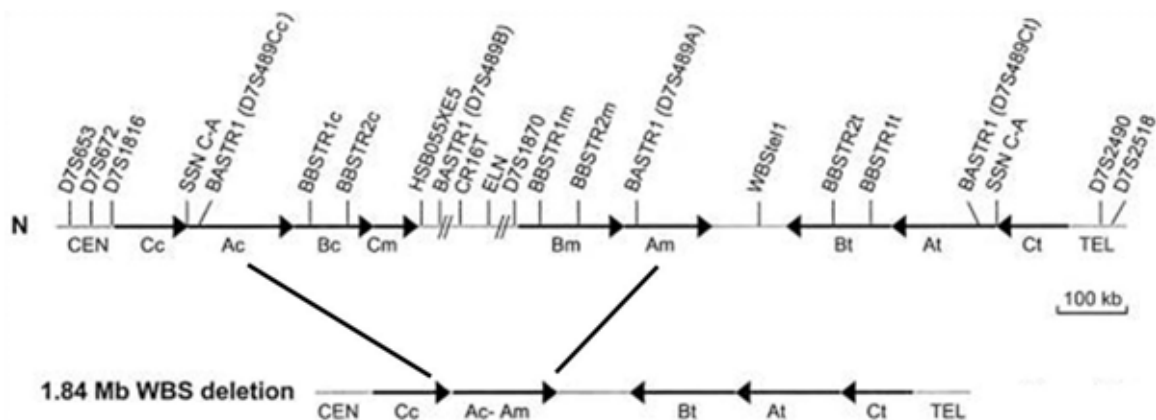


Figura 3. Deleção atípica de 1,84 Mb entre os blocos Ac e Am. CEN: Centrômero, TEL: Telômero. Imagem modificada de Bayes et al., 2003.

Entretanto, com relação ao *imprinting* genômico não existe uma diferença significativa, Hobart et al., (2010), afirmaram que a porcentagem de origem materna da deleção SWB é de 50,6% (130 de 257) e 49,4% (127 de 257) de origem paterno, estes dados sugerem que não existe uma diferença entre gêneros na transmissão do cromossomo responsável pela SWB (PEREZ JURADO et al., 1996; PEOPLES et al., 2000; VALERO et al., 2000; BAYÉS et al., 2003; SCHUBERT, 2009).

Outros tipos de rearranjos têm sido descritos para a região SWB, e um deles é um polimorfismo hemizigótico identificado como inversão da região SWB (SWBinv-1) e é encontrada com maior frequência entre genitores de indivíduos com SWB. Não obstante, Scherer et al., (2005), descreveram duas famílias com genitores não afetados (sem SWB) em que irmãos com SWB tinham deleção e apenas uma dessas famílias o genitor apresentava a inversão da região SWBinv-1. Enquanto, Osborne et al., (2001), identificaram 4/12 de

famílias (33%), com uma pessoa afetada pela deleção, onde os genitores eram portadores da inversão polimórfica.

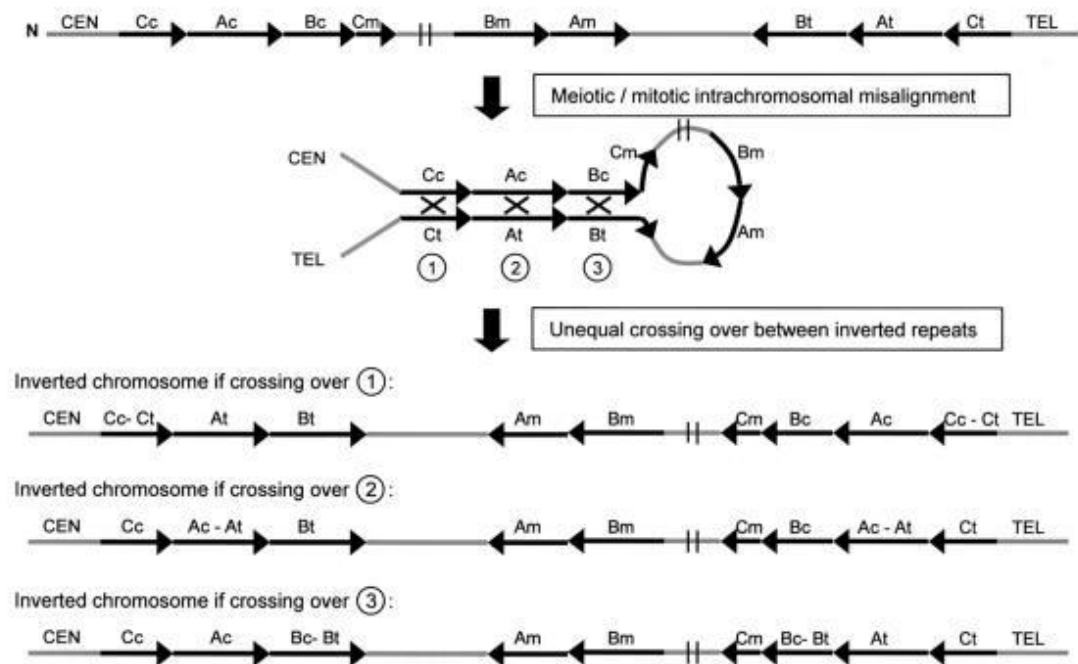
Estes resultados sugerem que a presença de uma variante genômica dentro da população pode estar associada com a SWB e resultando em uma predisposição a microdeleções, mas também podem causar translocações, inversões e duplicações.

1.3 Inversão SWBinv-1

A inversão da região 7q11.23 pode ocorrer pelo pareamento incorreto dos blocos LCRs centromérico e telomérico.

A recombinação desigual do cromossomo invertido e o homólogo normal (ocorre nos últimos 38 Kb dos blocos Bm e Bt) provocando a deleção da WBSRC (1.55 Mb). Isso pode ocorrer devido ao cruzamento dos blocos Bt do cromossomo invertido e do bloco Bm do homólogo não invertido (tipo 1) ou do bloco Bm do cromossomo invertido com o bloco Bt do homólogo normal (tipo 2), que por sua vez, leva a uma pequena inversão na região, entre as LCRs telomérico e medial (Figura 4).

a. GENERATION OF THE INVERSION



b. GENERATION OF THE WBS DELETION IN INVERSION CARRIERS

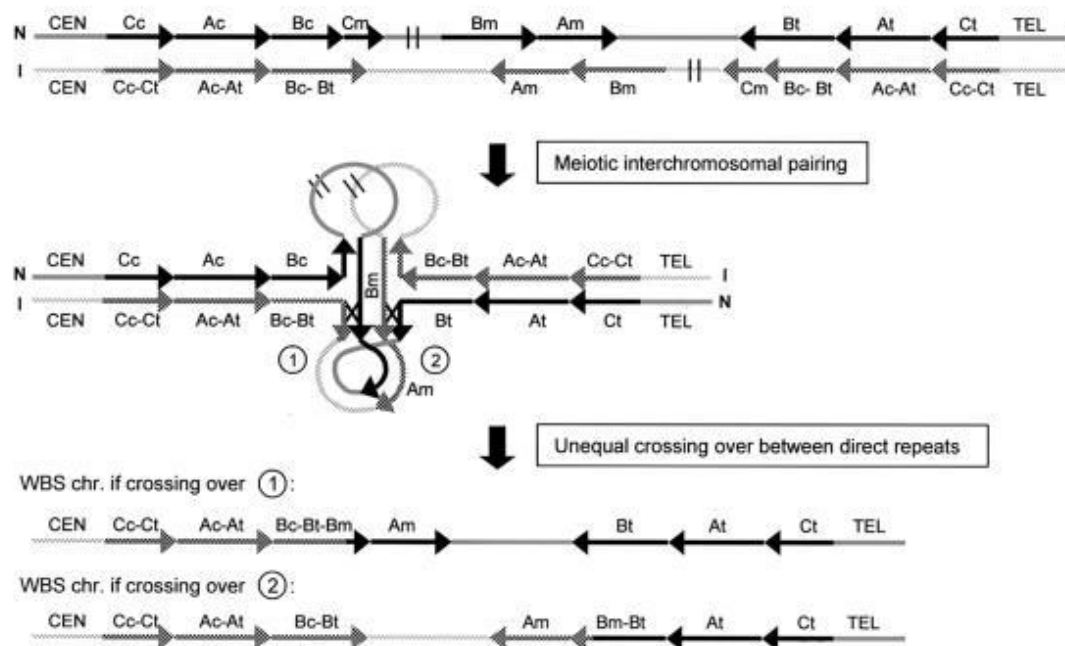


Figura 4. (a) Mecanismo para a origem da inversão polimórfica. Durante o pareamento cromossômico na divisão celular, os grandes duplicons de orientação invertida, contendo os blocos teloméricos e centromérico, A, B e C, podem favorecer o redobramento parcial de um cromossomo, permitindo uma sinapse intra-cromossômica ou desigual entre cromátides irmãs. Uma recombinação homóloga não-alélica (X preto) pode ocorrer no bloco C, A, ou B, resultando numa inversão paracêntrica. (b) Mecanismo de geração da deleção SWB em pais heterozigóticos pela inversão polimórfica. A sinapse na região invertida promove o dobramento de ambos os cromossomos, para tentar um emparelhamento de sequências homólogas. Note-se que duplicons

centroméricos e teloméricos são idênticos em comprimento nos blocos C e A, mas o bloco Bc é 38 kb mais curto do que bloco Bt, que é idêntico ao Bm. O cromossomo SWB é o resultado de crossing-over desigual (X preto) entre o bloco Bt do cromossomo invertido e Bm do normal (tipo 1) ou entre o bloco Bm do alelo invertido e o bloco Bt do normal (tipo 2). Eventos de recombinação em qualquer outro local, dentro dos laços resultaria em ambos os cromossomos acêntricos ou dicêntricos 7 (provavelmente não viáveis). N: cromossomo normal, I: cromossomo invertido. (BAYÉS et al., 2003).

A preferência do Bloco B como substrato para as recombinações homólogos e pontos de quebra na região é possivelmente devido ao alto grau de identidade dos blocos Bc-Bm (99,6%), comparado com o 98,2% de identidade dos blocos Ac-Am. A porcentagem de elementos repetitivos no bloco B foi estimado em 49,7% na sequência, o qual é maior que a média de 34% calculado para o DNA com o mesmo número de CG (SMITH, 1996).

Por outro lado, Tam et al., (2008) estudaram a expressão gênica da região 7q11.23 em três indivíduos normais com o polimorfismo SWBinv-1. Os resultados sugeriram que os indivíduos com o polimorfismo SWBinv-1 apresentavam uma expressão normal dos genes na região, sem interrupção da expressão gênica e sem sintomas clínicos, pois o ponto de quebra da inversão não altera sequências funcionais no bloco B (centromérico e medial), que são comumente deletados na SWB, e que provavelmente, elementos regulatórios para outros genes também não são afetados. Embora a expressão do gene STX1A foi estatisticamente elevada no grupo WBSinv-1, o aumento foi modesto (1,188 vezes comparado com os nível em indivíduos sem o polimorfismo WBSinv-1).

Este polimorfismo cromossômico está presente em 25% das transmissões cromossômicas parentais da população de pacientes com SWB (BAYÉS, et al., 2003; OSBORNE et al., 2001).

Na população normal (pessoas que não tem SWB ou portadoras de outro tipo de malformação) a presença da inversão está presente em cerca de 5% (OSBORNE et al. 2001; HOBART et al., 2004), sugerindo que a SWBinv-1 é uma predisposição ao rearranjo cromossômico, aumentando a chance de recombinações meióticas desiguais nas células germinativas de indivíduos com inversão. Mesmo sendo 5% a taxa da inversão na população normal continua sendo baixa comparada com outras síndromes causadas por inversões, como síndrome de Prader-Willi/Angelman, na região 15q11 (9%) ou a inversão da região 8p (26%) que abrange um grupo de genes que codificam receptores olfatórios (MALUF; RIEGEL, 2011).

Estudo realizado com 257 casais com filhos com SWB, verificou que 64 genitores (24,9%) possuíam a SWBinv-1 e que 15 genitores (5,8%) com filhos sem SWB, da população

normal também tinham esta inversão. Assim, um genitor de SWB com SWBinv-1 possui um risco 5 vezes maior de ter um outro filho com SWB do que pais de SWB sem a inversão. Usando estes dados e a frequência de 1: 7500 na população (HOBART et al., 2010) foi calculado que um genitor com SWBinv-1 possui um risco de 1/1750 de ter outro filho com SWB, e que pais sem SWBinv-1 tem um risco de 1/9500 de terem outro filho com SWB.

2. OBJETIVO

Estimar a frequência do polimorfismo genômico (SWBinv-1) na região 7q11.23 em genitores com filhos com Síndrome de Williams-Beuren em comparação com um grupo controle de genitores com filho(s) normais (sem SWB) na população brasileira.

3. JUSTIFICATIVA

A SWB é um defeito congênito do desenvolvimento causado por uma deleção na região 7q11.23. A deleção é variável e os estudos genéticos em pacientes afetados pela síndrome põem em evidência a relação entre o tamanho da deleção e o comportamento (sintomas) clínico, indicando que se trata de uma síndrome de genes contíguos.

Estudos prévios feitos por Osborne *et al.*, 2001; Bayes *et al.*, 2003; Frohnauer *et al.*, 2010 e Hobart *et al.*, 2010 entre outros, estimam que a frequência da inversão polimórfica em genitores da SWB é bastante alta (24.9%) comparada com a população geral (5,8%).

Na atualidade o Brasil não conta com um estudo que possa aclarar esta estimativa, por tal motivo este estudo estará baseado na procura das frequências de inversões polimórficas em pais com filhos SWB em relação a população geral no país.

Sendo a população brasileira heterogênea, com muita miscigenação, pretendemos com este estudo verificar a frequência da ocorrência da SWBinv-1 em um grupo de 100 famílias com pelo menos um afetado com SWB e 100 famílias com pelo menos 1 filho normal (sem a SWB) e assim podermos utilizar estes dados com maior acurácia para o aconselhamento genético nestas famílias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

O presente estudo tem sua casuística composta por dois grupos:

Grupo amostral formado por 100 casais (200 genitores), brasileiros com pelo menos um filho (a) com SWB, triados junto ao banco de dados do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – IBB/Unesp e a Associação Brasileira de Síndrome de Williams (ABSW) São Paulo, SP. Foram realizadas apresentações da pesquisa na sede da ABSW para oficializar o convite e subsequentemente a coleta do material biológico.

Grupo controle, formado por 100 casais (200 genitores) brasileiros com filho (s), (a) normal (is) - para este estudo filho (a)(s) normal(is) tem como significado não ter a SWB - triados junto aos funcionários administrativos, professores da UNESP, sem vínculo de hierarquia com o orientador, e de pessoas que se ofereciam de forma voluntária na pesquisa, normalmente vinculados pelos mesmo casais do grupo amostral (não aparentados), amigos preferivelmente.

Os geneticistas de outros centros convocaram seus pacientes e os encaminharam as palestras oferecidas na cidade de São Paulo, durante os eventos organizados pela associação ou por nossas visitas periódicas na sede. Para os pais de outros estados, ou quando não havia condição de encaminhamento do paciente, foram realizadas coletas nestas localidades, para aumentar o número de casais do grupo amostral. Estas cidades são: Brasília DF; Rio de Janeiro-RJ; Fortaleza-CE; Sorocaba-SP, Osório-RS e Araraquara-SP.

4.2 Ética

O projeto de pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP-SP o dia 02 de julho de 2012, (Anexo 1).

Todos os genitores de SWB foram informados dos objetivos do projeto e quando aceitavam participar do mesmo assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias (Anexo 2). Sendo que uma via ficou com casal participante e a outra se encontra no prontuário do paciente junto ao Serviço de Aconselhamento Genético (SAG).

Os casais participantes do grupo controle foram informados dos objetivos do projeto e quando aceitavam participar do mesmo assinavam o Termo de Consentimento Livre

e Esclarecido em duas vias (Anexo 3). Uma via ficou com casal participante e a outra se encontra junto ao SAG.

4.3 Análise da SWBinv-1

Para triagem da presença ou ausência da inversão da região crítica da SWB em pais de crianças com SWB e pais de crianças normais, foi realizada a técnica da FISH em esfregaço de sangue para a obtenção de células interfásicas, metodologia inovadora de triagem para a SWBinv-1, desenvolvido especialmente para este projeto.

4.3.1 Sequência na preparação da lâmina de extensão sanguínea (esfregaço de sangue), técnica Leishman.

- a. Lavar as lâminas com sabão líquido (pH neutro), para retirar o óleo da superfície.
- b. Fazer a assepsia do dedo indicador com algodão e álcool;
- c. Lancetar o dedo utilizando uma microlanceta (Gentle Draw);
- d. Colocar a gota de sangue na extremidade de uma lâmina histológica previamente limpa;
- e. Utilizando-se de outra lâmina histológica, fazer corretamente o esfregaço deixando uma película de sangue sobre a lâmina;
 - Segurar a lâmina, contendo a gota de sangue, com os dedos polegar e indicador da mão esquerda;
 - Inclinar outra lâmina histológica a 45°, segurando com os dedos polegar e indicador, da mão direita. Levar a lâmina inclinada até o início da gota de sangue;
 - Quando a lâmina toca na gota, o sangue escorre pela sua borda. Ai deve-se fazer voltar a lâmina inclinada para trás, formando-se então a película de sangue.
- f. Deixar secar ao ar, durante 48 horas;

4. 4 Sequência pré-FISH

- a) Retirar o excesso de citoplasma e material sanguíneo (plaquetas e eritrócitos) das lâminas deve-se lavar com uma solução metanol 3: 1 ácido acético durante 14 minutos. Depois secar ao ar.
- b) Desidratar o material biológico para uma maior eficiência da sonda (SWBinv-1 LIVE®)
 - 5 minutos em HCl 0,1N a 37 °C

- 1 minuto em água destilada
- 2 minutos em 2XSSC
- 4 minutos no enxágue 1 a 72°C

Série de álcoois

- (2x) Álcool a 70% por 1 minuto
- Álcool a 85% por 1 minuto
- Álcool a 90% por 1 minuto
- Álcool a 100% por 1 minuto

4.5 Hibridização *in situ* por Fluorescência FISH

No Laboratório de Citogenética do SAG as lâminas preparadas foram tratadas conforme o protocolo do fabricante das sondas. Neste estudo foi utilizada a sonda de fusão simples SWBinv-1 da LIVE® como a primeira opção para a identificação da inversão SWB. Esta sonda é composta por dois fluorocromos que se ligam as sequências RP11845K6 (vermelho) na região próxima as LCRs perto do centrômero e a RP11-614D7 (cor verde) fora da região crítica da SWB próxima ao LCR telomérico (Figura 5).

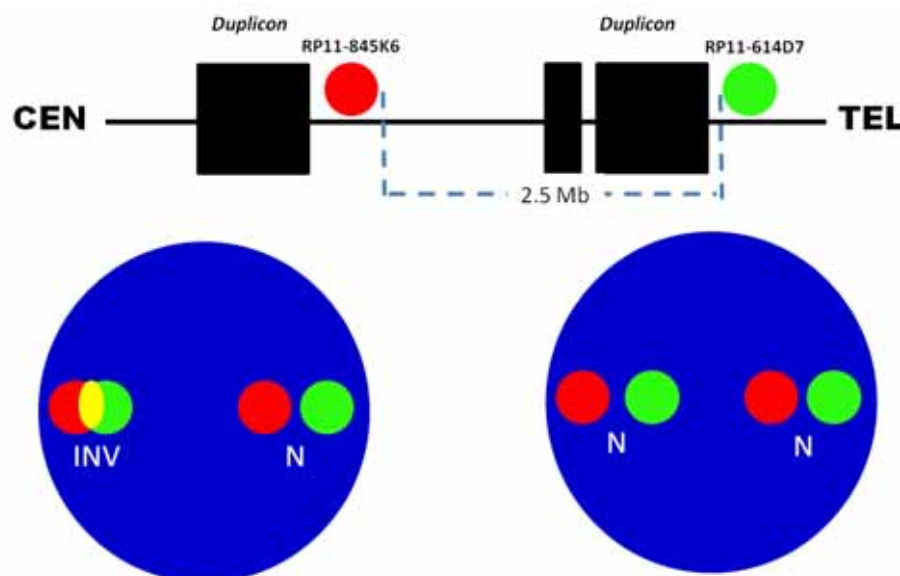


Figura 5: Esquema e interpretação da fluorescência da sonda de fusão simples LIVE® SWBinv-1. A inversão produz que os dois sinais fiquem mais perto, apreciando-se como fusionadas ou adjacentes de cor amarela.

4.6 Análise Citogenética Molecular

Uma vez que a sonda utilizada liga-se especificamente à região 7q11.23, o diagnóstico positivo é interpretado pela presença de dois tipos diferentes de sinal fluorescente, uma junção de cor verde-amarela indicando a inversão na região e dois sinais separados, presentes no cromossomo normal.

As análises da técnica da FISH foram realizadas no microscópio motorizado Olympus BX61-DP73. Para cada indivíduo, foram analisados cerca de 40 núcleos interfásicos e pelo menos 30 deles foram fotografadas, tanto para o diagnóstico positivo (SWBinv-1) ou negativo (sem a inversão). Para a comprovação da inversão observada na triagem em células interfásicas, foi realizada cultura temporária de linfócitos do genitor positivo. Neste passo foi utilizada uma segunda sonda da SWBinv-1 Lexel (alternativa 1). Esta sonda se liga na sequência RP11-359E24 (verde) na região próxima ao LCRs perto do centrômero fora da região crítica da SWB e a RP4-665P5 (vermelha) dentro da região crítica da SWB próxima a LCR telomérica (Figura 6).

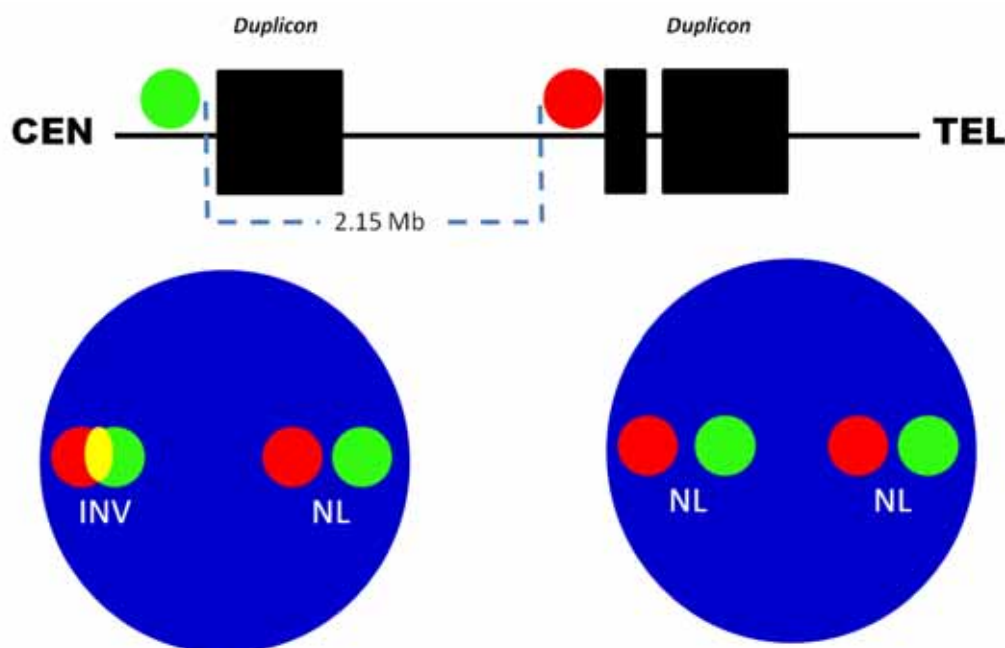


Figura 6: Esquema sonda de fusão simples: alternativa 1 LIVE® SWBinv-1. A inversão produz que os dois sinais fiquem mais perto, apreciando-se como fusionadas ou adjacentes de cor amarela.

4.7 Cultura temporária de linfócitos de sangue periférico

As culturas de linfócitos de sangue periférico foram desenvolvidas segundo a técnica proposta por MOORHEAD et al. (1960) modificada.

4.8 Análise Estatística

O tratamento estatístico dos resultados dos dois grupos foi efetuado utilizando-se o Statistical Pack for the Social Sciences – SPSS.19 IBM.

5. RESULTADOS

5.1 Análises de células interfásicas

5.1.1 Grupo amostral

Foram coletadas amostras de 112 casais (224 indivíduos), dos quais 53 casais (106 indivíduos) foram analisados. Como nem todos os casos, pai e mãe tiveram resultados, este número foi reduzido a 38 casais (76 indivíduos). Alguns destes indivíduos foram excluídos (30 indivíduos inconclusivos) por não superar o corte mínimo de 30 núcleos interfásicos necessários para serem considerados confiáveis, por apresentar núcleos amorfos, ou porque o esfregaço de sangue não respondeu aos experimentos (FISH); 59 casais (118 indivíduos) não foram analisados. Além disso 12 casais (24 indivíduos), os quais tinham resultados não compareceram a coleta da segunda etapa da pesquisa (cultura de linfócitos), sendo 7 indivíduos normais, 14 indivíduos NOR/INV e 3 com aparente SWBinv-1, tudo isto para a primeira etapa da pesquisa, com estes dados o grupo amostral ficou com um total de 26 casais analisados. As amostras foram coletadas nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Brasília DF, Minas Gerais, Pernambuco, Ceará, Paraná e Amazonas.

Dos 52 indivíduos, 27 indivíduos (52%) apresentaram exame de triagem negativo (Normal), ou seja, nos dois cromossomos 7 sinais verde e vermelho separados (figura 7, A e B); 16 indivíduos (30,7%) apresentaram dois tipos diferentes de diagnóstico (NOR/INV) ou seja, células com SWBinv-1 (um cromossomo 7 com sinais sobrepostas de cor amarelado e um cromossomo 7 com sinais separados verde-vermelha) e sem SWBinv-1 (sinais separados nos dois cromossomos); 9 indivíduos (17,3%) apresentaram exame de triagem positivo (SWBinv-1), ou seja, um cromossomo 7 com sinais sobrepostos e um cromossomo 7 com sinais separados (Figura 7, C e D) (ver tabela 3).

Tabela 3. Dados grupo amostral

Código	Sinais separados	Sinais diferentes	Fotografadas	Total	RESULTADOS
CS002H	31	0	31	31	NORMAL
CS002M	32	0	32	32	NORMAL
CS007M	22	9	31	31	NOR/INV
CS007H	4	32	36	36	INV
CS008H	39	0	39	39	NORMAL
CS008M	24	15	39	39	NOR/INV
CS009H	21	29	50	50	INV

CS009M	20	20	40	40	NOR/INV
CS010M	24	23	45	45	NOR/INV
CS010H	1	30	31	31	INV
CS011H	32	40	72	72	INV
CS011M	26	21	47	47	NOR/INV
CS012H	15	15	30	30	NOR/INV
CS012M	7	32	39	39	INV
CS018H	39	0	39	39	NORMAL
CS018M	7	38	45	45	INV
CS019H	46	0	46	46	NORMAL
CS019M	36	1	37	37	NORMAL
CS026H	12	20	32	32	INV
CS026M	33	15	48	48	NOR/INV
CS027H	25	28	53	53	NOR/INV
CS027M	19	12	31	31	NOR/INV
CS030H	24	9	33	33	NOR/INV
CS030M	41	0	41	41	NORMAL
CS031H	27	4	31	31	NORMAL
CS031M	3	39	42	70	INV
CS033M	22	8	30	30	NOR/INV
CS033H	30	0	30	30	NORMAL
CS034H	24	6	30	30	NORMAL
CS034M	36	3	39	39	NORMAL
CS037H	25	0	20	45	NORMAL
CS037M	35	13	48	48	NORMAL
CS040H	29	5	34	34	NORMAL
CS040M	29	2	31	31	NORMAL
CS047H	43	3	43	43	NORMAL
CS047M	58	4	62	62	NORMAL
CS048H	15	15	30	30	NOR/INV
CS048M	26	15	41	41	NOR/INV
CS053M	41	9	50	50	NORMAL
CS053H	54	6	60	60	NORMAL
CS054H	30	3	33	33	NORMAL
CS054M	41	35	76	76	NOR/INV
CS055M	76	15	91	91	NORMAL
CS055H	58	11	69	69	NORMAL
CS056H	31	2	33	33	NORMAL
CS056M	84	13	97	97	NORMAL
CS059M	29	21	50	50	NOR/INV
CS059H	13	30	43	43	INV
CS061M	41	7	48	48	NORMAL
CS061H	30	11	41	41	NORMAL

CS064 H	37	7	44	44	NORMAL
CS064M	32	8	40	40	NORMAL

Como indicado na tabela 3 os indivíduos que apresentaram a SWBinv-1 (9 indivíduos) e aqueles com dois tipos diferentes de diagnóstico - NOR/INV (15 indivíduos) somam um total de 24 indivíduos, os quais 10 são homens (44,67%) e 14 são mulheres (58,33%).

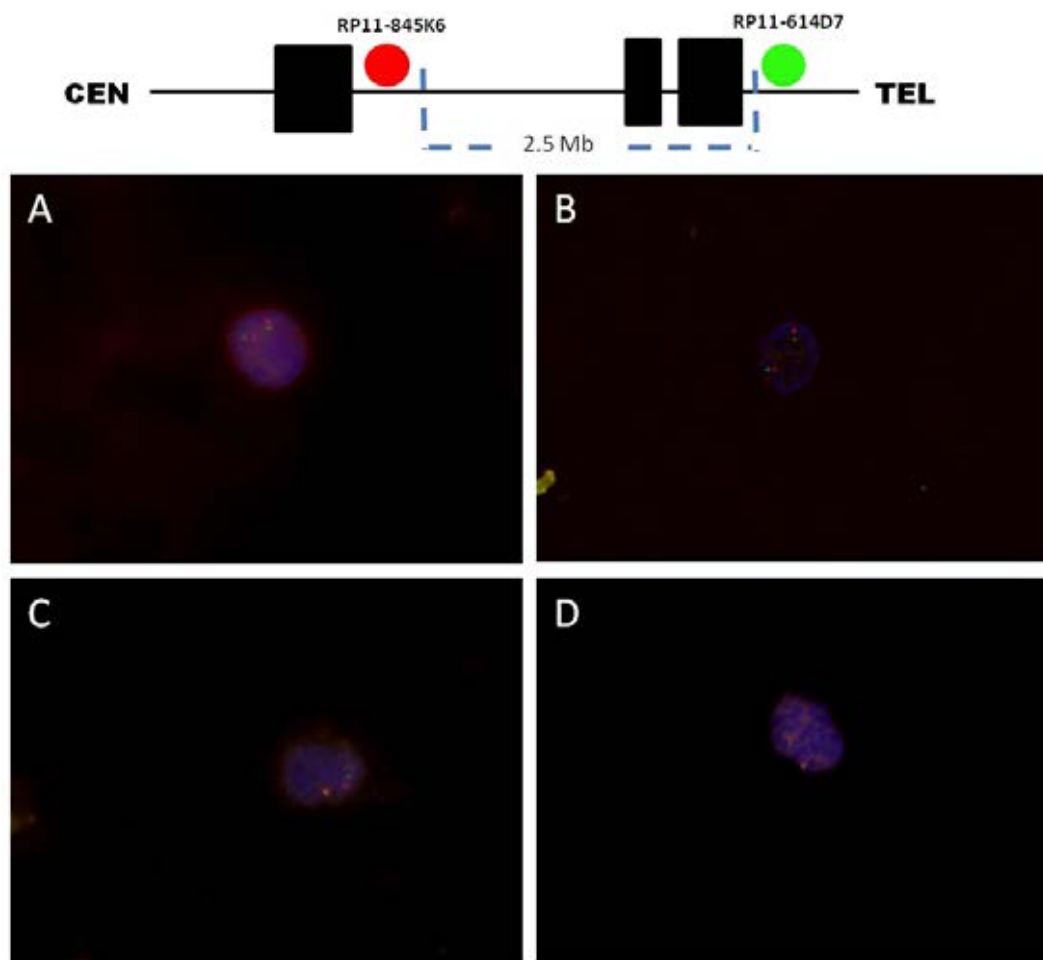


Figura 7. Detecção da inversão polimórfica em famílias com filhos SWB pela FISH em núcleos interfásicos. A, B) Núcleos interfásico de indivíduos do grupo amostral que não apresentam a inversão (CS002H, CS003M). C, D) A inversão esta presente num dos dois cromossomos 7 do indivíduo (CS0012M, CS049H). A sequência da sonda ao longo do cromossomo 7 está acima. (os sinais negros representam os duplicons). Os sinais superpostos indicam a inversão da região. Em quanto os sinais separadas marcam o cromossomo normal.

5.1.2 Grupo Controle

Foram coletadas amostras de 69 casais (138 indivíduos) dos quais 40 indivíduos foram analisados. Dentre estes, 34 indivíduos (85%) apresentaram exame de triagem negativo (Normal); 5 indivíduos (12,5%) apresentaram dois tipos de diagnóstico (NOR/INV), 1 indivíduo (2,5%) apresentou a SWBinv-1. Somando os indivíduos que apresentaram diagnóstico NOR/INV (5 indivíduos) e SWBinv-1 (1 indivíduos), 3 são mulheres (50%) e 3 são homens (50%). Ver Tabela 4.

Tabela 4. Dados grupo controle

Código	Sinais separados	Sinais diferentes	Fotografadas	Total	RESULTADOS
C001-H	50	0	50	50	NORMAL
C001- M	33	18	51	51	NOR/INV
C002- H	50	0	50	50	NORMAL
C002- M	50	0	50	50	NORMAL
C003- H	50	0	50	50	NORMAL
C003- M	50	0	50	50	NORMAL
C004- H	50	0	50	50	NORMAL
C004- M	36	17	53	53	NOR/INV
C005- H	50	0	50	50	NORMAL
C005- M	50	0	50	50	NORMAL
C006- H	50	0	50	50	NORMAL
C006- M	50	0	50	50	NORMAL
C007- H	39	15	54	54	NOR/INV
C007- M	50	0	50	50	NORMAL
C008- H	50	0	50	50	NORMAL
C008- M	50	0	50	50	NORMAL
C009- H	36	13	49	49	NOR/INV
C009- M	50	0	50	50	NORMAL
C010- H	50	0	50	50	NORMAL
C010- M	50	0	50	50	NORMAL
C011- H	50	0	50	50	NORMAL
C011- M	50	0	50	50	NORMAL
C012- H	50	0	50	50	NORMAL
C012- M	42	15	57	57	NOR/INV
C013- H	50	0	50	50	NORMAL
C013- M	50	0	50	50	NORMAL
C014- H	14	9	23	23	NORMAL
C014- M	25	8	33	33	NORMAL
C015- H	39	0	39	39	NORMAL
C015- M	19	34	33	33	INV
C035- H	41	16	57	57	NORMAL
C035- M	25	12	37	37	NORMAL
C038- H	47	14	61	61	NORMAL
C038- M	66	15	81	81	NORMAL
C039- H	39	24	63	63	NORMAL
C039- M	50	12	62	62	NORMAL
C040- H	40	23	63	63	NORMAL
C040- M	39	13	52	52	NORMAL
C041- H	48	17	65	65	NORMAL
C041- M	51	13	64	64	NORMAL

5.2 Tratamento pré-FISH

Os núcleos após o pré-tratamento (Figura 8) mostraram um diâmetro maior e diminuiu o risco de falsos positivos no diagnóstico da SWBinv-1(sobreposição de sinais, por

proximidade das regiões marcadas pela sonda). Este procedimento foi realizado no material biológico dos dois grupos.

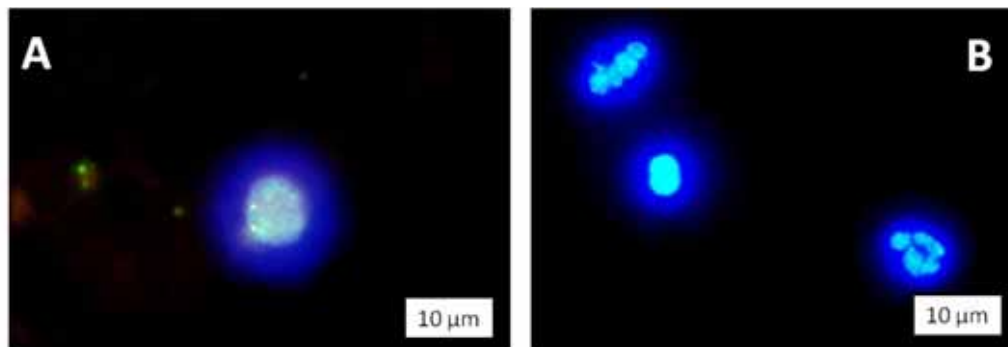


Figura 8. Comparação de tamanho dos núcleos numa escala 10µm. A) núcleo interfásico após o tratamento pré-FISH. B) núcleo interfásico sem tratamento pré-FISH.

5.3. Cultura temporária de linfócitos de sangue periférico

5.3.1 Grupo Amostral

Foram realizadas 32 culturas de linfócitos de 16 casais, dos quais, 24 indivíduos são normais e 8 indivíduos apresentaram mosaicismos (ver tabela 5). O diagnóstico dado para os indivíduos mosaicos foi baseado no estudo de Hook (1977), onde esta estipulada à exclusão de mosaicismos em N núcleos analisados, com 90%, 95% e 99% níveis de confiança.

Tabela 5. Dados comparativos dos resultados esfregaço x cultura de linfócito, grupo amostral.

ESFREGACO					CULTURA DE LINFOCITOS						
COD	SAG	SEPARADO	JUNTO	RESULTADO	# METÁFASES	SEPARADO	JUNTOS	# NUCLEOS	SEPARADO	JUNTO	RESULTADO
CS007 H	7677	4	32	INV	4	3	-	43	43	1	NORMAL
CS007 M	7528	22	9	NOR/INV	4	4	-	49	43	6	NORMAL
CS008 H	7550	39	0	NORMAL	3	3	-	48	41	4	NORMAL
CS008 M	7631	24	15	NOR/INV	-	-	-	40	37	3	NORMAL
CS009 H	8137	21	29	INV	3	3	-	41	26	15	MOSAICO
CS009 M	8136	20	20	NOR/INV	3	2	1	41	37	4	NORMAL
CS010 H	8120	1	30	INV	4	2	2	43	20	23	MOSAICO
CS010 M	8119	24	23	NOR/INV	4	4	-	43	42	1	NORMAL
CS011 H	8123	32	40	INV	2	2	-	41	39	2	NORMAL
CS011 M	8122	26	31	NOR/INV	3	3	-	43	41	2	NORMAL
CS012H	8138	10	10	NOR/INV	4	4	-	40	35	5	NORMAL
CS012 M	7524	7	32	INV	2	2	-	40	37	3	NORMAL
CS018 H	6606	39	0	NORMAL	4	1	3	41	32	9	MOSAICO
CS018 M	6605	7	38	INV	5	4	1	37	37	-	NORMAL
CS026 H	7787	12	20	INV	7	-	7	42	16	26	MOSAICO
CS026 M	7786	33	15	NOR/INV	5	5	-	42	38	6	NORMAL
CS027 H	8127	19	12	NOR/INV	7	7	-	45	42	3	NORMAL
CS027 M	8128	25	28	NOR/INV	4	4	-	46	41	5	NORMAL
CS030 H	4697	24	9	NOR/INV	3	3	-	52	48	4	NORMAL
CS030 M	4696	41	0	NORMAL	6	6	-	49	43	6	NORMAL
CS031 H	7751	27	4	NORMAL	4	4	-	42	39	3	NORMAL
CS031 M	7750	3	39	INV	2	2	-	46	34	12	MOSAICO
CS048 H	8078	13	13	NOR/NV	4	4	-	43	41	2	NORMAL
CS048 M	8077	26	15	NOR/INV	5	5	-	41	26	15	MOSAICO
CS054 H	8139	30	3	NORMAL	2	2	-	42	40	2	NORMAL
CS054 M	8140	41	35	NOR/INV	1	1	-	43	33	10	MOSAICO
CS058 H	8145	32	2	NORMAL	4	4	-	46	39	7	NORMAL
CS058 M	8146	34	14	NOR/INV	4	4	-	40	35	5	NORMAL
CS059 H	8144	29	21	NOR/INV	3	3	-	42	37	5	NORMAL
CS059 M	8143	13	30	INV	2	2	-	40	30	10	MOSAICO
CS062 H	8147	34	18	NOR/INV	2	2	-	44	41	3	NORMAL
CS062 M	8148	21	4	NORMAL	2	2	-	45	41	4	NORMAL

Na tabela 6 se compara a porcentagem de mosaicismo encontrado nos análises das culturas de linfócitos e o numero de células mosaico esperado para cada caso. Ver figura 9

Tabela 6. Numero de núcleos mosaicos esperados segundo Hook (1977).

RESULTADOS CULTURA DE LINFÓCITOS					HOKK (1977)		
COD	SEPARADO	JUNTO	TOTAL	%	N	NUM DE CELULAS MOSAICO	%
CS009H	26	25	41	60,9	41	4,5	11
CS010H	20	23	43	53,4	43	4,73	11
CS018H	32	9	41	21,9	41	4,5	11
CS026H	16	26	42	61	42	4,5	11
CS031M	34	12	46	26	46	4,6	10
CS048M	26	15	41	36,5	41	4,5	11
CS054M	36	10	43	23,2	43	4,73	11
CS059M	30	10	40	25	40	4,4	11

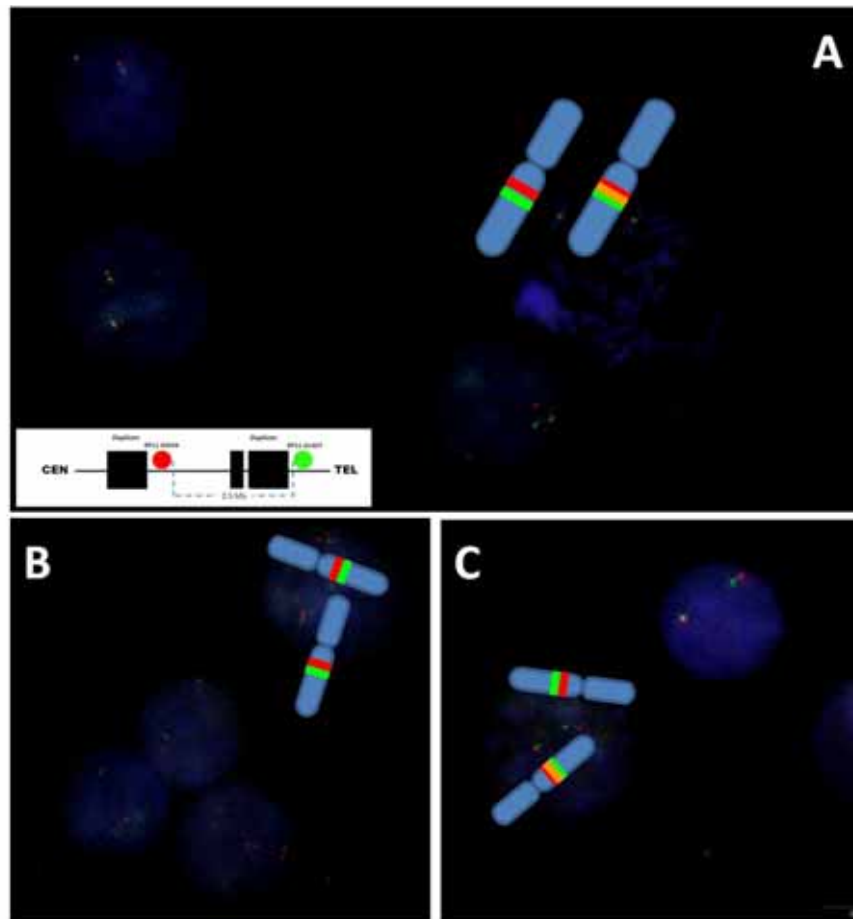


Figura 9. Mosaico cromossômico do indivíduo CS048 M. A) Metáfase e núcleos em interfase mostrando a SWBinV-1 em um dos cromossomos 7 junto com o esquema de interpretação da sonda de fusão simples LIVE® SWBinV-1. B) Núcleos em interfase mostrando os dois cromossomos 7 normais. C) Núcleos em interfase onde um dos cromossomos 7 apresenta a SWBinV-1.

5.3.2 Grupo controle

Foram realizadas 6 culturas de linfócitos de 3 casais, dos quais, os 6 indivíduos são negativos para a SWBinV-1; (ver tabela 7).

Os resultados do grupo amostral e controle desde o início da pesquisa até o final estão resumidos no fluxograma da figura 10.

Tabela 7. Dados comparativos dos resultados esfregaço VS cultura de linfócito, grupo controle.

ESFREGACO					CULTURA DE LINFOCITOS						
COD	SAG	SEPARADO	JUNTO	RESULTADO	# METÁFASES	SEPARADO	JUNTOS	# NUCLEOS	SEPARADO	JUNTO	RESULTADO
C004 H	8135	50	0	NORMAL	3	3	-	45	39	6	NORMAL
C004 M	8134	36	17	NOR/INV	2	2	-	43	41	2	NORMAL
C007 H	8131	39	15	NOR/INV	5	5	-	41	36	5	NORMAL
C007 M	8130	50	0	NORMAL	3	3	-	42	39	3	NORMAL
C012 H	8133	50	0	NORMAL	2	2	-	41	38	3	NORMAL
C012 M	8132	42	15	NOR/INV	3	1	2	46	37	6	NORMAL

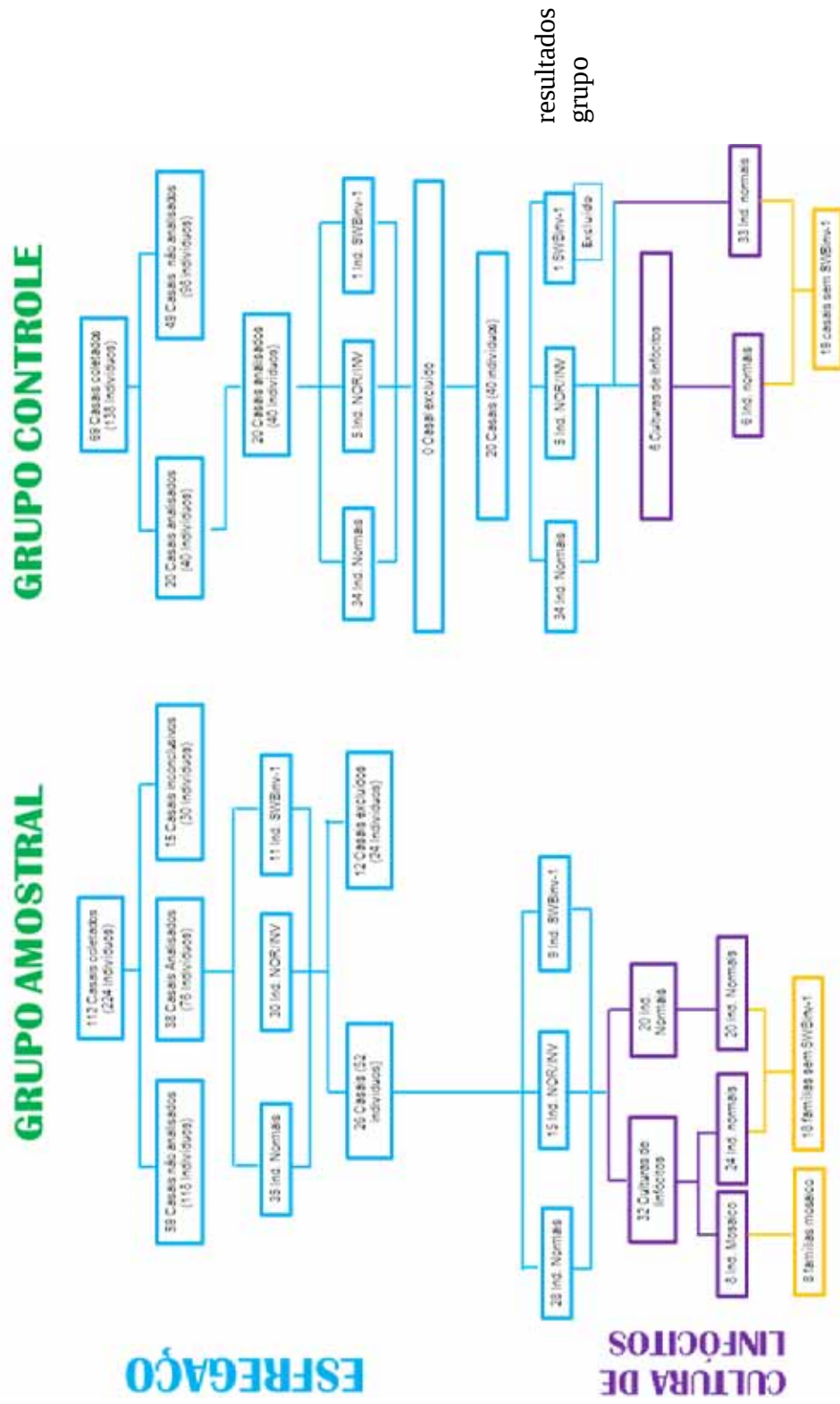


Figura 10.
Fluxograma
grupo amostral x
controle

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Vários tipos de tecidos humanos podem ser usados para preparação dos cromossomos e posterior análises do cariótipo. A escolha do tecido depende do tipo de paciente (pré ou pós-natal), do propósito do diagnóstico (constitucional ou adquirido) e da indicação clínica. A cultura de células é a técnica base na citogenética clássica e desde sua descoberta por Hsu, (1952) deu grandes avanços na identificação de síndromes humanas.

A maioria dos tecidos utilizados para o diagnóstico citogenético não possui um número significativo de mitoses espontâneas, sendo quase sempre necessária uma cultura de células para a preparação dos cromossomos. O conceito básico da cultura de tecidos tem permanecido inalterado durante anos. Entretanto, algumas variações nas condições das culturas e no meio apropriado para cada uma delas tem sido adotadas para uma maior e mais rápida proliferação celular, bem como para obtenção de maior quantidade de células mitóticas e melhor resolução dos cromossomos (MALUF et al., 2011).

O polimorfismo SWBinv-1 tem sido identificado em núcleos metafásicos obtidos de cultura de linfócitos de sangue periférico, e subsequentemente, realizadas análises pela FISH para observar a inversão da região. Nós desenvolvemos uma nova estratégia para identificar a inversão da região crítica 7q11.23 em pais com filhos SWB, onde o custo benefício trás melhores vantagens. Esta técnica baseia-se na obtenção de núcleos interfásicos a partir de esfregaços de sangue. Para a obtenção de núcleos em metáfases mediante a cultura de linfócitos é necessário um período mínimo de 48 a 72 horas para que as células em suspensão se multipliquem; no esfregaço a multiplicação celular não é necessária, pois o número de núcleos num campo óptico 10x é maior que 40 unidades. Este numero varia de acordo à qualidade do esfregaço, ou seja, quanto mais grosso mais núcleos ficaram fixados, mas nem sempre garante bons resultados, umas das estratégias selecionadas no método, foram, esfregaços denominados médios ou intermediários, assim, se mantém um número elevado de núcleos e a susceptibilidade aos processos experimentais.

Por outro lado, existe a possibilidade de ter sobreposição de sinais, já que, na intérfase, a cromatina mostra-se como um emaranhado de filamentos longos e finos, que podem se dobrar e consequentemente ficar um sinal mais perto do outro, levando ao falso positivo. Este foi visto em 30 indivíduos no grupo amostral durante a primeira etapa da pesquisa, e 5 indivíduos no grupo controle. Para confirmar os resultados da primeira triagem foram realizadas cultura de linfócitos destes indivíduos, lembrando que também foi feito cultura de linfócitos de seus correspondentes parceiros, para comparar os dados.

Das 32 culturas realizadas no grupo amostral para confirmar os dados iniciais, dos 15 indivíduos que apresentaram NOR/INV, só 2 indivíduos (13,33%) confirmaram os achados nos esfregaços de sangue periférico e 13/15 indivíduos (86,67%) foram normais; enquanto aos 9 indivíduos que apresentaram SWBinv-1, 5 indivíduos foram mosaicos (55,55%) e 4 indivíduos (44,45%) foram normais; por ultimo, 8/8 indivíduos (100%) normais confirmaram os resultados iniciais. Estes resultados sugerem que são necessários mais testes para aumentar a exactitude dos achados.

Enquanto ao grupo controle, das 6 culturas realizadas para confirmar os achados iniciais, 6/6 indivíduos (100%) que apresentaram NOR/INV nos esfregaços de sangue periférico, foram normais.

Outras considerações devem ser estimadas nas análises dos sinais nos esfregaços. Os núcleos analisados preferivelmente devem ser arredondados. Núcleos com uma morfologia disforme podem ser analisados de forma errônea (falsos negativos) e interferir no diagnóstico do individuo (anexo 4). Os cromossomos que estão localizados nas bordas dos núcleos podem estar dobrados o que poderia juntar ou separar os sinais, quando apresentado este tipo de núcleos, é necessário aumentar o número de núcleos interfásicos contados. Por tal motivo é recomendável analisar cromossomos com uma disposição mais centralizada.

7. BIBLIOGRAFIA

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Health care supervision for children with Williams syndrome. **Pediatrics**, v. 107, p. 1192-1204, 2001.

ANTONELL, A.; DE LUIS, O.; DOMINGO-ROURA, X.; PEREZ- JURADO, L. A. Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. **Genome Res.**, v. 15, p. 1179-1188. 2005.

BAYÉS, M.; MAGANO, L. F.; RIVERA, N.; FLORES, R.; PÉREZ JURADO, L. A. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 73, p. 131-151, 2003.

BELLUGI, U.; BIHRLE, A.; JERNIGAN, T.; TRAUNER, D.; DOHERTY, S. Neuropsychological, neurological, and neuroanatomical profile of Williams syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 6, p. 115-125, 1990.

BELLUGI, U.; LICHTENBERGER, L.; JONES, W.; LAI, Z. The neurocognitive profile of Williams syndrome: A complex pattern of strengths and weaknesses. **J. Cogn. Neurosci.**, v. 12, suppl., p. 7-29, 2000.

BEUREN, A. J.; APITZ, J.; HARMJANZ, D. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and certain appearance. **Circulation**, v. 26, p. 1235-1240, 1962.

BLACK, J. Á.; BONHAM-CARTER, R. E.; SUTCLIFFE, J. A syndrome of multiple of arterial stenosis in association with the severe form of idiopathic hypercalcemia. **Arch. Dis. Child.**, v. 39, p. 418-419, 1964.

BONINI, R.; PALAZZI, E.; CHACUR, P.; SOUZA, L. C. Correção cirúrgica da estenose aórtica supravalvar com modificação da técnica de Souza. **Rev. Bras. Cardiovsc.**, v. 25, p. 253-256, 2010.

BORG, I.; DELHANTY, J. D. A.; BARAITSER, M. Detection of hemizygosity at the elastin locus by FISH analysis as a diagnostic test in both classical and atypical cases of Williams syndrome. **J. Med. Genet.**, v. 32, n. 9, p. 692-696, 1995.

BREWER, C. M.; MORRISON, N.; TOLMIE, J. L. Clinical and molecular cytogenetic (FISH) diagnosis of Williams Syndrome. **Arch. Dis. Child.**, v. 74, p. 59-61, 1996.

CASTORINA, P.; SELICORNI, A.; BENEDESCHI, F.; DALPRÀ L, LARIZZA L. Genotypephenotype correlation in two sets of monozygotic twin with Williams syndorme. **Am. J. Med. Genet.**, v. 69, p. 107-111, 1997.

CURRAN, M. E.; ATKINSON, D. L.; EWART, A. K.; MORRIS, C. A.; LEPPERT, M. F.; KEATING, M. T. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. **Cell**, v. 73, p. 159-168, 1993.

CUSCÓ, I.; COROMINAS, R.; BAYÉS, M.; FLORES, R.; RIVERA-BRUGUÉS, N.; CAMPUZANO, V.; PÉREZ-JURADO, L. A. Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. **Genome Res.**, v. 18, p. 683-694, 2008.

COYNE, C. B.; GAMBLING, T. M.; BOUCHER, R. C.; CARSON, J. L.; JOHNSON, L. G. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 285, p. L1166-L1178, 2003.

DE ZEEUW, C. L.; HOOGENRAAD, C. C.; GOEDKNEGT, E.; HERTZBERG, E.; NEUBAUER, A.; GROSVELD, F.; GALJART, N. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. **Neuron**, v. 19, p. 1187-1199, 1997.

DOLL, A.; GRZESCHIK, H-K. Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren Syndrome. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 95, p. 20-27, 2001.

DOYLE, J. L.; DESILVA, U.; MILLER, W.; GREEN, E. D. Divergent human and mouse orthologs of a novel gene (WBSCR15/Wbscr15) reside within the genomic interval commonly deleted in Williams syndrome. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 90, p. 285-290, 2000.

DUBA, H.-C.; DOLL, A.; NEYER, M.; ERDEL, M.; MANN, C.; HAMMERER, I.; UTERMANN, G.; GRZESCHIK, K.-H. The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams-Beuren syndrome. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 10, p. 351-361, 2002.

ELÇIOĞLU, N.; MACKIE-OGILVIE, C.; DAKER, M.; BERRY, A. C. FISH analysis in patients with clinical diagnosis of Williams Syndrome. **Acta Paediatr.**, v. 87, p. 48-53, 1998.

EWART, A. K.; MORRIS, C. A.; ATKINSON, D.; JIN, W.; STERNES, K.; SPALLONE, P.; STOCK, A. D.; LEPPERT, M.; KEATING, M. T. Hemisizygosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. **Nat. Genet.**, v. 5, p. 11-16, 1993.

FANCONI, G et al. Chronische hypercalcemie kambierniert mit osteosklerose, hyperazotämie minderwuchs und kogenital missbildungen. **Helv. Paediatr. Acta**, v. 7, p. 314-334, 1952.

FROHNAUER, J.; CALIEBE, A.; GESK, S.; PARTSCH, C.; SIEBERT, R.; PANKAU, R.; JENDERNY, J. No significantly increased frequency of the inversion polymorphism at the WBS-critical region 7q11.23 in German parents of patients with Williams-Beuren syndrome as compared to a population control. **Mol. Cytogenet.**, v. 3, p. 21, 2010

FUNAKOSHI, T.; MAESHIMA, K.; YAHATA, K.; SUGANO, S.; IMAMOTO, F.; IMAMOTO, N. Two distinct human POM121 genes: requirement for the formation of nuclear pore complexes. **FEBS Lett.**, v. 581, p. 4910-4916, 2007.

GARCIA, R. E.; FRIEDMAN, W. F.; KABACK, M. M.; ROWE, R. D. Idiopathic hypercalcemia and supraaortic stenosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 271, p. 117-120, 1964.

HELLER, R.; RAUCH, A.; LUTTGEM, S.; SCHRODER, B.; WINTERPACHT, A. Partial of the critical 1,5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. **J. Med. Genet.**, v. 40, p. e99, 2003.

HIROTA, H.; MATSUOKA, R.; CHEN, X. N.; SALANDANAN, L. S.; LINCOLN, A.; ROSE, F. E.; SUNAHARA, M.; OSAWA, M.; BELLUGI, U.; KORENBERG, J. R. Williams syndrome deficits in visual spatial processing linked to GTF2IRD1 and GTF2I on chromosome 7q11.23. **Genet. Med.**, v. 5, p. 311-321, 2003.

HOBART, H.; MORRIS, C.; MERVIS, C.; PANI, A.; KISTLER, D.; RIOS, C.; KIMBERLEY, K.; GREGG, R.; BRAY-WARD, P. Inversion of the williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents in children with Williams syndrome. **Am. J. Med. Genet. C Semin. Genet.**, v. 154C, p. 220-228, 2010.

HOBART, H. H. Heterozygotes for the microinversion of the Willlliams-Beuren syndrome region have na increased risk for affected offspring. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, 54., 2004, Toronto. **Abstracts...** Toronto, 2004. Abstr. 891.

HOCKENHULL, E. L.; CARETTE, M. J.; METCALFE, K.; DONNAI, D.; READ, A. P.; TASSABEHJI, M. A complete physical contig and partial transcript map of the Williams síndrome critical region. **Genomics**, v. 58, p. 138-145, 1999.

HOOGENRAAD, C. C.; EUSSEN, B. H. J.; LANGEVELD, A.; VAN HAPEREN, R.; WINTERBERG, S.; WOUTERS, C. H.; GROSVELD, F.; DE ZEEUW, C. I.; GALJART, N. The murine **CYLN2** gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 Williams syndrome critical region. **Genomics**, v. 53, p. 348-358, 1998.

HOOGENRAAD, C. C.; KOEKKOEK, B.; AKHMANOVA, A.; KRUGERS, H.; DORTLAND, B.; MIEDEMA, M.; VAN ALPHEN, A.; KISTLER, W. M.; JAEGLE, M.; KOUTSOURAKIS, M.; VAN CAMP, N.; VERHOYE, M.; VAN DER LINDEN, A.; KAVERINA, I.; GROSVELD, F.; DE ZEEUW, C. I.; GALJART, N. Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. **Nat. Genet.**, v. 32, p. 116-127, 2002.

HOOVERS, J. M.; MELLINK, C. H.; LESCHOT, N. J. Fluorescence in situ hybridization in the study of chromosomal abnormalities. **Ned. Tijdschr. Geneesk.**, v. 143, p. 2265-2268, 1999.

JADAYEL, D. M.; OSBORNE, L. R.; COIGNET, L. J.; ZANI, V. J.; TSUI, L. C.; SCHERER, S. W.; DYER, M. J. The BCL7 gene family: deletion of BCL7B in Williams syndrome. **Gene**, v. 224, p. 35-44, 1998.

JONES, K. L.; SMITH, D. W. The Williams elfin facies syndrome. **J. Pediatr.**, v. 86, p. 718-723, 1975.

KORENBERG, J. R.; CHEN, X. N.; HIROTA, H.; LAI, Z.; BELLUGI, U.; BURIAN, D.; ROE, B.; MATSUOKA, R. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome. **J. Cogn. Neurosci.**, v. 12, Suppl., p. 89-107, 2000.

LASHKARI, A.; SMITH, A. K.; GRAHAM, J. R. J. M. Williams-Beuren syndrome: an update and Review for the primary physician. **Clin. Pediatr.**, v. 38, p. 189-208, 1999.

LOWERY, M. C.; MORRIS, C. A.; EWART, A. K.; BROTHMAN, L. J.; ZHU, X. L.; LEONARD, C. O. Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams Syndrome: evaluation of 235 patients. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 57, p. 49-53, 1995.

LU, X.; MENG, X.; MORRIS, C. A.; KEATING, M. T. A novel human gene, WSTF, is deleted in Williams syndrome. **Genomics**, v. 54, p. 241-249, 1998.

LUPSKI, J. R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends Genet.**, v. 14, p. 471-422, 1998.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética humana**. Porto alegre: Artmed, 2011.

MARTIN, N. D. T.; SNODGRASS, G. J. A. I.; COHEN, R. D. Idiopathic infantile hypercalcemia: a continuing enigma. **Arch. Dis. Child.**, v. 59, p. 605-613, 1984.

MENG, X.; LU, X.; MORRIS, C. A.; KEATING, M. T. A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. **Genomics**, v. 52, p. 130-137, 1998a.

MENG, X.; LU, X.; LI, Z.; GREEN, E. D.; MASSA, H.; TRASK, B. J.; MORRIS, C. A.; KEATING, M. T. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. **Hum. Genet.**, v. 103, p. 509-509, 1998b.

METCALFE, K.; SIMEONOV, E.; BECKETT, W.; DONNAI, D.; TASSABEHJI, M. Autosomal dominant inheritance of Williams Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clin. Dysmorph.* 14: 61-65. 2005. TRIM50 encodes an E3 ubiquitin ligase. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 16, p. 1038-1049, 2008.

MERLA, G.; UCLA, C.; GUIPPONI, M.; REYMOND, A. Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. **Hum. Genet.**, v. 110, p. 429-438, 2002.

MICALE, L.; FUSCO, C.; AUGELLO, B.; NAPOLITANO, L. M.; DERMITZAKIS, E. T.; MERONI, G.; MERLA, G.; REYMOND, A. Williams-Beuren syndrome TRIM50 encodes an E3 ubiquitin ligase. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 16, p. 1038-1049, 2008.

MITCHEL, J. D.; MANSFELD, J.; CAPITANIO, J.; KUTAY, U.; WOZNIAK, R. W. POM121 links two essential subcomplexes of the nuclear pore complex core to the membrane. **J. Cell Biol.**, v. 191, p. 505-521, 2010.

MOREIRA, M. **Avaliação do funcionamento cognitivo de pacientes com síndrome de Williams-Beuren.** 2010. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MORI, T.; OKANO, I.; KENSAKU, M.; TOHYMA, M.; WANAKA, A. Comparison of tissue distribution of two novel serine/threonine kinase genes containing the LIM motif (LIMK-1 and LIMK-2) in the developing rat. **Mol. Brain Res.**, v. 45, p. 247-254, 1997.

MORRIS, C. A.; DEMSEY, A. S.; LEONARD, C. O.; DILTS, C.; BLACKBURN, B. R. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. **J. Pediatr.**, v. 113, p. 318-326, 1988.

MORRIS, C. A. Genetic aspects of supralvalvular aortic stenosis. **Curr. Opin. Cardiol.**, v. 13, p. 214-219, 1998.

MORRIS, C. A.; THOMAS, I. T.; GREENBERG, E. Williams syndrome; autossomal dominant inheritance. **Am. J. Med. Genet.**, v. 47, p. 478-481, 1993.

MORRIS, C. A.; MERVIS, C. B. Williams syndrome and related disorders. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 1, p. 461-484, 2000.

OSBORNE, L. R.; LI, M.; POBER, B.; CHITAYAT, D.; BODURTHA, J.; MANDEL, A.; COSTA, T.; GREBE, T.; COX, S.; TSUI, L-C.; SCHERER, S. 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. **Nat. Genet.**, v. 29, p. 321-325, 2001.

OSBORNE, L. R.; MARTINDALE, D.; SCHERER, S. W.; SHI, X. M.; HUIZENGA, J.; HENG, H. H.; COSTA, T.; POBER, B.; LEW, L.; BRINKMAN, J.; ROMMENS, J.; KOOP, B.; TSUI, L. C. Identification of genes from a 500 Kb region at 7q11.23 that is commonly deleted in Williams syndrome patients. **Genomics**, v. 36, p. 328-336, 1996.

OSBORNE, L. R.; SODER, S.; SHI, X. M.; POBER, B.; COSTA, T.; SCHERER, S. W.; TSUI, L. C. Hemizygous deletion of the syntaxin 1 A gene in individuals with Williams syndrome [letter]. **Am. J. Med. Genet.**, v. 61, p. 449-452, 1997.

OSBORNE, L. R.; CAMPBELL, T.; DARADICH, A.; SCHERER, S.; TSUI, L. C. Identification of a putative transcription factor gene (WBSCR11) that is commonly deleted in Williams-Beuren syndrome. **Genomics**, v. 57, p. 279-284, 1999.

PAPERNA, T.; PEOLPES, 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**, v. 54, p. 453-459, 1998.

PEOPLES, R. J.; PEREZ-JURADO, L.; WANG, Y. K.; KAPLAN, P.; FRANCKE, U. The gene replication factor C subunit 2 (RFC2) is within the 7q11,23 Williams syndrome deletion. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 58, p. 1373-1377, 1996.

PEOPLES, R.; FRANKE, Y.; WANG, Y. K.; PÉREZ-JURADO, L.; PAPERNA, T.; CISCO, M.; FRANCKE, U. A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome–deletion region at 7q11.23. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 66, p. 47-68, 2000.

PEREZ-JURADO, L. A.; WANG, Y. K.; PEOPLES, R.; COLOMA, A.; CRUCES, J.; FRANCKE, U. A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-1 and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. **Hum. Mol. Genet.**, v. 7, p. 325-334, 1998.

PEREZ-JURADO, L. A.; WANG, Y. K.; FRANCKE, U.; CRUCES, J. TBL2, a novel transducin family member in the wbs deletion: characterization of the complete sequence, genomic structure, transcriptional variants and the mouse ortholog. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 86, p. 277-284, 1999.

ROSSI, N. F. **Caracterização do fenótipo comportamental e de linguagem na síndrome de Williams-Beuren**. 2010. Tese (Doutorado) – UNESP, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

ROSSI, N. F.; MORETTI-FERREIRA, D.; GIACHETI, C. M. Genética e linguagem na síndrome de Williams-Beuren: uma condição neuro-cognitiva peculiar. **Pró-Fono Rev. Atual. Cient.**, v. 18, p. 331-338, 2006.

ROSENBLOOM, J. Elastin: relation of protein and gene structure to disease. **Lab. Invest.**, v. 51, p. 605-623, 1984.

SADLER, L. S.; ROBINSON, L. K.; VERDAASDONK, K. R.; GINGELL, R. The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. **Am. J. Med. Genet.**, v. 47, p. 468-470, 1993.

SCHMITT, J. E.; ELIEZ, S.; BELLUGI, U.; REIS, A. L. Analysis of cerebral shape in Williams síndrome. **Arch Neurol.**, v. 58, p. 283-287, 2001.

SCHUBERT, C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 1178-1197, 2009.

SCHERER, S. W.; CHEUNG, J.; MACDONALD, J. R.; OSBORNE, L. R.; NAKABAYASHI, K.; HERBRICK, J. A.; CARSON, A. R.; PARKER-KATIRAEI, L.; SKAUG, J.; KHAJA, R.; ZHANG, J.; HUDEK, A. K.; LI, M.; HADDAD, M.; DUGGAN, G. E.; FERNANDEZ, B. A. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. **Science**, v. 300, p. 767-772, 2003.

SOTILLO, M.; NAVARRO, J. F. Síndrome de Williams: aspectos psicobiológicos. **Psicol. Conductual**, v. 6, p. 311-323, 1998.

SOUZA, D. H.; MORETTI-FERREIRA, D.; RUGOLO, L. M. S. S. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) as a diagnostic tool for Williams-beuren syndrome. **Genet. Mol. Biol.**, v. 30, p. 17-20, 2007.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKY, J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. **Trends Genet.**, v. 18, p. 74-82, 2002.

TASSABEHJI, M.; METCALFE, K.; FERGUSON, W. D.; CARETTE, M. J. A.; DORE, J. K.; DONNAI, D.; READ, A. P.; PROSCHEL, C.; GUTOWSKI, N. J.; MAO, X.; SHEER, D. LIM-kinase deleted in Williams syndrome. **Nat. Genet.**, v. 13, p. 272-273, 1996. (Letter)

TASSABEHJI, M.; CARETTE, M.; WILMOT, C.; DONNAI, D.; READ, A. P.; METCALFE, K. A transcription factor involved in skeletal muscle gene expression is deleted in patients with Williams syndrome. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 7, p. 737-747, 1999.

TASSABEHJI, M.; HAMMOND, P.; KARMILOFF-SMITH, A.; THOMPSON, P.; THORGEIRSSON, S. S.; DURKIN, M. E.; POPESCU, N. C.; HUTTON, T.; METCALFE, K.; RUCKA, A.; STEWART, H.; READ, A. P.; MACONOCHE, M.; DONNAI,

D. GTF2IRD1 in craniofacial development of humans and mice. **Science**, v. 310, p. 1184-1187, 2005.

SCHMITT, J. E.; ELIEZ, S.; BELLUGI, U.; REISS, A. L. Analysis of cerebral shape in Williams syndrome. **Arch. Neurol.**, v. 58, p. 283-287, 2001.

STROMME, P.; BJORNSTAD, P.; RAMSTAD, K. Prevalence estimation of Williams syndrome. **J. Child Neurol.**, v. 17, p. 269-271, 2002.

SUGAYAMA, S. M. M. **Estudo genético-clínico e citogenética molecular pela técnica da hibridação in situ por fluorescência (FISH) em pacientes com síndrome de Williams-Beuren**. 2001. 143 f. Tese (Doutorado em Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SUGAYAMA, S. M. M.; LEONE, C.; KIM, C. A. Síndrome de Williams-Beuren: proposta de sistema de pontuação para diagnóstico clínico. **Clin. Sci.**, v. 62, p. 159-166, 2007.

TAM, E.; TOUNG, E. J.; MORRIS, C. A.; MARSHALL, C. R.; LOO, W.; SCHERER, S. W.; MERVIS, C. B.; OSBORNE, L. R. The common inversion of the Williams-Beuren syndrome region at 7q11.23 does not cause clinical symptoms. **Am. J. Med. Genet. A**, v. 146A, p. 1797-1806, 2008.

THOMAS, N. S.; DURKIE, M.; POTTS, G.; SANDFORD, R.; VAN ZYL, B.; YOUINGS, S.; DENNIS, N. R.; JACOBS, P. A. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11-q13 and 22q11. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 831-837, 2006.

TURNER, D.; MIRETTI, M.; RAJAN, D.; FIEGLER, H.; CARTER, N.; BLAYNEY, M.; BECK, S.; HURLES, M. The rates of *de novo* meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders in the male germline. **Nat. Genet.**, v. 40, p. 90-95, 2008.

UDWIN, O.; YULE, W. A cognitive and behavioral phenotype in Williams syndrome. **J. Clin. Exp. Neuropsychol.**, v. 13, p. 2322-2344, 1991.

URBAN, Z.; HELMS, C.; FEKETE, G.; CSISZAR, K.; BONNET, D.; MINNICH, A.; DONIS-KELLER, H.; BOYD, C. D. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. **Am. J. Hum. Genet.**, v.59, p. 958-962, 1996.

VALERO, M. C.; DE LUIS, O.; CRUCES, J.; PEREZ JURADO, L. A. 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**, v. 69, p. 1-13, 2000.

VOLPP, B. D.; NAUSEEF, W. M.; DONELSON, J. E.; MOSER, D. R.; CLARK, R. A. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 86, p. 7195-7199, 1989.

WANG, Y. K.; SAMOS, C. H.; PEOPLES, R.; PÉREZ-JURADO, L. A.; NUSSE, R.; FRANCKE, U. A novel human homologue of the Drosophila frizzled with receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p. 465-472, 1997.

WANG, Y. K.; PEREZ-JURADO, L. A.; FRANCKE, U. A mouse single-copy gene, Gtf2i, the homolog of human GTF2I, that is duplicated in the Williams-Beuren syndrome deletion region. **Genomics**, v. 48, p. 163-170, 1998.

WANG, M. S.; SCHINZEL, A.; KOTZOT, D.; BALMER, D.; CASEY, R.; CHODIRKER, B. N.; GYFTODIMOU, J.; PETERSEN, M. B.; LOPEZ-RANGEL, E.; ROBINSON, W. P. Molecular and clinical correlation study of Williams-Beuren syndrome: no evidence of molecular factors in the deletion region or imprinting affecting clinical outcome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 86, p. 34-43, 1999.

WANG, Y.; CORTEZ, D.; YAZDI, P.; NEFF, N.; ELLEDGE, S. J.; QIN, J. BASC, a super complex BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. **Genes Dev.**, v. 14, p. 927-939, 2000.

WILLIAMS, J. C. P.; BARRATT-BOYES, B. G.; LOVE, J. B. Supravalvular aortic stenosis. **Circulation**, v. 21, p. 1311-1318, 1961.

WU, Y. Q.; SUTTON, V. R.; NICKERSON, E.; LUPSKI, J. R.; POTOCKI, L.; KORENBERG, J. R.; GREENBERG, F.; TASSABEHJI, M.; SHAFFER, L. G. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity and parental origin. **Am. J. Med. Genet.**, v. 78, p. 82-90, 1998.

ZHANG, R.; MAKSYMOWYCH, A. B.; SIMPSON, L. L. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human syntaxin 1A, a polypeptide essential for exocytosis. **Gene**, v. 159, p. 293-294, 1995.

8. ANEXO 1

Aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina, UNESP-Botucatu.

**Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu


Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Distrito Rubillo Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Botucatu, 02 de julho de 2012

329/2012-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Danilo Moretti Ferreira
Departamento de Genética do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Dr. Danilo,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4267-2012) "*Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do estado de São Paulo*", a ser conduzido por Juan Diego Loaiza Medina, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02/07/2012.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

-GRUPO AMOSTRAL-

Projeto de Pesquisa:

Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Estado de São Paulo

Nós estamos convidando vocês, o casal, a participarem do projeto de pesquisa citado a cima do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu cujo responsável é o pós-graduando Juan Diego Loaiza Medina, orientado pelo Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira e gostaríamos que vocês soubessem que:

- Vocês estão sendo convidados a participar deste projeto porque tem um filho(a) que foi diagnosticado com síndrome de Williams-Beuren pelo SAG.
- Participar deste projeto é uma opção de vocês, podendo decidir participar ou não; Caso vocês decidirem não participar ou desistirem de participar a qualquer momento vocês, ou o seu filho(a), não perderão nenhum benefício ou tratamento que estiverem fazendo nesta instituição.
- A qualquer momento vocês terão a liberdade de buscar junto aos responsáveis pelo projeto, esclarecimentos de qualquer natureza, inclusive os relativos à metodologia de trabalho.
- Suas participações nesta pesquisa é total e completamente isenta de qualquer ônus financeiro. Caso vocês venham a ter qualquer despesa decorrente de sua participação nesta pesquisa, será imediatamente ressarcido, mediante a devolução dos valores despendidos.
- Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- O presente trabalho tem por objetivo estimar a frequência dos rearranjos genômicas (inversões) da região 7q11.23 em pais com filhos com a Síndrome de Williams-Beuren em comparação com um grupo controle na população paulista.
- Através de análise por FISH de células interfásicas (que não estão em divisão) poderemos verificar se vocês possuem esta inversão.
- As células interfásicas são obtidas com uma gota de sangue.
- Caso vocês decidirem participar gostaríamos de informar-lhes que:
 - a) Iremos coletar uma gota de sangue de cada um dos genitores e faremos um esfregaço de sangue em uma lâmina de microscopia.
 - b) A coleta da gota de sangue pode causar algum desconforto físico.
 - c) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
 - d) Vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre a origem da deleção na síndrome de Williams-Beuren.
 - e) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
 - f) Caso um de vocês seja portador da inversão, iremos explicar detalhadamente o seu significado em uma consulta denominada de Aconselhamento Genético.

- g) Caso vocês tenham outros filhos, que não o portador da síndrome de Williams-Beuren, poderemos realizar o Aconselhamento Genético a eles, caso sejam adultos (maiores de 18), ou quando vierem a ser. O Aconselhamento Genético é um procedimento que o indivíduo tem de manifestar o desejo de realizar, por isso, é realizado somente com indivíduos adultos.
- h) Assim que existam resultados desta pesquisa, estes serão apresentados a vocês pelos responsáveis.
- i) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
- j) Sempre que ocorrerem publicações científicas, a sua identidade, de seu filho ou sua família será mantida em absoluto sigilo.
- l) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido o acesso aos dados por terceiros.
- j) Todos os resultados dos exames de FISH estarão disponíveis no prontuário do portador da síndrome, seu filho(a), no Serviço de Aconselhamento Genético.
- l) Os pesquisadores se responsabilizam por reparar danos eventuais associados e/ou decorrentes da pesquisa, sejam eles imediatos ou tardios, inclusive no que diz respeito às indenizações.

Eu, _____ RG nº: _____ e

Eu, _____ RG nº: _____

Concordamos em participar do projeto de pesquisa “Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Estado de São Paulo. Declaramos haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estamos cientes sobre os itens acima mencionados e nossa participação é voluntária por opção própria.

assinaturas: _____ e _____

Data: _____

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

-GRUPO CONTROLE-

Projeto de Pesquisa:

Estimativa da frequência da inversão SWBinv-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Estado de São Paulo

Nós estamos convidando vocês, o casal, a participarem do projeto de pesquisa citado a cima do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu cujo responsável é o pós-graduando Juan Diego Loaiza Medina, orientado pelo Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira e gostaríamos que vocês soubessem que:

- **Vocês estão sendo convidados a participar deste projeto porque tem um ou mais filho(a)(s) que NÃO TEM a síndrome de Williams-Beuren**
- Participar deste projeto é uma opção de vocês, podendo decidir participar ou não; - Caso vocês decidirem não participar ou desistirem de participar a qualquer momento vocês, ou o seu filho(a), não perderão nenhum benefício ou tratamento que estiverem fazendo nesta instituição.
- A qualquer momento vocês terão a liberdade de buscar junto aos responsáveis pelo projeto, esclarecimentos de qualquer natureza, inclusive os relativos à metodologia de trabalho.
- Suas participações nesta pesquisa é total e completamente isenta de qualquer ônus financeiro. Caso vocês venham a ter qualquer despesa decorrente de sua participação nesta pesquisa, será imediatamente ressarcido, mediante a devolução dos valores despendidos.
- Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- O presente trabalho tem por objetivo estimar a frequência dos rearranjos genômicos (inversões) da região 7q11.23 em pais com filhos com a Síndrome de Williams-Beuren em comparação com um grupo controle na população paulista.
- Através de análise por FISH de células interfásicas (que não estão em divisão) poderemos verificar se vocês possuem esta inversão.
- As células interfásicas são obtidas com uma gota de sangue.
- Caso vocês decidirem participar gostaríamos de informar-lhes que:
 - a) Iremos coletar uma gota de sangue de cada um dos genitores e faremos um esfregaço de sangue em uma lâmina de microscopia.
 - b) A coleta da gota de sangue pode causar algum desconforto físico.
 - c) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
 - d) Vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre a origem da deleção na síndrome de Williams-Beuren.
 - e) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
 - f) Caso um de vocês seja portador da inversão, iremos explicar detalhadamente o seu significado em uma consulta denominada de Aconselhamento Genético.

- g) Caso vocês tenham outros filhos, que não o portador da síndrome de Williams-Beuren, poderemos realizar o Aconselhamento Genético a eles, caso sejam adultos (maiores de 18), ou quando vierem a ser. O Aconselhamento Genético é um procedimento que o indivíduo tem de manifestar o desejo de realizar, por isso, é realizado somente com indivíduos adultos.
- h) Assim que existam resultados desta pesquisa, estes serão apresentados a vocês pelos responsáveis.
- i) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
- j) Sempre que ocorrerem publicações científicas, a sua identidade, de seu filho ou sua família será mantida em absoluto sigilo.
- l) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido o acesso aos dados por terceiros.
- j) Todos os resultados dos exames de FISH estarão disponíveis no prontuário do portador da síndrome, seu filho(a), no Serviço de Aconselhamento Genético.
- l) Os pesquisadores se responsabilizam por reparar danos eventuais associados e/ou decorrentes da pesquisa, sejam eles imediatos ou tardios, inclusive no que diz respeito às indenizações.

Eu, _____ RG

nº: _____ e

Eu, _____ RG

nº: _____

Concordamos em participar do projeto de pesquisa “Estimativa da frequência da inversão SWBin-1 entre pais de portadores da síndrome de Williams-Beuren e pais de filhos normais do Estado de São Paulo. Declaramos haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estamos cientes sobre os itens acima mencionados e nossa participação é voluntária por opção própria.

assinaturas: _____ E _____

Data: _____