

Deleção 22q11.2 em Pacientes com Defeito Cardíaco Conotruncal e Fenótipo da Síndrome da Deleção 22q11.2

22q11.2 Deletion in Patients with Conotruncal Heart Defect and del22q Syndrome Phenotype

Sintia Iole Nogueira Belangero, Fernanda T.S. Bellucco, Leslie Domenici Kulikowski, Denise M. Christofolini, Mirlene C. S. P. Cernach, Maria Isabel Melaragno

Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: A síndrome da deleção 22q11.2 é a mais freqüente síndrome de microdeleção humana. O fenótipo é altamente variável e caracterizado por defeito cardíaco conotruncal, dismorfias faciais, insuficiência velofaríngea, dificuldade de aprendizagem e retardo mental.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi investigar a freqüência da deleção 22q11.2 em uma amostra brasileira de indivíduos portadores de cardiopatia conotruncal isolada e do fenótipo da síndrome da deleção 22q11.2.

Métodos: Vinte e nove pacientes foram estudados por meio de citogenética clássica, por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e por técnicas moleculares.

Resultados: A análise citogenética por meio de bandamento G revelou cariótipo normal em todos os pacientes, com exceção de um que apresentou cariótipo 47,XX,+idic(22)(q11.2). Com o uso de técnicas moleculares, a deleção foi observada em 25% dos pacientes, todos portadores do fenótipo da síndrome da deleção 22q11.2. Em nenhum dos casos, a deleção foi herdada dos pais. A freqüência da deleção 22q11.2 foi maior no grupo de pacientes portadores do espectro clínico da síndrome da deleção 22q11.2 do que no grupo de pacientes com cardiopatia conotruncal isolada.

Conclusão: A investigação da presença da deleção e sua correlação com os dados clínicos dos pacientes podem auxiliar os pacientes e suas famílias a terem um melhor aconselhamento genético e um seguimento clínico mais adequado. (Arq Bras Cardiol 2009;92(4):307-311)

Palavras-chave: Deleção cromossômica, fenótipo, cardiopatias congênitas, marcadores genéticos.

Summary

Background: The 22q11.2 deletion syndrome is the most frequent human microdeletion syndrome. The phenotype is highly variable, being characterized by conotruncal heart defect, facial dysmorphisms, velopharyngeal insufficiency, learning difficulties and mental retardation.

Objective: The objective of this study was to investigate the frequency of deletion 22q11.2 in a Brazilian sample of individuals with isolated conotruncal heart defect and 22q11.2 deletion syndrome phenotype.

Methods: Twenty-nine patients were studied by classical cytogenetics, by fluorescence in situ hybridization (FISH), and by molecular techniques.

Results: Cytogenetic analysis by G-banding revealed a normal karyotype in all patients except one who presented a 47,XX,+idic(22)(q11.2) karyotype. Using molecular techniques, a deletion was observed in 25% of the patients, all exhibiting a 22q11.2 deletion syndrome phenotype. In none of the cases the deletion was inherited from the parents. The frequency of 22q11.2 deletion was higher in patients with the clinical spectrum of the 22q11.2 deletion syndrome than in patients with isolated conotruncal heart defect.

Conclusion: Investigating the presence of the deletion and its correlation with the patients' clinical data can help the patients and their families to have a better genetic counseling and more adequate clinical follow-up. (Arq Bras Cardiol 2009;92(4):289-293)

Key words: Chromosome deletion; phenotype; heart defects, congenital; genetic markers.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Sintia Iole Nogueira Belangero •
Rua Botucatu, 740 - Vila Clementino - 04023-900 - São Paulo, SP - Brasil
E-mail: sintia.morf@epm.br

Artigo recebido em 17/12/07, revisado recebido em 23/01/08; aceito em 10/04/08.

Introdução

As síndromes de DiGeorge (DGS), velocardiofacial (VCFS) e de anomalias faciais e conotruncais (CAFS) durante muitos anos foram consideradas como sendo síndromes distintas. No entanto, por possuírem a mesma etiologia, a deleção da região q11.2 do cromossomo 22, são atualmente classificadas como sendo variações de um mesmo espectro clínico, com sobreposição de fenótipo e expressividade variável, denominado síndrome da deleção 22q11.2¹. Uma das características mais freqüentes dessa síndrome é a presença de malformação cardíaca conotruncal, porém outras alterações podem estar presentes, tais como palato fendido, hipoplasia de timo e de glândula paratireóide, dismorfias faciais, voz nasalada, dificuldade de aprendizagem, doenças psiquiátricas e retardo mental leve².

A freqüência da deleção 22q11.2 é de aproximadamente 1:4000 nascidos vivos³ e está presente em cerca de 90% dos pacientes com o fenótipo da síndrome⁴. A deleção é esporádica em aproximadamente 90% dos casos e herdada de um dos pais em 10% deles⁵. A grande maioria dos pacientes (87%) apresenta uma deleção de 3Mb (megabases)⁴. Não é possível detectar a deleção por meio de citogenética clássica (cariótipo), sendo necessária a utilização de outras técnicas, tais como a de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a de marcadores polimórficos de DNA.

A identificação de uma deleção esporádica implica em baixo risco de recorrência (1 a 3%), enquanto que em uma deleção herdada, há um risco de 50% de transmissão da deleção^{1,6}. Dessa forma, investigações citogenéticas e moleculares nos indivíduos afetados e seus pais são fundamentais para um diagnóstico preciso, bem como para um aconselhamento genético adequado.

O objetivo deste estudo foi avaliar a constituição cromossômica e a freqüência da deleção 22q11.2 em pacientes portadores de cardiopatia conotruncal isolada e em portadores do espectro clínico da síndrome da deleção 22q11.2. Nos casos em que a deleção estava presente, verificamos se era a forma herdada ou não. Além disso, comparamos a eficiência das metodologias de FISH e de marcadores polimórficos de DNA para a detecção da deleção 22q11.2.

Casuística

A amostra consistia de 29 pacientes (Tabela 1). Os critérios clínicos para inclusão foram: (I) malformação cardíaca conotruncal associada a outros aspectos clínicos da síndrome da deleção 22q11.2 (13 pacientes); (II) fenótipo característico da síndrome da deleção 22q11.2, sem cardiopatia (10 pacientes); e (III) malformação cardíaca conotruncal isolada (6 pacientes). A maioria dos pacientes era proveniente do berçário e do Centro de Genética Médica, ambos do Hospital São Paulo; os outros foram provenientes de outros hospitais de São Paulo. Dezessete famílias foram compostas por probando e seus genitores, sete por probando e mãe e cinco, apenas pelo probando.

Os pais dos pacientes, quando disponíveis, também foram estudados pela técnica de marcadores de DNA e, quando a criança apresentava deleção, eles também foram estudados por FISH, com a finalidade de investigar se a deleção era

herdada ou não. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo. Todas as famílias dos probandos deram o consentimento informado para participação nesta pesquisa.

Métodos

Análise citogenética

Culturas de linfócitos foram realizadas para a análise de cariótipo⁷. Quinze metáfases foram analisadas por indivíduo. Os cromossomos metafásicos, com resolução de 400-550 bandas cromossômicas, foram classificados conforme o ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) (2005). Técnicas adicionais de bandamento C e de coloração das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) foram usadas quando necessário.

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de FISH foi realizada, a partir da cultura de linfócitos, com sonda comercial que resulta na marcação simultânea da região cromossômica da DGS que inclui o gene *TUPLE1* (marcação em vermelho) e da região terminal do cromossomo 22 como controle (marcação em verde) (Cytocell® - Cambridge) (figura 1). Vinte metáfases e/ou 100 núcleos interfásicos de cada paciente foram analisados. No caso em que havia um cromossomo marcador, foi utilizada a sonda para centrômero dos cromossomos 14/22 (*D14Z1/D22Z1* - Vysis®) e sondas de cosmídeos (c106e4 e c103a2) para região crítica da síndrome *cat eye*.

Estudo por marcadores polimórficos de DNA

O DNA foi extraído a partir de linfócitos de sangue periférico⁸ e a técnica de PCR⁹ foi realizada utilizando *primers* para três *loci* polimórficos localizados na região comumente deletada: D22S941, D22S944N e D22S264¹⁰⁻¹² (Figura 1). Os produtos da PCR foram testados em gel de agarose a 1% para verificar a presença da amplificação e em seguida, os polimorfismos de tamanho foram avaliados em gel de poliacrilamida desnaturante de alta resolução (GeneGel HyRes-Amersham Biosciences®) corado com nitrato de prata.

Este trabalho foi financiado pela CAPES, FADA e FAPESP.

Resultados

Dentre os 29 pacientes estudados, 13 eram do sexo feminino e 16 do masculino, com idades variando entre um dia e 28 anos (Tabela 1).

A análise do cariótipo foi realizada em 28 dos 29 pacientes (não foi possível coletar sangue periférico de um dos pacientes) e todos apresentaram resultados normais, com exceção de um dos pacientes (S77) que apresentou o cariótipo 47,XX,+mar. Após a realização das técnicas de FISH e de bandamento C e NOR, esse cariótipo foi dado como 47,XX,+idic(22)(pter→q11.2::q11.2→pter).

Entre os pacientes com cariótipo normal, a deleção 22q11.2 foi observada em 25% (7/28) dos pacientes estudados. Entretanto, quando analisamos os grupos separadamente, a

Tabela 1 - Dados dos pacientes

	Paciente	Sexo	Idade na 1ª consulta	Tipo de cardiopatia	DNPM	Deleção 22q11.2
Fenótipo da síndrome e cardiopatia	S19	M	10a 8m	Estenose pulmonar	atraso	-
	S26	M	7a 8m	CIV e insuficiência aórtica	normal	-
	S48	M	RN	Interrupção do arco aórtico	/	+
	S49	M	11a 5m	Tetralogia de Fallot	atraso	+
	S52	F	28a 11m	CIA e prolapso mitral	atraso	-
	S69	M	RN	CIA, CIV perimembranosa	/	+
	S70	M	RN	Hipoplasia de ventrículo direito e atresia de válvula pulmonar	/	-
	S71	M	RN	CIV e interrupção do arco aórtico	/	-
	S72	F	1m	Defeito de septo átrio-ventricular, CIV e CIA	atraso	+
	S83	F	RN	Defeito de septo átrio-ventricular forma completa tipo A de Rastelli	/	-
	S86	M	9a 2m	Persistência do canal arterial, hipoplasia ístmica da aorta	atraso	-
	S94	F	7a 5m	CIV e hipertensão pulmonar	atraso	+
	Fenótipo da síndrome sem cardiopatia	S1	F	12a 9m	-	atraso
S2		F	6a 11m	-	atraso	-
S4		F	7a 3m	-	atraso	-
S5		M	5a 10m	-	atraso	+
S7		F	3a 9m	-	atraso	-
S10		F	7a 6m	-	atraso	+
S22		M	4a 11m	-	atraso	-
S29		F	10a 6m	-	normal	-
S38		F	6a 10m	-	atraso	-
S45		M	2a 8m	-	atraso	-
Cardiopatia isolada	S32	M	11a 5m	Tetralogia de Fallot	normal	-
	S35	M	11a 7m	Valva aórtica bicúspide	normal	-
	S40	M	16a 1m	Comunicação interventricular fallotizada	normal	-
	S43	M	8a 11m	Tetralogia de Fallot, CIV sub-aórtica e estenose do ramo direito da artéria pulmonar	normal	-
	S59	F	3a 8m	Tetralogia de Fallot	normal	-
	S65	M	1m	Tetralogia de Fallot	/	-
'Cat Eye Syndrome	S77	F	4m	CIV e interrupção do arco aórtico tipo B	/	-

F - feminino; M - masculino; RN - recém-nascido; +: presença; -: ausência; /: não determinado; a - anos; m - meses; C.I.V - comunicação interventricular; C.I.A. - comunicação interatrial.

deleção estava presente em aproximadamente 42% (5/12) dos pacientes com fenótipo da síndrome associado à cardiopatia, em 20% (2/10) dos indivíduos com fenótipo da síndrome, mas sem cardiopatia e em nenhum dos pacientes (0/6) com cardiopatia conotruncal isolada. Verificamos que nenhuma das deleções era herdada.

Considerando os dados dos três marcadores polimórficos de DNA conjuntamente, um resultado informativo quanto à presença da deleção foi obtido em 94% (16/17) das famílias compostas por pacientes e ambos os genitores, em 71% (5/7) das famílias compostas por paciente e mãe e em 25% (1/4) dos casos em que estudamos só o probando. Quando

consideramos todos os casos, encontramos resultados informativos dos marcadores em 79% dos casos (22/28).

Discussão

A deleção 22q11.2 não foi detectada pela análise do cariótipo, reforçando a idéia de que essa técnica é pouco eficaz para a investigação da deleção. No entanto, o exame de cariótipo é necessário para a investigação de outras aberrações cromossômicas relacionadas à cardiopatia, como no caso da paciente que apresentou cariótipo 47,XX,+idic(22)(pter→q11.2::q11.2→pter). A hipótese

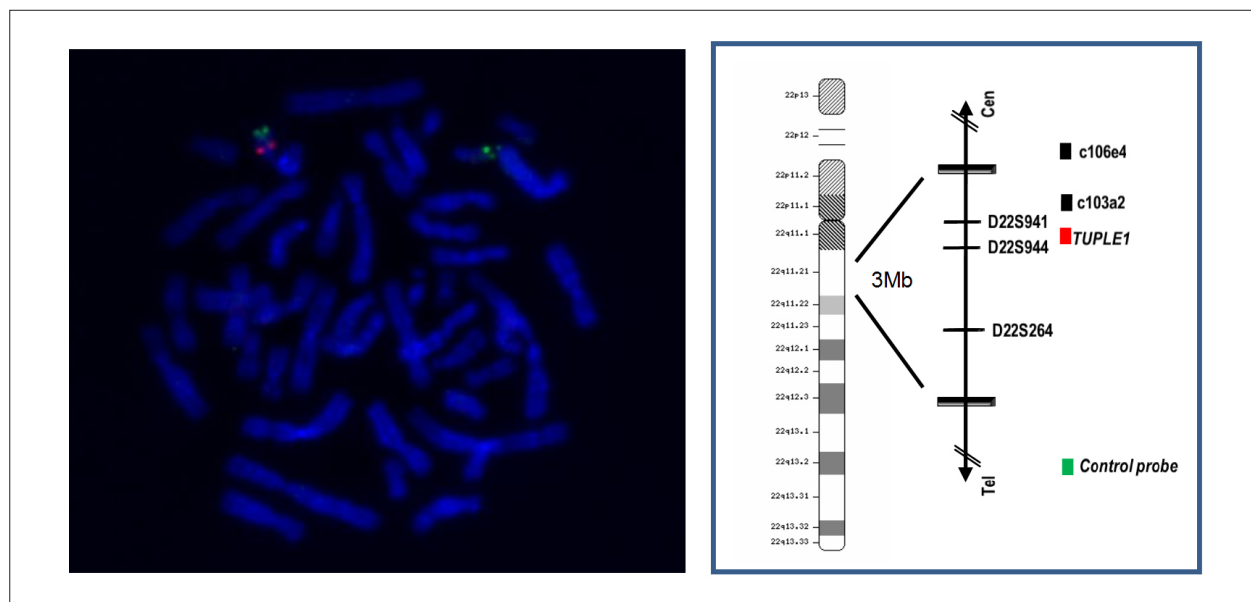


Fig. 1 - (a) Metáfase de um paciente portador de deleção 22q11.2 submetida à técnica FISH. O sinal vermelho indica a região 22q11.2 e o sinal verde a região controle terminal do cromossomo 22, usada como controle. A seta indica o cromossomo 22 deletado, mostrando a presença apenas da região controle. (b) Esquema do cromossomo 22 mostrando a região comumente deletada de 3Mb, os marcadores polimórficos de DNA e as sondas de FISH utilizadas neste estudo.

diagnóstica inicial para essa paciente foi a síndrome da deleção 22q11.2, devido à presença de anomalias fenotípicas e interrupção do arco aórtico tipo B, um defeito cardíaco que está presente em 50% dos casos de deleção 22q11.2¹³. Entretanto, como o cariótipo revelou a presença de um marcador isodicêntrico derivado do cromossomo 22, o diagnóstico final foi a tetrassomia parcial do cromossomo 22 ou síndrome *cat eye* (CES), uma síndrome malformativa rara, cujo diagnóstico é baseado na presença de um cromossomo marcador extra, derivado do cromossomo 22¹⁴. Nesse caso, a técnica de FISH também se mostrou eficiente para o aprimoramento do diagnóstico citogenético.

A frequência da deleção 22q11.2 associada à síndrome da deleção 22q11.2 ainda não está bem estabelecida na literatura e pode variar, entre outros fatores, de acordo com a amostra estudada e com a técnica utilizada para a detecção. A análise molecular, incluindo marcadores de DNA e FISH, mostra que a deleção está presente em cerca de 80-90% dos casos da síndrome^{2,15,16}. Em nosso estudo, a deleção 22q11.2 foi encontrada em 25% da amostra, frequência menor do que a relatada na literatura.

Um fator que poderia explicar essa baixa frequência da deleção é a grande variabilidade fenotípica observada nos pacientes desse estudo, uma vez que a amostra compreende desde pacientes com cardiopatia isolada até pacientes com o quadro completo da síndrome. De acordo com a literatura, a frequência de deleção 22q11.2 entre os pacientes portadores de cardiopatia conotruncal isolada é de cerca de 29%^{17,18}, bem menor do que a frequência de deleção entre os pacientes com cardiopatia associada a outros sinais clínicos (80-90%)^{2,15,16}. Em nossa casuística, nenhum dos seis pacientes com cardiopatia isolada apresentou deleção 22q11.2, um achado que corrobora o fato da deleção ser mais frequente

em pacientes que apresentam, além da cardiopatia, outros sinais fenotípicos associados^{17,18}.

Todas as deleções foram encontradas em pacientes com o espectro clínico da síndrome, tanto em portadores de cardiopatia, como nos que não apresentavam cardiopatia. Esses dados mostram que pacientes com características fenotípicas faciais da síndrome, mesmo sem as malformações cardíacas, devem ser investigados quanto à presença da deleção.

A idade dos pacientes também pode ter influenciado a frequência da deleção, uma vez que os pacientes selecionados apresentaram idades bem variadas e o fato de que em crianças muito pequenas o fenótipo nem sempre é tão evidente.

Vários indivíduos (15/22), apesar de serem portadores de sinais clínicos da síndrome, não apresentaram deleção detectável e, apesar de a deleção 22q11.2 ser a etiologia mais provável, outras causas podem ser responsáveis pelo fenótipo. Entre elas estão as mutações nos genes presentes nessa região (22q11.2) e em genes de outras regiões relacionadas à cardiopatias congênitas conotruncais, tais como 8p23.1¹⁹ e 10p13²⁰.

Em relação ao uso de marcadores polimórficos de DNA, de acordo com nossos resultados concluímos que o ideal é estudar o probando e os dois genitores, embora o estudo isolado do paciente possa revelar resultados normais quando o indivíduo é heterozigoto, independente do estudo molecular dos pais. Assim, a avaliação molecular pode ser realizada em crianças com o fenótipo da síndrome da deleção 22q11.2 como primeira triagem para se detectar a deleção 22q, antes de se utilizar a FISH. Além disso, na impossibilidade de colher sangue periférico dos pacientes, os ensaios moleculares podem ser realizados com DNA extraído de outros tecidos.

Neste trabalho, utilizamos três marcadores de DNA localizados na região que está deletada em aproximadamente 98% dos pacientes com o fenótipo da síndrome, o que aumenta a taxa de sucesso na investigação da deleção. No entanto, esses marcadores podem não detectar deleções atípicas, ou seja, deleções de segmentos que estejam fora da região tipicamente deletada, que ocorrem a uma frequência de 2% em pacientes com o fenótipo da síndrome⁴.

A deleção 22q11.2 não estava presente em nenhum dos genitores das crianças com a deleção, caracterizando assim, todas as deleções dos probandos como esporádicas.

Conclusões

Os dados deste estudo sugerem que a deleção 22q11.2 é mais freqüente em pacientes portadores do quadro clínico da síndrome, do que em pacientes portadores de cardiopatia conotruncal isolada. Quanto às metodologias utilizadas para detecção, a técnica de FISH é mais precisa para se detectar deleção do que a técnica de marcadores

de DNA. A técnica de FISH possibilita a investigação da presença de alterações cromossômicas nos pais de crianças portadoras da deleção, o que determina o risco reprodutivo do casal. A investigação da presença da deleção e sua correlação com os dados clínicos dos pacientes podem auxiliar o cardiologista a realizar um melhor seguimento aos pacientes.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por FAPESP, CNPq e CAPES.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Sintia Iole Nogueira pela Universidade Federal de São Paulo.

Referências

1. McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, et al. The Philadelphia Story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns.* 1999; 10: 11-24.
2. Matsuoka R, Kimura M, Scambler PJ, Morrow BE, Imamura S, Minooshima S, et al. Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Hum Genet.* 1998; 103: 70-80.
3. Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, van Thienen MN, Keymolen K. The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet.* 1998; 35: 789-90.
4. Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Maisenbacher MK, et al. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet.* 2004; 13: 417-28.
5. McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med.* 2001; 3: 23-9.
6. Nora JJ, Nora AH. Genetic epidemiology of congenital heart diseases. *Prog Med Genet.* 1983; 5: 91-137.
7. Moorhead PS, Nowell PC, Mellmann WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960; 20: 613-6.
8. Lahiri DK, Nurnberg JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 5444.
9. Saiki RK, Scharf S, Falona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1991; 230: 1350-4.
10. Morrow B, Goldberg R, Carlson C, Das Gupta R, Sirotkin H, Collins J, et al. Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet.* 1995; 56: 1391-403.
11. Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, et al. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 620-9.
12. Marineau C, Aubry M, Julien JP, Rouleau GA. Dinucleotide repeat polymorphism at the D22S264 locus. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 1430.
13. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics.* 2003; 112: 101-7.
14. Rosias PR, Sijstermans JM, Theunissen PM, Pulles-Heintzberger CF, De Die-Smulders CE, Engelen JJ, et al. Phenotypic variability of the cat eye syndrome: case report and review of the literature. *Genet Couns.* 2001; 12: 273-82.
15. Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, et al. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet.* 1992; 44: 261-8.
16. Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, et al. Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet.* 1992; 339: 1138-9.
17. Thomas JA, Graham JM Jr. Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr.* 1997; 36: 253-66.
18. Goldmuntz E, Clark B, Mitchell L, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32: 492-8.
19. Giglio S, Graw SL, Gimelli G, Pirola B, Varone P, Voullaire L, et al. Deletion of a5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. *Circulation.* 2000; 102: 432-7.
20. Greenberg F. DiGeorge syndrome: a historical review of clinical and cytogenetic features. *J Med Genet.* 1993; 30: 803-6.