

Deise Helena de Souza

A síndrome de Williams-Beuren:  
contribuições à avaliação clínica e  
genômica

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de  
Botucatu para obtenção do título de Doutor do Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Botucatu – SP  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/56511

Souza, Deise Helena.

Síndrome de Williams-Beuren: contribuição às avaliações clínica e genômica /  
Deise Helena Souza. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira

Capes: 20205007

1. Crianças - Doenças. 2. Análise de microarranjo. 3. Genética médica. 4.  
Williams-Beuren, Síndrome de – Diagnóstico.

Palavras-chave: Genética médica; Microarranjo; Síndrome de Williams-Beuren

***Dedicatória***

*in memoriam*

***À Jéssica Nunes Herculano***

à quem foi fundada a Associação Brasileira da Síndrome de Williams, cujo lema ... Somos muitos, mas somos um... inspira a todos a continuarmos na luta pelo melhor saber sobre esta condição.

***Ao Sr. Adelino Luís de Souza***

meu pai, presente em minha mente, em todos os momentos da minha vida.

***À Sra. Petronilha Durante Meira***

minha tia, que sempre prestigiou e incentivou os grandes momentos da minha vida.

**À DEUS,**

Pelo amparo nos momentos difíceis firmando minha fé em dias futuros, e principalmente por eu estar aqui hoje.

**À Sra. Iracy Aparecida. Durante de Souza,**

minha mãe, que sempre deu forças para realização dos meus sonhos.

**Ao Sr. Edson Luiz de Souza e Sra. Élide Edir Niz de Souza,**  
meu irmão e cunhada, que sempre apoiaram minhas realizações.

**Ao Renato Niz de Souza, Eduardo Niz de Souza, Felipe Niz de Souza, e Karina Coutinho de Souza,** meus sobrinhos (a), pelo apoio e carinho.

### ***Agradecimentos.***

Aos pacientes e seus responsáveis que participaram deste projeto tornando-o possível.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Unesp Campus de Botucatu-SP, e a todo corpo docente e funcionários, pela estrutura de ensino.

Ao Dr. Jeremy Square diretor do laboratório de Patologia e Medicina Molecular na Queen’s University, Kingston, Ontário-Canada, pela recepção, apoio e suporte.

Ao Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, meu orientador, por creditar na minha capacidade de trabalho, permitindo assim, que eu realizasse esta pesquisa.

Ao Instituto de Biociências UNESP-Botucatu, ao Departamento de Genética e ao Serviço de Aconselhamento Genético pela liberdade para realizar minhas atividades no programa de Pós-Graduação.

A Dra. Lucia Regina Martelli pelo apoio e colaboração prestados nesse projeto.

A Dra. Maisa Yashimoto pelos ensinamentos e dedicação desprendida nas técnicas moleculares.

Ao Dr. Paulo Nuin pelas análises computacionais.

À Profa. Dra Claudia Aparecida Rainho, coordenadora do programa de pós- graduação, na vigência do meu estudo de doutorado, pelo apoio recebido em todos os momentos da minha vida.

Aos colegas de pós-graduação Gustavo Henrique Vieira, Carlos Eduardo Frigério Domingues, Rodrigo Gonçalves Quieze e Bruno Faulim Gamba e Natalia Freitas Rossi, que auxiliaram e apoiaram em momentos o desenvolvimento deste trabalho.

Ao aluno de pós-graduação Juan Diego Loaiza Medina pela ajuda nas dúvidas de informática e pela ajuda na rotina do SAG, para que eu pudesse finalizar essa tese.

Ao aluno de iniciação científica Darlan Leme, que auxiliou na coleta de dados e tornou possível a publicação do primeiro artigo.

A Rosemary Cristina da Silva funcionária da Biblioteca Central do Campus de Botucatu Unesp pelo auxílio na elaboração das referências.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IB pela dedicação e apoio recebido na orientação dos tramites acadêmicos e burocráticos.

À amiga e colega Rosana Aparecida Bicudo da Silva, que sempre colaborou comigo para que eu pudesse concluir meu trabalho.

## Índice

Lista de abreviaturas e siglas	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
<b>1. Introdução</b>	<b>01</b>
1.1. Histórico	02
1.2. Genética e Etiologia	05
1.3. Diagnóstico	08
1.4. Correlação Genótipo Fenótipo	15
<b>2. Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>23</b>
3.1. Tipos de estudo	23
3.2. Casuística	23
3.3. Aspectos Éticos	24
3.4. Avaliação Clínica	24
3.5. Análise Citogenética	25
3.5.1. Cultura temporária de linfócitos periféricos	25
3.5.2. Coloração	26
3.5.2.1. Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)	26
3.6. Análise citogenética	27
3.7. Análise Molecular	27
3.7.1. Obtenção do DNA genômico	27
3.7.2. Hibridação Genômica Comparativa em Microarranjos	28
<b>4. Resultados</b>	<b>32</b>
4.1. Artigo científico 01 em inglês	33
4.2. Artigo científico 02 em inglês	38
<b>5. Conclusão</b>	<b>59</b>
<b>6. Referências</b>	<b>60</b>
<b>Anexos</b>	
ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa	75
ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido	76
ANEXO 3 – Ficha de Anamnese	78
ANEXO 4 – Fotos dos 22 pacientes utilizados no <i>paper 2</i>	84

## 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 (<http://www.genenames.org/guidelines.html>).

AAP	Academia Americana de Pediatria
aCGH	Hibridação Genômica Comparativa em microarranjos
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
cen	Centrômero
DNPM	Desenvolvimento Neuropsicomotor
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>ELN</i>	Gene da elastina
EAP	Estenose pulmonar periférica
EASV	Estenose aórtica supravalvular
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
gDNA	DNA genômico
HII	Hipercalcemia Idiopática Infantil
Kb	Kilobase
LCRs	Repetições com baixo número de cópias
Mb	Megabase
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas de ligação
μL	Microlitro
Mid	Medial
ML	Mililitro
Ng	Nanograma
NAHR	Recombinação homóloga não alélica
PCR	Reação em cadeia por polimerase
q	Braço curto do cromossomo
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
rpm	Rotações por minuto
SWB	Síndrome de Williams Beuren
SWBinv	Inversão na região cromossômica da SWB
SAG	Serviço de Aconselhamento Genético
SUS	Serviço Único de Saúde
tel	Telômero



## Resumo

A síndrome de Williams-Beuren (SWB) é uma afecção genética rara, com frequência estimada em 1:7500 nascidos vivos, caracterizada por alterações do desenvolvimento associados a deficiência mental moderada, anomalias cardíacas e fâcies peculiar, além de um comportamento amigável, alegre e desinibido. O diagnóstico clínico é bastante acurado, porém as diferenças fenotípicas conforme a idade pode dificultar o diagnóstico. O diagnóstico clínico pode ser confirmado pelo diagnóstico molecular, sendo a técnica de FISH, o padrão ouro deste diagnóstico. A SWB tem por etiologia a deleção em 7q11.23, sendo esta ocorrência esporádica. A deleção típica envolve uma região cromossômica de 1.5 Mb ou 1.8 Mb contendo 28 genes denominada de região crítica da SWB. O mecanismo de deleção está ligado as duplicações segmentarias (DSs) ou repetições com baixo números de cópias LCRs. A origem da deleção tem sido atribuída ao rearranjo desigual na meiose devido as recombinações homologas não alélicas (*Nonallelic homologous recombination-NAHRs*), que pode ocorrer entre regiões repetidas de baixo número de cópias (LCRs). Para termos a indicação ou não da realização do exame de FISH, existem na literatura 3 sistemas de pontuações (escores), publicados por Lowery et al,1997, AAP, 2001 e Sugayama et al, 2007. O presente estudo teve como um dos seus objetivos a verificação da especificidade e da sensibilidade dentre os 3 sistemas publicados, para termos a indicação de qual seria o melhor a ser aplicado. Para tanto foram utilizados um banco de características clínicas com 250 pacientes que já haviam realizados exames da FISH e onde foram aplicados os 3 sistemas de escores. Todos os três sistemas de escores apresentaram alta sensibilidade e baixa especificidade, porém o escore descrito por Lowery et al., 1995 foi considerado o de mais fácil aplicação. O segundo objetivo deste estudo foi avaliar os tamanhos dos fragmentos deletados para podermos inferir os locais de quebras. Desta forma foram estudados pela primeira vez na literatura, 22 pacientes com a técnica de aCGH, que apresentou 4 conjuntos de tamanhos de fragmentos; dois deles já esperados, fragmentos de 1.6 Mb e 1.9 Mb (17 casos), e dois conjuntos inesperados sendo um de 2.0 Mb (3 casos), e o outro conjunto de segmentos menores de 1.2 Mb (1 caso) e 1.4 Mb (1 caso). Todos os fragmentos encontrados tiveram suas quebras junto as LCRs e em nenhum deles ocorreu quebras na região crítica da SWB. Esse estudo demonstrou assim a enorme complexidade genômica desta região cromossômica.

## Abstract

The Williams - Beuren syndrome (WBS ) is a rare genetic disorder , often estimated at 1:7500 live births , characterized by developmental disorders associated with moderate mental retardation , cardiac anomalies and peculiar facies , and a friendly demeanor , cheerful and uninhibited . The clinical diagnosis is fairly accurate, but the phenotypic differences according to age can make diagnosis difficult. The clinical diagnosis can be confirmed by molecular diagnosis, and the technique of FISH, the gold standard for this diagnosis . The SWB is etiology deletion in 7q11.23, which is sporadic. The typical deletion involves a chromosomal region of 1.5 Mb or 1.8 Mb containing 28 genes designated critical region of SWB. The mechanism of deletion is linked to segmental duplications (SDs) or repetitions with low copy numbers of LCRs. The origin of the deletion has been attributed to unequal rearrangement in meiosis because nonallelic homologous recombination (NAHRs), which can occur from repeated regions of low copy number (LCRs). To get an indication whether or not the examination of FISH, in literature there are 3 systems scores (scores), published by Lowery et al, 1997, AAP, 2001 and Sugayama et al, 2007. The present study had as one of its objectives to verify the specificity and sensitivity among 3 systems publish, to terms to indicate what would best be applied. Therefore, we used a database of clinical characteristics of 250 patients who had already performed the FISH tests were applied and where the three scoring systems. All the three scoring systems showed high sensitivity and low specificity, but the score described powder Lowery et al., 1995 was considered the easiest application. The second objective of this study was to evaluate the sizes of the fragments deleted in order to infer the local break points. Thus were studied for the first time in the literature, 22 patients with aCGH technique , which showed four clusters of fragment sizes, two of them have expected fragments of 1.6 Mb and 1.9 Mb (17 cases) and two sets of unexpected be a 2.0 Mb (3 cases), and another set of smaller segments of 1.2 Mb (1 case) and 1.4 Mb (1 case) . All fragments had found their breaks together LCRs and none of them break points occurred in the critical region of SWB. Our study thus demonstrates the enormous complexity of this genomic chromosomal region.

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Williams-Beuren (SWB), também conhecida como síndrome de Williams (OMIM 194050) é uma afecção do grupo das anomalias múltiplas e deficiência mental, que foi descrita independentemente por Williams et al., 1961, e Beuren et al., 1962\*.

A SWB é caracterizada por várias anormalidades físicas e de desenvolvimento, incluindo dismorfismos faciais que estão sempre presentes, anomalias cardiovasculares congênitas, deficiência mental e de crescimento, perfil cognitivo característico, e ocasionalmente hipercalcemia infantil transitória (AAP, 2001).

O perfil linguístico é muito peculiar nos indivíduos com SWB, que apresentam relativa preservação de sua capacidade de linguagem, mas geralmente são deficientes em habilidades não verbais que envolvem: manipulações com números, cognição visuo-espacial, motricidade e resolução de problemas (VOLTERRA et al., 1996; BELLUGI et al., 2000; ROSSI et al., 2006).

As crianças com SWB apresentam problemas comportamentais tais como, hiperatividade, desinibição social, amabilidade excessiva, insegurança, e baixa capacidade de concentração, características estas que prejudicam o relacionamento e adaptação social, bem como a aprendizagem (LASHKARI et al., 1999; AAP 2001).

A SWB é causada por uma microdeleção hemizigótica no braço longo do cromossomo 7 (7q11.23), abrangendo de 1.5 a 1.8 Mb, contendo 28 genes. A haploinsuficiência destes genes leva a um fenótipo característico, mas a correlação genótipo-fenótipo ainda é pouco estabelecida (SCHUBERT, 2009). A ocorrência desta afecção é estimada em 1/7.500 nascidos vivos (STRØMME et al., 2002).

A região cromossômica deletada na SWB envolve o gene *ELN* (*Elastin*) que codifica a proteína elastina, importante componente das fibras elásticas do tecido conjuntivo, o que pode explicar várias características da SWB como, alterações faciais, voz rouca, cardiopatia, envelhecimento precoce da pele, divertículos vesicais, hérnias, contratura ou frouxidão de articulações.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

Entretanto, outras características importantes na síndrome, como a hipercalcemia, o perfil neuropsicológico e a deficiência mental não são decorrentes da deleção no gene da elastina e tem sido atribuída a deleção de outros genes contíguos, ainda não completamente elucidados (EWART et al., 1993b; OSBORNE et al., 1996; AAP, 2001).

A hipótese diagnóstica da SWB baseia-se na evolução clínica durante os primeiros anos de vida, quando as características faciais, o perfil cognitivo e as anomalias cardíacas tornam-se evidentes. 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 é muito eficiente em demonstrar a microdeleção da banda 7q11.23 no cromossomo 7 (LOWERY et al., 1995; AAP, 2001; SUGAYAMA et al., 2003; SOUZA et al., 2007).

A terminologia descritiva desta síndrome gerou polêmica. Os aspectos faciais comuns como nariz arrebitado, ponte nasal achatada, órbitas profundas, boca grande, lábios inferiores grossos, bochechas proeminentes, filtro nasal longo, propiciam semelhança com duende (*elfin-like*), e por isso alguns autores designaram essa síndrome como síndrome da face de duende (*Elfin-Facies Syndrome*) (JOSEPH; PARROT, 1958). Entretanto este termo tem conotação mitológica e obviamente não é bem recebido pelos familiares.

Outros autores descreveram essa afecção como síndrome do “frequentador de coquetel” (*Cocktail Party Syndrome*), pois as crianças comprometidas são loquazes, amáveis e desinibidas (UDWIN et al., 1987). Esta denominação também tem conotação negativa e não reflete o conjunto de sintomas associados com a síndrome. Hoje a designação mais aceita pelos profissionais e pais é síndrome de Williams-Beuren, ou simplesmente síndrome de Williams.

## 1.1 Histórico

Em 1961, Williams et al., na Nova Zelândia descreveram 4 pacientes com estenose aórtica supravalvular, deficiência mental, e aspectos faciais distintos, consistindo de testa e bochechas proeminentes, olhos profundos, boca e lábios grandes. Um ano após, Beuren et al. (1962) na Alemanha relataram dados peculiares em 4 pacientes que apresentavam estenose da artéria pulmonar, anomalias dentária, estrabismo, e temperamento amigável. Nestes pacientes os achados faciais eram semelhantes aos descritos por Williams et al. (1961). Esses relatos delinearão uma nova síndrome.

Apesar das primeiras descrições detalhadas da síndrome terem sido atribuídas à Williams e Beuren, ambos cardiologistas, existem relatos prévios na literatura de pacientes com hipercalcemia idiopática infantil (HII) tipo Fanconi que apresentavam características semelhantes às da SWB (BLACK; BONHAM CARTER, 1963).

As características clínicas como fâcies de duende, retardo de crescimento, dificuldades na alimentação, vômitos persistentes, irritabilidade, constipação, hipotonia, alterações renais, sopro cardíaco e deficiência mental caracterizavam a HII tipo Fanconi (FANCONI et al., 1952; MARTIN et al., 1984).

No ano seguinte às publicações de Williams et al., (1961) e Beuren et al., (1962), outros pesquisadores notaram que a fâcies das crianças com SWB eram semelhantes a fâcies de duende dos pacientes com HII tipo Fanconi acompanhada de sopro cardíacos, então propuseram que o sopro cardíaco da HII tipo Fanconi poderia estar relacionado com lesões estenóticas evidenciadas na SWB. Outra comparação seria que as crianças com SWB que apresentavam problemas de alimentação durante a infância tivessem um período de hipercalcemia não diagnosticado e que se resolvia espontaneamente. Consideraram então a possibilidade de se tratar de uma entidade única (BLACK; BONHAM CARTER, 1963; MARTIN et al., 1984).

O vínculo entre as duas doenças ficou claramente estabelecido quando Garcia et al., (1964) descreveram um recém nascido que apresentou hipercalcemia, estenose aórtica supra-avalvular e estenose da artéria pulmonar, tendo evoluído com fâcies de duende e deficiência mental. Neste mesmo ano Bonham Carter e Sutcliffe (1964), estudando a manifestação cardiovascular nos pacientes com SWB, observaram que a estenose arterial não se limitava à aorta, e ocorria também nas bifurcações das grandes artérias, seja da circulação pulmonar ou sistêmica, podendo comprometer as artérias renais e consequentemente causar hipertensão arterial em pacientes adultos.

As manifestações neurológicas nos pacientes portadores da SWB foram destacadas no estudo de Von Armin e Engel (1964). Os 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 intelectual.

O resultado de necrópsia de um caso de HII tipo Fanconi, no qual foi encontrada estenose aórtica supra-avalvular, caracterizou a presença da estenose aórtica supra-avalvular na HII tipo Fanconi (BLACK et al., 1965). Neste mesmo ano, Jue et al. (1965) publicaram o

relato de 2 pacientes com HII tipo Fanconi, um deles associado com estenose aórtica supra-avalvular (EASV) e o outro com estenose da artéria pulmonar. Esses pacientes, durante a infância, apresentaram problemas gastrointestinais e nível sérico de cálcio elevado.

Um estudo com 19 indivíduos com SWB, enfatizando algumas características como baixa estatura, microcefalia, e grande amabilidade, foi importante por envolver casuística relativamente ampla e acompanhamento que se estendeu da infância à fase adulta (JONES; SMITH, 1975).

Em uma família com EASV de caráter autossômico dominante, detectou-se uma translocação recíproca,  $t(6;7)(p21.1;q11.23)$ , na qual foi documentado que a translocação causou ruptura no gene da elastina. Esta descoberta associou o gene da elastina a EASV, sugerindo que a lesão poderia ser causada pela expressão reduzida desta proteína no tecido vascular. Como grande parte dos pacientes com SWB apresentam EASV, o locus da elastina passou a ser considerado como candidato ao gene desta síndrome (CURRAN et al., 1993; MORRIS et al., 1993a).

A relação entre SWB e EASV foi demonstrada em um estudo com duas famílias as quais apresentavam EASV, um distúrbio vascular hereditário que causa estreitamento na maioria das artérias e pode levar a problemas cardíacos. Nesse estudo foram utilizados marcadores de DNA no braço longo do cromossomo 7 (*D7S371*, *D7S395*, *D7S448* e *ELN*). Os achados concluíram que o gene para a EASV está localizado no braço longo do cromossomo 7, próximo ao gene *ELN*, e ainda pode ser o responsável pelas anormalidades cardíacas da SWB (EWART et al., 1993a).

Esses achados levaram a hipótese que a SWB é uma síndrome de genes contíguos na qual as anormalidades dos tecidos conjuntivo e vascular são causadas pela deleção do gene que codifica um alelo do gene *ELN* na região 7q11.23. Um estudo realizado em 9 pacientes com SWB, onde 4 eram familiares e 5 esporádicos, todos apresentavam características faciais da síndrome, voz rouca, personalidade da síndrome e deficiência mental e seis apresentavam EASV. Nesse estudo foram utilizadas a técnica da hibridação *in situ* por fluorescência (*FISH*) e análise de *Southern blotting* para comprovar a hemizigosidade do locus da *ELN* em cada um dos pacientes afetados, sugerindo assim que a hemizigosidade do gene *ELN* está envolvida com a patogênese da SWB. Esse estudo concluiu que a possível causa da SWB é uma deleção submicroscópica dentro da subbanda cromossômica 7q11.23, e pode ser confirmada por testes genéticos como a (*FISH*) e

análises moleculares (EWART et al., 1993b). Subsequentemente confirmada por LOWERY et al., 1995 e MARI et al., 1995.

A técnica da FISH utilizando sondas para o gene da ELN torna-se o método padrão ouro para o diagnóstico da SWB (LOWERY et al., 1995; BRONDUM-NIELSEN et al., 1997). Atualmente os testes diagnósticos para detecção da deleção podem ser realizados pela FISH, amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA) ou microarranjos também denominada de aCGH (MORRIS, 2010).

A partir da década dos anos noventa foram publicados inúmeros estudos de identificação de genes, resultado de um grande esforço em determinar o tamanho da deleção e explicar a diversidade fenotípica (FRANCKE, 1999; OSBORNE et al., 1997; PEZZI et al., 2000; SCHUBERT, 2009).

## 1.2 Genética e Etiologia

A SWB acomete igualmente homens e mulheres, de qualquer etnia. Embora seja uma afecção rara, dentre as síndromes genéticas é uma das mais detectadas na infância (AAP, 2001).

A maioria dos casos é de ocorrência esporádica, resultado de uma deleção *de novo*, embora herança autossômica dominante tenha sido descrita. Foram identificadas três famílias nas quais a criança e os pais foram clinicamente diagnosticados como SWB, com padrão de herança autossômico dominante, sendo que os pais só foram diagnosticados após a identificação das crianças afetadas (MORRIS et al., 1993b).

Como a síndrome tem padrão de herança autossômica dominante os indivíduos acometidos têm 50% de chance de transmitir o distúrbio para seus descendentes. Quando os pais não são afetados o risco de recorrência é geralmente baixo, mas permanece a possibilidade teórica de mosaicismo de células germinativas (MORRIS et al., 1993b).

O diagnóstico clínico da SWB é confirmado pela técnica de FISH, que detecta 96% dos pacientes, a deleção submicroscópica 7q11.23, que é impossível de ser visualizada na citogenética clássica (LOWERY et al. 1995). A técnica utiliza uma sonda com a sequência de DNA do gene da *ELN* marcada com fluorocromo que se liga especificamente à região cromossômica, detectando a presença ou ausência da região comprometida na SWB, em células metafásicas e nos núcleos interfásicos.



A citogenética clássica, em bandamento GTG permite o diagnóstico de alterações cromossômicas estruturais como a identificação de deleções, inversões, translocações e outros rearranjos cromossômicos. No entanto, aberrações estruturais, como pequenas deleções e duplicações menores do que 3 ou 5 Mb não são possíveis de serem detectadas (MALUF; RIEGEL, 2011). No caso da SWB o estudo citogenético clássico também permite caracterizar rearranjos cromossômicos envolvendo a região 7q11.23 ou qualquer outra anormalidade citogenética. A falha em detectar a deleção do gene da elastina (4%) em um paciente com características clínicas sugestivas de SWB pode ser devida a várias possibilidades: (1) o paciente pode ter uma deleção pequena não envolvendo o gene da elastina, e não detectável pela sonda da FISH disponível. (2) podem ter sido deletados genes contíguos ao gene da elastina sem incluir este último, (3) o paciente pode ser uma fenocópia de SWB, ou (4) o paciente pode ter sido diagnosticado erroneamente (LOWERY et al., 1995).

A origem da deleção tem sido atribuída ao rearranjo intercromossômico desigual na meiose, que pode ocorrer em uma região contendo sequências repetidas de DNA, como a região da SWB 7q11.23 (DUTLY; SHINZEL, 1996; SCHUBERT, 2009; ZHANG et al., 2009).

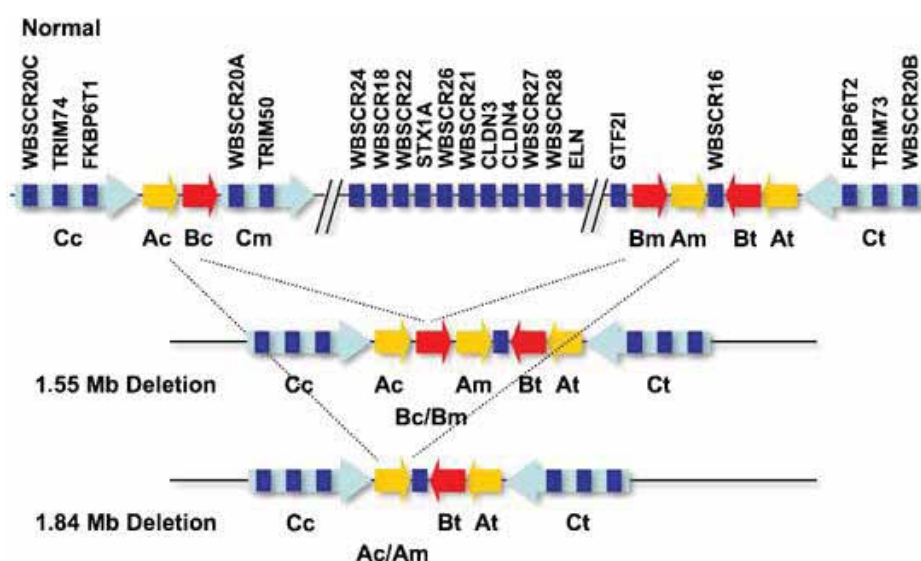
Estudos demonstraram que o mecanismo de microdeleção está diretamente ligada a regiões repetitivas chamadas de repetições com baixo número de cópias, denominadas de LCRs (*Low Copy Repeats*), também chamadas de duplicações segmental (*SDs*) e apresentam entre 10 a 400 Kb de tamanho. Estas regiões repetitivas são distribuídas por todo o genoma, constituindo cerca de 5% de seu total e está diretamente ligada a recombinação cromossômica durante o processo meiótico. Alguns processos de recombinação podem ocorrer de maneira desigual entre homólogos não alélicos (*nonallelic homologous recombination-NAHR*) o que resulta na deleção, duplicação ou inversão de um gene ou genes (LUPSKY, 1998).

A região comumente deletada na SWB contém 28 genes de cópias únicas com aproximadamente 1.5 Mb em tamanho e flanqueada por três grandes sequências de LCRs arranjadas em blocos A, B e C. Esses blocos são ordenados em complexos, os quais são localizados na região centromérica (cen), medial (mid) e telomérica (tel) do locus SWB (A, B, C cen, A, B, C mid e A, B, C tel). Cada LCR contém genes e pseudogenes (SCHUBERT, 2009; HOBART et al., 2010). (Fig. 01)

Quanto à origem parental da deleção, a maioria dos estudos mostrou proporção discretamente maior da origem materna, mas não parece haver influência desta origem no fenótipo dos pacientes (WU et al., 1998; WANG et al., 1999). Contudo uma inversão na região cromossômica da SWB (SWBinv-1) em pais de pacientes com SWB, aumentam a probabilidade de um subsequente rearranjo genômico meiótico como a deleção (BAYÈS et al., 2003).

A deleção comum em pacientes com SWB é variável, em torno de 1.55 Mb com pontos de quebra nos blocos de LCRs B (cen) e B (mid) (OSBORNE et al., 1996; PEOPLES et al., 2000; OSBORNE et al., 2001; SCHUBERT ., 2009). (Fig.01)

As deleções atípicas com menor ou maior tamanho também têm sido descritas (KORENBERG et al., 2000; SCHUBERT C., 2009). Cerca de 5% dos pacientes com SWB apresentam deleções de aproximadamente 1,84 Mb, que é causada pela recombinação entre os blocos de LCRs A (cen) e A (mid) (PEREZ JURADO et al., 1996; PEOPLES et al., 2000; VALERO et al., 2000; BAYÈS et al., 2003; SCHUBERT, 2009). (Fig. 01).



**Fig. 01.** Esquema parcial do mapa de transcrição da região 7q11.23. No topo o cromossomo normal, no centro e abaixo os cromossomos com as deleções clássica da SWB (1.55 e 1.84 Mb). Os diferentes duplicons centromérico (c) medial (m) e telomérico (t) dentro da LCRs e suas orientações são representados pelas setas específicas bloco (A) seta amarela; bloco (B) seta vermelha; bloco (C) seta azul claro. Unidades de transcrição são representadas por retângulos azuis escuros e nomeadas acima segundo Bayés et al., (2003).

Contudo há relatos de detecções de deleções parciais com ponto de quebra dentro da cópia única da região SWB, que variam entre os tamanhos 0.1 Mb - 1.0 Mb, levando estes pacientes a um fenótipo isolado de EASV, quando inclui apenas o gene da *ELN*, até o espectro completo da SWB com deleções de 1Mb (FRANGISKAKIS et al., 1996; KORENBERG et al., 2000; SCHERER et al., 2003). Deleções parciais que abrangem região telomérica da SWB distal ao gene da *ELN* são mais graves do que as deleções que englobam a parte centromérica ao gene da *ELN* (FRANGISKAKIS et al., 1996; MORRIS et al., 2003; HELLER et al., 2003; BAYÉS et al., 2003; SCHUBERT C., 2008).

As inversões paracêntricas no locus da SWB são devido a quebras externas da região de cópia única do gene, sem interrupção da expressão gênica, sem sintomas clínicos e presente em 30% das transmissões cromossômicas parentais da população de pacientes com SWB (BAYÉS, et al., 2003; OSBORNE et al., 2001). Na população não SWB a presença da inversão está presente em cerca de 5% (OSBORNE et al. 2001; HOBART et al., 2004).

A presença da inversão predispõe a formação de gametas desbalanceados durante a meiose. Um evento NAHR intercromossômico ou intercromatide entre um cromossomo invertido e um não invertido pode resultar em uma deleção ou uma duplicação recíproca na região da SWB. Esses eventos podem acontecer quando ocorre um *crossing-over* desigual entre o bloco B (tel) e B (mid), derivada de um cromossomo invertido ou um cromossomo não invertido (BAYÉS et al., 2003; SCHUBERT, 2009).

As duplicações dentro da região SWB são explicadas pelo mesmo mecanismo de NAHR, como as que ocorrem nas deleções. Embora as duplicações devessem ocorrer com frequência similar das deleções, isso não ocorre. As duplicações têm sido identificadas recentemente devido ausência de fenótipo compatível com SWB, porém com comprometimento de fala e linguagem similar ou mais severas aquelas apresentadas pelos pacientes com deleção (TURNER et al., 2008; OSBORNE et al., 2007).

### **1.3 Diagnóstico**

Embora a SWB seja definida por características clínicas específicas, muitas vezes, o diagnóstico clínico pode ser difícil durante a infância, pois esta é uma doença de manifestação progressiva e muitas características podem não estar presentes no início da vida, especialmente as anormalidades cardíacas EASV e estenose da artéria pulmonar

(EAP), que podem desenvolver-se lenta e gradativamente. Os aspectos faciais típicos acentuam-se com a idade e podem não ser reconhecidos no primeiro semestre de vida. Restrição de crescimento pode manifestar-se ao nascimento e geralmente está presente nos primeiros anos de vida, bem como os problemas de alimentação, cólicas, refluxo gastroesofágico, vômitos e irritabilidade, que podem ser sintomas da hipercalcemia, mas são inespecíficos durante a infância, além do que, não se avalia rotineiramente o nível sérico de cálcio (MORRIS et al., 1988; AAP, 2001; PATIL et al., 2012).

Um aspecto que chama a atenção no desenvolvimento das crianças com SWB é seu distinto perfil cognitivo e comportamental. Elas evoluem com atraso motor, de linguagem e cognitivo, com importante deficiência na cognição visuo-espacial e relativa preservação na linguagem. Muitas apresentam deficiência mental moderada, com QI médio em torno de 60. Os distúrbios comportamentais incluem: hiperacusia, porém aliado a forte atração pela música, problemas de sono, dificuldade de concentração, hiperatividade, ansiedade e excessiva sociabilidade (UDWIN; YULE, 1991; SCHULTZ et al., 2001).

Frente às dificuldades no diagnóstico clínico, desde 1984 até os dias atuais tem-se tentado elaborar sistemas de pontuação para facilitar o diagnóstico clínico da SWB. Preus (1984) estudou 52 pacientes com suspeita clínica de SWB e propôs um escore baseado em 50 características clínicas, incluindo predominantemente dismorfismos faciais e achado dermatoglíficos, mas esse escore tem sido pouco utilizado na literatura devido à sua complexidade (MARI et al., 1995).

Em 1995, Lowery et al. realizaram estudo citogenético com FISH em 235 pacientes e elaboraram um escore baseado em 6 características fenotípicas de 153 pacientes estudados (quadro 01). Os pacientes com valores de quatro a dez pontos foram considerados como clássicos; e entre zero e três, classificados como duvidosos quanto ao diagnóstico da SWB. Esta classificação teve boa correlação com o genótipo, pois dos 114 pacientes com fenótipo clássico, 110 apresentaram a microdeleção, enquanto que dos 39 duvidosos apenas 3 tinham microdeleção.

**Quadro 01.** Sistema de pontuação de Lowery et al. (1995)

Características fenotípicas	Pontos
Características faciais típica	3
Deficiência mental / Atraso DNPM	1
EASV	2
Cardiopatía congênita que não EASV	1
Hérnia inguinal	1
Hipercalcemia	2
Total	10

O Comitê de Genética da Academia Americana de Pediatria elaborou um guia para auxiliar o pediatra nos cuidados às crianças com SWB, propondo um escore simples atribuindo um ponto a cada uma das 7 características clínico-laboratoriais: crescimento, comportamento e desenvolvimento, dismorfismos faciais, estenose aórtica supra-valvular, outros problemas cardíacos, alterações do tecido conjuntivo e hipercalcemia. Se a pontuação obtida for inferior a 3, o diagnóstico de SWB é improvável, e se maior que 3 deve ser realizado o teste de FISH (AAP, 2001).

Um estudo realizado por SUGAYAMA et al., (2004; 2007) envolvendo 20 pacientes com diagnóstico clínico de SWB que foram submetidos à criteriosa avaliação clínico-laboratorial e realização do teste de FISH, que detectou a microdeleção em 17 casos. Além de analisar seus pacientes, a autora realizou também uma metanálise com vários trabalhos da literatura para estabelecer quais características clínicas associaram-se com a presença de microdeleção. Seus resultados culminaram na elaboração de um escore pontuando 15 características da SWB, com valor máximo de 31 pontos e nível de corte em 20 pontos. A probabilidade de um paciente com valor igual ou maior que 20 pontos não ter microdeleção é baixa, portanto o teste de FISH estaria indicado na suspeita da SWB com pontuação inferior a 20. Quanto aos pacientes FISH negativo, na prática, há duas direções: (1) realizar seguimento clínico proposto aos pacientes com SWB, pois uma minoria dos pacientes, com fenótipo típico da SWB não é detectada pela técnica de FISH ou outros estudos moleculares; (2) proceder-se aos principais diagnósticos diferenciais da SWB, como a síndrome de Noonan, a síndrome de Coffin-Lowry, síndrome álcool fetal e a síndrome da rubéola fetal (SUGAYAMA et al., 2004; 2007).

**Quadro 02.** Sistema de pontuação elaborado por SUGAYAMA et al., (2004; 2007)

Características	Pontos
Baixo peso ao nascimento	3
Dificuldades alimentares	3
Constipação intestinal	3
Fácies típica	3
EASV	3
Deficiência mental	3
Personalidade amigável	3
Estrabismo	2
Atraso de DNPM	2
Dificuldade de ganho de peso	1
Outra cardiopatia que não a EASV	1
Hipertensão arterial	1
Contraturas articulares	1
Hiperacusia	1
Hipoplasia unguial	1
<b>Total</b>	<b>31</b>

Um estudo realizado na Índia nos mostra que as características clínicas dos pacientes com SWB são dependentes da idade e fundamentais no diagnóstico. Em uma amostra de 27 pacientes com idade média de 3 meses a 15,1 anos todos apresentaram boca grande, nariz curto e edema periorbital. Na maioria estreitamento bitemporal, bochechas proeminentes, hipoplasia malar, queixo pequeno, filtro nasal longo, ponta do nariz bulboso e pregas epicânticas. A maloclusão dentaria, dentes espaçados e orelhas grandes em abano foram observados em 41-44% da amostra e como achados menores sobrancelhas amplas, íris estrelada e estrabismo. A maioria dos problemas cardíacos apresentados tratava-se de EASV e EPP (PATIL et al., 2012).

O estudo de Patil et al., (2012) foi comentado por Viana et al., (2012), comparando um estudo realizado com 23 pacientes brasileiros. As características mais encontradas foram personalidade amigável (93%), lábios proeminentes (93%), clinodactilia de 5º dígito (66,7%), fissura palpebral (60%), filtro longo (53%), hipersensibilidade ao som (46,7%), íris estrelada (40%), hiperextensibilidade das juntas (40%), narinas antevertidas e voz rouca (33,3%). As diversidades de características encontradas nas 2 amostras deve estar relacionada com as diferenças étnicas. A confirmação da suspeita clínica é essencial para o monitoramento clínico do paciente e aconselhamento genético para a família.

A hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) utilizando sondas específica para o gene da *ELN* tanto comerciais quanto preparadas a partir de insertos em cromossomos

artificiais de bactérias (BAC), estabelecem o diagnóstico da SWB mostrando a presença de um alelo da *ELN* em vez de dois alelos. Embora a FISH seja o padrão ouro para o diagnóstico da SWB, outras técnicas vem sendo utilizadas como a amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA) e hibridação genômica comparativa em microarranjos (*array CGH* ou *aCGH*).

A técnica da MLPA permite a detecção do número de cópias de até 40 sequências de DNA genômico em uma única reação baseada na realização de polimerização em cadeia (PCR) (SCHOUTEN, et al 2002). Cada sequência-alvo é identificada por meio de um par de sondas que hibridam com o DNA do paciente em regiões adjacentes. Após a adição de ligase, que faz a junção das duas sondas, e posterior desnaturação, estas são amplificadas por PCR utilizando um *primer* universal marcado com fluorocromo. A separação e a quantificação dos produtos de amplificação são feitas por eletroforese capilar. A MLPA tem a vantagem de ser uma técnica fácil e rápida além de detectar deleções, deleções atípicas e duplicações presentes no genoma e entre suas desvantagens estão à incapacidade de detectar rearranjos balanceados, mosaicismos em baixo grau e a sensibilidade em relação à qualidade do DNA utilizado (KOZLOWSKI et al., 2008).

Um estudo comparando a técnica da MLPA e FISH, com 63 pacientes portadores da SWB, onde foram utilizadas para a FISH sondas comerciais comumente usadas para detecção da deleção (CYTOCELL® e VYSIS®) e para o MLPA o Kit (SALSA PO29) contendo 8 sondas para os genes da região crítica da SWB: *FKBP6*, *FZD9*, *TBL2*, *STX1A*, *ELN*, *LIMK1*, *RFC2* e *CYLN2*. Em 52 pacientes a deleção foi detectada em ambas as técnicas, 10 pacientes não apresentaram a deleção em ambas às técnicas e apenas um paciente apresentou uma pequena deleção atípica não detectada pela FISH e detectada por MLPA (VAN HAGEN et al. 2007).

Os testes realizados com as técnicas MLPA e FISH em diagnóstico de pacientes com síndromes de microdeleção acompanhadas de deficiência mental houve concordância entre os dois testes. Para a MLPA utilizaram Kits (MRC-Holland) e para a FISH sondas comerciais Qbiogene® e Vysis®. A MLPA foi realizada em uma amostra de 12 pacientes, com microdeleção confirmadas pela FISH. Os resultados obtidos foram 3 pacientes eram portadores da síndrome de DiGeorge, 4 da síndrome de Williams, 4 da síndrome Prader-Willi e 1 síndrome Miller-Diecker (CHO et al., 2009) .

A comparação entre a MLPA e marcadores de microssatélites no diagnóstico da SWB, foram consideradas eficazes na detecção do tamanho da deleção e sua origem



parental. Em um total de 88 pacientes foram utilizados para a análise de microssatélites 5 marcadores D7S1870, D7S489, D7S613 e D7S2476 dentro da deleção comum de 1.55 Mb e D7S489A para distinguir as deleções de 1.84 Mb e para a MLPA o Kit (SALSA P029). Os resultados foram concordantes em ambas as técnicas. A MLPA foi considerada uma técnica rápida, sensível, e de baixo custo quando comparada com a FISH ou array-CGH (DUTRA et al., 2012).

Na Argentina, pesquisadores descrevem o primeiro caso de SWB detectado pela técnica de MLPA utilizando o Kit comercial P064 baseada no protocolo de MRC-Holland com modificações, comprovando assim a eficácia da técnica (LAURITO et al., 2013).

Uma deleção atípica foi detectada por MLPA na região crítica da SWB em um paciente que apresentava estenose aórtica supravalvar, mas sem o fenótipo facial e comportamental típico da síndrome (HONJO et al., 2012).

Hibridização genômica comparativa em microarranjos ou aCGH também tem sido uma poderosa ferramenta na detecção de microdeleções e identificação de novas anormalidades citogenéticas. O método é relativamente difícil, trabalhoso e dispendioso e depende muito da plataforma a ser empregada (SNIJDERS et al., 2001; SHAFFER et al., 2004).

A técnica array-CGH permite investigar perdas e ganhos de sequências de DNA no genoma total. O uso desta tecnologia tem possibilitado o diagnóstico molecular de alterações cromossômicas submicroscópicas não detectadas previamente, principalmente em indivíduos com deficiência mental e/ou múltiplas malformações congênitas de causa desconhecida. A técnica possibilita também delineamento de novas síndromes e mapeamento de genes envolvido na etiologia de várias condições clínicas (MALUF; RIEGEL, 2011).

Enquanto a análise citogenética detecta 10% de anomalias cromossômicas em pacientes com deficiência mental esta técnica possibilita a detecção de mais de 10%. Essa técnica é baseada na co-hibridização de um DNA teste e um DNA controle marcado diferencialmente (fluorocromos verde e vermelho). Após a co-hibridização, a fluorescência emitida de cada clone é capturada por varredura de fluorescência, utilizando-se um *scanner*. Uma imagem de fluorescência é gerada, e a intensidade de fluorescência emitida por Cy3 (DNA teste) e Cy5 (DNA controle) é comparada. Os sinais de fluorescência são medidos quantitativamente por meio de uma análise digital de imagem utilizando-se um



software específico que converte os dados da intensidade de hibridização em um perfil linear (MALUF; RIEGEL, 2011).

Vários estudos realizados comprovaram a eficácia da técnica array CGH nas síndromes de microdeleção

A técnica da FISH foi realizada em um paciente, que apresentava EASV e estenose da artéria pulmonar periférica, mas sem qualquer outra característica clínica. Utilizando sondas, que envolviam os genes *ELN* e *LIMK1* detectou-se a deleção da SWB. E utilizando-se da plataforma Agilent® constituída de 4 X 44K oligonucleotídeos foi realizada aCGH, confirmando uma deleção de 2.43 Mb da região 7q11.22-q11.23, abrangendo 1.43 Mb proximal da região crítica da SWB e entendendo-se 1 Mb além dela (BLYTH et al. 2008).

A técnica de aCGH foi primordial no diagnóstico de um bebê prematuro com 31 semanas e fenótipo sugestivo de síndrome de Alagille, onde foi detectada uma deleção 7q11.23 que é o locus da SWB. E no ano seguinte também ocorrera um caso semelhante com bebê prematuro e suspeita diagnóstica de síndrome de Alagille, e quando realizado a análise array-CGH utilizando a plataforma (Genome®Dx v3.0 contendo 105,000 oligonucleotídeos) revelou uma deleção de 1.6 Mb na banda 7q11.23 consistente com a SWB (SHAH et al, 2008; HONEYWELL et al. 2009).

Uma triagem realizada entre pacientes com epilepsia e defeitos neuronais migratórios, utilizando-se da aCGH plataforma Agilent® 60K oligonucleotídeos cobrindo toda a extensão do genoma, detectaram uma paciente com duplicação do locus da SWB. O resultado foi complementado por análise de microssatélites demonstrando que a duplicação era de origem materna e a análise da FISH demonstrou que a duplicação era em *tandem* e que a mãe não apresentava a região de duplicação invertida. A paciente apresentava um grave atraso de linguagem-expressiva, que confirmava o diagnóstico descrito por Somerville et al. (2005) em pacientes com duplicação do locus da SWB (TORNIERO et al, 2007).

A duplicação recíproca do locus da SWB foi detectada em 14 pacientes de uma série de pacientes com deficiência mental idiopática. Os achados clínicos associados à duplicação não eram bem definidos, mas o atraso na linguagem era frequente. Dentre os pacientes com duplicação da região crítica da SWB, 9 eram familiares e 5 *de novo*. Eles foram identificados pela técnica de MLPA baseado na matriz de aCGH ou aCGH/oligonucleotídeo. Esse estudo demonstrou que além de atraso de linguagem a

duplicação 7q11.23 está associada as anomalias congênitas e fácies característica (VAN DER Aa et al, 2009).

A aCGH detectou em uma família, onde a mãe, o pai e a filha apresentavam deficiência mental inespecífica, sem manifestações clínicas ou características dismórficas, uma deleção da região crítica da SWB na filha e no pai. Não foram detectadas outras anomalias na família. Os autores contrariam relatos anteriores em que as manifestações clínicas são à base do diagnóstico (RAFATI et al. 2012).

O estudo genético molecular realizado pela aCGH utilizando a plataforma Affymetrix® 250K, detectou uma duplicação da região SWB em uma paciente com paralisia cerebral e dismorfismos faciais acompanhados de diagnóstico de epilepsia, pelo departamento de neurologia pediátrica de Ankara Children's Health and Diseases, Hematology-Oncology Hospital, Ankara, Turkey. O aCGH dos pais foi normal (DEGERLIYURT et al. 2012).

A primeira triplicação da região da SWB em uma paciente com deficiência mental, severo atraso de linguagem expressiva, problemas comportamentais e dismorfismos, foi detectada com aCGH e confirmadas pela FISH e MLPA (BEUNDERS et al. 2010).

#### **1.4 Correlação Genótipo-Fenótipo**

A região comumente deletada na SWB, que se estende de D7S489 a D7S1870, foi definida pela genotipagem de indivíduos afetados por marcadores de microssatélite da região 7q11.23 (PEREZ-JURADO et al., 1996; WU et al., 1998). Nesta região crítica, além da hemizigosidade do gene da *ELN*, vários outros genes foram identificados. (Fig. 02)

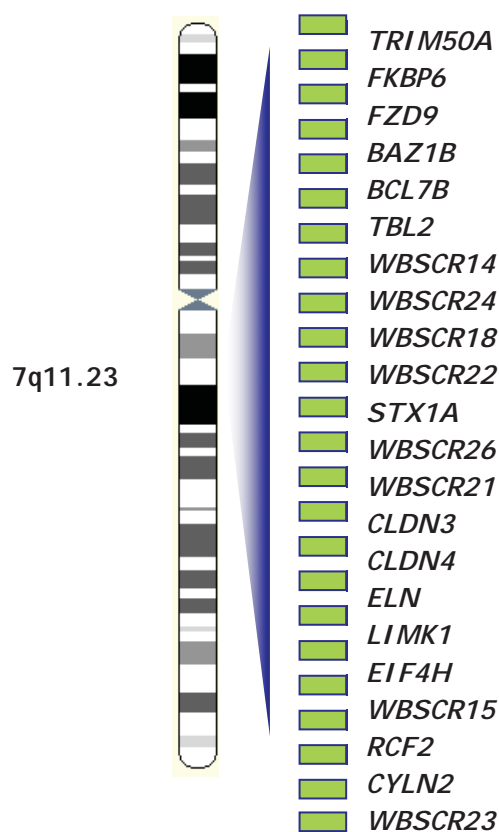


Figura 02. Principais genes mapeados na região deletada da SWB.

♦ *ELN* consiste de 34 exons e ocupa 47 Kb do DNA genômico. A proteína elastina é encontrada predominantemente no tecido conjuntivo das artérias, onde está disposta em camadas paralelas separadas pelo músculo liso. Insuficiência ou anormalidade do gene da elastina tipicamente resulta em estenose aórtica supravalvular, o que pode ocorrer como traço isolado de dominância autossômica, ou como parte de um padrão principal de problemas, tal como na SWB (EWART et al., 1993a, URBAN et al., 1996; OSBORNE et al., 1997; TASSABEHJI et al., 1997). Estudos genéticos mostraram que a estenose aórtica supravalvular isolada associa-se a mutações intragênicas no gene da elastina, enquanto que a SWB envolve deleção do gene da elastina na sua totalidade. Esses achados sugerem que a estenose aórtica supravalvular, pode ser causada por defeitos quantitativos ou qualitativos do gene da elastina. Indivíduos com estenose aórtica supravalvular isolada podem ter envelhecimento precoce da pele e características faciais similares àquelas dos pacientes com SWB, mas não apresentam as anormalidades comportamentais e do desenvolvimento neurológico associadas com a SWB (URBAN et al., 1996; LI et al., 1997; KARNIK et al., 2003; MERLA et al., 2010). Contudo, a

patogênese da arteriopatia em pacientes com SWB pode ser mais complexa incluindo outros genes da região crítica deletada como *NCF1* (DEL CAMPO et al., 2006, MERLA et al., 2010). Hipertensão também é uma característica frequente em pacientes com SWB, mesmo sem apresentar estenose da artéria renal (BRODER et al., 1999).

◆ *LIM-quinase 1 (LIMK1)*: é o segundo gene mais frequentemente deletado nos pacientes com SWB. Este gene pertence a uma família de proteína quinase envolvida no desenvolvimento do cérebro. Tem sido demonstrado in vivo que a LIMK1 está localizada na sinapse neuromuscular, sugerindo que *LIMK1* pode desempenhar um papel na formação e manutenção da sinapse (SCOTT; OLSON, 2007). A criança com WBS tem incapacidade de reproduzir visualmente objetos, isto é, deficiência de cognição construtiva visuo-espacial e suspeita-se que *LIMK1* contribui para esta característica, com bases em relatos de crianças afetadas por EASV isolada e deleção parcial da região de SWB compreendendo apenas os genes *ELN* e *LIMK1* (FRANGISKAKIS, et al. 1996; WANG et al. 1998). A deleção do gene *LIMK1* tem sido implicada na deficiência de integração visuo-espacial, que é uma característica marcante na SWB (FRANGISKAKIS et al., 1996), mas atualmente esta possibilidade é questionada, pois foram identificados vários casos de deleção do *LIMK1* sem deficiência visuo-espacial (TASSABEHJI et al., 1996) e assim considera-se mais provável que a função visuo-espacial não dependa de um único gene e sim de combinações gênicas específicas (SCHULTZ et al., 2001; SMITH et al., 2009).

◆ *GTF2IRD1* juntamente com *GTF2I* e *GTF2IRD2*: pertencem à família do fator de transcrição *TFII-I* que se liga aos elementos dos genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação (THOMPSON et al., 2007). Similar a outros membros da família do gene *TFII-I*, *GTF2IRD1* é altamente expresso durante a odontogênese, e por consequência pode estar envolvido nas anormalidades dentárias na SWB (OHAZAMA; SHARPE, 2007). O gene *GTF2IRD1* durante o desenvolvimento é predominantemente expresso nos tecidos musculoesqueléticos e craniofaciais, ao passo que em camundongos é expresso nos neurônios do sistema nervoso central e periférico, gânglio espiral da cóclea, músculo liso, retina e epitélio olfativo. Um modelo animal de rato abrangendo uma deleção entre os genes *clip2* e *gtf2ird1* mostraram anormalidades craniofaciais, como mandíbula desalinhada, focinho disforme e anomalias dentárias (TASSABEHJI et al., 2005). O gene *gtf2ird1* em camundongo *knockout* por sua vez não exibiu anomalias craniofaciais ou dentárias (PALMER et al., 2007). A haploinsuficiência dos genes *gtf2ird1* em camundongos foi

associada ao déficit de crescimento, hipoplasia da mandíbula entre outros defeitos craniofaciais semelhantes às anormalidades e problemas dentários encontrados na SWB (ENKHMANKH et al., 2009). Inúmeros estudos mostraram que o nível de transcrição do gene *GTF2IRD1* em pacientes com SWB não apresentam diferenças significantes perante aos controles, considerando os níveis de transcrição dos genes flanqueados *BAZ1A*, *TBL2* e *GTF2I* (MERLA et al., 2006; COLLETTE et al., 2009; PALMER et al., 2009; ANTONELL et al., 2010). Análises de fenótipos dos pacientes com deleções parciais da região SWB sugerem que *GTF2IRD1* tem sobreposição nas suas funções e pode contribuir para algumas das características craniofaciais, incluindo déficit intelectual e perfil cognitivo comportamental, como as habilidades visoespaciais, cognição e hipersociabilidade (EDELMAN et al., 2007; HOWALD et al., 2006; MORRIS et al., 2003). Os genes *GTF2I* e *GTF2IRD1* também podem estar envolvidos com as características neurocognitivas dos pacientes com SWB, dentre elas a habilidade visuo-espacial e sociabilidade (EDELMANN et al., 2007). Hipótese confirmada por (ANTONELL et al., 2010). Outro estudo sugeriu que o gene *GTF2I* possa estar envolvido com a sociabilidade e o *GTF2IRD1* com as habilidades visuo-espacial (DAÍ et al., 2009). Estudos em modelos animais também comprovaram a função do gene *GTF2I* no comportamento social na SWB (SAKURAI et al., 2010).

- ◆ *FKBP6*: gene que tem homologia com a proteína de ligação Fk-560 da classe das imunofilinas. *FKBP6* é expresso em testículos, coração, músculo esquelético, fígado e rim. A deleção desse gene em pacientes com WBS podem contribuir para alguns defeitos, tais como hipercalcemia e atraso do crescimento (MENG et al., 1998a).

- ◆ *FZD9*: gene que codifica um receptor trans-membrana humano homólogo ao gene receptor para a proteína *wg* (asa vestigial) da *drosophila melanogaster* (WANG et al., 1997). O gene está ligado à inibição de degradação de beta-catenina e a transcrição subsequente dos genes induzíveis beta-catenina/LEF. A beta-catenina é conhecida por estar envolvida com o desenvolvimento de tumorigênese e auto renovação de células estaminais. Em humanos o gene está na região comumente deletada da SWB sem qualquer anormalidade para o sistema imunológico e hematopoiético (RANHEIM et al., 2005).

- ◆ *BAZ1B*: esta proteína também conhecida como fator de transcrição da síndrome de Williams (*WSTF*), é um componente do complexo de remodelação da cromatina dependente de ATP chamado (*WSTF*) incluindo complexo conjunto de nucleossomo

(WINAC), esses complexos são requeridos em muitos processos nucleares como replicação, transcrição e reparo da cromatina (CUS, et al., 2006; CAVELLÁN et al. 2006). O complexo *WINAC* interage com o receptor da vitamina D ligando e induzindo ativação do receptor (KITAGAWA et al. 2003). O gene *BAZIB* é expresso no tecido neural e evidências sugerem que algumas características da SWB podem ser resultados da disfunção da remodelagem da cromatina devida sua haploinsuficiência, incluindo anormal metabolismo da vitamina D e hipercalcemia (KITAGAWA et al. 2003; CUS, et al., 2006).

◆ *STX1A*: gene da syntaxina 1A *STX1A* desempenha um papel essencial na exocitose de células neuronais e neuroendócrinas, que também está relacionado nos processos de liberação e fusão de neurotransmissores nas vesículas sinápticas (OSBORNE et al., 1997; SCHMITT, 2001). Estudos realizados em ratos *knockout* e ratos transgênicos demonstraram um aumento na expressividade do gene *Stx1a* exibindo uma redução na secreção de insulina e deficiência de tolerância à glicose, possivelmente pela regulação anormal das células  $\beta$  pancreática. Alteração nos níveis de *STX1A* pode contribuir para a deficiência do metabolismo da glicose em pacientes adultos com SWB (LAM et al., 2005). Um estudo realizado em 65 pacientes com SWB demonstraram que uma variação nos níveis de transcrição do gene *STX1A* pode estar relacionada significativamente com a determinação de inteligência desses pacientes (GAO et al., 2010).

◆ *CLIP2/CYLN2/CLIP115*: codifica uma proteína de ligação intracelular semelhante aos transcritos parciais dos genes *WSCR3* e *WSCR4* (DE ZEEUW et al., 1997; HOOGENRAAD et al., 1998). Ratos *knockout* com haploinsuficiência do gene *clip2* apresentavam características semelhantes às da SWB, incluindo deficiência de crescimento, alterações funcionais do hipocampo e deficiência de coordenação motora. A haploinsuficiência desse gene pode explicar as disfunções cerebelares e hipocampais envolvendo as características motoras e cognitivas em pacientes com SWB (HOOGENRAAD et al., 2002). Pacientes com deleções parciais da região SWB que não incluem o gene *CLIP2* exibem deficiência leve no aspecto visoespacial e coordenação motora. Esses achados sugerem a função do gene *CLIP2* em fenótipo cognitivo e motor (DAÍ et al., 2009; FERRERO et al., 2010).

◆ *EIF4H*: este gene é ubiquamente expressado e envolvido com o fator de iniciação na tradução e atributos de estabilização durante a ligação de RNA, hidrólises de ATP e desenrolamento da fita dupla de RNA (RICHTER et al., 1999).

◆ *RFC2*: subunidade do fator de replicação C que desempenha função essencial na replicação dos cromossomos em células eucarióticas (OSBORNE et al., 1996; PEOPLES et al., 1996). O alongamento do molde de DNA pela DNA polimerase requer a ação de uma proteína acessória (*PCNA*) antígeno nuclear de proliferação celular juntamente com o complexo *RFC* (PEOPLES et al., 1996). Quando ligado ao DNA, este complexo organiza varias proteínas envolvidas na replicação, reparação, modificação do DNA e modelagem da cromatina (MAJKA; BURGERS, 2004). O gene *RFC2* é ubíquo pelo complexo RAD6-RAD18 *in vitro*, e sua modificação é inibida na presença da proteína de replicação em resposta a um dano do DNA (TOMIDA *et al.*, 2008). Interessantemente, a linhagem celular derivada dos pacientes com SWB exibem um defeito na sinalização da ATR (*ataxia telangiectasia e RAD3*) ativas, similar a outras síndromes com defeito a resposta de reparo do DNA (O'DRISCOLL et al., 2007). As características clínicas desse grupo de doenças incluem microcefalia, déficit de crescimento, as quais são comuns na SWB. Portanto um defeito na sinalização da ATR na SWB pode ser responsável pela microcefalia e deficiência de crescimento, os quais são tipicamente vistos na resposta aos danos e reparos do DNA em síndromes de deficiência (KERZENDORFER; O'DRISCOLL, 2009).

◆ *BCL7*: sequência relacionada ao gene identificado na linhagem celular do linfoma de Burkitt (JADAYEL et al., 1998; MENG et al., 1998b). Não há evidencia em aumento no risco deste tumor na SWB (POBER; MORRIS, 2007). Embora uma estimativa de incidência de câncer na SWB ainda tenha sido calculada.

◆ *TBL2/WS-βTRP*: membro da família de genes β-transducinas (MENG et al., 1998b; PEREZ-JURADO et al., 1999). A expressão desse gene mostrou se reduzida, em testículo, músculo esquelético e coração (PEREZ JURADO et al., 1999). A função do gene *TBL2* na fisiopatologia da SWB (MERLA et al., 2010).

◆ *WBSCR14/WB-bHLH*: codifica o fator de transcrição da superfamília *Myc/Max/Mad* (MENG et al., 1998b). O gene *WBSCR14/WB-bHLH* é considerado atualmente um dos genes críticos da SWB; ele codifica um polipeptídeo da subclasse de fatores de transcrição designada *basic-helix-loop-helix leucine zipper (bHLHZip)*, que pertence à superfamília *Myc/Max/Mad*. Estes fatores de transcrição estão relacionados a várias funções das células eucarióticas como proliferação, crescimento, diferenciação e

apoptose. Desse modo, o gene *WBSCR14* pode estar envolvido no controle do crescimento (MENG et al., 1998b; DE LUIS *et al.*, 2000; Cairo et al., 2001).

Apesar dos progressos no conhecimento das funções básicas destes genes, a nível celular, o papel de cada um deles nas manifestações da SWB ainda não foi esclarecido e tem sido alvo de atenção dos pesquisadores que buscam estabelecer correlações genótipo-fenótipo.



*Objetivos*

## **2. OBJETIVOS**

1. Avaliar a sensibilidade e especificidade dos escores publicados por Lowery, et al., 1995; AAP, 2001; Sugayama et al., 2007 para orientação da realização do exame da FISH.

2. Avaliar os tamanhos exatos dos fragmentos deletados pela técnica de aCGH em pacientes com SWB.

## *Material e Métodos*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Tipo de Estudo

Série de casos de crianças, encaminhadas ao Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) do Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu–Unesp, com hipótese diagnóstica de síndrome de Williams-Beuren, para confirmação de diagnóstico, pela técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) no período de 2003 a 2012.

#### 3.2 Casuística

Indivíduos com hipótese diagnóstica de SWB foram sendo selecionados pela Associação Brasileira de Síndrome de Williams, São Paulo-SP.

A cada dois meses o geneticista do SAG realizava consultas genético clínicas junto a estes casos e propunha aos pais participarem desta pesquisa, que para sua realização forneceria de imediato o resultado do exame citogenético por FISH (padrão ouro de diagnóstico).

Todos os pais e/ou responsáveis que aceitavam participar deste projeto de pesquisa, assinaram o TCLE e duas vias, sendo que uma ficava em sua posse.

Após a realização do exame de citogenética por FISH, foi elaborado o relatório genético clínico e realizado Aconselhamento Genético com os pais e/ou responsáveis.

Para aumentar o tamanho da amostra o projeto da pesquisa foi divulgado em congressos de genética, para que outros centros enviassem pacientes com suspeita diagnóstica de SWB, a fim de aumentar a amostra. Os centros de genética que participaram do estudo foram: Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP; e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

Os geneticistas destes centros convocaram seus pacientes e os reavaliaram de acordo com nossa tabela de sinais e sintomas para SWB. Após os responsáveis pela criança terem sido esclarecidos sobre a pesquisa e assinarem o termo de consentimento, os pacientes foram fotografados e convidados a comparecer ao SAG – Botucatu para atendimento médico e realização do teste de FISH. Para os pacientes de outros estados, ou

quando não havia condição de encaminhamento do paciente, foi enviada amostra de sangue, fotos e todos os dados médicos disponíveis da criança.

Foram incluídos na amostra os pacientes que preencheram os seguintes critérios de inclusão:

- ◆ Obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido.
- ◆ Avaliação da criança pelo médico geneticista do SAG ou obtenção de dados clínicos e de fotos suficientes para o preenchimento do protocolo de estudo.
- ◆ Presença de dois dos três sinais mais frequentes associados a dois outros sinais menos frequentes da SWB

Nos casos em que os responsáveis não enviaram o termo de consentimento assinado, os dados clínicos e/ou fotos eram insuficientes para o protocolo da pesquisa, os exames citogenéticos foram realizados e os resultados enviados aos médicos responsáveis, porém estes pacientes foram excluídos.

Desta forma, os pacientes que apresentaram a microdeleção 7q11.23 foram selecionados para o estudo molecular.

### **3.3 Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP-SP (anexo 1).

Todos os responsáveis pelos pacientes foram informados dos objetivos do projeto e quando aceitavam participar do mesmo assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2) em duas vias. Uma via ficou com os responsáveis e a outra se encontra no prontuário do paciente junto ao SAG.

Uma vez que as características faciais são componentes essenciais ao diagnóstico clínico, foi solicitada autorização dos responsáveis, para publicação das fotografias do paciente, sem a colocação de tarja preta sobre os olhos.

### **3.4. Avaliação clínica**

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pelo geneticista do SAG com base na ficha de anamnese genético-clínica, à qual foi adicionada uma tabela com as principais

características clínicas da SWB (anexo 3) e para melhor documentação do caso, todos os pacientes foram fotografados (frente, perfil, membros superiores e inferiores). Os sinais e sintomas da SWB foram tabulados como presentes (+), ausentes (-) ou sem informação (X).

As medidas antropométricas obtidas dos pacientes na primeira consulta no SAG como peso, altura, e perímetro cefálico foram comparadas com a nova tabela proposta por Martin et al., (2007), para crianças britânicas com SWB.

Dentre os dados de nascimento foram investigados: a idade gestacional e a adequação do peso de nascimento para a idade gestacional. Definiu-se como prematuro quando a idade gestacional foi menor que 37 semanas, segundo critério da OMS. A adequação do peso de nascimento para a idade gestacional baseou-se na tabela de ALEXANDER et al., (1996), tendo como limite mínimo da normalidade o percentil 10.

Aplicou-se o sistema de pontuação fenotípica de LOWERY et al. (1995), AAP (2001) e de SUGAYAMA (2004; 2007) para verificar se havia discriminação entre os pacientes que apresentaram FISH com microdeleção e FISH sem microdeleção.

### **3.5 Análise Citogenética**

O estudo citogenético–molecular foi realizado em cromossomos metafásicos obtidos de cultura temporária de linfócitos. Foi utilizada técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH).

#### **3.5.1. Cultura temporária de linfócitos periférico**

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

Após assepsia da pele com álcool iodado, foram coletados 5ml de sangue venoso periférico, com seringa estéril descartável e previamente heparinizada (Liquemine Roche<sup>®</sup> 5000u/ml), que foi mantida em posição vertical, à temperatura ambiente, até que ocorresse a sedimentação. Após a sedimentação procedeu-se a suspensão da camada de linfócitos, que juntamente com o plasma (1ml) foram colocados em frascos de cultura contendo 4,5 ml de meio RPMI (CULTILAB<sup>®</sup>), suplementado com 20% de soro bovino fetal (GIBCO<sup>®</sup>), acrescido de 0,1 ml de fitohemaglutinina (DIFCO<sup>®</sup>) e 0,1ml de antibióticos

penicilina/estreptomicina (GIBCO®) (concentração final dos antibióticos 1U/ml e 1µg/ml, respectivamente).

Em seguida, os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37°C, durante 72 horas. Cada amostra sanguínea foi fracionada em, no mínimo 2 e no máximo 4 frascos de cultura, para possibilitar exame em duplicata, se necessário, garantindo o resultado da análise e evitando nova coleta de sangue.

Para obtenção de cromossomos metafásicos, após 71 horas de cultivo celular foi adicionado 0,1ml de colchicina (0.0016 % -SIGMA) a cada frasco, e estes foram mantidos em estufa a 37°C por mais 45 minutos. Após esse período, os conteúdos dos frascos foram transferidos para tubos de centrifuga (15ml) e centrifugados a 1500 rpm por cinco minutos. A seguir foi feita a hipotonização do material acrescentando-se 5ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) pré-aquecida a 37°C e após homogeneização, as culturas retornaram à estufa a 37°C por mais vinte minutos. Seguiu-se a fixação da cultura, acrescentando-se 1 ml de fixador (metanol/ácido acético 3:1) e o material foi submetido à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. O processo de fixação e centrifugação foi repetido por mais duas ou três vezes, adicionando-se 5ml de fixador e o sobrenadante foi desprezado a cada operação.

O material, uma suspensão do *pellet* de linfócitos acrescido de 1ml de fixador, foi então gotejado em lâminas previamente lavadas e geladas. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em freezer (-20° C), como também o material em suspensão para a análise de FISH.

### **3.5.2 Coloração**

As metáfases e prometáfases obtidas pela técnica de cultura temporária de linfócitos foram submetidas às técnicas de FISH.

#### **3.5.2.1. Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)**

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) para as sondas comerciais seguiu os padrões do protocolo que acompanham cada produto. Neste estudo foram utilizadas: sonda para microdeleção LSI (Identificação Específica do *Locus*) na síndrome de WILLIAMS-BEUREN (gene da elastina) com sonda controle para a região 7q31 da VYSIS®, sonda para a região da síndrome de Williams-Beuren (7q11.23) com

sonda controle (centrômero 7) da CYTOCELL<sup>®</sup> e sonda LIVE<sup>®</sup> para a região da síndrome de Williams abrangendo 200Kb envolvendo o gene *ELN* e a sonda controle 7p22.3.

### **3.6 Análise Citogenética**

As análises da técnica de FISH foram realizadas em fotomicroscópio de fluorescência LEICA LEITZ DMRBE. Em cada paciente, foram analisadas cerca de 25 metáfases e pelo menos 5 delas foram fotografadas, tanto para o diagnóstico positivo ou negativo da microdeleção que envolve a região 7q11.23.

Uma vez que a sonda utilizada liga-se especificamente à região 7q11.23, o diagnóstico positivo é feito pela ausência da hibridação, ou seja, a região estaria deletada em um dos cromossomos homólogos e no outro apareceria o sinal fluorescente.

Para não haver dúvidas quanto à interpretação do resultado devido a erros técnicos, a sonda contém uma região controle (no caso da sonda VYSIS a região 7q3.1 e da sonda CYTOCELL a região centromérica), que aparece corada em verde. A sonda LIVE tem como controle a região telomérica corada em rosa. Desta forma, pacientes SWB sem a microdeleção apresentam os dois cromossomos 7 com dois sinais fluorescentes, sendo um verde e um rosa em cada um deles. Os portadores da SWB com microdeleção apresentam um cromossomo 7 com dois sinais fluorescentes um verde e um rosa enquanto o outro cromossomo 7 tem apenas o sinal verde fluorescente. A ausência do sinal rosa comprova a microdeleção da região 7q11.23.

### **3.7 Análise Molecular**

#### **3.7.1 Obtenção do DNA genômico.**

O DNA foi extraído, de uma alíquota (1ml) e (3ml) do tubo contendo 5ml de sangue com EDTA, com o kit comercial de extração Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega). Este protocolo segue os seguintes passos: lise das hemácias; lise dos leucócitos; precipitação salina das proteínas nucleares e citoplasmáticas seguido da precipitação do DNA genômico com isopropanol a 100%; o DNA foi lavado com etanol a 70% e depois da secagem a temperatura ambiente, hidratação do *pellet* de DNA em amostras de 1ml de sangue foram utilizados 100 µL de solução tampão TE (TRIS-



HCL/EDTA) e para amostras de 3ml de sangue foram utilizados 250 µl da mesma solução e incubação em banho-maria por 60 minutos a 65°C ou 37° C *overnight*.

As amostras de DNA foram quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotômetro (*ND-100 Spectrophotometer* da NanoDrop®). Neste processo utilizou-se de 0,5 até 1,0µl da amostra. As amostras foram armazenadas em freezer a temperatura de -20°C.

### 3.7.2. Hibridação Genômica Comparativa em Microarranjos ou array-CGH

A análise aCGH foi realizada no laboratório de patologia e medicina molecular, junto ao “*Richard Laboratory*” que tem como diretor o Dr. Jeremy Square, na Queen’s University, Kingston, Ontário-Canadá.

Das 93 amostras de DNA dos pacientes com SWB portadores da microdeleção 7q11.23, confirmados por FISH, foram escolhidos 22 pacientes, os quais possuíam maior quantidade de DNA (ng/µl).

O DNA que fora hidratado com TRIS-HCL/EDTA, precisou ser reidratado com água destilada UltraPure™ da GIBCO® livre de DNase e RNase. Para isso utilizou-se um tratamento com RNase utilizando o *Kit Master Pure™ DNA Purification* (nº de catálogo MCD 85201).

As amostras de DNA foram novamente quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotômetro (*ND-100 Spectrophotometer* da NanoDrop®). Neste processo utilizou-se 1,0µl da amostra. As amostras quantificadas que obtiveram valores acima de 200 ng/µl foram diluídas e novamente quantificadas.

A eletroforese para a verificação da integridade e qualidade do DNA extraído foi realizada em gel de agarose a 1%, por 30 minutos, utilizando 500 ng/µl da amostra estoque e da amostra diluída.

Após análise do gel para comparar a qualidade do DNA da amostra estoque e diluída, iniciou-se a técnica de array CGH segundo protocolo *Agilent Technologies® 8x 60K*, versão 6.3.

Para a digestão enzimática foram utilizados DNA genômico das amostras dos pacientes e para referência DNA genômico humano: masculino (G1471) em um volume de 10,1 µl cada. Sendo 2X o volume de DNA utilizado na eletroforese e completando com água ultrapura. Às amostras foram adicionados 2,9 µl de *Digestion Master Mix* (1 µl

*nuclease-free water*, 1.3  $\mu\text{l}$  *10X Buffer C* suplementado com enzima de restrição *RsaI*, 0.1  $\mu\text{l}$  de *acetylated BSA*, 0.25  $\mu\text{l}$  *Alu I*, 0.25  $\mu\text{l}$  *Rsa I*), volume final de 13,0  $\mu\text{l}$ . As amostras foram incubadas por 2 horas em banho-maria a 37°C e depois transferidas por 20 minutos a 65° C para inativar as enzimas. As amostras foram mantidas em gelo. Realizou-se uma nova eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando 2  $\mu\text{l}$  da amostra.

Para a marcação fluorescente do DNA genômico deu-se um *spin* nas amostras por 1 minuto a 6,000 x g. Adicionou-se 2.5 $\mu\text{l}$  de *Random Primers* em cada tubo, volume total 13,5  $\mu\text{l}$ . A desnaturação e fragmentação das amostras por meio de termociclador a 95° C por 3 minutos e manteve-se a 4° C. Após centrifugou-se por 1 minuto a 6,000 x g e acrescentou-se 11.5  $\mu\text{l}$  de *Labeling Master Mix* (2.0  $\mu\text{l}$  *nuclease-free water*, 5.0  $\mu\text{l}$  *5X Buffer*, 2.5 $\mu\text{l}$  *10X dNTP*, 1.5  $\mu\text{l}$  *Cyanine 3-dUTP (CY3)* e/ou *Cyanine 5-dUTP (CY5)* 1.0 mM, 0.5  $\mu\text{l}$  *exo-Klenow fragment* ), a cada uma das amostras. Volume total de cada reação 25  $\mu\text{l}$ . Incubou-se em termociclador por 2 horas a 37°C, 10 minutos a 65° C e manteve-se a 4°C.

Após agitação das amostras por 1 minuto a 6,000 x g. Para o processo de purificação das amostras adicionou-se 430 $\mu\text{l}$  de 1X TE (pH 8.0) para cada tubo de reação contendo filtro *Amicon 30KDa* centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 x g e desprezou-se o sobrenadante, repetiu-se o passo acrescentando-se 480  $\mu\text{l}$  de 1X TE (pH 8.0). Inverteu-se os filtros dentro de um tubo de microcentrifuga 1.5 ml, spin por 1 minuto a 1000 g x a temperatura ambiente. Volume das amostras de aproximadamente 21  $\mu\text{l}$ . As amostras com volume acima de 15 $\mu\text{l}$  foram concentradas a vácuo e amostras com volume menor foram adicionadas *1X TE*, até volume de aproximadamente 16 $\mu\text{l}$  e/ou 9.5 $\mu\text{l}$ .

Utilizou-se 1.5  $\mu\text{l}$  de cada amostra para nova quantificação, em *Nano-Drop 8000* ou *2000 UV-VIS Spectrophotometer* e calculou-se o rendimento comparando-os com a tabela fornecida pelo protocolo *Agilent*®.

$$\text{Degree of Labeling} = \frac{340 \times \text{pmol per } \mu\text{L dye}}{\text{ng per } \mu\text{L genomic DNA} \times 1000} \times 100\%$$

$$\text{Specific Activity}^* = \frac{\text{pmol per } \mu\text{L dye}}{\mu\text{g per } \mu\text{L genomic DNA}}$$

Com os cálculos obtidos combinou-se as amostras testes e referências usando as amostras marcadas com CY3 e CY5 apropriados.

Antes de iniciar a marcação do DNA genômico para hibridização, prepara-se o *10X Blocking Agent* adicionando 1,350µl de *nuclease-free water* ao frasco contendo *10X Blocking Agent* liofilizado (suplemento com *Agilent Oligo aCGH hybridization KIT*), e deixando a temperatura ambiente por 1 hora.

Adicionou-se 29µl de *Hybridization Master Mix* (2µl de *Cot-1*, 4.5µl de *Agilent 10x blocking agent*, 22.5µl de *Agilent 2xHi-RPM buffer*) em cada amostra, pipetando para homogeneização e após rápido spin levou-as ao termociclador a 95° C por 3 minutos e após 37°C por 30 minutos. Volume final das amostras aproximadamente 45µl.

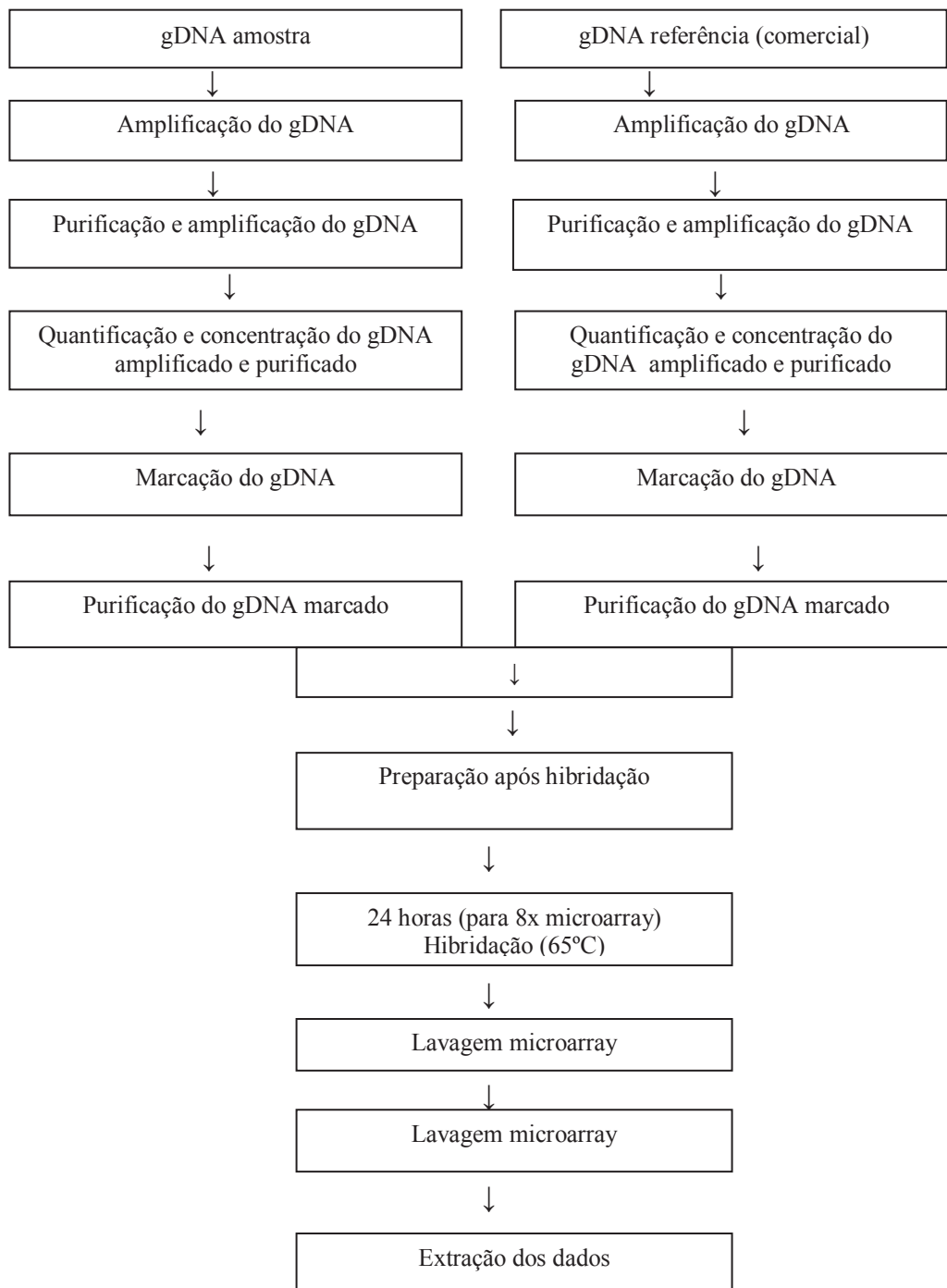
Para a hibridização, fez-se um mapa da distribuição e colocou-se em cada divisão apenas 40µl de amostra. A aplicação é realizada do lado inativo da lamina contendo o código de barras e sobre ela a lamina de microarray onde está impresso “*Agilent*” chamado de lado ativo da lamina. Hibridização por 24 horas a 65°C.

No processo de lavagem da preparação utilizou-se para a separação das laminas de hibridização sobrepostas *Oligo aCGH Wash Buffer 1* a temperatura ambiente, e as demais lavagens *Oligo aCGH Wash Buffer 1* a temperatura ambiente por 5 minutos, *Oligo aCGH Wash Buffer 2* a 37°C por 1 minuto, *Acetonitrile* a temperatura ambiente por 10 segundos e *Stabilization and drying solution* temperatura ambiente por 30 segundos.

Após a lavagem as laminas foram analisados pelo escâner de alta resolução da plataforma *Agilent®* e os resultados dos arrays foram gerados pelo software versão 10.5.

As duplicações segmental (SDS) foram identificadas através da análise computacional do cromossomo 7 usando o Washington Genome Sciences Semental Duplication Database ([http:// humanparalogy.gs.washington.edu/](http://humanparalogy.gs.washington.edu/)).

Fig. 03. Esquema do método de aCGH.



*Resultados*

#### **4. RESULTADOS**

Com os dados obtidos pelas análises clínicas e citogenética molecular, foram escritos dois artigos científicos e enviados para publicação, descritos a seguir (a formatação dos artigos seguem as instruções de cada revista).

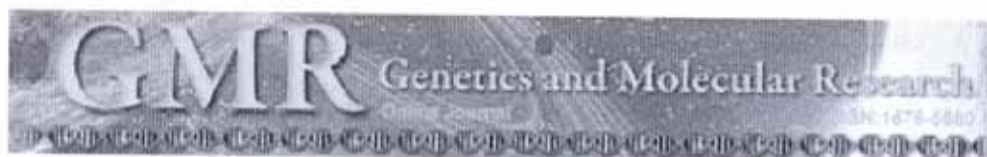
##### **Artigo científico 1**

Revista: **Genetics and Molecular Research**

Formato da publicação: *Short Communication*

Fator de impacto: 1.18

Publicado *on line* em setembro de 2013



*Short Communication*

## Assessment of clinical scoring systems for the diagnosis of Williams-Beuren syndrome

D.E.S. Leme<sup>1</sup>, D.H. Souza<sup>1</sup>, G. Mercado<sup>2</sup>, E. Pastene<sup>2</sup>, A. Dias<sup>3</sup> and D. Moretti-Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Aconselhamento Genético, Departamento de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

<sup>2</sup>Centro Nacional de Genética Médica, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup>Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

Corresponding author: D. Moretti-Ferreira  
E-mail: sag@fmb.unesp.br

Genet. Mol. Res. 12 (3): 3407-3411 (2013)

Received December 20, 2012

Accepted April 16, 2013

Published September 4, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.September.4.7>

**ABSTRACT.** Williams-Beuren syndrome (WBS) is a genetic disorder characterized by physical and intellectual developmental delay, associated with congenital heart disease and facial dysmorphism. WBS is caused by a microdeletion on chromosome 7 (7q11.23), which encompasses the elastin (*ELN*) gene and about 27 other genes. The gold standard for WBS laboratory diagnosis is FISH (fluorescence *in situ* hybridization), which is very costly. As a possible alternative, we investigated the accuracy of three clinical diagnostic scoring systems in 250 patients with WBS diagnosed by FISH. We concluded that all three systems could be used for the clinical diagnosis of WBS, but they all gave a low percentage of false-positive (6.0-9.2%) and false-negative



(0.8–4.0%) results. Therefore, their use should be associated with FISH testing.

**Key words:** Williams-Beuren syndrome; Clinical diagnosis; Fluorescence *in situ* hybridization; Elastin (*ELN*) gene; Chromosome 7

## INTRODUCTION

Williams-Beuren syndrome (WBS), first described by Williams et al. (1961) and Beuren (1972), is a genetic disorder that leads to physical and intellectual developmental delay associated with congenital heart diseases and facial dysmorphisms. WBS is caused by a microdeletion on chromosome 7 (7q11.23), which encompasses the elastin gene (*ELN*) and about 27 other genes. *ELN* haploinsufficiency is responsible for supravalvular aortic stenosis (SVAS), the most severe WBS clinical characteristic (Merla et al., 2010; Schubert, 2009).

Mothers usually report the pregnancy of a child with WBS as uneventful. An infant with WBS often has difficulty feeding and sleeping and may be brought for medical care because of frequent crying, constipation, and especially hernias (most commonly of the inguinal type). WBS patients start walking late, at around two and half years of age. Facial features include prominent forehead and full cheeks, deep-set eyes, flattened nasal bridge with small upturned nose and long philtrum, wide mouth, and full lower lip. The cognitive profile includes over-friendliness, loquacity, and uninhibited. WBS patients show mild to moderate mental retardation with IQ ranging between 50 and 60, hyperacusia, very good memory, and deep hoarse voice (Williams et al., 1961; Beuren, 1972; Souza et al., 2007).

The estimated incidence of WBS is 1:7500 live births (Stromme et al., 2002). Cases are generally sporadic, or *de novo*, but autosomal dominant inheritance has been reported. The deletions in the WBS region arise as a consequence of misalignment of gametes during meiosis following unequal crossing over (non-allelic homologous recombination) due to high similarity of low-copy-repeat sequence blocks (Schubert, 2009).

In the population of WBS patients, about 30% of parents carry a heterozygous inversion of the WBS locus (presence of this inversion predisposes to chromosomal mispairing in meiosis). In the non-WBS population, this inversion is present in about 5% (Schubert, 2009). In 90% of the cases, WBS microdeletion is 1.55 Mb, whereas 1.88 Mb in 8% of the cases, and atypical sizes are observed in only 2% (Pober, 2010).

WBS diagnosis is mostly clinical. Laboratory tests using molecular biology techniques can be used to identify the WBS microdeletion. The gold standard for WBS laboratory diagnosis is the fluorescence *in situ* hybridization (FISH), which, despite being effective, is very expensive. Another molecular method is the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), which allows the detection of deletions in specific target sequences, by amplifying over 40 different types of probes, and simultaneous hybridization (Schouten et al., 2002). MLPA is not as expensive as FISH, but it is still not widely available. There is also microarray-based comparative genomic hybridization, which, in comparison with karyotyping, is able to detect chromosomal alterations (deletions and duplications) not visible under a light microscope. However, it does not permit identifying the structural organization of a chromosomal aberration, and is as costly as FISH (Riegel et al., 2011).

To improve WBS clinical diagnosis and to improve the use of molecular techniques



that can help establish such diagnosis, Lowery et al. (1995) proposed a scoring system that classifies WBS patients as classic or uncertain. The American Academy of Pediatrics (AAP, 2001) recommends the use of a system that is based on the patient's score and indicates whether FISH should be performed. Sugayama et al. (2007) developed a system in which a total score lower than "standard" points out the need for FISH testing to establish the diagnosis.

Within this context, the scoring systems proposed by Lowery et al. (1995), AAP (2001), and Sugayama et al. (2007) were used in a group of patients from Brazil and Argentina with clinically suspected WBS, who had not undergone any kind of score-based evaluation or laboratory molecular testing. The diagnostic accuracy of the clinical features of the scoring systems was compared with that of the gold standard, FISH test.

## MATERIAL AND METHODS

Cases of suspected WBS registered in the databases of Serviço de Aconselhamento Genético, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil, and of Centro Nacional de Genética Médica, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Buenos Aires, Argentina, were randomly selected and reviewed. All patients were assessed by experienced clinical geneticists who completed clinical charts for each case.

The references of the clinical signs used in the scoring systems were described by the AAP (2001). The suspected patients with 3 or more clinical signs, whose frequency was equal to or greater than 60%, underwent FISH testing.

Thus, the clinical diagnostic scoring systems proposed by Lowery et al. (1995), AAP (2001), and Sugayama et al. (2007) were used in 250 patients with WBS: 149 Brazilian patients [140 FISH (+) and 9 FISH (-)], and 101 patients from Argentina [88 FISH (+) and 13 FISH (-)].

Lowery et al. (1995) reviewed the clinical findings for 110 patients with WBS confirmed by FISH, and developed a scoring system that classified WBS patients according to 6 different phenotypes. Patients scoring 0-3 were classified as "uncertain", and patients scoring 4-10 were classified as "classic". Clinical features were grouped as follows: facial characteristics: 3 points; mental retardation, non-SVAS congenital heart disease, or inguinal hernia: 1 point; and SVAS or hypercalcemia: 2 points.

The AAP (2001) developed a system on the basis of a study of 107 individuals with WBS confirmed by FISH. This system is divided into 7 items: growth (if 3 of 5 items are checked, 1 point is scored), behavior (if 3 of 6 items are checked, 1 point is scored), development (if 3 of 6 items are checked, 1 point is scored), facial features (if 8 of 17 items are checked, 3 points are scored), cardiovascular problems-SVAS (if 1 of 2 items is checked, 1 point is scored), non-SVAS cardiovascular problems (if 1 of 3 items is checked, 5 points are scored), connective tissue abnormality (if 2 of 6 items are checked, 2 points are scored), and calcium studies (if 1 of 2 items is checked, 2 points are scored). If the total score is <3, a diagnosis of WBS is unlikely. If the score is  $\geq 3$ , FISH study should be considered.

The scoring system of Sugayama et al. (2007) is based on a meta-analysis including 577 patients and 42 clinical signs. The cut-off score indicating the need for the FISH test is 20. Clinical findings are scored as follows: low birth weight, difficulty feeding, typical facies, SVAS, mental retardation and over-friendliness: 3 points; strabismus and developmental delay: 2 points; failure to thrive, non-SVAS cardiovascular problems, arterial hypertension, joint contractures, hyperacusia, and ungual hypoplasia: 1 point.

The results obtained were compared by statistical methods for the validation of diag-

nostic tools using the OpenEpi v.2.3 software (Dean et al., 2009). Significance level was set at 5% for all scoring systems.

## RESULTS

Patient age ranged from 2 months to 31 years. Of the 250 WBS patients included, 227 were FISH (+) and 23 were FISH (-). Thus, the gold standard indicated that in this case series, WBS prevalence was 90.8%. Table 1 shows patient distribution according to the three scoring systems assessed and FISH testing, as well as estimates of sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values (PV+ and PV-). Confidence intervals (95%CI) were adjusted by the Wilson scoring method, which is favored when adjustment for a single proportion is made (Vollset, 1993).

**Table 1.** Validation estimates and confidence intervals of the three scoring systems assessed compared with FISH testing.

		FISH		Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PV+ (95%CI)	PV- (95%CI)
		+	-				
Lowery et al. (1995)	+	224	23	98.68%	0.00%	90.69%	0.00%
	-	3	0	(96.19-99.55)	(0.0-14.31)	(86.42-93.71)	(0.0-56.15)
AAP (2001)	+	217	15	95.59%	34.78%	93.53%	44.44%
	-	10	8	(92.08-97.59)	(18.81-55.11)	(89.61-96.04)	(24.56-66.28)
Sugayama et al. (2007)	+	225	19	99.12%	17.39%	92.21%	66.67%
	-	2	4	(96.84-99.76)	(6.98-37.14)	(88.16-94.96)	(30.9-90.32)

PV+ = positive predictive values; PV- = negative predictive values.

All three scoring systems showed high sensitivity, but little or no specificity. The PV+ were high, whereas the PV- were intermediate.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Over 95% of the FISH (+) patients were also clinically diagnosed with WBS, showing that clinical evaluation was infrequently wrong.

However, specificity estimates lower than 35% (even reaching zero), indicated that scoring systems based on clinical signs may classify unaffected individuals as affected if individuals displaying WBS signs or symptoms or WBS phenocopies are evaluated.

It is worth noting that the validation of diagnostic tests aims at sensitivity/specificity balance, since highly specific tests tend to have low sensitivity, and since highly sensitive tests tend to have low specificity. Our results pointed to the latter case.

PVs are known to depend not only on the test used but also on the prevalence of the disease investigated, which in this case exceeded 90%. This results in higher PVs when test sensitivity and specificity are fixed, particularly the PV+ (over 90% for the three scoring systems).

This study clearly demonstrates that WBS can be clinically diagnosed using any one of the three scoring systems assessed. The system proposed by Lowery et al. (1995) is the easiest to apply from the operational standpoint. However, all of them show a small percentage of false-positive (6.0-9.2%) and false-negative results (0.8-4.0%). Thus, the use of FISH testing in combination with clinical evaluation can help in establishing a more accurate and specific diagnosis.

## REFERENCES

- American Academy of Pediatrics (AAP) (2001). Health care supervision for children with Williams syndrome. *Pediatrics* 107: 1192-1204.
- Beuren AJ (1972). Supravalvular aortic stenosis: a complex syndrome with and without mental retardation. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* 8: 45-56.
- Dean AG, Sullivan KM, Soe MM and Mir RA (2009). Openepi. V.2.3. Atlanta, USA.
- Lowery MC, Morris CA, Ewart A, Brothman LJ, et al. (1995). Strong correlation of elastin deletions, detected by FISH, with Williams syndrome: evaluation of 235 patients. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 49-53.
- Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L and Fusco C (2010). Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum. Genet.* 128: 3-26.
- Pober BR (2010). Williams-Beuren syndrome. *N. Engl. J. Med.* 362: 239-252.
- Riegel M (2011). Hibridização Genômica Comparativa em Microarranjos ou Array-CGH. In: *Citogenética Humana* (Maluf SW and Riegel M, eds.). Artmed, Porto Alegre, 273-277.
- Schubert C (2009). The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol. Life Sci.* 66: 1178-1197.
- Souza DH, Moretti-Ferreira D and Rugolo LMSS (2007). Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) as a diagnostic tool for Williams-Beuren syndrome. *Genet. Mol. Biol.* 30: 17-20.
- Stromme P, Bjornstad PG and Ramstad K (2002). Prevalence estimation of Williams syndrome. *J. Child Neurol.* 17: 269-271.
- Sugayama SMM, Leone C, Chauffaille MLLF, Okay TS, et al. (2007). Williams syndrome. Development of a new scoring system for clinical diagnosis. *Clinics* 62: 159-166.
- Vollset SE (1993). Confidence intervals for a binomial proportion. *Stat. Med.* 12: 809-824.
- Williams JCP, Barratt-Boyes BG and Lowe JB (1961). Supravalvular aortic stenosis. *Circulation* 24: 1311-1318.

**Artigo científico 2**

Revista a ser enviado GENOME RESEARCH

Fator de impacto: 14.395

**Genomic characterization of deletions in patients with Williams-Beuren syndrome.**

Souza DH<sup>1</sup>, Martelli LR<sup>2</sup>, Yoshimoto M<sup>3</sup>, Nuin P<sup>3</sup>, Squire JA<sup>2,3</sup>, Moretti-Ferreira D.<sup>1</sup>

- 1- Genetic Counseling Service – São Paulo State University, UNESP – Botucatu, SP- Brazil.
- 2- Department of Genetics, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.
- 3- Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá.

**Abstract**

Williams-Beuren syndrome (WBS) is a developmental genomic disorder with an incidence of 1/7,500 newborns. Multisystem manifestations have included vascular stenosis (predominantly supraaortic stenosis), distinctive craniofacial features, mental retardation with a characteristic neurocognitive profile, short stature and some endocrine and connective tissue abnormalities. WBS syndrome is caused by a heterozygous deletion of contiguous genes at chromosomal region 7q11.23 which spans a genomic region of ~1.5 (94%) or ~1.8 (5%) Mb, encompassing approximately 28 genes. Deletions occur due to nonallelic homologous recombination (NAHR) in a region of chromosome 7 containing blocks of unstable low copy repeat called segmental duplications, that have high sequence homology, and may predispose to genomic rearrangements such as microdeletion during meiosis. There is considerable heterogeneity in deletion locations within this cytoband, as NAHR can occur within any of the blocks of low copy repeats that cluster to the WBS region. Furthermore, a genotype-phenotype correlative study of patients with WBS requires that the complexity of the pattern of genomic imbalance within this region be considered. Currently, data of altered expression and haploinsufficiency of the affected genes is only available for a restricted number of loci. Unfortunately there is limited useful phenotypic data concerning behavioral or cognitive aspects in WBS using knock out mice of genes within this region. Current mouse models suggest that several genes may act in a coordinated manner to elicit neurological behavior patterns similar to WBS.

In this study an integrative clinical, cytogenetic and high-resolution array Comparative Genomic Hybridization (CGH) map of 7q11.23 deletions in 22 Brazilian patients with WBS has been performed, to compare the pattern of genomic imbalance with variations in the WBS phenotype. All selected patients showed normal karyotype and FISH analysis confirmed a deletion of the WBS region. To analyze and precisely map the



position of each deletion in this region array CGH (60K x 8 platform Agilent oligonucleotides) was performed. In 18 cases of the deletions had a minimal region of loss of 1.5 Mb and in 4 cases genomic losses were more extensive, approaching 1.8 Mb. Direct correlations of phenotypical characteristics with the genomic mapping data failed to detect a significant differences between these two deletion classes of WBS patients.

This is the first comprehensive high resolution genomic deletion analysis of WBS in Brazilian patients. The use of array-CGH technology allowed better delineation of the deletion maps that may be helpful for the patient prognosis.

## **Introduction**

Williams-Beuren syndrome (WBS) described by Williams et al. (1961) and Beuren et al (1962) was previously reported by Fanconi et al as an idiopathic infantile hypercalcemia (1952). WBS (OMIM 194050) is considered a multi-system disorder characterized by developmental abnormalities associated with moderate mental retardation, cardiac anomalies, peculiar facies and friendly, cheerful and uninhibited behavior (AAP, 2001). The linguistic and cognitive profile is very peculiar in affected children who usually keep their language ability, but are deficient in non-verbal skills which involve numbers, spatial cognition, motor skills and problems solving (Volterra et al. 1,996; Bellugi et al. 2000; Asada et al. 2010). The patients often present hyperacusis, hyperactivity, social disinhibition, excessive kindness, insecurity and low span, which affect relationship and social adaptation and learning skills (Bellugi et al., 1999, 2000; Lashkari at al., 1999; Jones et al. 2000; Karmiloff-Smith et al. 2012).

The WBS affects 1 in 7500 live births and is caused by a hemizygous deletion of contiguous genes on chromosome 7q11.23 (Stromme et al., 2002). Deletion typically ranges from 1.5 to 1.8 Mb in size and contains 26 to 28 genes (Poerber BR, 2010). The first identified gene was the elastin gene (*ELN*), reported by Morris et al. (1993) in a family who presented a supra-valvar aortic stenosis and a translocation involving chromosomes 6 and 7. Disruption of the *ELN* gene and the hypothesis that *ELN* haploinsufficiency would also be responsible for WBS phenotype were confirmed by Ewart et al. 1993. After that, analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) using *ELN* locus probes consolidated the haploinsufficiency hypothesis and became the gold standard for the diagnosis of WBS (Souza et al., 2007).

According to Lupsky, et al. (1998) the deletion mechanism is directly linked to segmental duplications (SDs) or Low Copy Repeats (LCRs), which usually have a size of 10Kb to 400 Kb. These regions comprise 5% of the human genome and share at least 90 to 99.5% identity (Lander et al. 2001; Peoples et al. 2000; Valero et al. 2000). The origin of the deletion has been assigned to unequal rearrangement during meiosis (NAHRs) which can occur between the repeat regions. The genomic structure of the WBS locus (7q11.23) consists of three major LCRs, centromeric (c), medial (M) and telomeric (T), each region composed of three blocks (A, B, C) in different orientations containing genes and pseudogenes. LCRs misalignment in the same direction cause deletions while duplications and inversions occur when pairing occurs in LCRs with inverted orientation. (Schubert 2009; Hobart et al., 2010). Sometimes, recombination process can occur unevenly among non-allelic homologous (nonallelic homologous recombination - NAHR), resulting in deletion of one or more genes. NAHR (intrachromatid, interchromatid or interchromosomal) (Figure 1) between misaligned LCRs is the main mechanism to generate WBS duplication or deletion of almost identical size, in most cases corresponding to 1.5Mb. Deletions and duplications occur when LCRs are oriented in the same direction, while the inversions are the result of pairing in inverted orientation of LCRs. Hobart et al (2010) and Schubert (2009) noted that the common deletion of 1.5 Mb originated from the meiotic recombination of the medial (bm) and centromeric (bc) blocks of LCRs, followed by a non-homologous allelic recombination. On the other hand, NAHR between block A LCRs in the centromeric (Ac) and medial (Am) regions resulted in 1.8Mb unusual deletion (Figure1) Haplotype analyses with polymorphic markers have shown that interchromosomal NARHs account for 2/3 of deletions, whereas intrachromosomal result in 1/3 of deletions (Dutly and Schinzel, 1996; Baumer et al. 1,998, Urban et al., 1996; Thomas et al. 2006).

Our approach used a well-established and reliable *in silico* technique, which was able to identify LCR elements that may cause the genomic imbalances seen in the WBS region on chromosome 7. More importantly we were able to demonstrate that the LCR clusters that are whitening and surrounding the WBS region are highly homologous, another evidence that they might participate in the events leading to the deletion.

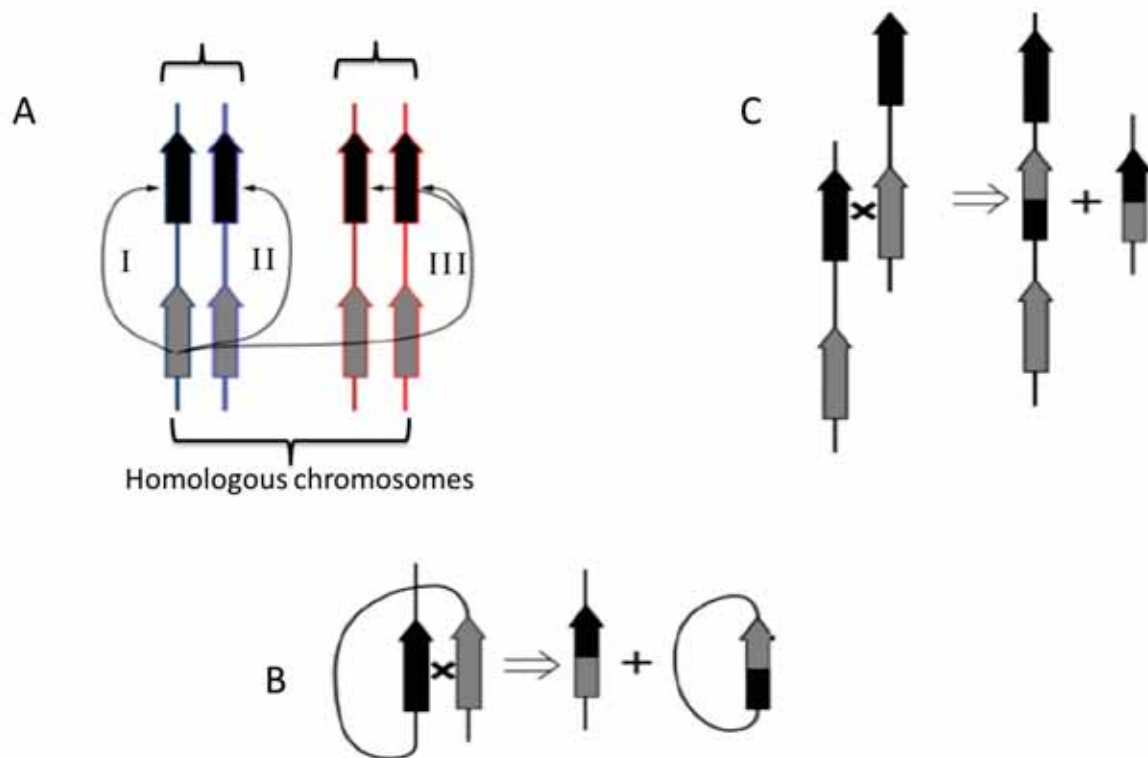


Figure 1. A) Intrachromatid (I), interchromatid (II) interchromosomal (III) NAHRs. B) Intra-molecular NAHR: intrachromatid generating deletion and a circular DNA molecule. C) Inter-molecular NAHRs between chromatids or between chromosomes producing reciprocal deletions and duplications (modified from Turner et al., 2008).

WBS is considered a microdeletion disorder or contiguous-gene-deletion disorder and genotype-phenotype correlations can be useful for clinical monitoring and prognosis of these patients. However, the mechanisms to explain how gene loss is responsible for specific phenotypic findings remains unknown.

However there have been no systematic studies of the region of chromosome 22 subject to recurrent deletion in WBS. In addition the role of repetitive sequences facilitating rearrangements has not been investigated. In this study we selected 22 typical WBS patients that were identified based on standard FISH analysis for genomic array Comparative Genomic Hybridization (aCGH). The position of the deletion for each patient was mapped and the location of breakpoint regions was examined using informatics methods to determine their proximity to repetitive sequences near the WBS locus.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subjects**

We have analyzed twenty two patients, eight female and fourteen male referred to the Genetic Counseling Service (UNESP-Botucatu, SP, Brazil) with clinical diagnosis of WBS. All patients have showed 7q deletions by the FISH technique. The study was approved by the ethics committee of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (Proc #.545/08).

### **Fluorescence in situ Hybridization (FISH)**

Peripheral blood culture of all patients was performed cytogenetic standard methods. FISH was performed using commercial probes involving *ELN* gene (Cytocell®, UK, Oxford) as target, consisting of three non-overlapping clones from genes *FZD9* to *GTF2IRD1* which cover most of the 450kb deletion region. It was designed to detect the common large deletions covering the 1,6 Mb region and includes chromosome 7 centromere  $\alpha$ - satellite D7Z1 probe as control. Twenty metaphases per case were analyzed using a fluorescence microscope (Leitz DM RBE-LEICA®).

### **Whole genome array CGH**

Genomic DNA was purified using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, CA, USA). DNA was labeled, hybridized, washed and scanned according to the manufacture's protocol version 6.3 to an Agilent® for 8x60k oligonucleotides. Slides were dried and further scanned using an Agilent 2565AA DNA microarray scanner. Microarray images were analyzed using Agilent Feature Extraction software version 8.1. Default settings for CGH arrays were used according to the supplier's recommendations. CGH Analytics software version 3.4 (Agilent Technologies) was used for analysis. The data quality of each microarray was assessed using the Quality Metrics report generated by the Agilent CGH analytics software (v.3.4). All CGH data represent the average of dye-flip experiments for each of the samples, using the aberration detection method 1 (ADM-1), which is based on computing significance ratios for all genomic intervals (Lipson et al., 2006). To make aberration calls, a robust estimate of the noise was obtained by calculating the spread of the ratio differences between consecutive probes (DLRSpread) along all chromosomes. The ability of the DLRSpread to measure the noise

of the ratios independently of the number and severity of aberrations was used to assess the overall quality of each experiment.

### Segmental Duplications

Segmental duplications (SDs) comprise unstable LCRs present throughout the human genome. These were identified by computational analysis of chromosome 7 using the Washington Genome Sciences Segmental Duplication Database (<http://humanparalogy.gs.washington.edu/>) and NCBI's blast (Altschul et al, 1990). The full chromosome 7 sequence file was formatted as a NCBI blast database and used as subject for the runs. Individual SDs obtained from the Segmental Duplication Database (She et al., 2004) were aligned to the chromosome in an hyper threaded machine for fast parallel processing, and the resulting hits stored on a local database and then tabulated for each segment. The blast data were filtered for hits with sequence homology higher than 90% and alignment length  $\geq 10$  Kb.

### Results

Twenty-two patients with submicroscopic 7q11.23 deletions were identified by FISH analysis using probes from the *FZD9* to *GTF2IRD1* genomic region. High-resolution chromosome Agilent 60K array CGH confirmed the known copy number changes in all cases and delineated the specific aberrations detailed in Table 1 with the genomic location of the genes associated with the various regions of microdeletion shown in Table 1 (supplementary material). Figure 2 shows the deletion map of 22 WBS patients. All deletions analyzed included the region 71.833 to 74.146 (5'). The deletion sizes identified in this study varied considerably between the different patients, that is, the largest deletion spanning 2.0 Mb with breakpoint mapping to *POM121* to *GATS1* (cases 7522 and 7780) and the smallest deletion spanning 1.2 Mb with breakpoints mapping to *GTF2IP* to *GTF2IRD2P* (case 7746). Deletions could be found grouped in cluster 4. Most microdeletions appeared in sizes of 1.6 Mb = 9 cases (similar to literature 1.5 Mb) and 1.9 Mb = 8 cases (similar to literature 1.8 Mb). Other clusters were larger deletions of 2.0 Mb = 3 cases and smaller than 1.2 Mb and 1.4 Mb = 2 cases. (Fig. 3A and 3B). Interstitial deletions case 7517 had breakpoint regions *GTFIP* to *GTF2IRD2P*. Identical proximal breakpoint regions were localized in cases 6237, 7338, 7512, 7744, 7745, 7785, 7630 and

7513 (between *GTF2IP* to *GTF2IRD2P*) and cases 7543, 7578, 7661, 7663, 7670, 7704, 7742, 7747 (between *POM121* to *GTF2IRD2P*), case 7520 ( *FKBP6-Like* to *GATSI*) and case 7515 (*POM121* to *STAG3L2*) in deletion sizes of a range of 1.6Mb a 2.0Mb, respectively. Figure 3 (A-D) shows representative examples of profile of genomic losses of chromosome 7 based on the array CGH findings.

A computational method was used to search for complex SD groups  $\geq 10$  kB in length involving chromosome 7. The overall results of this search for chromosome 7 are presented in Figure 4A. In total, four clusters of SDs in the region were found, composed by hits with  $>90\%$  homology and most of these segments had multiple hits within or flanking the WBS region (Figure 4B). These observational data provide some support the hypothesis that these four clusters of SDs provides sufficient local genomic microhomology to facilitate the formation of WBS microdeletions of chromosome 7 during meiosis.

Figure 2 – Deletion map summarizing position losses in 22 patients cohort.

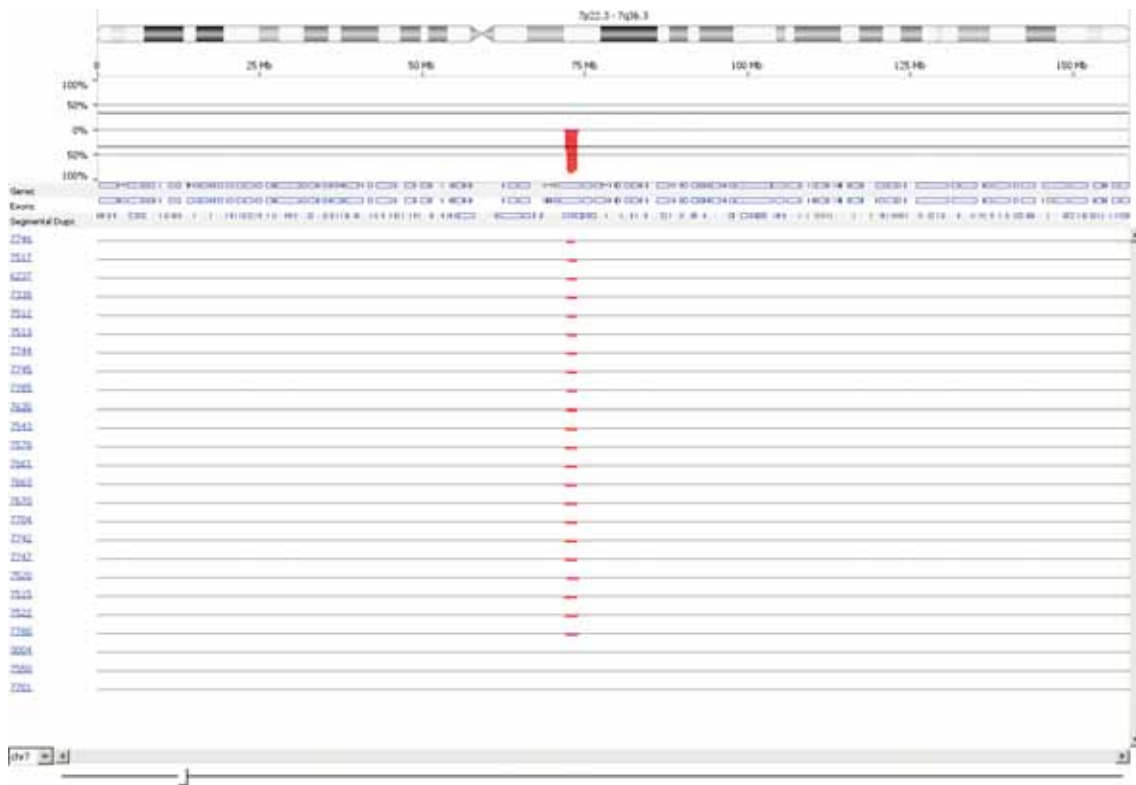


Figure 3A - Whole chromosome profile of case 7745 showing deletion in 7q11.23

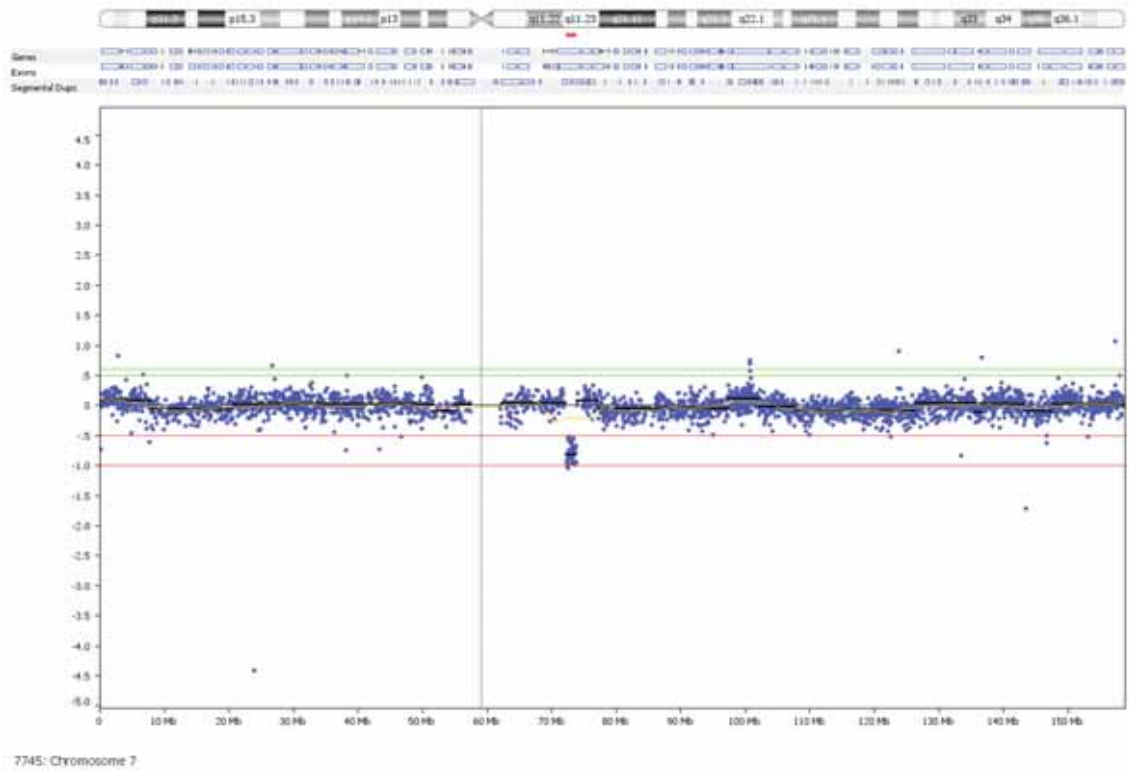


Figure 3B - Enlargement showing the position of deletion and genomic imbalance consisted with one copy case 7745.



Figure 3C - Whole chromosome profile of case 6237 showing deletion in 7q11.23

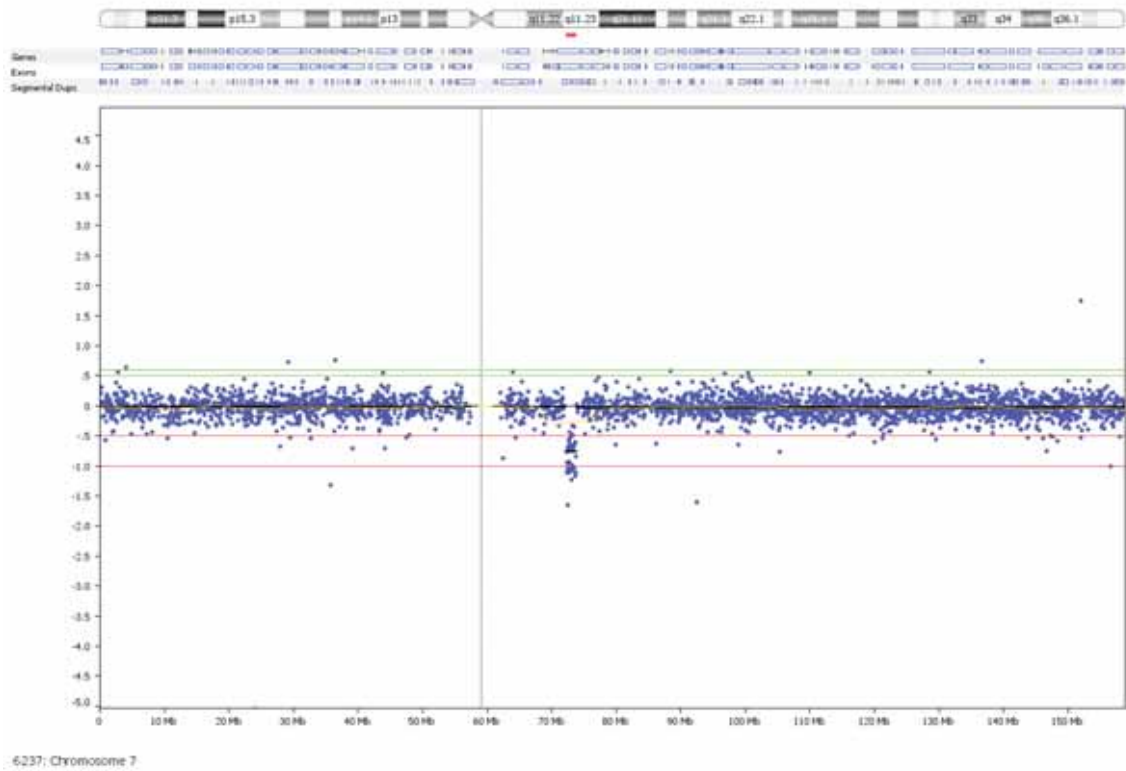


Figure 3D - Enlargement showing the position of deletion and genomic imbalance consisted with one copy in case 6237

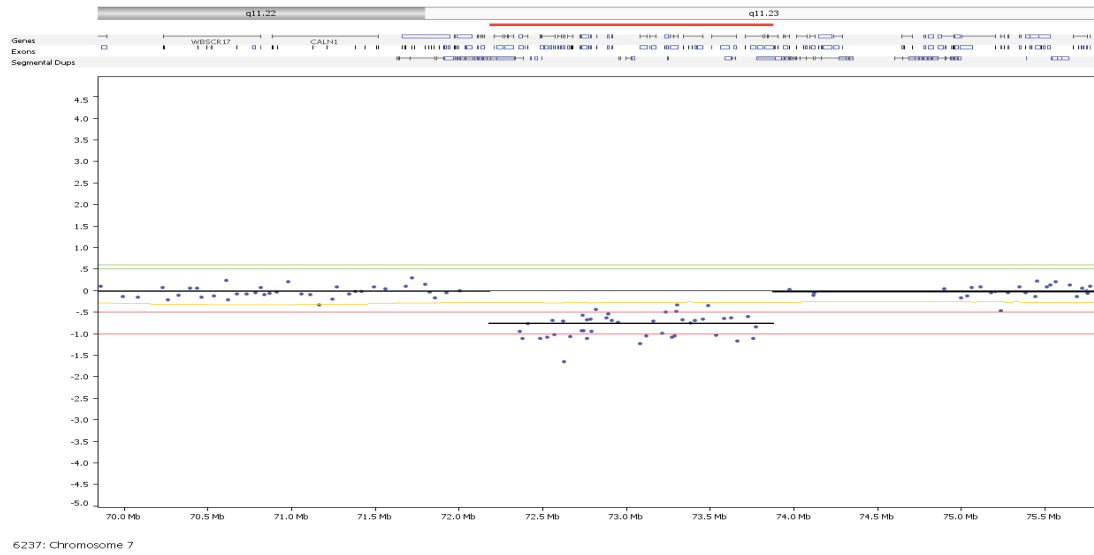




Figure 4A - Circus plot of chromosome 7 showing the distal and next boundaries of all deleted regions found (highlighted in green on chromosome long arm), the different sub-groups of deletions organized by length, and SDs linked with red lines inside the chromosome. Values on ticks on the outside the chromosome are Mb; black, white and gray regions accurately represent cytobands; centromere is shown in red.

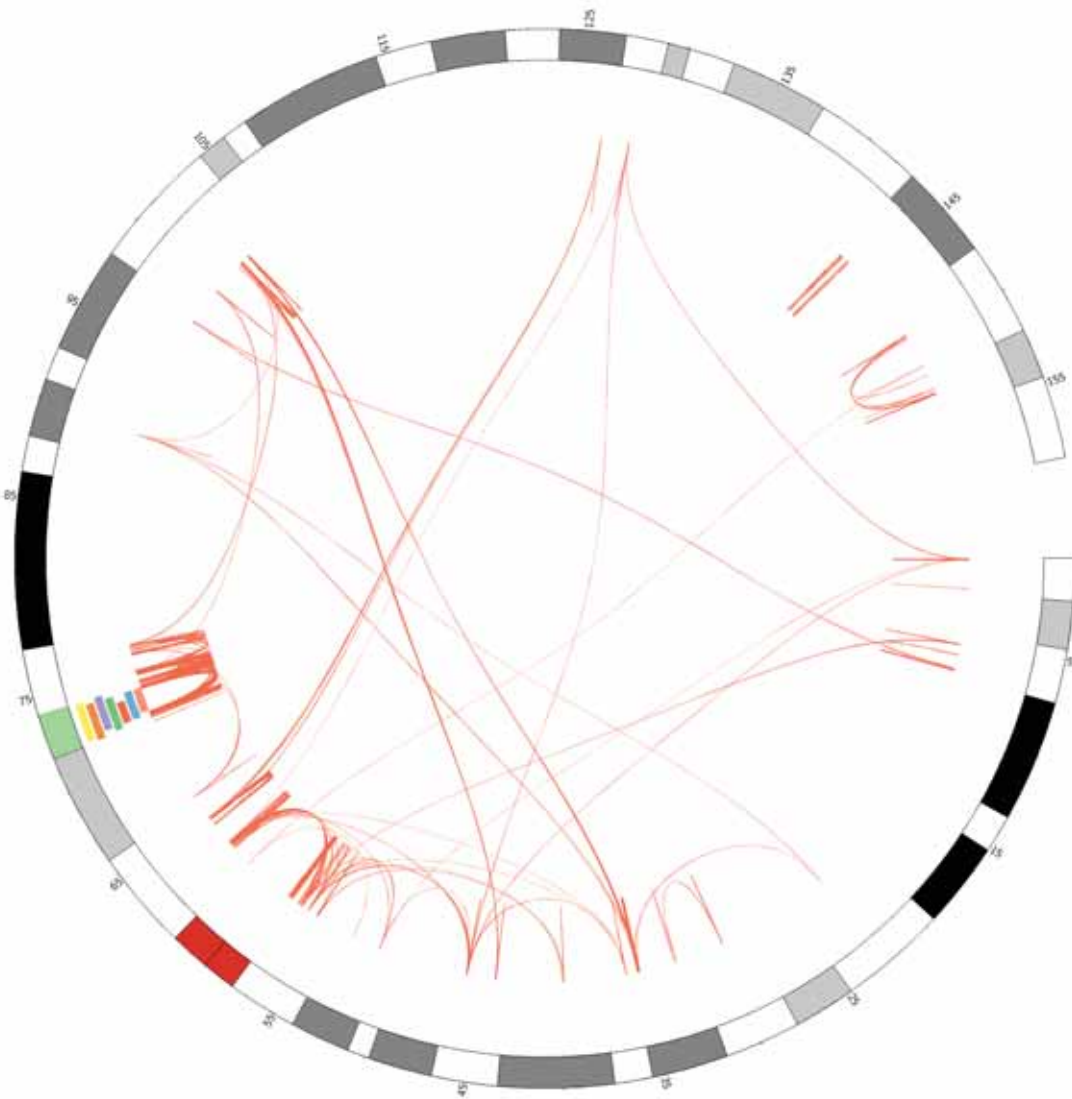
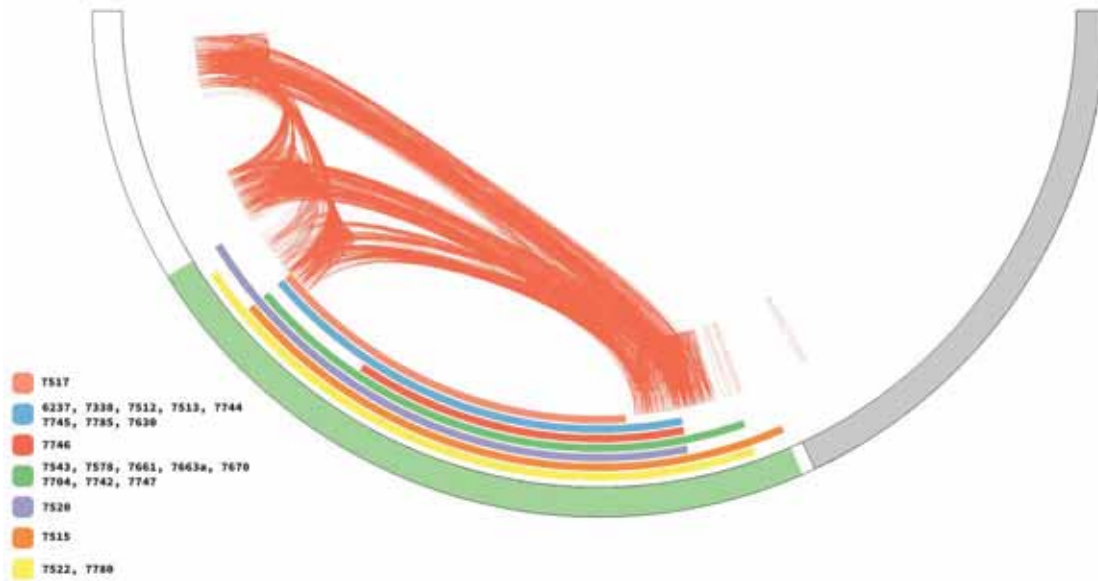


Figure 4B - Enlarged representation of the region of interest, showing in green the proximal and distal boundaries of deletions observed (green on top of the chromosome). Each colour band represent one or more cases selected by deletion length. SDs are represented in red lines connecting the different clusters.



## Discussion and Conclusions

To our knowledge this is the first publication to characterize a large number of sporadic WBS deletion that relates the flanking deletion breakpoints to segmental duplications and their associated regions of microhomology within chromosome 7. Moreover most previous studies have reported groups of patients with heterogeneous phenotypes associated to 7q11.23 region (Van der Aa N. et al, 2009), or individual case reports (Torniero et al., 2007; Blyth et al., 2008; Shah et al., 2008; Honeywell et al., 2009; Rafati et al., 2012). In this study we report bioinformatics analysis and array CGH deletion mapping of a large cohort of 22 new WBS cases, with homogeneous inclusion criteria involving typical phenotypic findings, together with the presence of the classical FISH deletion of the elastin gene.

Twenty-eight coding genes have been identified within the WBS deletion region which is flanked by three large low-copy-repeat sequences (LCR) (reviewed in Schubert, 2009). Common deletions in WBS patients span a genomic interval of approximately ~1.5 Mb, with suspected breakpoint clustering close to each of the immediate flanking LCR regions (Dutly et al 1996; Robinson et al 1996).

It was first proposed that mispairing between unknown multicopy sequences in the flanking LCR regions could facilitate the DNA rearrangements that initiated WBS deletion formation (Robinson et al 1996). It was later suggested that during meiosis non-allelic homologous recombination could occur between duplicated sequences close to the WBS region, and that this mechanism could generate the reciprocal deletions and duplications observed in WBS and other genomic disorders of the germline (Turner et al 2008). More recently Dittwald et al (2013) used a bioinformatics approach to show that copy number variants and LCRs that flank many of the common genomic disorders, appeared to map in close proximity to the position of the recurrent rearrangements associated with syndromes such as WBS. They showed that architectural features leading to susceptibility to genomic rearrangements included: LCR length, the percent fraction matching of paralogous segments, and the density of the homologous recombination hot spot motif. In keeping with these studies we have provided additional evidence that regions of microhomology within the large SDs either side of the WBS region are likely involved in deletion formation during meiosis. Our study has demonstrated that >90% homology is present in the centromeric SD and the two medial SDs that have the closest proximity to the WBS deletion breakpoint regions. Based on the detailed studies of Dittwald et al (2013) and

earlier analysis of this region (Dutly 1996; Robinson 1996; Turner 2008) it seems probable that the high homology within the WBS SDs leads to deletion by non-allelic homologous recombination at meiosis.

WBS phenotype is complex and variable, and some clinical manifestations are age dependent (Del Campo et al 2006). Differences in the size or location of the breakpoints of the deleted interval, genetic variants in the nondeleted allele, and other subtle factors may all contribute to the variable expression of the WBS phenotype. Our study demonstrated the complexity of genomic architecture of this region of the genome, demonstrating the large differences that may occur during the production of meiotic errors, or crossing over.

## References

- American Academy of Pediatrics. 2001. Health care supervision for children with Williams syndrome. *Pediatrics* **107**: 1192-1204.
- Asada K, Tomiwa K, Okada M, Itakura S. 2010. Fluent language with impaired pragmatics in children with Williams syndrome. *J Neurolinguistics* **23**: 540-552.
- Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA. 1998. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* **7**: 887-894.
- Blyth M, Beal S, Huang S, Crolla J, Foulds N. 2008. A novel 2.43 Mb deletion of 7q11.23-q11.23. *Am. J. Med. Genet* **146A**: 3206-3210.
- Bellugi U, Lichtenberger L, Jones W, Lai Z, St George M. 2000. The neurocognitive profile of Williams Syndrome: a complex pattern of strengths and weaknesses. *J Cogn Neurosci* **1**(Suppl 12): 7-29.
- Beuren AJ, Apitz J, Harnjanz D. 1962. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and certain appearance. *Circulation* **26**: 1235-1240.
- Dittwald P, Gambim T, Gonzaga-Jauregui C, Carvalho CM, Lupski JR, Stankiewicz P, Gambim A. 2013. Inverted low-copy repeats and genome instability—a genomic wide analysis. *Hum Mutat* **34**: 210-220.
- Dutly F, Schinzel A. 1998. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet* **5**: 1893-1898.
- Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Stemes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. 1993. Hemizygoty at the elastin locus in an developmental disorder, Williams Syndrome. *Nat Genet* **5**: 11-16.
- Fanconi G, Girardet P, Schlesinger B, Butler N, Black J. 1952. Chronische hypercalcemie kambierniert mit osteosklerose, hyperazotamie minderwuchs und kogenital missbildungen. *Helv Paediatr Acta* **7**: 314-334.
- Hobart HH, Morris CA, Mervis CB, Pani AM, Kistler DJ, Rios CM, Kimberley KW, Gregg RG, Bray-Ward P. 2010. Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **154C**: 220-228.
- Honeywell C, Gardin L, Jimenez-Rivera C, Allason J. 2009. Array CGH ends diagnostic Odyssey for infant with features of Williams and Alagille Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **149A**: 1102-1103.
- Lander ES. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Lipson D, Aumann Y, Ben-Dor A, Linial N, Yakhini Z. 2006. Efficient calculation of interval scores for DNA copy number data analysis. *J Comput Biol* **13**: 215-228.

- Lupski JR. 1998. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* **14**: 417-422.
- Morris CA, Thomas IT, Greenberg E. 1993. Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* **47**: 478-481.
- Peoples RJ, Franke Y, Wang YK, Pérez-Jurado L, Papema T, Cisco M, Francke U. 2000. A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome deletion region at 7q11.23. *Am J Hum Genet* **66**: 47-68.
- Pober BR. 2010. Williams Beuren syndrome. *N Engl J Med* **362**: 239-252.
- Schubert C. 2009. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1178-1197.
- Rafati M, Seyyedaboutorabi E, Brujerdi R, Moossavi S, Ghaffari SR. 2012. Familial Williams-Beuren syndrome ascertained by screening rather than targeted diagnosis. *Clin. Dismorphol.* **21**; 118-123.
- Robinson WP, Waslynka J, Bernasconi F, Wang M, Clark S, Kotzot D, Schinzel A. 1996. Delineation of 7q11.2 deletions associated with Williams-Beuren Syndrome and mapping of a repetitive sequence to within and to either side of the common deletion. *Genomics* **34**: 17-23.
- Shah PS, Murthy P, Skidmore D, Shaffer LG, Bejjani BA, Chitayat D. 2008. Williams Syndrome in a preterm infant with phenotype of Alagille syndrome. *Am. J. med. Genet.* **146A**; 2407-2411.
- She X, Jiang Z, Clark RA, Liu G, Cheng Z, Tuzun E, Church DM, Sutton G, Halpern AL, Eichler EE. 2004. Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome. *Nature* **431**: 927-930.
- Souza DH, Moretti-Ferreira D, Rugolo LMSS. 2007. Fluorescent in situ hybridization (FISH) as a diagnostic tool for Williams-beuren syndrome. *Genet Mol Biol* **30**: 17.
- Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. 2002. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* **7**: 269-271.
- Torniero C, Bernardina B, Novara F, Vetro A, Ricca I, Darra F, Pramparo T, Guerrini R, Zuffardi. 2007. Cortical dysplasia of the left temporal lobe might explain severe expressive language delay in patients with duplication of the Williams-Beuren locus. *Eur. J. Hum. Genet.* **5**: 62-67.
- Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME. 2008. Germline ates of e novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet* **40**: 90-95.
- University of Washington Genome Sciences. **Segmental Duplication Database** [<http://humanparalogy.gs.washington.edu/>]

- Urban Z, Helms C, Fekete G, Csiszár K, Bonnet D, Munnich A, Donis-Keller H, Boyd CD. 1996. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet* **59**: 958-962.
- Valero MC, De Luis O, Cruces J, Pérez Jurado LA. 2000. 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* **69**: 1-13.
- Van der AAN, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B, et al. 2009. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet* **52**: 94-100.
- Volterra V, Capirci O, Pezzini G, Sabbadini L, Vicari S. 1996. Linguistic abilities in Italian children with Williams syndrome. *Cortex* **32**: 663-677.
- Williams JCP, Barratt-Boyes BG, Love JB. 1961. Supravalvular aortic stenosis. *Circulation* **21**: 1311-1318.

## Supplementary material

DELETION SIZE	POSITION													
	5'	3'	71,833	71,936	71,938	71,977	71,988	72,063	72,078	72,078	72,114	72,115	72,138	72,146
			71,823	71,677	71,942	71,971	72,057	72,057	72,068	72,080	72,107	72,122	72,128	72,150
	CASE/GENE	SPDYE8P	TYWIB	SBDSP	WBSCR19	POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L	WBSCR19	PMS2L	
1.6 Mb	6237													
1.6 Mb	7338													
1.6 Mb	7512													
1.6 Mb	7744													
1.6 Mb	7745													
1.6 Mb	7785													
1.6 Mb	7630													
1.6 Mb	7513													
1.9 Mb	7543	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7578	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7661	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7663	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7670	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7704	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7742	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7747	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.9 Mb	7520								FKBP6-LIKE					
2.0 Mb	7515	SPDYE8P	TYWIB	SBDSP		POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE		PMS2L		PMS2L	
2.0 Mb	7522	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE		PMS2L		PMS2L	
2.0 Mb	7780	SPDYE8P				POM121	NSUN5C	TRIM74	FKBP6-LIKE	STAG3L3	PMS2L		PMS2L	
1.2 Mb	7746													
1.4 Mb	7517													

C CENT

A CENT

**Table 1:** Scheme of the 22 deletions analyzed with the breaks points. There is the clinical case number, the size of the deletions, genomic position, genes lost, and the WBS-LCRs, green C block, red block A and blue block B. The blank region is the WBS critical region (based on Schubert, 2009)



72,164	72,207	72,273	72,324	72,341	72,347	72,361	72,380	72,380	72,486	72,575	72,6	72,610	72,631
72,156	72,259	72,282	72,295	72,333	72,356	72,355	72,364	72,411	72,488	72,429	72,5	72,589	72,621
<b>WBSCR19</b>	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC1</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC2</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC3</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC4</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC5</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC6</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC7</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC8</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC9</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC10</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC11</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC12</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC13</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC14</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC15</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC16</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC17</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC17</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC17</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC17</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>	<b>SPDYE7P</b>	<b>POM121B</b>	<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC17</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>	<b>GTF2IRD2P</b>			<b>NSUN5</b>	<b>TRIM50</b>	<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC17</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>
	<b>GTF2IP</b>	<b>NCFIB</b>						<b>FKBP6</b>	<b>FZD9</b>	<b>BAZIB</b>	<b>LOC17</b>	<b>BCL7B</b>	<b>TBL2</b>

B CENT

C MID







*Conclusão*

## 5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, publicados ou enviados para publicação concluímos que:

- Os três métodos de escores de sinais clínicos, publicados por Lowery, et al., 1995; AAP, 2001 e Sugayama et al., 2007 para a indicação da realização do exame da FISH apresentaram alta sensibilidade e baixa especificidade, ou seja, qualquer um dos três é eficiente para ser utilizado. O escore de Lowery et al., 1995 é o de mais fácil aplicabilidade.
- A aplicação, pela primeira vez na literatura, da técnica de aCGH em um grupo de pacientes com SWB demonstrou-se altamente eficaz para a detecção dos tamanhos dos fragmentos deletados e a utilização do processamento paralelo FAST permitiu uma melhor interpretação da estrutura genômica e dos eventos moleculares que originaram as microdeleções nesse grupo de pacientes

## *Referências*

## 6. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, G.R. et al. A United States national reference for fetal growth. **Obstet. Gynecol.**, v. 87, p. 163-168, 1996.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Health care supervision for children with Williams syndrome. **Pediatrics**, v.107, p. 1192-1204, 2001.
- ANTONELL, A. et al. Partial 7q11.23 deletions further implicate GTF2I and GTF2IRD1 as the main genes responsible for the Williams-Beuren syndrome neurocognitive profile. **J. Med. Genet.**, v. 47, p. 312-320, 2010.
- BAYÉS, M. et al. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 73, p. 131-151, 2003 .
- BELLUGI, U. et al. The neurocognitive profile of Williams Syndrome: a complex pattern of strengths and weaknesses. **J. Cogn. Neurosci.**, v. 1, suppl. 12, 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.A.; BONHAM-CARTER, R.E. Association between aortic stenosis and facies of several infantile hypercalcemia. **Lancet**, v. 2, p. 745-749, 1963.
- BLACK, J.A.; BUTLER, N.; SCHLESINGER, B.E. Aortic stenosis and hypercalcemia. **Lancet**, v. 2, p. 546, 1965.
- BLYTH, M. et al. A novel 2.43 Mb deletion of 7q11.22-q11.23. **Am. J. Med. Genet.**, v. 146A, p. 3206-3210, 2008.



BEUNDERS, G. et al. A triplication of the Williams-Beuren syndrome region in a patient with mental retardation, a severe expressive language delay, behavioural problems and dysmorphisms. **J. Med. Genet.**, v. 47, p. 271-275, 2010.

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.

BRODER, K. et al. Elevated ambulatory blood pressure in 20 subjects with Williams syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 23, p. 356-360, 1999.

BRONDUM-NIELSEN, K. et al. Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphism. **Hum. Genet.**, v. 99, p. 56-61, 1997.

CAIRO, S. et al. WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, p. 617-27, 2001.

CAVELLÁN, E. et al. The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 16264-16271, 2006.

COLLETTE, J.C. et al. William's syndrome: gene expressio 2009n is related to parental origin and regional coordinate control. **J. Hum. Genet.**, v. 54, p. 193-198, 2009.

CHO, E.H. et al. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: Multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. **Korean J. Lab. Med.**, v. 29, p. 71-76, 2009.

CURRAN, M.E. et al. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supraaortic stenosis. **Cell**, v. 73, p. 159-168, 1993.

CUS, R.; MAURUS, D.; KÜHL, M.. Cloning and developmental expression of WSTF during *Xenopus laevis* embryogenesis. **Gene Expr. Patterns**, v. 6, p. 340-346, 2006.

DAÍ, L. et al. Is it Williams syndrome? GTF2IRD1 implicated in visual-spatial construction and GTF2I in sociability revealed by high resolution arrays. **Am. J. Med. Genet.**, v. 149, p. 302-314, 2009.

DEGERLIYURT, A.; CEYLANER, S.; ÖZDAG, H. A 7q11.23 microdeletion patient with cerebral palsy and facial dysmorphism. **Genet. Couns.**, v. 23, p. 263-267, 2012.

DEL CAMPO, M. et al. Hemizyosity at the *NCF1* Gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 78, p. 533-542, 2006.

DE LUIS, O.; VALERO, M.C.; PEREZ-JURADO, L.A. WBSCR14, a putative transcription factor gene in Williams-Beuren syndrome: complete characterization of the human gene and the mouse ortholog. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 8, p. 215-222, 2000.

DE ZEEUW, C.L. et al. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. **Neuron**, v. 19, p. 1187-1199, 1997.

DUTLY, F.; SCHINZEL, A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, v. 5, p. 1893-1898, 1996.

DUTRA, R.L. et al. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnosis strategy for developing countries. **BMC Res. Notes**, v. 5, p. 13, 2012.

EDELMANN, L. et al. An atypical deletion of the Williams-Beuren syndrome interval implicates genes associated with defective visuospatial processing and autism. **J. Med. Genet.**, v. 44, p. 136-143, 2007.

ENKHMANDAKH, B. et al. Essential functions of the Williams-Beuren syndrome-associated TFII-I genes in embryonic development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, p. 181-186, 2009.

EWART, A.K. et al. A human vascular disorder, supravalvular aortic stenosis, maps to chromosome 7. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 3226-3230, 1993a.

EWART, A.K. et al. Hemizyosity at the elastin locus in an developmental disorder, Williams Syndrome. **Nat. Genet.**, v. 5, p. 11-16, 1993b.

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

FERRERO, G.B. et al. An atypical 7q11.23 deletion in a normal IQ Williams-Beuren syndrome patient. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 18, p. 33-38, 2010

FRAGISKAKIS, J.M. et al. LIM-Kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial construct cognition. **Cell**, v. 86, p. 1-20, 1996.

FRANCKE, U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. **Hum. Mol. Genet.**, v. 8, p. 1947-1954, 1999.

GARCIA, R.E. et al. Idiopathic hypercalcemia and supravalvular aortic stenosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 271, p. 117-120, 1964.

GAO, M.C. et al. Intelligence in Williams syndrome is related to STX1A, which encodes a component of the presynaptic SNARE complex. **Plos One**, v. 5, p. e10292, 2010.

HELLER, R. et al. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 40, p. 99, 2003.

HOBART, H.H. et al. Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome. **Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.**, v. 154C, p. 220-228, 2010.

HOBART, H.H. et al. Heterozygotes for the microinversion of the Williams-Beuren syndrome region have no increased risk for affected offspring. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, 54., 2004, Toronto. **Abstracts...** Toronto, 2004. Abstr. 891.

HONEYWELL, C. et al. Array CGH ends diagnostic odyssey for infant with features of Williams and Alagille syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 149A, p. 1102-1103, 2009.

HONJO, R.S. et al. Deletion in Williams-Beuren syndrome critical region detected by MLPA in a patient with supraaortic stenosis and learning difficulty. **J. Genet. Genomics**, v. 39, p. 571-574, 2012.

HOOGENRAAD, C.C. et al. 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.

HOWALD, C. et al. Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions. **J. Med. Genet.**, v. 43, p. 266-273, 2006.

JADAYEL, D.M. et al. 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.

JOSEPH, M.C.; PARROT, D. Severe infantile hypercalcemia with special reference to the facies. **Arch. Dis. Child.**, v. 33, p. 3853-3895, 1958.

JUE, K.L.; NOREN, G.R.; ANDERSON, R.C. The syndrome of idiopathic hypercalcemia of infancy with associated congenital heart disease. **J. Pediatr.**, v. 67, p. 1130-1149, 1965.

KARNIK, S.K. et al. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. **Development**, v. 130, p. 411-423, 2003.

KERZENDORFER, C.; O'DRISCOLL, M. Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. **DNA Repair**, v. 8, p. 1139-1152, 2009.

KITAGAWA, H. et al. The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. **Cell**, v.113, p. 905-917, 2003.

KORENBERG, J.R. et al. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome. **J. Cogn. Neurosci.**, v. 12, p. 89-107, 2000.

KOTZOT, D. et al. Phenotype of the Williams-Beuren Syndrome associated with hemizyosity at the elastin locus. **Eur. J. Pediatr.**, v. 154, p. 477-482, 1995.

KOZLOWSKI, P.; JASINSKA, A.J.; KWIATKOWSKI, D.J. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. **Electrophoresis**, v. 29, p. 4627-4636, 2008.

LAM, P.P. et al. Transgenic mouse overexpressing syntaxin-1A as a diabetes model. **Diabetes**, v. 54, p. 2744-2745, 2005

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.

LAURITO, S. et al. Detección de un caso de síndrome de Williams-Beuren por MLPA. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 73, p. 47-50, 2013.

LI, D.Y. et al. Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p. 1021-1028, 1997.

LOWERY, M.C. et al. 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.

LUPSKI, J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends Genet.**, v. 14, p. 417-422, 1998.

MAJKA, J.; BURGERS, P.M. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 78, p. 277-260, 2004.

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

MARI, A. et al. Analysis of the elastin gene in 60 patients whit clinical diagnosis of Williams syndrome. **Hum. Genet.**, v. 96, p. 444-448, 1995.

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.

MARTIN, N.D.T. et al. New height, weight and head circumference charts for British children with Williams syndrome. **Arch. Dis. Child.**, v. 92, p. 598-601, 2007.

MENG, X. et al. A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. **Genomics**, v. 52, p. 130-137, 1998a.

MENG, X. et al. 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.

MERLA, G. et al. Submicroscopic deletion in patients with Williams Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 79, p. 332-341, 2006.

MERLA, G. et al. Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23. **Hum. Genet.**, v. 128, p. 3-26, 2010 .

MOORHEAD, O.S.; NOWELL, P.C. Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood. **Cell**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MORRIS, C.A. et al. Supravalvular aortic stenosis co-segregates with a familial 6; 7 translocation which disrupts the elastin gene. **Am. J. Med. Genet.**, v. 46, p. 737-744, 1993a.

MORRIS, C.A. et al. Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. **J. Pediatr.**, v. 113, p. 318-326, 1988.

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

MORRIS, C.A. et al. GTF2I hemizyosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis of five families with deletions in the Williams syndrome region. **Am. J. Med. Genet. A**, v. 1, p. 45-59, 2003.

MORRIS, C.A. Williams syndrome. **Am. J. Med. Genet. Part C Semin Med Genet.**, v. 154C, p. 203-208, 2010.

O'DRISCOL, M. et al. Cellular and clinical impact of haploinsufficiency for genes involved in ATR signaling. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 81, p. 77-86, 2007.

OMIM® On line mendelian in man. Disponível em: < <http://ncbi.nlm.nih.gov/omim>>. Acesso em: 27 jun. 2013.

OHAZAMA, A.; SHARPE, P.T. TFII-I gene family during tooth development: candidate genes for tooth anomalies in Williams syndrome. **Dev. Dyn.**, v. 10, p. 2884-2888, 2007.

OSBORNE, L.R. et al. 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. et al. 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. et al. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. **Nat. Genet.**, v. 29, p. 321-325, 2001.

OSBORNE, L.R.; MERVIS, C.B. Rearrangements of the Williams-Beuren syndrome locus: molecular basis and implications for speech and language development. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 13, p. 1-16, 2007.

PALMER, S.J. et al. Expression of Gtf2ird1, the Williams syndrome-associated gene, during mouse development. **Gene Expr. Patterns**, v. 7, p. 396-404, 2007.

PALMER, S.J. et al. Negative autoregulation of GTF2IRD1 in Williams-Beuren syndrome via a novel DNA binding mechanism. **J. Biol. Chem.**, v 7, p. 4715-4724, 2009.



PATIL, S.J. et al. Facial phenotype at different ages and cardiovascular malformations in children with Williams Beuren syndrome: a study from India. **Am. J. Med. Genet.**, v. 158A, p. 1729-1734, 2012.

PEOPLES, R.J. et al. 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.

PEOPLES, R.J. et al. 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.

PEREZ-JURADO, L.A. et al. 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.

PEREZ JURADO LA, PEOPLES R, KAPLAN P, HAMEL BCJ, FRANCKE U. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 59, p. 781-92, 1996.

PEZZI, N. et al. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. **FASEB J.**, v. 14, p. 581-592, 2000.

PREUS, M. The Williams syndrome: objective definition and diagnosis. **Clin. Genet.**, v. 25, p. 422-428, 1984.

POBER, B.R.; MORRIS, C.A. Diagnosis and management of medical problems in adults with Williams-Beuren syndrome. **Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.**, v. 145C, p. 280-290, 2007

RAFATI, M. et al. Familial Williams-Beuren syndrome ascertained by screening rather than targeted diagnosis. **Clin. Dismorphol.**, v. 21, p. 118-123, 2012.

RANHEIM, E.A. et al. Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. **Blood**, v. 105, p. 2487-294, 2005.

RICHTER, N.J. et al. Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 35415-35424, 1999.

ROSSI, N.F.; MORETTI-FERREIRA, D.; GIACHETI, C. Genetics and Language in the Williams-Beuren Syndrome: a distinct neurobehavioral disorder. **Pro Fono**, v. 18, p. 331-338, 2006.

SAKURAI, T. et al. Haploinsufficiency of GTF2I, a gene deleted in Williams syndrome leads to increases in social interactions. **Autism Res.**, v. 4, p. 28-39, 2011.

SCHERER, S. W. et al. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science*. v. 300, p. 767-772, 2003.

SCHMITT, J.E. Williams syndrome: recent developments. **Curr. Opin. Psychiatry**, v. 14, p. 451-456, 2001.

SCHOUTEN, J.P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res.** v.30, p.57, 2002.

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

SCHULTZ, R.T. et al. Genetics of childhood disorders: XXVI. Williams syndrome and brain-behavior relationships. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v. 40, p. 606-609, 2001.

SHAFFER, L.G.; BEJJANI, B.A. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. **Hum. Reprod. Update**, v. 10, p. 221-226, 2004.

- SHAH, P.S. et al. Williams Syndrome in a Preterm Infant with phenotype of Alagille syndrome. **Am. J. Med. Genet. A**, v. 146, p. 2407-2411, 2008.
- SCOTT, R.W.; OLSON, M.F. LIM Kinases: function, regulation and association with human disease. **J. Mol. Med.**, v. 85, p. 1178-1179, 2007.
- SMITH, A.D. et al. Inefficient search of large-scale space in Williams syndrome: further insights on the role of LIMK1 deletion in deficits of spatial cognition. **Perception**, v. 38, p. 694-701, 2009.
- SNIJDERS, A.M. et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. **Nat. Genet.**, v. 29, p. 263-264, 2001.
- STROMME, P.; BJORNSTAD, P.G.; RAMSTAD, K. Prevalence estimation of Williams syndrome. **J. Child. Neurol.**, v. 7, p. 269-271, 2002.
- SOMERVILLE, M.J. et al. Severe expressive –language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1694-1701, 2005.
- 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.
- SUGAYAMA, S.M. et al. Williams-Beuren syndrome: cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 81, p. 462-473, 2003.
- SUGAYAMA, S.M.M.; LEONE, C.; KIM, C.A. Síndrome de Williams-Beuren: proposta de sistema de pontuação para diagnóstico clínico. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 22, p. 137-144, 2004.
- 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.

TASSABEHJI, A.K. et al. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supraaortic stenosis. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p. 1029-1036, 1997.

TASSABEHJI, A.K. et al. LIM- Kinase deleted in Williams syndrome. **Nat. Genet.**, v. 13, p. 272- 273, 1996.

TASSABEHJI, A.K. et al. GTF2IRD1 in craniofacial development of humans and mice. **Science**, v. 310, p. 1184-1187, 2005.

TOMIDA, J. et al. DNA damage-induced ubiquitylation of RFC2 subunit of replication factor C complex. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 9071-9079, 2008.

TORNIERO, C. et al. Cortical dysplasia of the left temporal lobe might explain severe expressive of the Williams-Beuren locus. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 15, p. 62-67, 2007.

TURNER, D.J. et al. Germline ates of e novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. **Nat. Genet.**, v. 40, p. 90-95, 2008.

UDWIN, O.; YULE, W.; MARTIN, N. Cognitive abilities and behavioral characteristics of children with idiopathic infantile hypercalcemia. **J. Child Psychol. Psychiatry.**, v. 28, p. 297-309, 1987.

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

URBAN, Z. et al. 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. et al. 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.

VAN DER, A.A.N. et al. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. **Eur. J. Med. Genet.**, v. 52, p. 94-100, 2009.

VAN HAGEN, J.M. et al. Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification. **Genet. Test.**, v. 11, p. 321-327, 2007.

VIANA, M.M. et al. Phenotype of Williams-Beuren syndrome in Brazilian patients: comments on the article by Patil et al. (2012) and discussion of variable phenotypes in distinct populations. **Am. J. Med. Genet.**, v. 161A, p. 637-638, 2012.

VOLTERRA, V. et al. Linguistic abilities in Italian children with Williams syndrome. **Cortex**, v. 32, p. 663-677, 1996.

VON ARMIN, G.; ENGEL, P. Mental retardation related to hypercalcemia. **Dev. Med. Child. Neurol.**, v. 6, p. 366-377, 1964.

WANG, M.S. et al. Molecular and clinical correlation study of Williams-Beuren syndrome: no evidence of molecular factors in the deletion region or imprinting affecting clinical outcome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 86, p. 34-43, 1999.

WANG, Y.K. et al. 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.; PÉREZ-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.

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

WU, J.J. et al. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity and parental origin. **Am. J. Med. Genet.**, v. 78, p. 82-90, 1998.

ZHANG, F. et al. Copy number variation in human health, disease, and evolution. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 10, p. 451-481, 2009.

*Anexos*

## ANEXO 01

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

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

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

 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

---

Botucatu, 01 de dezembro de 2008 Of. 545/08-CEP

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

Prezado Prof. Danilo,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Estudo das síndromes humanas de microdeleções", a ser conduzido por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável (cópia em anexo), aprovado em reunião de 01/12/2008.

Projeto não necessita de ser enviado à CONEP, pois cumpre a Resolução 340/2004 Genética Humana.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.



## Anexo 02

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Depto. de Genética - Inst. de  
Biociências - UNESP  
Tel. (14) 3811-6016 Fone/Fax (14) 3815-  
3131  
Cx.P. 529 18618-000 Botucatu/SP  
E-Mail: sag@fmb.unesp.br

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós estamos convidando vocês a participarem do projeto de pesquisa do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu intitulado “Análise Molecular na Síndrome de Williams-Beuren” e gostaríamos que vocês soubessem que:

- participar deste projeto é uma opção de vocês, podendo participar ou não;
- caso vocês decidirem não participar ou desistirem de participar a qualquer momento vocês não perderão nenhum benefício ou tratamento que estiverem fazendo nesta instituição;
- se vocês decidirem participar gostaríamos de informar-lhes que:
  - a) Serão coletados 5ml de sangue (2 colheres de sopa) do paciente e seus pais, nos quais será realizado um estudo da região 7q11.23, iniciando a busca de genes candidatos a Síndrome de Williams-Beuren.
  - b) A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta.
  - 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 Síndrome de Williams-Beuren.
  - e) O material biológico (DNA) será armazenado em nossos bancos de estoque e poderá ser usado em futuras pesquisas de genes, relacionados com a Síndrome de Williams-Beuren, que venham a ser descoberto, diante de nova aprovação pelo CEP e CONEP, desde que seja autorizado por vocês.
  - e) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
  - f) Assim que existam resultados, estes serão apresentados a vocês pelos médicos do SAG e será garantido, nesta entidade, o aconselhamento genético e acompanhamento clínico sem qualquer custo.
  - g) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulem entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área inclusive com fotos descritivas do paciente.
  - h) Sempre que ocorrerem publicações científicas a sua identidade e do seu filho será mantida em absoluto sigilo.
    - i) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido, em nenhuma hipótese, o acesso dos dados por terceiros.
    - j) Todos os resultados de exames moleculares estarão disponíveis no prontuário do paciente no Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu.

Eu, \_\_\_\_\_ portador do R.G. n° \_\_\_\_\_  
(responsável pelo paciente) concordo em participar do projeto de pesquisa “Análise Molecular na Síndrome de Williams-Beuren”. Declaro haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estar ciente sobre os itens acima mencionados e minha participação é voluntária por opção própria.

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura  
Nome do responsável:

Responsável pela pesquisa: Deise Helena de Souza  
Fone: (14) 3815-3131 (14)3815-9466  
Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu  
Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético  
Botucatu/SP – CEP:18.600-000

Obs: Este termo apresenta-se em duas vias sendo uma delas pertencente ao paciente e outra ao SAG.

**Anexo 03**

FICHA DE ANAMNESE  
Para pacientes com suspeita de síndrome de  
Williams-Beuren  
Projeto de Pesquisa.

**1. Identificação:**

**Data:**----- **RG:**-----  
**Nome:** ----- **Nasc.:**-----  
**Idade:**----- **Local:**-----  
**Mãe:** ----- **Idade:**-----  
**Profissão:**-----  
**Pai:** ----- **Idade:**-----  
**Profissão:**-----  
**Endereço:**-----  
**Fone:**-----  
**Encaminhado por:**-----  
 -----

**2. Dados gestacionais e antecedentes maternos**

Pré-natal ( ) Período \_\_\_\_\_ Duração da gravidez \_\_\_\_\_ Início dos movimentos  
fetais \_\_\_\_\_  
 Intensidade \_\_\_\_\_ Ganho de peso com a gravidez \_\_\_\_\_ kg Hemorragia ( ) Processo febril ( )  
 Contágio ( ) Edema ( ) PA \_\_\_\_\_ Convulsões ( ) Polidrâmnio ( ) Oligodrâmnio ( )  
 Obs.: \_\_\_\_\_  
 Enfermidades agudas/crônicas: \_\_\_\_\_  
 Fatores físicos/químicos: \_\_\_\_\_

**3. Parto**

Normal ( ) Cesariana ( ) Fórceps ( ) Obs.: \_\_\_\_\_  
 Hospitalar ( ) Domiciliar ( ) Outro ( ) Especificar \_\_\_\_\_  
 Obs.: \_\_\_\_\_

**4. Condições do RN**

Peso \_\_\_\_\_ Comprimento \_\_\_\_\_ PC \_\_\_\_\_ PT \_\_\_\_\_ APGAR \_\_\_\_\_ Choro \_\_\_\_\_  
 Cianose \_\_\_\_\_ Sucção \_\_\_\_\_ Tônus \_\_\_\_\_  
 Icterícia \_\_\_\_\_  
 Fototerapia ( ) Exangüineotransfusão ( ) Permanência na  
maternidade \_\_\_\_\_ Febre \_\_\_\_\_ Convulsões \_\_\_\_\_  
 Obs.: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**5. Evolução**

Firmou cabeça \_\_\_\_\_ Sorriso social \_\_\_\_\_ Sentou com apoio \_\_\_\_\_  
 Sentou sem apoio \_\_\_\_\_ Andou \_\_\_\_\_ Palavra \_\_\_\_\_ Frases \_\_\_\_\_  
 Fechou fontanela \_\_\_\_\_ Controle vesical \_\_\_\_\_  
 Anos de escolaridade \_\_\_\_\_ Tipo de escola \_\_\_\_\_

**Passado mórbido:** Doenças próprias da infância: \_\_\_\_\_

---



---



---

Complicações \_\_\_\_\_

Convulsões (quantos episódios, tempo de duração, descrição) \_\_\_\_\_

---



---

Obs.: \_\_\_\_\_

**6. Antecedentes Familiais**

Retardo mental \_\_\_\_\_

Recorrência familiar da doença semelhante \_\_\_\_\_

Caso de malformação na família \_\_\_\_\_

Recorrência familiar de alguma outra doença \_\_\_\_\_

Consangüinidade entre os pais? ( ) Tipo \_\_\_\_\_

**7. Composição familiar**

Gest.	Concepto	Nome do Filho	Sexo	Idade	Data do Nasc.
Obs.					

---



---



---



---



---



---

**. Heredograma:**

**Exame Físico****1. Biometria**

Estatura \_\_\_\_ cm ( %) Peso \_\_\_\_ gr ( %) Envergadura \_\_\_\_ cm ( %) PC \_\_\_\_ cm ( %)  
 PT \_\_\_\_ cm ( %) DII \_\_\_\_ mm ( %) DIE \_\_\_\_ mm ( %) Bregma \_\_\_\_\_  
 AP \_\_\_\_ cm BP \_\_\_\_ cm  $\frac{BP \times 100}{AP} =$  I.C. = \_\_\_\_\_

**2. Crânio e face**

Microcefalia ( ) Macrocefalia ( ) Hidrocefalia ( ) Craniossinostose ( ) Occipital plano ( )  
 Proeminente ( ) Abaulamento Frontal ( ) Glabela proeminente ( ) Assimetria craniana ( )  
 Braquicefalia ( ) Dolicocefalia ( ) Plagiocefalia ( ) Faceis triangular ( ) Faceis redonda ( )  
 Assimetria Facial ( ) Áreas de aplasia de couro cabeludo ( ) Implantação do cabelo Normal ( )  
 Baixa ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**3. Orelhas**

Grandes ( ) Pequenas ( ) Implantação normal ( ) Baixa ( ) Microtia ( ) Pavilhão  
 malformado ( )  
 Apêndices auriculares ( ) Ausência do conduto auditivo externo ( ) Estenose do mesmo ( ) Fístula ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**4. Olhos**

Sinofre ( ) Ptose Palpebral ( ) Estrabismo ( ) Convergente ( ) Divergente ( ) Infecção ( )  
 Lacrimejamento ( ) Anoftalmia ( ) Microftalmia ( ) Hipertelorismo ( ) Prega epicântica ( )  
 Fendas palpebrais oblíquas para cima ( ) Para baixo ( ) Retificados ( ) Exoftalmo ( ) Nistagmo ( )  
 Escleróticos azuis ( ) Íris ( ) Coróide ( ) Cristalino ( ) Retina ( ) Pálpebra ( ) Aniridia ( )  
 Manchas na íris ( ) Glaucoma congênito ( ) Cataratas ( ) Opacidade corneana ( ) Retinose pigmentar ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**5. Nariz**

Em sela ( ) ponte nasal: \_\_\_\_\_ base nasal \_\_\_\_\_ Estenose de narinas Columela \_\_\_\_\_  
 Desvio de septo ( ) Hipoplasia alar ( ) Nariz proeminente ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**6. Maxilar e Mandíbula**

Hipoplasia maxilar ( ) Micrognatismo ( ) Macrognatismo ( ) Prognatismo ( ) Retrognatismo ( )  
 Filtro Nasal \_\_\_\_\_ Obs.: \_\_\_\_\_

**7. Boca**

Lábio leporino ( ) \_\_\_\_\_ Fissura palatina ( ) \_\_\_\_\_  
 Lábios volumosos ( ) Fossetas no lábio inferior ( ) Comissuras bucais desviadas para baixa ( )  
 Microstomia ( ) Macrostomia ( ) Língua fendida ( ) Língua geográfica ( ) Freio lingual curto ( )  
 Defeito dentário ( ) Palato alto ( ) Ogival ( ) Úvula bifida ( ) Início da dentição: \_\_\_\_\_

Obs.: \_\_\_\_\_

**8. Pescoco**

Pescoco curto ( ) Cistos ( ) Fístulas ( ) Tireóide ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**9. Tórax**Caixa Torácica ( ) Externo curto ( ) Peito escalvado ( ) Peito carenado ( ) Mamilos anormais ( )  
Supernumerários ( ) Defeitos costais ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

Semiologia pulmonar: \_\_\_\_\_

Semiologia cardiovascular: \_\_\_\_\_

**10. Coluna**

Cifose ( ) Escoliose ( ) Lordose ( ) Apêndice pré sacral ( ) Fóvea coccígea ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**11. Abdome**

Hérnia umbilical ( ) Hérnia inguinal ( ) Diástase músculos retos abdominais ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

Semiologia \_\_\_\_\_

**12. Membros****A. Membros Superiores:** Mãos grandes ( ) Pequenas ( ) Braquidactilia ( ) Aracnodactilia ( )  
Polidactilia ( ) Tipo: \_\_\_\_\_ Sindactilia cutânea ( ) Óssea ( ) Tipo: \_\_\_\_\_  
Prega simiesca completa ( ) Incompleta ( ) Prega única no dedo mínimo ( )

Hipoplasia da falange média do 5º dedo ( ) Clinodactilia ( dedo: \_\_\_\_\_ Acavalgamento dos dedos ( )

Descrever: \_\_\_\_\_ Deformidade por redução do membro superior ( )

Amelia ( ) Focomelia ( ) Ausência congênita (total ou parcial) dos dedos ( ) Da mão ( )

Do antebraço ( ) Do braço ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**B. Membros Inferiores:** Pés grandes ( ) Pequenos ( ) Polidactilia ( ) Tipo: \_\_\_\_\_

Sindactilia cutânea ( ) Óssea ( ) Dedos: \_\_\_\_\_ Pé torto congênito ( ) Cavo ( ) Calcâneo ( )

Equino ( ) Varo ( ) Pé plano ( ) Distância aumentada entre o hálux e o segundo artelho ( )

Sulco Plantar entre o hálux e o segundo artelho ( ) Deformidade por redução do membro inferior ( )

Amelia ( ) Focomelia ( ) Ausência congênita [total ou parcial de dedos] ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**C. Articulações:** Limitação articular \_\_\_\_\_

Hiperextensibilidade articular ( ) Contratura generalizada por flexão das articulações dos membros ( )

Luxação congênita ( ) Obs.: \_\_\_\_\_

**13. Genitália Externa**

Ambígua ( ) Criptorquidia ( ) Testículo retrátil ( ) Hipoplasia dos grandes lábios ( )

Hipertrofia do clitóris ( ) Hidrocele congênita ( ) Hipospadia: Balanoprepucial ( ) Penoescrotal ( )

Perineal ( ) Epispadia ( ) Fimose ( ) Obs.: \_\_\_\_\_

**14. Tecidos Celular Subcutâneo**

Desenvolvimento: médio ( ) Escasso ( ) Abundante ( ) Ausente ( ) Turgor firme ( )  
Frouxo ( )

Pastoso ( ) Edema das mãos ( ) Pés ( ) Outro: \_\_\_\_\_

Gânglios \_\_\_\_\_ Obs.: \_\_\_\_\_

**15. Musculatura**

Nomotrófica ( ) Hipotrófica ( ) Hipertrófica ( ) Normotônica ( ) Hipotônica ( ) Hipertônica ( )

Força muscular normal ( ) Diminuída ( ) Aumentada ( ) Agenesia muscular congênita ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**16. Pele e Anexos**

Pigmentação cutânea: normal ( ) Aumento generalizado ( ) Diminuição generalizada ( )

Albinismo total ( ) Parcial ( ) Vitiligo ( ) Manchas café-com-leite ( ) tipo \_\_\_\_\_

Manchas peri-orais ( ) Outras manchas ( ) Local: \_\_\_\_\_ Hemangiomas ( )

Telangiectasias ( ) Alopecia generalizada ( ) Parcial ( ) Hirsutismo ( ) Local: \_\_\_\_\_

Dismorfismo ungueal ( ) Tipo \_\_\_\_\_ Dos pés ( ) Tumorações ( )

Obs.: \_\_\_\_\_

**17. Exames Neurológicos**

Facies: \_\_\_\_\_

Motricidade: \_\_\_\_\_

Sensibilidade: \_\_\_\_\_

Coordenação: \_\_\_\_\_

Movimentos involuntários: \_\_\_\_\_

Equilíbrio: \_\_\_\_\_

Reflexos: \_\_\_\_\_

Nervos Cranianos: \_\_\_\_\_

Sind. De Williams	Nome:	SAG:
-------------------	-------	------

<b>CARACTERÍSTICAS DA SWB</b>
<b>Características Gerais</b>
Sexo
Idade Gestacional (semanas)
Peso RN (percentil)
Comprimento RN (percentil)
Idade ao 1º Atendimento
Motivo da Consulta
Estatura (percentil)
Peso (percentil)
P.C. (percentil)
<b>Evolução</b>
Atraso DNPM / DM
Hipotonia
Sociabilidade Excessiva
Hiperatividade
Loquacidade
Voz grave
Deficiência de crescimento
Dificuldade Alimentar
Vômitos
Constipação Intestinal
Hérnia inguinal e/ou umbilical
Problemas cardíacos <u>especificarem</u>
Problemas respiratórios <u>especificarem</u>
Otites de Repetição
Problemas renais
Hipertensão arterial
<b>Características Físicas</b>
Microcefalia
Fronte Alargada
Orelhas grandes em abano
Edema periorbital
Estrabismo
Íris estrelada
Ponte nasal baixa
Filtro nasal longo
Boca de carpa
Lábio inferior grosso
Anomalias dentárias <u>especificarem</u>
Bochechas proeminentes
Micrognatismo
Clinodactilia de 5º dígito
Halux valgo
Hipoplasia ungueal
Hipercalcemia

Estudado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



**ANEXO 4**

Fotos dos 22 pacientes utilizados no *paper 2*.



6237



7515



7522



7512



7517



7543



7513



7520



7747



7578



7663



7742



7630



7670



7744



7661



7704



7746



7745



7338



7780



7785