

Deleción 22q11.2 en Pacientes con Defecto Cardíaco Conotruncal y Fenotipo del Síndrome de la Deleción 22q11.2

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

Resumen

Fundamento: El síndrome de la deleción 22q11.2 es el más frecuente síndrome de microdeleción humana. El fenotipo, altamente variable, se caracteriza por defecto cardíaco conotruncal, dismorfias faciales, insuficiencia velofaríngea, dificultad de aprendizaje y retardo mental.

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue investigar la frecuencia tanto de la deleción 22q11.2 en una muestra brasileña de individuos portadores de cardiopatía conotruncal aislada, como del fenotipo del síndrome de la deleción 22q11.2.

Métodos: Se estudiaron a 29 pacientes por medio de citogenética clásica, por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y también por técnicas moleculares.

Resultados: El análisis citogenético por medio de bandejo G reveló cariotipo normal en todos los pacientes, con excepción de uno, que presentó cariotipo 47,XX,+idic(22)(q11.2). Con la utilización de técnicas moleculares, se observó la deleción en el 25% de los pacientes, todos portadores del fenotipo del síndrome de la deleción 22q11.2. En ningún de los casos, la deleción se heredó de los padres. La frecuencia de la deleción 22q11.2 en el grupo de pacientes portadores del espectro clínico de este síndrome resultó mayor que en el grupo de pacientes con cardiopatía conotruncal aislada.

Conclusión: La investigación de la presencia de deleción y su correlación con los datos clínicos de los pacientes pueden auxiliar los pacientes y sus familias a tener un mejor asesoramiento genético, así como un seguimiento clínico más adecuado. (Arq Bras Cardiol 2009;92(4):298-302)

Palabras-clave: Deleción cromosómica, fenotipo, cardiopatías congénitas, marcadores genéticos.

Introducción

Durante muchos años se consideró que los síndromes de DiGeorge (DGS), velocardiocéfalo (VCFS) y de anomalías faciales y conotruncales (CAFS) eran síndromes distintos. Sin embargo, como presentan la misma etiología –la deleción de la región q11.2 del cromosoma 22–, dichos síndromes se clasifican como variaciones de un mismo espectro clínico, con superposición de fenotipo y expresividad variable, denominado síndrome de la deleción 22q11.2¹. Una de las características más frecuentes de ese síndrome es la presencia de malformación cardíaca conotruncal, pero otras alteraciones pueden presentarse, tales como paladar hendido, hipoplasia de timo y de glándula paratiroide, dismorfias faciales, voz nasalizada, dificultad de aprendizaje, enfermedades psiquiátricas y retardo mental leve².

La deleción 22q11.2, cuya frecuencia resulta en cerca de 1:4000 nacidos vivos³, está presente en alrededor del 90% de los pacientes con el fenotipo del síndrome⁴. La deleción resulta esporádica aproximadamente en el 90% de los casos; el 10% de ellos la hereda de uno de los padres⁵. La gran mayoría de los

pacientes (87%) presenta una deleción de 3Mb (megabases)⁴. No se puede detectar la deleción por medio de citogenética clásica (cariotipo), siendo necesaria la utilización de otras técnicas, tales como la de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la de marcadores polimórficos de ADN.

La identificación de una deleción esporádica implica un bajo riesgo de recurrencia (del 1 al 3%), mientras que en una deleción heredada, hay un riesgo del 50% de transmisión del síndrome^{1,6}. De esa forma, investigaciones citogenéticas y moleculares, tanto en los individuos afectados como en sus padres, resultan fundamentales para un diagnóstico preciso, así como para un asesoramiento genético adecuado.

El objetivo de este estudio fue evaluar la constitución cromosómica y la frecuencia de la deleción 22q11.2, tanto en pacientes portadores de cardiopatía conotruncal aislada como en portadores del espectro clínico del síndrome de la deleción 22q11.2. En los casos en que la deleción se presentaba, verificamos si era la forma heredada o no. Además de ello, comparamos la eficiencia de las metodologías de FISH y de marcadores polimórficos de ADN para detectar la deleción 22q11.2.

Casística

La muestra estaba conformada por 29 pacientes (Tabla 1). Los criterios clínicos para inclusión fueron los siguientes: (I)

Correspondencia: Sintia Iole Nogueira Belangero •
Rua Botucatu, 740 - Vila Clementino - 04023-900 - São Paulo, SP - Brasil
E-mail: sintia.morf@epm.br
Artículo recibido el 17/12/07, revisado recibido el 23/01/08;
aceptado el 10/04/08.

malformación cardíaca conotruncal asociada a otros aspectos clínicos del síndrome de la delección 22q11.2 (13 pacientes); (II) fenotipo característico del síndrome de la delección 22q11.2, sin cardiopatía (10 pacientes); y (III) malformación cardíaca conotruncal aislada (6 pacientes). La mayoría de los pacientes provenía del nido de la maternidad y del Centro de Genética Médica, ambos del Hospital São Paulo; los demás provinieron de otros hospitales de São Paulo. La cantidad de 17 familias estaban compuestas por los propositus y sus genitores, siete por los propositus y su madre, y cinco sólo por los propositus.

Cuando disponibles, se estudiaron a los padres de los pacientes con la técnica de marcadores de ADN. Si el niño presentaba delección, se estudiaron a los padres por medio de la FISH, con la finalidad de investigar si la delección era heredada o no. El Comité de Ética en Investigación de la Universidad Federal de São Paulo/Hospital São Paulo aprobó este estudio. Todas las familias de los propositus firmaron el formulario consentimiento informado para participar en esta investigación.

Métodos

Análisis citogenético

Se realizaron culturas de linfocitos para el análisis de cariotipo⁷. Se analizaron 15 metafases por individuo. Se clasificaron los cromosomas metafásicos, con resolución de 400-550 bandas cromosómicas, conforme el ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) (2005). Cuando necesario, se utilizaron técnicas adicionales de bandeado C y coloración de las regiones organizadoras de nucléolo (NOR).

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Se realizó la técnica de FISH a partir de la cultura de linfocitos, con sonda comercial que consiste en la marcación simultánea de la región de la DGS –que incluye el gen *TUPLE1* (marcación en rojo)– y de la región terminal del cromosoma 22 como control (marcación en verde) (Cytocell®- Cambridge) (Figura 1). Se analizaron 20 metafases y/o 100 núcleos interfásicos de cada paciente. En los casos que presentaron un cromosoma marcador, se utilizó la sonda para centrómero de los cromosomas 14/22 (*D14Z1/D22Z1* - Vysis®) y sondas de cósmidos (c106e4 y c103a2) para región crítica del síndrome *cat eye*.

Estudio por marcadores polimórficos de ADN

Se extrajo el ADN a partir de linfocitos de sangre periférica⁸. Se realizó la técnica de PCR⁹, con utilización de *primers* para tres *loci* polimórficos ubicados en la región comúnmente delecionada: D22S941, D22S944N y D22S264¹⁰⁻¹² (Figura 1). Se probaron los productos de PCR en gel de agarosa al 1% para verificar la presencia de amplificación y, enseguida, se evaluaron los polimorfismos de tamaño en gel de poliacrilamida denaturante de alta resolución (GeneGel HyRes-Amersham Biosciences®) coloreado con nitrato de plata.

Este trabajo fue financiado por CAPES (Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior), FADA (Fondo de Auxilio a los Docentes y Alumnos – UNIFESP) y FAPESP (Fundación de Amparo a la Investigación del Estado de São Paulo).

Resultados

Entre los 29 pacientes estudiados, 13 eran del sexo femenino y 16 del masculino, con edades que variaban entre un día y 28 años (Tabla 1).

Se realizó el análisis del cariotipo en 28 de los 29 pacientes (no se pudo coleccionar sangre periférica de uno de los pacientes); todos tuvieron resultados normales, con excepción de uno (S77), que presentó el cariotipo 47,XX,+mar. Tras la realización de las técnicas de FISH y de bandeado C y NOR, ese cariotipo se mostró como 47,XX,+idic(22)(pter→q11.2::q11.2→pter).

Entre los pacientes con cariotipo normal, se observó la delección 22q11.2 en el 25% (7/28) de los pacientes estudiados. Sin embargo, cuando analizamos los grupos separadamente, la delección se presentaba: en cerca del 42% (5/12) de los pacientes con fenotipo del síndrome asociado a cardiopatía; en el 20% (2/10) de los individuos con fenotipo del síndrome, pero sin cardiopatía; y en ningún de los pacientes (0/6) con cardiopatía conotruncal aislada. Verificamos que ninguna de las deleciones era heredada.

Tomándose en consideración los datos de los tres marcadores polimórficos de ADN en su conjunto, se obtuvo un resultado informativo respecto a la presencia de la delección en el 94% (16/17) de las familias compuestas por pacientes y ambos genitores, así como en el 71% (5/7) de las familias compuestas por paciente y madre y, también en el 25% (1/4) de los casos en que estudiamos solamente el propositus. Cuando consideramos todos los casos, encontramos resultados informativos de los marcadores en el 79% de los casos (22/28).

Discusión

No se detectó la delección 22q11.2 a través del análisis del cariotipo, lo que refuerza la idea de que esa técnica resulta poco eficaz para la investigación de dicho defecto. No obstante, el examen de cariotipo se muestra necesario para investigarse otras aberraciones cromosómicas relacionadas a la cardiopatía, como en el caso de la paciente que presentó cariotipo 47,XX,+idic(22)(pter→q11.2::q11.2→pter). La hipótesis diagnóstica inicial para dicha paciente fue el síndrome de la delección 22q11.2, en virtud de la presencia de anomalías fenotípicas e interrupción del arco aórtico tipo B, un defecto cardíaco que está presente en el 50% de los casos de delección 22q11.2¹³. Sin embargo, como el cariotipo reveló la presencia de un marcador isodicéntrico derivado del cromosoma 22, el diagnóstico final fue de tetrasomía parcial del cromosoma 22 o síndrome *cat eye* (CES), un síndrome malformativo raro, cuyo diagnóstico se basa en la presencia de un cromosoma marcador extra, derivado del cromosoma 22¹⁴. En ese caso, la técnica de FISH también se mostró eficiente para el perfeccionamiento del diagnóstico citogenético.

Todavía no se estableció suficientemente en la literatura la frecuencia de la delección 22q11.2 asociada al síndrome de la delección 22q11.2. Ella puede variar, entre otros factores, de acuerdo con la muestra estudiada y con la técnica utilizada para

Tabla 1 – Datos de los pacientes

	Paciente	Sexo	Edad en la primera consulta	Tipo de cardiopatía	DNPM	Delección 22q11.2
Fenotipo del síndrome y cardiopatía	S19	M	10a 8m	Estenosis pulmonar	retraso	-
	S26	M	7a 8m	CIV e insuficiencia aórtica	normal	-
	S48	M	RN	Interrupción del arco aórtico	/	+
	S49	M	11ª 5m	Tetralogía de Fallot	retraso	+
	S52	F	28ª 11m	CIA y prolapso mitral	retraso	-
	S69	M	RN	CIA, CIV perimembranosa	/	+
	S70	M	RN	Hipoplasia de ventrículo derecho y atresia de válvula pulmonar	/	-
	S71	M	RN	CIV e interrupción del arco aórtico	/	-
	S72	F	1m	Defecto de septo atrioventricular CIV y CIA	retraso	+
	S83	F	RN	Defecto de septo atrioventricular forma completa tipo Rastelli A	/	-
	S86	M	9a 2m	Persistencia del canal atrial, hipoplasia ístmica de la aorta	retraso	-
	S94	F	7a 5m	CIV e hipertensión pulmonar	retraso	+
Fenotipo del síndrome sin cardiopatía	S1	F	12a 9m	-	retraso	-
	S2	F	6a 11m	-	retraso	-
	S4	F	7a 3m	-	retraso	-
	S5	M	5ª 10m	-	retraso	+
	S7	F	3a 9m	-	retraso	-
	S10	F	7a 6m	-	retraso	+
	S22	M	4a 11m	-	retraso	-
	S29	F	10a 6m	-	normal	-
	S38	F	6a 10m	-	retraso	-
	S45	M	2a 8m	-	retraso	-
Cardiopatía aislada	S32	M	11a 5m	Tetralogía de Fallot	normal	-
	S35	M	11a 7m	Válvula aórtica bicúspide	normal	-
	S40	M	16a 1m	Comunicación interventricular Tetralogía de Fallot	normal	-
	S43	M	8a 11m	Tetralogía de Fallot, CIV sub-aórtica y estenosis de la rama derecha de la arteria pulmonar	normal	-
	S59	F	3a 8m	Tetralogía de Fallot	normal	-
	S65	M	1m	Tetralogía de Fallot	/	-
Síndrome Cat Eye	S77	F	4m	CIV e interrupción del arco aórtico tipo B	/	-

F - femenino; M - masculino; RN - recién-nacido; +: presencia; -: ausencia; /: no determinado; a - años; m - meses; C.I.V - comunicación interventricular; C.I.A. - comunicación interatrial.

la detección. El análisis molecular, incluidos los marcadores de ADN y FISH, muestra que la delección está presente en cerca del 80-90% de los casos del síndrome^{2,15,16}. En nuestro estudio, se verificó la delección 22q11.2 en el 25% de la muestra, frecuencia menor que la relatada en la literatura.

Un factor que podría explicar esa baja frecuencia de la delección es la gran variabilidad fenotípica observada en los pacientes de ese estudio, una vez que la muestra comprende desde pacientes con cardiopatía aislada hasta pacientes

con el cuadro completo del síndrome. De acuerdo con la literatura, la frecuencia de delección 22q11.2 entre los pacientes portadores de cardiopatía conotruncal aislada es de cerca del 29%^{17,18}, mucho menor que la frecuencia de delección entre los pacientes con cardiopatía asociada a otros señales clínicas (80-90%)^{2,15,16}. En nuestra casuística, ningún de los seis pacientes con cardiopatía aislada presentó delección 22q11.2, un hallazgo que corrobora el hecho de que dicha enfermedad sea más frecuente en pacientes que presentan, además de cardiopatía,

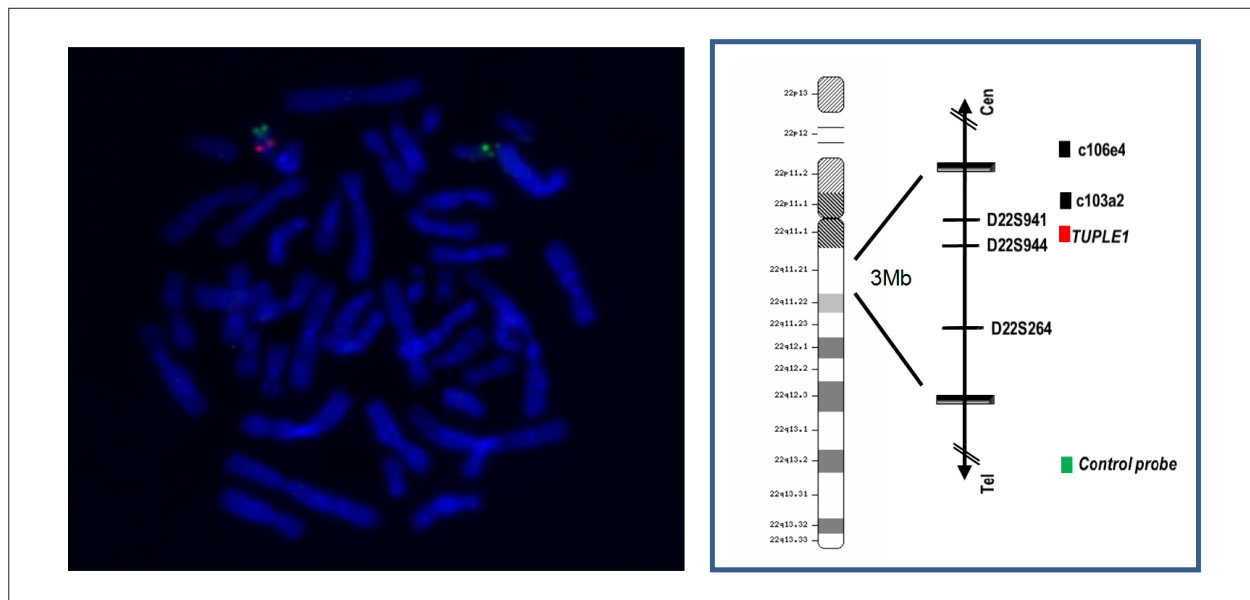


Figura 1 - (a) Metafase de un paciente portador de deleción 22q11.2 sometida a la técnica FISH. La señal roja indica la región 22q11.2 y la señal verde, la región control terminal del cromosoma 22, utilizada como control. La flecha indica el cromosoma 22 deleciónado, y muestra la presencia de la región control solamente. (b) Esquema del cromosoma 22 muestra la región comúnmente deleciónada de 3Mb, los marcadores polimórficos de ADN y las sondas de FISH utilizados en este estudio.

otras señales fenotípicas asociadas^{17,18}.

Se encontraron todas las deleciones en pacientes con el espectro clínico del síndrome, tanto en portadores de cardiopatía, como en los que no presentaban cardiopatía. Esos datos muestran que se debe investigar pacientes con características fenotípicas faciales del síndrome con relación a la presencia de deleción, aunque no presenten malformaciones cardíacas.

La edad de los pacientes también puede haber influido en la frecuencia de la deleción, una vez que los pacientes seleccionados presentaron edades bastante variadas, y si se toma en cuenta el hecho de que en niños muy pequeños el fenotipo no se muestra siempre de modo evidente.

Varios individuos (15/22), aunque eran portadores de señales clínicas del síndrome, no presentaron deleción detectable y, a pesar de que la deleción 22q11.2 sea la etiología más probable, otras causas pueden ser responsables por el fenotipo. Entre ellas están las mutaciones en los genes presentes en esa región (22q11.2), así como en genes de otras regiones relacionadas a cardiopatías congénitas conotruncuales, como por ejemplo 8p23.1¹⁹ y 10p13²⁰.

Con relación al uso de marcadores polimórficos de ADN, de acuerdo con nuestros resultados concluimos que lo ideal es estudiar el propositus y sus dos genitores, aunque el estudio aislado del paciente puede revelar resultados normales cuando el individuo es heterocigoto, independientemente del estudio molecular de los padres. Así, se puede realizar la evaluación molecular en niños con el fenotipo del síndrome de la deleción 22q11.2 como primer triaje, con la finalidad de detectar la deleción 22q, antes que se utilice a la FISH. Además de ello, cuando no es posible coleccionar sangre periférica de los pacientes, se

pueden realizar los ensayos moleculares con ADN extraído de otros tejidos.

En este trabajo, utilizamos tres marcadores de ADN ubicados en la región que está delecionada en cerca del 98% de los pacientes con el fenotipo del síndrome, lo que aumenta la tasa de éxito de la investigación de la enfermedad en cuestión. Sin embargo, esos marcadores pueden no detectar deleciones atípicas, es decir, deleciones de segmentos que estén fuera de la región típicamente delecionada, lo que ocurre en un frecuencia del 2% en pacientes con el fenotipo del síndrome⁴.

La deleción 22q11.2 no estaba presente en ningún de los genitores de niños con dicha enfermedad, lo que caracteriza todas las deleciones de los propositus como esporádicas.

Conclusiones

Los datos de este estudio sugieren que la deleción 22q11.2 en pacientes portadores del cuadro clínico del síndrome resulta más frecuente que en aquellos portadores de cardiopatía conotruncal aislada. En cuanto a las metodologías utilizadas para detección, la técnica de FISH se muestra más precisa para detectarse la deleción, si se la compara a la técnica de marcadores de ADN. La técnica de FISH posibilita la investigación de la presencia de alteraciones cromosómicas en los padres de niños portadores de la deleción, lo que determina el riesgo reproductivo de la pareja. La investigación de la presencia de la deleción y su correlación con los datos clínicos de los pacientes puede auxiliar al cardiólogo a realizar un mejor seguimiento a los pacientes.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

FAPESP, CNPq y CAPES financiaron el presente estudio.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Doctorado de Sintia Iole Nogueira por la Universidade Federal de São Paulo.

Referencias

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, Minoshima 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 JJ. 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, Pirolo 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.