

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Bruna Lixinski Diniz

**Investigação clínica e citogenética
molecular de indivíduos com
cardiopatía congênita e suspeita de
deleção 22q11.2.**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2020**

Bruna Lixinski Diniz

**Investigação clínica e citogenética
molecular de indivíduos com
cardiopatía congênita e suspeita de
deleção 22q11.2.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen
Co-orientador: Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa

**Porto Alegre
2020**

Catálogo na Publicação

Diniz, Bruna Lixinski

Investigação clínica e citogenética molecular de indivíduos com cardiopatia congênita e suspeita de deleção 22q11.2. / Bruna Lixinski Diniz. -- 2020.

85 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2020.

Orientador(a): Paulo Ricardo Gazzola Zen ;
coorientador(a): Rafael Fabiano Machado Rosa.

1. Cardiopatia congênita. 2. Síndrome de deleção 22q11. 3. Dismorfia facial. 4. Hibridização in situ Fluorescente. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Neste momento me faltam palavras para começar a escrever este agradecimento. Gostaria de descrever todos os sentimentos que este trabalho e o Mestrado em si me proporcionaram, mas mesmo assim, talvez, esta página não seria suficiente. Sendo assim, gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que por mais que minha fé seja distante de qualquer religião, essa força que me fez chegar até aqui não poderia ser esquecida.

Agradeço imensamente a minha mãe, Neli e ao meu namorado/esposo, Diego por serem a base emocional e claro, financeira. Sabemos que viver estes dois anos não foram fáceis, mas ao mesmo tempo, muito gratificante. Não estaria aqui hoje, se não fosse vocês.

Agradeço também ao meu orientador Paulo Zen, primeiramente por me aceitar nesta empreitada, estar sempre presente, nos momentos bons e ruins e sempre com o melhor conselho. Todos os ensinamentos, tanto a nível profissional quanto pessoal foram extremamente importantes para me tornar a pessoa que está entregando este trabalho. Devo muito a você a profissional que serei!

Agradeço ao meu co-orientador Rafael Rosa por ser um exemplo para mim de comprometimento e pesquisador. Me ensinastes a escrever melhor, a buscar sempre mais e não ficar na comodidade. És um excelente professor!

Agora um agradecimento muito especial, para a “meninas pesquisadoras da Genética”: Andressa dos Santos, Andressa Glaeser, Bianca Soares, Bruna Guaraná, Desirée Deconte e Luiza Scherner. Quando cheguei a este laboratório, não imaginava que iríamos ter uma equipe tão unida quanto essa. Trabalhar com mulher, todas nós sabemos, que não é fácil, mas vocês são

excepcionais. Obrigada pelo apoio, trabalho, estudo, doces no meio da tarde e diversão. Eu tenho muito orgulho de fazer parte deste time feminino que ainda vai dar muito o que falar. Gratidão!

Agradeço também a Maiara Aschau que foi a pessoa que mais me acolheu no começo do mestrado. Sempre muito paciente e prestativa. Obrigada por me receber tão bem e fazer parte de momentos marcantes dessa trajetória.

Durante o Mestrado, tive a honra de participar do Programa de Extensão Doutores-Palhaços UFCSPA que me mostrou e mostra todos os dias o quão praticar a humanização é importante no mundo em que vivemos. A Bruna que entrou no começo do Mestrado neste Programa e a que está saindo, com certeza é muito melhor, graças a vocês. Obrigada por me ensinarem a sorrir com os olhos e ver que sempre há o lado bom, mesmo nos momentos ruins.

Resumo

Introdução: 22q11.2SD é a síndrome de microdeleção cromossômica mais frequente, originada a partir de eventos de recombinação meiótica não homóloga que ocorrem em aproximadamente 1 em cada 1.000 - 6.000 fetos. As manifestações clínicas sugestivas de 22q11.2SD e que requerem testes diagnósticos variam de acordo com a idade. Na infância, os sintomas típicos incluem alguma combinação de defeitos cardíacos congênitos e outras manifestações. Atualmente, a 22q11.2SD é considerada uma das anomalias cromossômicas mais frequentemente observadas em associação com as cardiopatias congênitas, ficando atrás somente da síndrome de Down.

Objetivos: o objetivo deste trabalho foi verificar o perfil de dismorfias e cardiopatias encontradas em pacientes encaminhados a um centro de referência no sul do Brasil com suspeita clínica de 22q11.2SD. **Material e**

Métodos: Foi um estudo prospectivo com amostra de conveniência desenvolvido no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). A amostra consistiu de pacientes atendidos pelo SUS que apresentavam achados clínicos sugestivos de 22q11.2SD. A avaliação genética consistiu de uma entrevista para dados clínicos e história médica, como ecocardiografia, seguida de um exame físico dismorfológico. Após avaliação genética, a amostra de sangue foi coletada em tubo de heparina e, em seguida, enviada ao Laboratório de Citogenética da UFCSPA para cultura e análise celular pelo FISH. **Resultados:** No total, três perfis de pacientes suspeitos com 22q11.2SD foram encaminhados para análise: indivíduos que apresentavam apenas dismorfias (n=4); indivíduos com cardiopatia congênita isolada (n=7) e indivíduos com dismorfias e cardiopatia

congênita (n=35). A hibridização *in situ* fluorescente(FISH) foi realizada em 46 pacientes com achados clínicos de 22q11.2SD, incluindo aqueles com resultados de cariótipo alterados. Da amostra total, 15,21% (7/46) apresentaram a deleção 22q11.2, consistente com o diagnóstico clínico de 22q11.2SD. Destes, apenas pacientes com dismorfia associada à cardiopatia congênita tiveram a deleção de 22q11.2 (7/35).

Conclusão: A associação de dismorfias faciais (crânio, olhos, ouvido e nariz) e cardiopatia congênita provou ser um critério clínico confiável para o encaminhamento à análise citogenética molecular. Entre os defeitos cardíacos, sugerimos que indivíduos com anel valvar pulmonar obstrutivo, truncus arteriosus e valva aórtica bicúspide associada à CIA e/ou arco aórtico à direita devem realizar investigação por FISH para deleção 22q11.2.

Palavras-chave: Cardiopatia congênita; Síndrome de deleção 22q11; Dismorfia facial; Hibridização *in situ* Fluorescente.

Abstract

Introduction: 22q11.2DS is the most frequent chromosomal microdeletion syndrome, estimated to result mainly from de novo non-homologous meiotic recombination events occurring in approximately 1 in every 1,000 – 6,000 fetuses. Clinical manifestations that urge for diagnostic testing vary by age. In infancy, typical symptoms include some combination of congenital heart defects and others conditions. Currently, 22q11.2DS is considered one of the most frequently observed chromosomal abnormalities in association with congenital heart disease (CHD), only after Down syndrome. **Aim of study:** the aim of this work was to verify the profile of dysmorphia and heart defects found in patients referred to a reference center in Southern Brazil with clinical findings suggestive of 22q11.2DS. **Materials and methods:** It was a prospective study with a convenience sample developed at the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) Cytogenetics Laboratory. The sample consisted of patients cared by UHS presenting clinical findings suggestive of 22q11.2DS. Genetic evaluation consisted of an interview for clinical data and medical history such as echocardiography, followed by a dysmorphological physical examination. After genetic evaluation, blood sample was collected in heparin tube and, then, sent to the UFCSPA Cytogenetics Laboratory for cell culture and analysis by FISH. **Results:** In total, three suspected patients profiles with 22q11.2DS were referred for analysis: individuals with only dysmorphia (n=4); individuals with isolated heart disease (n=7) and individuals with both dysmorphia and CHD (n=35). FISH was performed in 46 patients with clinical findings of 22q11DS, including those with altered karyotype results. Of

overall sample, 15.21% (7/46) showed a 22q11.2 deletion, consistent with the clinical diagnosis of 22q11.2DS. Of these, only patients with dysmorphia associated with CHD had a 22q11.2 deletion (7/35). **Conclusion:** Facial dysmorphia (skull, eyes, ear, and nose) associated with CHD proved to be a reliable clinical criteria for referral to molecular analysis. Among heart defects, we suggest that individuals with obstructive pulmonary valve ring, truncus arteriosus and bicuspid aortic valve associated with ASD and/or right aortic arch should perform FISH investigation for 22q11.2 deletion.

Keywords: Heart Defects, Congenital; 22q11 Deletion Syndrome; Facial Dysmorphism; In Situ Hybridization, Fluorescence.

Lista de abreviaturas

CHD: *Congenital Heart Disease*

CIA: Comunicação Interatrial

CIV: Comunicação Interventricular

CMA: Microarray Cromossômico

CNV: *copy number variants*

DI: Deficiência Intelectual

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FISH: Hibridização *in situ* Fluorescente

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MMS: Microdeleções e Microduplicações

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCA: Persistência do Canal Arterial

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

SD22q11.2: síndrome de Deleção 22q11.2

SGC: síndromes de Genes Contíguos

SMMs: síndromes de Microdeleções e Microduplicações

ToF: Tetralogia de Fallot

Lista de Figuras

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Visão geral esquemática de todas as regiões de microdeleção e microduplicação genômica já relatadas..... | 19 |
| Figura 2. Figura esquemática das LCRs..... | 23 |
| Figura 3. Observações experimentais de rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados a distúrbios genômicos..... | 24 |
| Figura 4. Deleção 22q11..... | 29 |
| Figure 5. Localização dos microssatélites de DNA presentes na sonda TUPLE1-HIRA..... | 32 |
| Figure 6. Imagens de análise da FISH do Laboratório de Citogenética da UFCSPA..... | 33 |

Lista de Tabelas

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Cardiopatias congênitas – condições mais comuns..... | 17 |
| Tabela 2. Exemplos de síndromes de microdeleções e microduplicações mais comuns..... | 20 |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 1 |
| 1.1 Malformações congênitas | 2 |
| 1.1.1 Cardiopatia congênita | 3 |
| 1.2 Síndromes de microdeleções/microduplicações..... | 6 |
| 1.3 Aspectos moleculares das microduplicações e microdeleções | 9 |
| 1.3.1 Síndrome de deleção 22q11.2..... | 13 |
| 1.4 Metodologias utilizadas para a investigação da SD22q11 | 18 |
| 1.5 Gene <i>HIRA</i> | 23 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 24 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |
| 4. OBJETIVOS..... | 36 |
| 4.1 Objetivo geral..... | 36 |
| 4.2Objetivos específicos | 36 |
| 5. ARTIGO CIENTÍFICO | 37 |
| 6. CONCLUSÕES | 62 |
| 7. ANEXOS | 64 |
| 7.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA..... | 64 |
| 7.2 Parecer do Comitê de Ética do HCSA | 65 |
| 7.3 Parecer do Comitê de Ética do IC-FUC | 66 |
| 7.4 Produção Bibliográfica..... | 67 |

1. REFERENCIAL TEÓRICO

Embora as doenças genéticas teoricamente sejam raras, sua frequência conjunta faz com que elas reforcem uma parte importante da Medicina. De 2010 a 2014, um estudo transversal registrou 819.018 nascidos vivos na cidade de São Paulo, dos quais 14.657 apresentaram algum tipo de anomalia congênita, correspondendo a uma prevalência de 17,9 casos para cada 1.000 nascidos vivos ao longo do período estudado.¹ Em países desenvolvidos, os distúrbios genéticos e as malformações congênitas contribuem com 30% de todas as admissões infantis, e cerca de 40 a 50% de todos os óbitos observados nesta faixa etária.²

O diagnóstico precoce é de suma importância, podendo inclusive impactar a morbimortalidade infantil associada as malformações congênitas, especialmente no período neonatal. O aumento e a redução da sobrevida estão diretamente relacionados ao planejamento prévio e a busca de recurso especializados nos sistemas de saúde para esses pacientes. No entanto, muitos médicos podem não estar cientes das diretrizes recomendadas e podem não ter acesso a serviços genéticos. Segundo Tarini et al., 2015, apenas 5% dos médicos de cuidados primários pediátricos entrevistados encaminhariam um paciente com atraso global de desenvolvimento para um especialista em genética.³ Desses, 50% indicaria o cariótipo, ou seja, um exame que não detectaria as condições comuns que são objeto deste artigo.

Estima-se que 10 a 12% de todos os indivíduos nascidos vivos irão desenvolver uma doença influenciada geneticamente ao longo de suas vidas. De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita

maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos.^{2,4,5,6}

Segundo o banco de dados da Vigilância Europeia de Anomalias Congênitas, 18% das mortes neonatais com presença de alguma malformação congênita, tem origem cromossômica.⁷ Além disso, foi verificado que anomalias cromossômicas são responsáveis por cerca de 15% das principais síndromes congênitas, sendo associadas a 25% das mortes perinatais na Europa.⁸ Já no Brasil, 37% das internações pediátricas nos sistemas de saúde terciários são de pacientes com algum defeito congênito ou enfermidade genética.⁹ Além disso, essas alterações são ainda responsáveis pela elevação das taxas de cesarianas e nascimentos de recém-nascidos prematuros.¹⁰

1.1 Malformações congênitas

As malformações congênitas são anomalias estruturais ou funcionais originadas por eventos fisiológicos ou não que precedem o nascimento.¹¹ As manifestações clínicas são diversificadas, podendo variar desde dismorfias menores até alterações complexas e raras.¹² A etiologia das malformações pode estar relacionada a alterações mendelianas, cromossômicas, ambientais, entre outros, porém muitas vezes não é possível determinar a sua causa. Sugere-se que 6% das malformações congênitas estejam relacionadas a anomalias cromossômicas, podendo esta proporção aumentar quando são associados os desequilíbrios genômicos abaixo da resolução (<5Mb), ou seja, não diagnosticáveis pela análise cromossômica padrão, o cariótipo.¹³

As microdeleções e microduplicações (MMs) podem estar presentes no período pré-natal, as quais apenas são identificadas por métodos mais

sofisticados de diagnóstico citogenético, como por exemplo, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) ou microarray cromossômico (CMA).¹⁴ As microduplicações e microdeleções cromossômicas estão envolvidas em diversas malformações congênitas, sendo a mais comum e uma das principais causas de morbidade infantil, a cardiopatia congênita ou *congenital heart disease* (CHD).¹⁵

As anomalias congênitas podem contribuir para a incapacidade motora de longo prazo, o que pode resultar em impactos significativos nos indivíduos acometidos, além dos familiares, sistemas de saúde e da sociedade como um todo. Com isso, é importante que se faça um diagnóstico completo de cada síndrome, obtendo um maior número de informações possíveis a fim de proporcionar melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes. Assim, a partir de uma atenta avaliação clínica se pode traçar uma estratégia de investigação visando a otimização do uso dos diferentes testes genéticos.

1.1.1 Cardiopatia congênita

A CHD é um conjunto de anormalidades estruturais e funcionais do coração e grandes vasos, que podem surgir durante a embriogênese cardíaca.¹⁵ Possui incidência que varia de 19-75 casos a cada 1000 nascidos vivos. A etiologia é complexa e multifatorial, com cerca de 80% das CHDs surgindo através da combinação de fatores genéticos e ambientais.¹⁶ A malformação cardíaca oriunda de anomalias genéticas ou cromossômicas, como a síndrome de Down, está presente em 1 a cada 100 crianças.¹⁷

A CHD pode ser classificada em cianótica ou acianótica devido à mistura, ou não, de sangue venoso e arterial.¹⁶ A CHD acianótica é a mais

frequente, levando a alterações que nem sempre causam repercussões tão graves no funcionamento cardíaco. A depender dos sintomas provocados, estas alterações podem ser descobertas logo após o nascimento, ou apenas na idade adulta. São elas: comunicação interatrial (CIA), comunicação interventricular (CIV), persistência do canal arterial (PCA), estenose pulmonar, estenose aórtica e coarctação da aorta. Nessa qualificação, a CIA e a CIV são mais encontradas. Já a CHD cianótica é a mais grave, pois a alteração cardíaca pode afetar de forma significativa o fluxo sanguíneo e a capacidade de oxigenação do sangue, sendo a mais frequente a Tetralogia de Fallot (ToF).¹⁸

A base genética, epigenética e ambiental precisa da CHD ainda não está totalmente compreendida. A maioria das CHDs ocorrem como malformações de forma isolada, enquanto 25-30% estão associadas a alterações extracardíacas e alguns defeitos específicos são frequentemente encontrados na associação com síndromes genéticas conhecidas.¹⁹ Cerca de 20% dos casos podem ser atribuídos a anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, desordens genéticas não sindrômicas ou teratógenos.²⁰

Aneuploidias e microdeleções de regiões cromossômicas estão associadas ao desenvolvimento da CHD (Tabela 1), porém os mecanismos pelos quais esse desequilíbrio cromossômico altera a cardiogênese são pouco conhecidos e provavelmente muito mais complexos do que um efeito de dosagem gênica. Já se sabe que mutações em genes associados as CHDs humanas afetam um conjunto heterogêneo de moléculas que coordenam o desenvolvimento cardíaco^{21,15}

Tabela 1. Cardiopatias congênitas – condições mais comuns.

| Mecanismo genético | Cromossomo / Região | Síndrome genética | Características dos defeitos cardíacos |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tetrassomia | 22pter-q11 | síndrome do Olho do Gato | Retorno total/parcial venoso pulmonar anormal; Veia cava superior esquerda persistente |
| Trissomia | 13 | síndrome de Patau | Defeito do septo ventricular; Ductus arteriosus patente; Defeito do septo atrial; Dextroposição. |
| | 18 | síndrome de Edwards | Defeito do septo ventricular; Defeito do septo atrial; Ductus arteriosus patente. |
| | 21 | síndrome de Down | Defeito do septo ventricular; Defeito do septo atrioventricular; Defeito do septo atrial. |
| Monossomia | X | síndrome de Turner | Via de saída do ventrículo esquerdo; Malformação da aorta. |
| Deleção | 3p | síndrome-3p | Defeito do septo atrioventricular |
| | 4p | síndrome de Wolf-Hirschhorn | Defeito do septo atrial |
| | 5p | síndrome Cri-du-chat | Variável (em 30%) |
| | 8p | síndrome-8p | Defeito do septo atrioventricular |
| | 9p | síndrome-9p | Defeito do septo ventricular; Ductus arteriosus patente; Estenose da valva pulmonar. |
| Microdeleção | 7q11 | síndrome de Willms | Estenose supravalvar aórtica; Estenose periférica da artéria pulmonar; Estenose da valva pulmonar. |
| | 17p11.2 | síndrome Smith-Magenis | Estenose da valva pulmonar; Defeito do septo atrial; Defeito do septo ventricular; Malformação da valva atrioventricular. |
| | 17p13.3 | síndrome Miller-Dieker | Tetralogia de Fallot; Defeito do septo ventricular; Estenose da valva pulmonar. |
| | 22q11.2 | síndrome de DiGeorge | Anomalias da via de saída e do arco aórtico. |

Adaptado de Brennan et al., 2001. Exames para diagnóstico: Tetrassomia, Trissomia e Monossomia – Cariótipo, array-CGH; Deleção – Cariótipo, array-CGH; Microdeleção – FISH, array-CGH.

Dentre as principais causas da CHD, a síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2) é a segunda mais comum, ficando atrás da síndrome de Down. A CHD é a manifestação mais crítica e principal fator de morbimortalidade na SD22q11 afetando entre 74% e 80% dos pacientes. Dentre diversas CHDs relatadas, os defeitos conotrunciais e/ou do arco aórtico são os mais prevalentes.^{22,15}

1.2 Síndromes de microdeleções/microduplicações

A associação entre malformações congênitas e alterações cromossômicas teve seu início no ano de 1956, quando o pesquisador Jerome Lejeune identificou um cromossomo 21 adicional, em pacientes com síndrome de Down.²³ A partir dessa descoberta juntamente com o auxílio da citogenética básica e, posteriormente, da molecular, o tratamento e aconselhamento genético para esses indivíduos foram aprimorados. As MMs puderam ser detectadas a partir da criação de técnicas moleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), onde é possível observar rearranjos menores que antes não eram identificados com técnicas menos sofisticadas, como o cariótipo com bandamento G.²⁴

As síndromes de microdeleções e microduplicações (SMMs) originam-se de variações submicroscópicas no número de cópias de uma região do genoma, que por sua vez levam a ganhos ou perdas subcromossômicas específicas. Esses distúrbios podem ser chamados de síndromes de genes contíguos (SGC). As SGCs possuem regiões críticas de dois ou mais genes, com localização próxima, que são responsáveis por anomalias congênitas, atraso do desenvolvimento e transtornos neuropsiquiátricos.²⁵ Estatisticamente, para cada síndrome de microdeleção deve haver uma síndrome de microduplicação recíproca, onde uma comparativa atual realizada no ano de 2012, entre as duas alterações cromossômicas, mostra uma relação de 211 microdeleções versus 79 microduplicações relatadas,²⁶ conforme demonstrado na Figura 1.

Tabela 2. Exemplos de síndromes de microdeleções e microduplicações mais comuns.

| Síndromes | Rearranjo cromossômico | Região crítica cromossômica | Incidência (nascimentos) |
|--------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|
| Microdeleção 1p36 | Deleção | 1p36 | 1 em 5.000–10.000 |
| Microdeleção 3q29 | Deleção | 3q29 | Não informada |
| Wolf-Hirschhorn | Deleção | 4p16.3 | 1 em 50.000 |
| Cri-du-chat | Deleção | 5p15 | 1 em 20.000–50.000 |
| Sotos | Deleção | 5q35.3 | 1 em 5000–10.000 |
| Willams-Beuren | Deleção Duplicação | 7q11.23 7q11.23 | 1 em 7.500 (del) Não informada (dup) |
| Kleefstra | Deleção | 9q34.3 | <1 em 1 milhão |
| Beckwith-Wiedemann | Duplicação | 11p15 | Não informada |
| Jacobsen | Deleção | 11q24.1/24.3/25 | 1 em 100.000 |
| Prader-Willi* | Deleção | 15q11.2-q13 (paterno) | 1 em 10.000–30.000 |
| Angelman* | Deleção | 15q11.2-q13 (materno) | 1 em 12.000–20.000 |
| Rubenstein-Taybi | Deleção | 16p13.3 | Não informada |
| Miller-Dieker | Deleção | 17p13.3 | Não informada |
| Microduplicação 17p13.3 | Duplicação | 17p13.3 | <1 em 1 milhão |
| Smith-Magenis | Deleção | 17p11.2 | 1 em 25.000 |
| Potocki-Lupski | Duplicação | 17p11.2 | Não informada |
| Charcot-Marie-Tooth, tipo 1 (A) | Duplicação | 17p11.2-p12 | Não informada |
| Koolen-de Vries | Deleção | 17q21.31 | 1 em 16.000 |
| Alagille | Deleção | 20p11.2-p12 | Não informada |
| DiGeorge/Velocardiofacial | Deleção | 22q11.2 | 1 em 2.000 –4.000 |
| DiGeorge 2 (10p13-p14 deletion) | Deleção | 10p13 pter | 1 em 200.000 |
| Distrofia muscular de Duchenne | Deleção | Xp21 | Não informada |

Adaptado de Crotwell & Hoyme, 2012; Vialard et al., 2012; Grati et al., 2015. Legenda: * = outras causas como imprinting dissomia uniparental.

1.3 Aspectos moleculares das microduplicações e microdeleções

A caracterização das síndromes genéticas originou-se através da junção dos achados clínicos comumente encontrados em pacientes afetados, e na capacidade de detectar anormalidades cromossômicas por análise citogenética clássica e molecular. As deleções e duplicações cromossômicas parciais se destacam pela importância para a variabilidade do genoma, podendo ser ou não, patogênicas.³¹ Desde os anos 80, as microduplicações e as microdeleções vêm sendo associadas a formas sindrômicas de deficiência intelectual (DI) e atraso do desenvolvimento (AD).³²

As microduplicações e microdeleções cromossômicas compreendem a perda ou ganho de parte de um ou mais genes devido à presença de variantes de número de cópias (CNVs) de um segmento de DNA.^{33,34} As CNVs abrangem deleções, translocações, duplicações ou rearranjos complexos que podem afetar a função dos genes através da disjunção da região codificadora ou reguladora, pela geração de um gene quimérico ou por efeito de posição. O tamanho dessas variantes é >50 pares de bases (pb) e sua presença no genoma humano é estimada em 12% com mais de 100.000 CNVs já identificadas.^{35,36,37}

A detecção das microduplicações e microdeleções permite identificar rearranjos cromossômicos e CNVs, os quais estão envolvidos em uma parcela significativa das anomalias congênitas. Cerca de 1 a 1,7% de gestantes com idade avançada possuem CNVs patogênicas, o que significaria, quando comparado, uma frequência muito maior do que o número de casos de síndrome de Down.^{38,39}

Os rearranjos cromossômicos podem ser balanceados ou desbalanceados. O que difere entre os dois é se há perdas ou ganhos de material genético, embora tenha ocorrido algum rearranjo. No caso, as CNVs estão envolvidas nos rearranjos desbalanceados, que podem estar associados a deleções/duplicações ou a herança de produtos de translocações não balanceadas. Além disso, ambos mecanismos demonstram ter impactos na expressão de genes.⁴⁰ As CNVs podem ser classificadas em variações benignas, patogênicas ou variações de significância incerta (VOUS), com isso, muitas dessas podem estar associadas a síndromes ou basicamente a deficiências neurocognitivas, como autismo ou atraso do desenvolvimento.⁴¹

As CNVs estão estabelecidas em duas classes: as recorrentes e as não recorrentes. Ambas são mediadas por diferentes mecanismos na formação de rearranjos estruturais.⁴² As variantes recorrentes originam-se a partir de recombinações homólogas não-alélicas (NAHR), onde são mediadas por uma pequena sequência de DNA repetitivo, conhecidas como LCRs (low-copy repeats) (Figura 2). Os rearranjos genômicos mais observados são causados por NAHR entre duas LCRs. As LCRs são regiões específicas do DNA que possuem geralmente o tamanho de 10-300 kilobases (kb) e 95-97% de similaridade entre si.^{43,44} Importante ressaltar que a extensão das CNVs recorrentes é idêntica em diferentes indivíduos.^{45,46} Aproximadamente, 37 regiões do genoma já foram evidenciadas para esse tipo de recombinação.⁴⁷

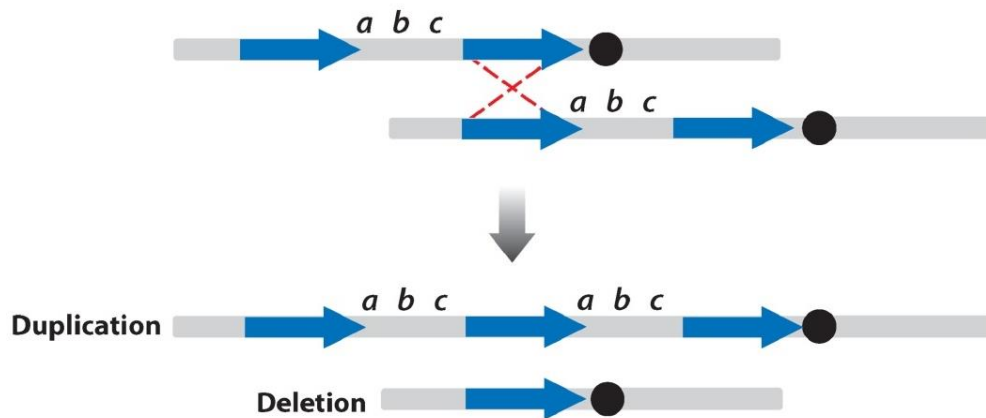


Figura 2. Figura esquemática das LCRs. As LCRs representam regiões de sequência altamente repetitivas de baixa cópia que podem fornecer um substrato para rearranjos cromossômicos mediados por NAHR. As setas azuis exemplificam duas grandes duplicações de uma sequência de alta similaridade que flanqueia uma região contendo genes a, b e c. Seguindo o desalinhamento dos homólogos, estas duplicações facilitam as NAHR durante a meiose, auxiliando um evento crossing-over entre duplicações segmentares parálogas, em vez de alélica. Isso resulta em dois produtos recíprocos: um cromossomo que transporta uma duplicação da região intermediária e uma cópia adicional dos genes a, b e c; e um segundo cromossomo que contém uma deleção dessa mesma região. Tais rearranjos são causas comuns de muitos distúrbios genômicos recorrentes, caracterizados por rearranjos recíprocos de regiões cromossômicas específicas. Adaptado de Watson et al., 2014.

As CNVs não recorrentes possuem sequências com similaridade mais limitada que flanqueiam os pontos de quebra, contendo apenas 2-15 pb em sua estrutura. Estes rearranjos podem ocorrer em regiões ricas em LCRs, alterando a arquitetura genômica por estarem em sentido invertido nas sequências de DNA.^{48,49} Além disso, os rearranjos não recorrentes compartilham uma região genômica comum de sobreposição (SRO, *smallest region of overlap*), que abrange o locus associado ao transtorno genômico (Figura 3).⁵⁰

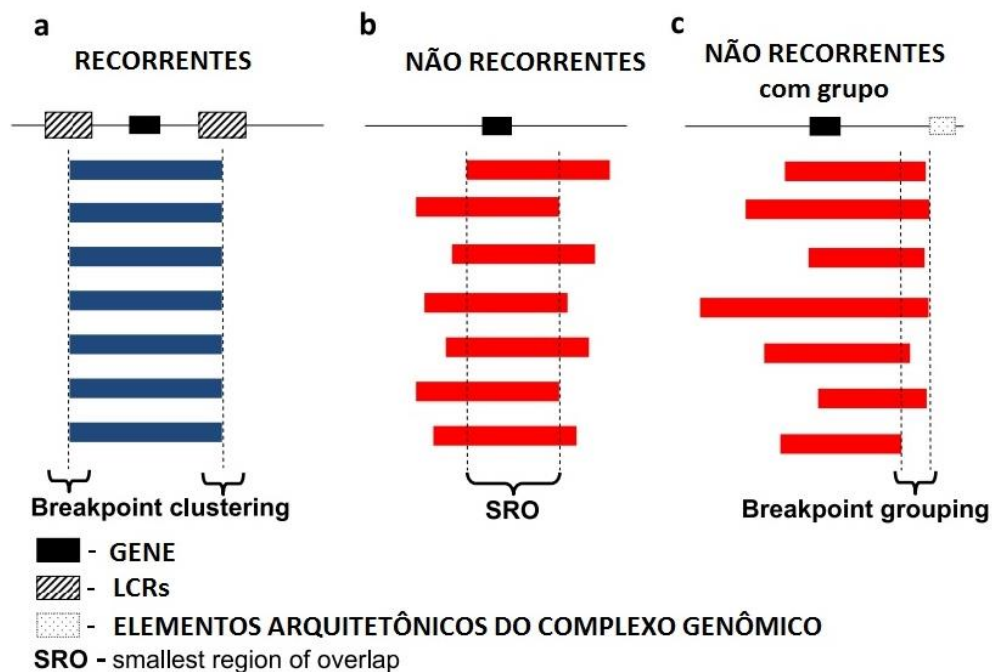


Figura 3. Observações experimentais de rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados a distúrbios genômicos. A linha longa e fina significa a região genômica submetida a rearranjos genômicos. O retângulo preto representa um gene que está localizado na região reorganizada e pode ser afetado pelos rearranjos. As barras de azul escuro (em a) e vermelho (em b e c) representam os rearranjos (duplicações, eliminações ou inversões) com seus pontos de interrupção. **a.** Rearranjos recorrentes com um tamanho comum e pontos de quebra agrupados. A maioria dos rearranjos recorrentes resulta da recombinação homóloga não alélica (NAHR). Os dois retângulos listrados que flanqueiam o gene, retratam as repetições de baixa cópia (LCRs) funcionando como substratos para NAHR. Os pontos de quebra do rearranjo são agrupados dentro dos LCRs. **b.** Rearranjos não recorrentes. Os pontos de quebra dos rearranjos não recorrentes são dispersos na região genômica. Nota-se que todos os rearranjos compartilham uma região genômica comum de sobreposição (SRO), que engloba um gene necessário para o traço fenotípico transmitido, o que permite que esses rearranjos sejam determinados. **c.** Rearranjos não recorrentes com agrupamento de um ponto de interrupção. Alguns dos rearranjos não recorrentes têm um de seus pontos de quebra localizados em uma pequena região genômica. Este agrupamento de pontos de quebra é distinto do agrupamento do rearranjo recorrente, mas sendo um agrupamento de quebra, pode refletir na arquitetura genômica subjacente (por exemplo, palíndromo ou cruciforme) importante para o mecanismo de rearranjo, representado como o retângulo pontilhado na Figura 2c. Adaptado de Gu et al., 2008.

As CNVs podem estar presentes em sequências de um gene ou em um gene inteiro, em um segmento contendo vários genes ou, em elementos regulatórios. As variantes intragênicas podem possuir consequências similares as mutações de ponto patogênicas, sendo que as CNVs maiores podem levar a síndromes de genes contíguos devido a sua possível inclusão em múltiplos genes. Com isso, essas variantes estão sendo associadas com o surgimento de doenças devido à interferência em funções fisiológicas.⁵¹ A expressão gênica nas regiões de CNVs está fortemente relacionada ao número de cópias de genes, ou seja, quanto maior concentração das variantes maior vai ser a

expressão dos genes. Já para deleções, observa-se o oposto desse mecanismo.^{52,53}

Há também, genes que podem modificar a sua expressão pelo fato de estarem próximos aos pontos de quebra e presentes em número de cópias normais, como por exemplo, as microdeleções do cromossomo 7q11.2 responsáveis pela síndrome de Williams-Beuren (WBS). Deleções e duplicações relacionadas a alterações na expressão gênica para CNVs também estão sendo citadas em estudos em humanos e camundongos, nas regiões 16p11.2 e 17p11.2, respectivamente.^{54,55,56}

A herança de produtos não balanceados dos rearranjos cromossômicos, como as translocações, é uma das causas para a origem das alterações nos números de cópias do genoma. Além disso, como resultado, podem-se observar grandes ganhos ou perdas de regiões cromossômicas.⁵⁷ Portanto, as duplicações e deleções podem influenciar nos níveis normais de expressão gênica, alterando o número de cópias de um gene e assim, resultando em um produto genético diferenciado, além de exercer um efeito em outros genes que estão próximos ou distantes dos pontos de quebra. Possivelmente há também, alteração no tempo e na localização em que há a expressão. Assim, observa-se a importância do estudo das CNVs em relação à expressão gênica, levando em conta todos os efeitos espaciais e temporais já relatados.⁵⁸

1.3.1 Síndrome de deleção 22q11.2

A síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11 ou DiGeorge) (OMIM #188400) é uma das mais comuns desordens relacionadas a variantes do número de cópias (CNVs) e erros de recombinação meiótica não-homóloga. A

SD22q11 é caracterizada por uma microdeleção no braço longo (q), região 11.2 do cromossomo 22, com perda de, aproximadamente, 90 genes.^{59,22}

A prevalência e incidência em nascidos vivos ainda é objeto de estudo devido à grande variação no fenótipo que dificultaria a imediata identificação de indivíduos acometidos. Entretanto, na literatura são relatadas incidências ao nascimentos entre 1 em 2000 – 7000 nascidos vivos⁶⁰, e atualmente, é considerada uma das anormalidades cromossômicas mais frequentemente observadas em associação com a CHD, ficando atrás apenas da síndrome de Down.⁶¹ Hoje, a maioria (90-95%) dos indivíduos recém identificados com SD22q11.2 possui deleções *de novo*, ou seja, nenhum dos pais tem a deleção 22q11.2. No entanto, devido à melhora da sobrevivência e, portanto, maior aptidão reprodutiva dos indivíduos com SD22q11.2, a prevalência, especialmente dos tipos hereditários, deve aumentar.^{62,63}

A SD22q11 é conhecida pela heterogeneidade de achados clínicos e a dificuldade de se estabelecer uma análise fidedigna baseado no fenótipo. Ainda hoje, o diagnóstico é basicamente clínico devido a impossibilidade de fornecimento de testes genéticos, principalmente em nível SUS, que poderiam auxiliar no acompanhamento e tratamento desses indivíduos. A primeira caracterização da SD22q11 veio por meio da descrição de achados clínicos em crianças que apresentavam a tríade clínica de imunodeficiência, hipoparatiroidismo e CHD, pelo Dr. Angelo DiGeorge, em 1965.⁶⁴ Após o surgimento das técnicas citogenéticas convencionais e moleculares, foi possível a identificação da deleção da região q11.2 do cromossomo 22 que estava presente frequentemente nesses indivíduos diagnosticados clinicamente como síndrome de DiGeorge.^{65,66}

A SD22q11 é agora conhecida por ter uma apresentação heterogênea que inclui múltiplas anomalias congênitas e condições identificadas no decorrer da investigação clínica, tais como anomalias palatais, gastrointestinais e renais, doença autoimune, atrasos cognitivos variáveis, fenótipos comportamentais e doenças psiquiátricas.⁶⁷

Através da identificação da CHD nesses indivíduos, criou-se hipóteses de que um mecanismo que leva a uma alteração no desenvolvimento embrionário poderia estar envolvido.⁶⁸ Na população em geral, a deleção 22q11.2 está entre as causas mais comuns detectáveis de várias condições. Um grande número de indivíduos que apresentam a CHD possui a deleção 22q11.2: em 52% dos indivíduos com arco aórtico tipo B interrompido, em 34% com truncus arteriosus, em 16% com Tetralogia de Fallot e em aproximadamente 5-10% com defeitos do septo ventricular.⁶⁹

A relação entre os genes presentes na região 22q11.2 deletados em heterozigose e fenótipos ainda é pouco compreendida. Sabe-se que 4 LCRs (A, B, C e D) definem essa região. Estas LCRs, devido à semelhança substancial de sequência, facilitam a recombinação meiótica homóloga não-alélica, resultando em translocação, deleção ou duplicação desequilibrada. Dependendo do tamanho da deleção e LCRs envolvidas, o fenótipo pode ser sucinto ou até mais abrangente. Mais de 85% da recombinação ocorre entre LCR A e LCR D, resultando em uma deleção "típica" de 3 Mb (Figura 4a). A deleção de 1,5 Mb entre LCR A e LCR B pode ser identificada em ~10% dos indivíduos afetados.⁷⁰

Indivíduos com deleção LCR22A – LCR22B possuem o espectro completo de fenótipos que também é encontrado em indivíduos com a deleção

típica LCR22A – LCR22D, sugerindo que os fenótipos chave da SD22q11 são, na sua maior parte, devidos à diminuição da dosagem dos genes localizados na região das LCR22A – LCR22B. Defeitos cardiovasculares também parecem ser 3 vezes mais frequentes em deleções de LCR22A – LCR22B ou LCR22A – LCR22D.⁷¹ Já as deleções em regiões distais, LCR22B –LCR22D ou LCR22C –LCR22D, são associadas a alterações no desenvolvimento cardíaco semelhantes àsquelas associadas a deleção típica, embora apresentadas em menor frequência(Figura 4b). Existem ~90 genes conhecidos presentes no locus típico de 3-Mb da região 22q11.2, incluindo 46 genes codificadores de proteínas, sete microRNAs (miRNAs), dez RNAs não codificantes e 27 pseudogenes.⁷²

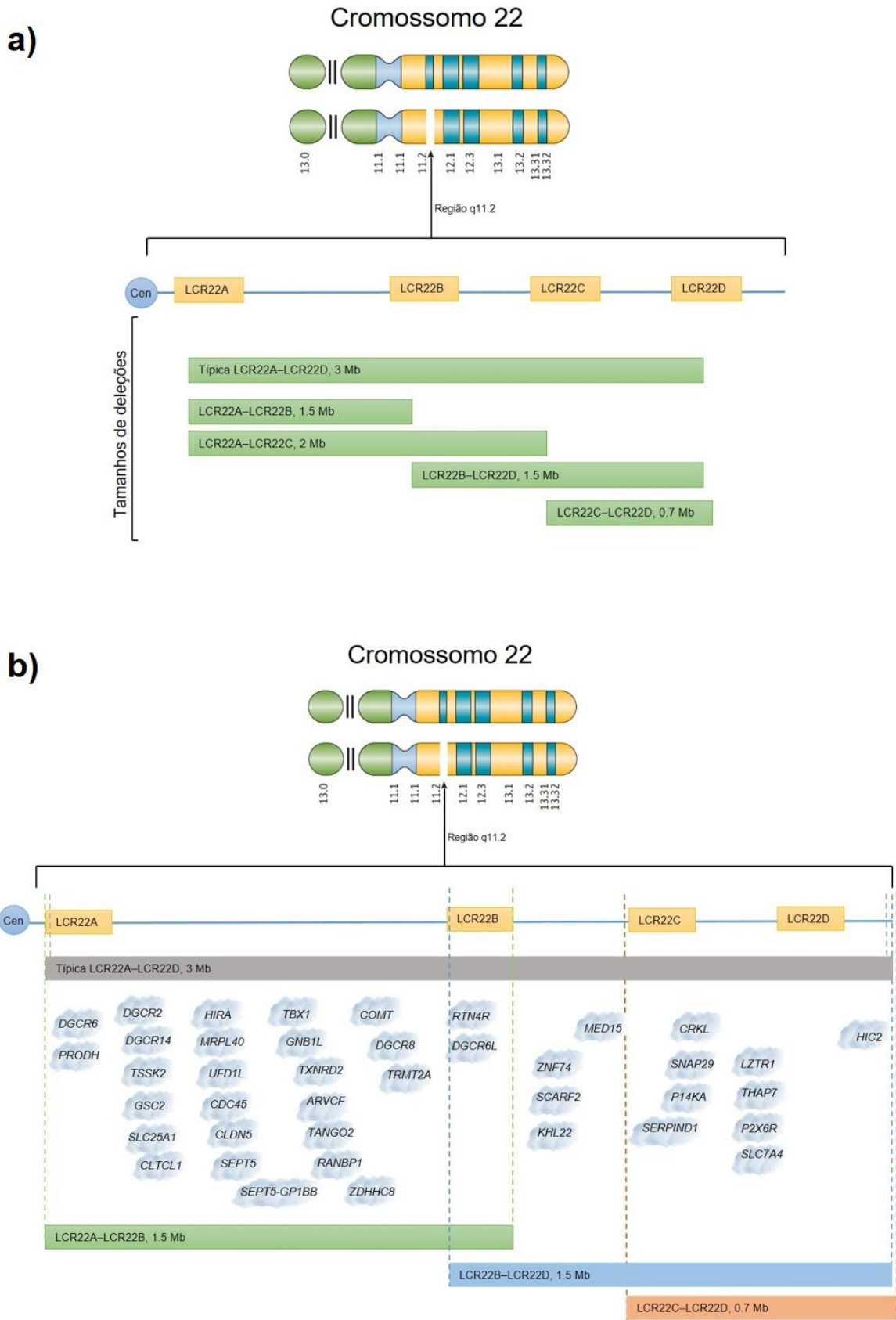


Figura 4. Deleção 22q11. **a)** Tamanho de deleções entre LCRs na região 22q11. **b)** Genes envolvidos nas deleções entre LCRs na região 22q11. Adaptado de McDonald-McGinn et al., 2015, Motahari et al., 2019.

1.4 Metodologias utilizadas para a investigação da SD22q11

O início da citogenética clássica deu-se no final do século 19, através da realização de análises microscópicas de cromossomos em células de carcinoma e sarcoma.⁷³ A partir disso, com o descobrimento de técnicas mais aprimoradas com o intuito de aumentar a resolução dos cromossomos, a citogenética humana tornou-se não só uma ciência valiosa, como uma estratégia de diagnóstico tradicional para detecção de anormalidades cromossômicas pré-natais, pós-natais e adquiridas.⁷⁴ A primeira visualização de padrão de bandas cromossômicas foi através do método de bandamento Q e logo após, desenvolveu-se a técnica mais usada em tempos atuais, o bandamento G⁷⁵

A cariotipagem com bandamento G é considerada padrão-ouro para análises de doenças cromossômicas, como aneuploidias, trissômicas ou monossomias, além de grandes rearranjos estruturais (>5-10Mb). Esta metodologia baseia-se em cultura de células que varia de 3 a 5 dias, associado com a confecção de lâminas, seguida da coloração de Giemsa, com uso de uma enzima proteolítica (tripsina), e análise microscópica que possibilita a visualização habitual de um padrão de 450 a 550 bandas nos cromossomos. No entanto, a técnica não possibilita a visualização de alterações pequenas, a nível submicroscópico, como no caso de microdeleções cromossômicas.⁷⁶

A introdução e aplicação de abordagens moleculares aprimoraram a resolução da análise de cromossomos, resultando na obtenção rápida de resultados e detecção mais precisa de anormalidades cromossômicas. A FISH foi a primeira metodologia aplicada na pesquisa citogenética⁷⁷, além de ser atualmente uma das principais técnicas para diagnósticos clínicos e análises de

microdeleções e microduplicações.⁷⁸ Através da hibridização do DNA alvo com sondas fluorescentes, esta técnica permite identificar cromossomos envolvidos em aneuploidias e rearranjos cromossômicos, podendo ser obtido o resultado em 48 horas. Por mais que esta abordagem seja de nível mais elevado, a capacidade de detecção é considerada limitada, pois dependendo dos conjuntos de sondas escolhidas, as alterações podem não ser possíveis de análise.⁷⁹

A FISH é a técnica mais utilizada para o diagnóstico devido à sua alta sensibilidade e baixo custo relativo. As sondas comerciais para SD22q11 têm como alvo o segmento de DNA entre as LCR22A - LCR22B da região 22q11.2, mas não podem precisar o tamanho da deleção. A sonda LSI *TUPLE1-HIRA* Spectrum Orange/LSI *ARSA* Spectrum Green possui duas sequências de DNA marcadas com duas cores (vermelho e verde), na qual uma hibridiza na banda alvo 22q11.2 (LSI *TUPLE1* Spectrum Orange) e a outra na banda controle 22q13 (*ARSA* Spectrum Green).⁷⁸

A *TUPLE1-HIRA* é específica para a banda 22q11.2, mais precisamente no gene *HIRA* que está posicionado entre a LCR22A-LCR22B. A sonda apresenta microssatélites de DNA (D22S553, WI-326, D22S942) localizados em diferentes posições no gene *HIRA* (Figura 5). A ausência do sinal vermelho no cromossomo 22 indica deleção do locus *HIRA* em 22q11.2 (Figura 6a). A *ARSA* é específica para a banda 22q13 que hibridiza na extremidade telomérica do cromossomo 22, diretamente marcada com verde e é usada como um controle interno, além de verificar a região 22q13. As sondas hibridizadas fluorescem com luminosidade moderada a intensa tanto em núcleos de interfase como em metáfases cromossômicas. Em núcleos de interfase e metáfases de células

normais, a sonda geralmente aparece como 2 sinais vermelhos e dois sinais verdes distintos (Figura 6b).

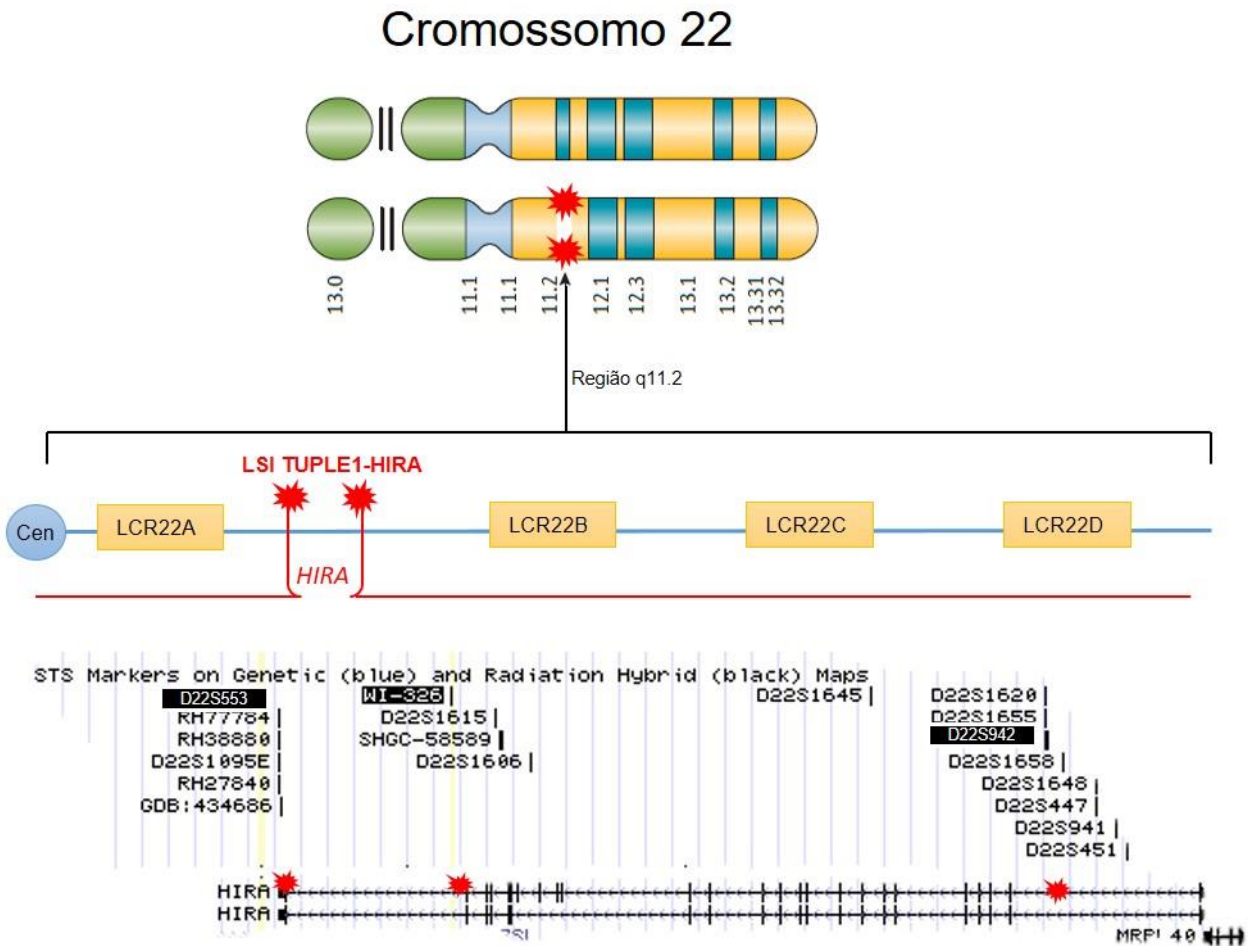


Figure 5. Localização dos microssatélites de DNA presentes na sonda TUPLE1-HIRA. Adaptado de McDonald-McGinn et al., 2015; USCSgenome browser (<http://genome.uscs.edu>).

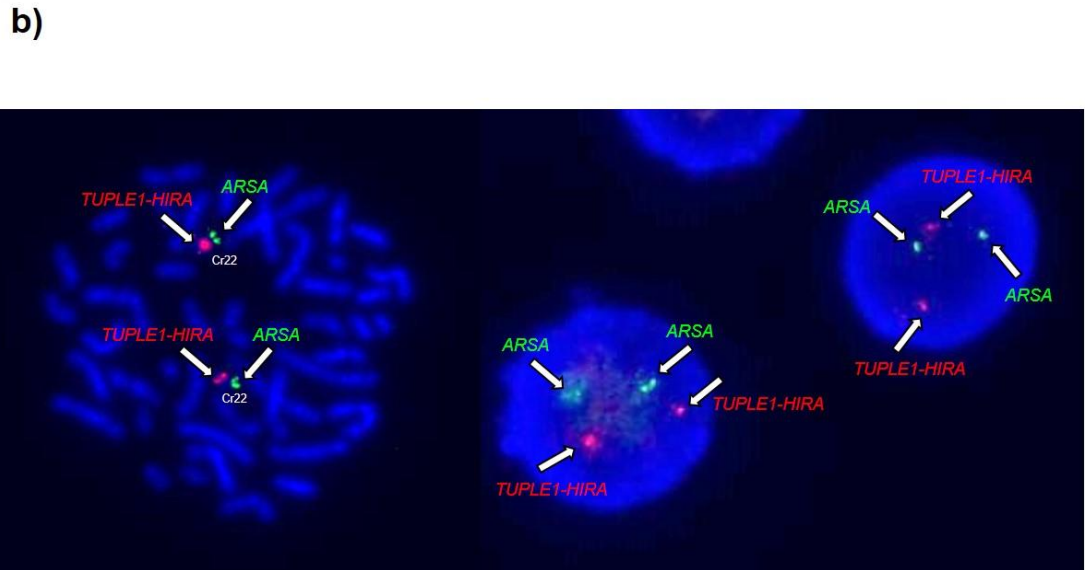
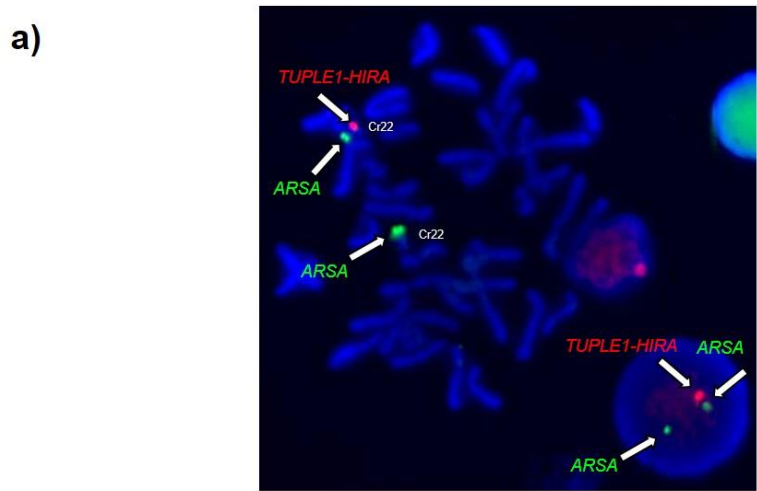


Figure 6. Imagens da análise da FISH do Laboratório de Citogenética da UFCSPA. **a)** Células alteradas: ausência do sinal vermelho (*TUPLE1-HIRA*) em metáfase e em intérfase, indicando deleção do locus HIRA em 22q11.2. **b)** Células normais: núcleos de intérfase e metáfase de células normais apresentando 2 sinais vermelhos (*TUPLE1-HIRA*) e dois sinais verde (*ARSA*) distintos.

Outras técnicas, como a amplificação de sonda multiplex dependente de ligação (MLPA) e o array-CGH são úteis para definir o tamanho da deleção. O array-CHG permite detectar rearranjos cromossômicos muito pequenos inicialmente esta abordagem era feita para identificar desequilíbrios cromossômicos através da detecção de CNVs em tumores, no intuito de

distinguir genes que poderiam estar envolvidos na patogênese do câncer.^{80,81} Pouco depois, começou então a ser utilizada como uma poderosa tecnologia genômica, auxiliando o diagnóstico clínico de pacientes que apresentavam atraso mental idiopático, deficiência intelectual, anormalidades congênitas, esquizofrenia e outros transtornos neuropsiquiátricos. Através desta técnica foi possível analisar o genoma inteiro em alta resolução, detectando variações até então desconhecidas.⁸²

Em relação à detecção de genes com deleções/duplicações, podemos destacar a técnica de MLPA. Por ser um método sensível e rápido, simples e econômico, é indicado para caracterizar desordens congênitas e hereditárias, analisando quantitativamente mais de 40 dosagens diferentes de sequências em uma única reação de PCR.⁸³ Além disso, o MLPA pode analisar até 96 amostras simultaneamente, com resultados em até 24h, seguindo o protocolo descrito em basicamente quatro passos (desnaturação, hibridização do DNA, reação de ligação e amplificação por PCR). Já para interpretação dos resultados, é necessário realizar etapas de separação dos produtos por eletroforese capilar e a análise dos dados por programas específicos. Mais de 300 sondas (probes) estão sendo comercializadas para a investigação de doenças genéticas, porém a técnica é incapaz de detectar rearranjos balanceados e mosaicismos de baixo grau, além de ser sensível a qualidade da amostra de DNA testada.^{84,85,86}

1.5 Gene *HIRA*

O gene *HIRA* (Histone Cell Cycle Regulator), também conhecido como *DGCR1* ou *TUPLE1* é considerado o principal gene candidato em algumas síndromes de haploinsuficiência, como a SD22q11, e a sua atividade insuficiente pode interromper o desenvolvimento embrionário normal.⁸⁷ O *HIRA* codifica uma chaperona responsável pela incorporação de uma variante da histona H3.3 em nucleossomos, é conservado em eucariontes e está associado ao silenciamento transcricional. Seu domínio N-terminal também funciona como um ativador transcricional que marca genes ativos e promotores, e potencialmente envolvido na recuperação após dano ao DNA. Estes gene provavelmente media as alterações irreversíveis do ciclo celular que ocorrem em células senescentes.⁸⁸

A ligação entre o *HIRA* e a SD22q11 tem estimulado muito a investigação sobre a função da proteína *HIRA*, visto que é essencial para o desenvolvimento embrionário.⁸⁹ Em camundongos e galinhas, o *HIRA* é detectado na crista neural, pré-migratória e migratória, arcos faríngeos e coração. Já se sabe também que a deleção do *HIRA* em pintinhos está associado ao tronco arterioso persistente, um fenótipo chave do SD22q11. A deleção condicional de *HIRA* em miócitos cardíacos de camundongo altera a expressão gênica, causa patologia e hipertrofia, mas não perturba a morfogênese cardíaca.⁸⁷

2. JUSTIFICATIVA

A identificação de alterações cromossômicas é importante, principalmente no acompanhamento pré-natal e na antecipação de diagnósticos, contribuindo para o planejamento familiar por meio de aconselhamento genético adequado. A falta de disponibilização de exames diagnósticos em genética médica torna difícil a realização de testes genéticos principalmente para pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

A FISH é considerada padrão-ouro para análises de microdeleções e microduplicações cromossômicas, sendo a primeira alternativa quando evidenciado a suspeita clínica de SMMs, como a SD22q11. A SD22q11 é conhecida pela heterogeneidade de achados clínicos e a dificuldade de se estabelecer uma análise fidedigna baseado no fenótipo. Ainda hoje, o diagnóstico é basicamente clínico devido a impossibilidade de fornecimento de testes genéticos, principalmente em nível SUS, que poderiam auxiliar no acompanhamento e tratamento desses indivíduos.

Apesar da variabilidade fenotípica da SD22q11, a CHD vem se tornando o principal achado para a suspeita clínica juntamente com a presença ou ausência de dismorfias, sendo elas, faciais e vertebrais. Com isso, é importante que se faça um diagnóstico completo da SD22q11, obtendo um maior número de informações possíveis a fim de proporcionar melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes. Assim, a partir de uma atenta avaliação clínica pode-se traçar uma estratégia de investigação visando a otimização do uso dos diferentes testes genéticos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cosme, HW; Lima, LS; Barbosa, LG. Prevalence of congenital anomalies and their associated factors in newborns in the city of São Paulo from 2010 to 2014. *Rev. paul. pediatr.* 2017 Mar;35(1):33-38,
2. Turnpenny PD; Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics E-Book, Genética médica*. 2016. 15° ed. Elsevier.
3. Tarini BA, Zikmund-Fisher BJ, Saal HM, Edmondson L, Uhlmann WR. Primary care providers' initial evaluation of children with global developmental delay: a clinical vignette study. *J Pediatr.* 2015;167(6):1404- 1408.
4. Wilson, G. *Clinical genetics: a short course*. Wiley-Liss. 2000.
5. Robinson A, Linden MG. *Clinical genetics handbook*. Boston, USA: Blackwell Science. 1993.
6. Stevenson, RE; Hall, JG. *Human malformations and related anomalies*. Oxford University Press. 2005.
7. European surveillance of congenital anomalies. EUROCAT special report: geographic inequalities in public health indicators related to congenital anomalies [Internet]. Northern Ireland: European surveillance of congenital anomalies; 2014:31. [cited 2018 dez 5]. Available in: Available in: <http://www.eurocat-network.eu/content/Special-Report-Geographical-Inequalities.pdf> .
8. Zeitlin, J, Mohangoo, A; Cuttini, M. *The European Perinatal Health Report: comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in Europe*. 2009:681-682.

9. Horovitz DDG; Llerene JJC; Mattos RAD. Birth defects and health strategies in Brazil: an overview. *Cad. saúde pública*. 2005;21(4):1055-1064.
10. Guerra, FAR; Llerene JJC; Gama SGND; Cunha, CBD, Thaeme, MMF. Birth defects in Rio de Janeiro, Brazil: an evaluation through birth certificates (2000-2004). *Cadernos de saúde pública*. 2005;24(1):140-149.
11. World Health Organization. Congenital anomalies. WHO: 2019. [acesso em 01 de set de 2019]. Disponível em:
https://www.who.int/topics/congenital_anomalies/en/ .
12. São Paulo (cidade). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. Declaração de Nascido Vivo - Manual de Anomalias Congênicas (2012) 2nd edition. Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, 97 pp.
13. Barber JCK. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. *J. Med. Genet.* 2002;39:375.
14. Wellesley, D, Dolk, H, Boyd, PA, Greenlees, R, Haeusler, M, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur j hum genet.* 2012;20(5):521.
15. Fahed, AC, Gelb, BD, Seidman, JG, & Seidman, CE. Genetics of congenital heart disease: The glass half empty. *Circ. Res.* 2013; 112(4):707–720.
16. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* 2008;451(7181):943–8.

17. Sun, R; Liu, M; Lu, L; Zheng, Y; Zhang, P Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72(3):857-860.
18. Born, D. Cardiopatia congênita. *Arq. Bras. Cardiol*. 2009;93(6):130-132.
19. Digilio MC, Marino B. What is new in genetics of congenital heart defects? *Front Pediatr*. 2016;4:120.
20. Blue, GM, Kirk, EP, Sholler, GF, Harvey, RP, Winlaw, DS. Congenital heart disease: Current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust* .2012;197(3):155–159.
21. Brennan, P; Young, ID. Congenital heart malformations: aetiology and associations. *Semin Fetal Neonat M*. 2001:17-25.
22. 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.
23. Lejeune, J; Turpin, R; Gautier, M; Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *B Acad Nat Med Paris*. 1959;143(11-12):256.
24. Krantz, ID; Spinner, NB. Novel microdeletion syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* . 2007; 145(4):323-326.
25. Deak, KL; Horn SR; Rehder, CW. The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: Variable expressivity and genomic complexity. *Clin Lab Med*.2011;31(4)-543-564.
26. Weise, A, Mrasek, K, Klein, E, Mulatinho, M, Llerena Jr, JC, Hardekopf, D, et al. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(5):346-358.

27. Oskarsdottir, S; Vujic, M; Fasth, A. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Arch Dis Child*. 2004;89(2):148-151.
28. Schubert, C. The genomic basis of the Williams–Beuren syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(7):1178-1197.
29. Buiting, K. Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154(3):365-376.
30. Brunetti-Pierri, N; Berg, JS; Scaglia, F; Belmont, J; Bacino, CA; et al. Recurrent reciprocal 1q21. 1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat. Genet*. 2008;40(12):1466-1471.
31. Redon, R; Ishikawa, S; Fitch, KR; Feuk, L; Perry, GH; et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444.
32. Butler, MG; Meaney, FJ; Palmer, CG; Opitz, JM; Reynolds, JF. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*. 1986;23(3):793-809.
33. Sebat, J. et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 2004;305(5683):525-528.
34. Itsara, A; Cooper, GM; Baker, C; Girirajan, S; Li, J; et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet*. 2009;84(2):148-161.
35. MacDonald, JR. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res*, 2013;42(D1):D986-D992.

36. Cook JR, Edwin H.; Scherer, SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, 2008;455(7215):919.
37. Connolly, JJ, Glessner, JT, Almoguera, B, Crosslin, DR, Jarvik, GP, et al. Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts. *Front Genet*, 2014;5:51.
38. Van den Veyver, IB, Patel, A, Shaw, CA, Pursley, AN, Kang, SHL, et al. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn*, 2009;29(1):29-39.
39. Hillman, SC, McMullan, DJ, Hall, G, Togneri, FS, James, N, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013;41(6):610-620.
40. Harewood, L, Chaignat, E, Reymond, A. Structural variation and its effect on expression. *Genomic Structural Variants: Methods and Protocols*, 2012:173-186.
41. Gross, SJ, Bajaj, K, Garry, D, Klugman, S, Karpel, BM, et al. Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes. *Prenat Diagn*, 2011;31(3):259-266.
42. Klopocki, E, Mundlos, S. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2011;12:53-72.
43. Shaw, CJ, Lupski, JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet*, 2004;13:R57-R64.

44. Bailey, JA, Eichler, EE. Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nat Rev Genet*, 2006;7(7):552.
45. Lupski, JR, Stankiewicz, P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 2005;1(6):e49.
46. Lindsay, SJ, Khajavi, M, Lupski, JR, Hurles, ME. A chromosomal rearrangement hotspot can be identified from population genetic variation and is coincident with a hotspot for allelic recombination. *Am J Hum Genet*, 2006;79(5):890-902.
47. Liu, P, Carvalho, CM, Hastings, PJ, Lupski, JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev*, 2012;22(3):211-220.
48. Stankiewicz, P, Shaw, CJ, Dapper, JD, Wakui, K, Shaffer, LG, et al. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet*, 2003;72(5):1101-1116.
49. Hastings, PJ, Ira, G, Lupski, JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet*, 2009;5(1):e1000327.
50. Gu, W, Zhang, F, Lupski, JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, 2008;1(1):4.
51. Lee, C, Scherer, SW. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med*, 2010;12.
52. Stranger, BE, Forrest, MS, Dunning, M, Ingle, CE, Beazley, C, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, 2007;315:848–853.

53. Schlattl, A, Anders, S, Waszak, SM, Huber, W, Korbel, JO. Relating CNVs to transcriptome data at fine resolution: assessment of the effect of variant size, type, and overlap with functional regions. *Genome Res*, 2011;21(12):2004-2013.
54. Merla, G, Howald, C, Henrichsen, CN, Lyle, R, Wyss, C, et al. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. *Am J Hum Genet*, 2006;79(2):332-341.
55. Ricard, G, Molina, J, Chrast, J, Gu, W, Gheldof, N, et al. Phenotypic consequences of copy number variation: insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski syndrome mouse models. *PLoS Bio*, 2010;8(11):e1000543.
56. Jacquemont, S, Reymond, A, Zufferey, F, Harewood, L, Walters, RG, et al. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11. 2 locus. *Nature*, 2011;478(7367):97.
57. Harewood, L, Schütz, F, Boyle, S, Perry, P, Delorenzi, M, et al. The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome Res.*, 2010;20(5):554-564.
58. Harewood, L, Fraser, P. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *HumMolGen*, 2014;23(R1):R76-R82.
59. Shprintzen, RJ. Velo-Cardio-Facial Syndrome: 30 Years of Study. *National Institutes of Health*, 2008;14:3-10.
60. Mastroiacovo P, Rossi P, Cancrini C, Azzari C, DiGilio MC, et al. Chromosome 22q.11 deletion - Recommendations for Diagnosis and

Treatment. Italian Primary Immunodeficiencies Strategic Scientific Committee, 2005.

61. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, 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.
62. McDonald-McGinn, DM, Tonnesen, MK, Laufer-Cahana, A, Finucane, B, Driscoll, DA, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet. Med.*, 2001;3:23–29.
63. Repetto, GM, Guzmán, ML, Delgado, I, Loyola, H, Palomares, M, et al. Case fatality rate and associated factors in patients with 22q11 microdeletion syndrome: a retrospective cohort study. *BMJ Open*, 2014;4:e005041.
64. Lischner, HW; Dacou, C; Digeorge, AM. Normal lymphocyte transfer (NLT) test: negative response in a patient with congenital absence of the thymus. *Transplantation*, 1967,5(3):555-557.
65. De La Chapelle, A, Herva, R, Koivisto, M, Aula, P. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum. Genet.*, 1981;57:253–256.
66. Scambler, PJ, Carey, AH, Wyse, RK, Roach, S, Dumanski, JP, et al. Microdeletions within 22q11 associated with sporadic and familial DiGeorge syndrome. *Genomics*, 1991;10:201–206.
67. McDonald-McGinn, DM, Sullivan, KE, Marino, B, Philip, N, Swillen, A, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers*, 2015;1:15071.

68. Takao, A, Ando, M, Cho, K, Kinouchi, A, Murakami, Y. Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease. Futura Pub. Co.,1980;253-269.
69. Peyvandi, S, Lupo, PJ, Garbarini, J, Woyciechowski, S, Edman, S, et al. 22q11.2 deletions in patients with conotruncal defects: data from 1,610 consecutive cases. *Pediatr. Cardiol.*, 2013;34:1687–1694.
70. Nogueira SI, Hacker AM, Bellucco FT, Christofolini DM, Kulikowski LD, et al. Atypical 22q11.2 deletion in a patient with DGS/VCFS spectrum. *Eur J Med Genet.* 2008;51(3):226–30.
71. Burnside RD. 22q11.21 deletion syndromes: a review of proximal, central, and distal deletions and their associated features. *Cytogenet Genome Res.* 2015;146(2):89–99
72. Motahari, Z, Moody, SA, Maynard, TM, LaMantia, AS. In the line-up: deleted genes associated with DiGeorge/22q11. 2 deletion syndrome: are they all suspects?. *J. Neurodev. Disord.*, 2019; 11(1):7.
73. Arnold, J. Beobachtungen über Kerntheilungen in den Zellen der Geschwülste. *Virchows Archiv*, 1879;78(2):279-301.
74. Riegel, M. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides. *Genetics and molecular biology*, 2014;37(1):194-209.
75. Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*,1971;298(7731):971-972.
76. Bui, TH. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon!. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2007;30(3):247-251.

77. Gall, JG, Pardue, ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci.,1969;63(2):378-383.
78. El-Ella, SS, El Gendy, F, Tawfik, MA, El Sobky, E, Khattab, A, et al. Chromosome 22 microdeletion in children with syndromic congenital heart disease by fluorescent in situ hybridization (FISH).Egypt. J. Med. Hum. Genet., 2012;13(3):313-322.
79. Shaffer, LG, Bejjani, BA, Torchia, B, Kirkpatrick, S, Coppinger, J, et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future.Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007;145(4):335-345.
80. Cai, WW,Mao, JH, Chow, CW, Damani, S, Balmain, A, et al. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays.Nat Biotechnol, 2002;20(4):393-396.
81. Albertson, DG, Pinkel, D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. Hum MolGen, 2003;12:R145-R152.
82. Lee, C, Iafrate, AJ, Brothman, AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders.Nat. Genet., 2007;39:S48-S54.
83. Sørensen, KM,Andersen, PS, Larsen, LA, Schwartz, M, Schouten, JP. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material.Anal. Chem., 2008;80(23):9363-9368.

84. Schouten, JP, McElgunn, CJ, Waaijer, R. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.*, 2002;30(12):57
85. Kozlowski, P, Jasinska, AJ, Kwiatkowski, DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 2008;29(23):4627-4636.
86. Stuppia, L, Antonucci, I, Palka, G, Gatta, V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int. J. Mol.*, 2012;13(3):3245-3276.
87. Gunjan, A, Paik, J, Verreault, A. Regulation of histone synthesis and nucleosome assembly. *Biochimie*, 2005;87(7):625-635.
88. Kirov, N, Shtilbans, A, Rushlow, C. Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster*. *Gene.*, 1998;212(2):323-332.
89. Halford, S, Wadey, R, Roberts, C, Daw, SC, Whiting, JA, et al. Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum Mol Gen*, 1993;2(12):2099-2107.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar avaliação clínica e análise por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) de pacientes com suspeita clínica de SD22q11.2 encaminhados ao Serviço de Genética Clínica da UFCSPA.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar o perfil de paciente encaminhado com suspeita clínica de SD22q11;
2. Determinar as dismorfias e alterações cardíacas encontradas nos pacientes que apresentarem a deleção 22q11;
3. Verificar se há alguma alteração exclusiva para pacientes com a deleção 22q11;
4. Comparar os achados encontrados com a literatura e sugerir um critério mais assertivo para o encaminhamento a investigação molecular;
5. Possibilitar o acesso a novas tecnologias aos pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas;
6. Fornecer laudos aos pacientes sobre os procedimentos diagnósticos realizados;
7. Composição de um biorepositório visando análises futuras;

5. ARTIGO CIENTÍFICO

“Congenital heart defects and dysmorphic facial features in patients suspicious of 22q11.2 deletion syndrome in Southern Brazil.”

Bruna Lixinski Diniz, Andressa Schneiders dos Santos, Andressa Barreto Glaeser, Bruna Baierle Guaraná, Cláudia Fernandes Lorea, Juliana Alves Josahkian, Janaína Huber, Rafael Fabiano Machado Rosa, Paulo Ricardo Gazzola Zen.

Journal of Pediatric Genetics

Submetido em: Fevereiro de 2020

Title: Congenital heart defects and dysmorphic facial features in patients suspicious of 22q11.2 deletion syndrome in Southern Brazil.

Bruna Lixinski Diniz¹, Andressa Schneiders Santos², Andressa Barreto Glaeser¹, Bruna Baierle Guaraná³, Cláudia Fernandes Lorea⁴, Juliana Alves Josahkian⁵, Janaína Huber⁶, Rafael Fabiano Machado Rosa^{1,3}, Paulo Ricardo Gazzola Zen^{1,3}.

¹Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Graduation in Biomedicine, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Department of Internal Medicine, Clinical Genetics, UFCSPA and Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Child and Adolescent Health Care Unit, Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE-UFPEL), Pelotas, RS, Brazil.

⁵Department of Clinical Medicine, Hospital Universitário de Santa Maria (HU-SM), Santa Maria, RS, Brazil.

⁶Department of Congenital and Pediatric Heart Disease, Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia (IC-FUC), Porto Alegre, RS, Brazil.

Address for correspondence:

Paulo Ricardo Gazzola Zen, PhD – Serviço de Genética Clínica/UFCSPA

Rua Sarmiento Leite, 245/403 – Bairro Centro

Porto Alegre, RS – Brasil CEP: 90050-170

Telefone: 51-33038771 Fax: 51-33038810

E-mail: paulozen@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

22q11.2DS is considered one of the most frequently observed chromosomal abnormalities in association with congenital heart disease (CHD) include some combination with others conditions. Thus, the aim of this work was to verify the profile of dysmorphia and heart defects found in patients referred to a reference center in Southern Brazil with clinical findings suggestive of 22q11.2DS. Of overall sample, only patients with facial dysmorphia (skull, eyes, ear, and nose) associated with CHD (obstructive pulmonary valve ring, truncus arteriosus and bicuspid aortic valve associated with ASD and/or right aortic arch) had a 22q11.2 deletion. These findings proved to be reliable clinical criteria for referral to perform FISH investigation for 22q11.2 deletion.

KEYWORDS: Heart Defects, Congenital; 22q11 Deletion Syndrome; Facial Dysmorphism;

INTRODUCTION

22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS or DiGeorge syndrome) (OMIM#188400) is one of the most common disorders caused by copy number variants (CNVs) and non-homologous meiotic recombination errors. 22q11.2DS is characterized by a microdeletion in region 11.2 of the long arm of chromosome 22, with approximately 90 genes being deleted.^{1,2}

The prevalence and incidence in live births is still studied due to the high phenotypic variation, which makes the immediate identification of affected individuals difficult. However, the literature reports incidences between 1 in 2000 - 7000 live births.³ Currently, 22q11.2DS is considered one of the most frequently observed chromosomal abnormalities in association with congenital heart disease (CHD), only after Down syndrome.⁴

CHD is a condition characterized by structural and functional abnormalities of the heart and great vessels, which appear during cardiac embryogenesis.⁵ It has an incidence of 19-75 cases per thousand live births. CHD has a complex and multifactorial etiology, with about 80% of CHDs being a combination of genetic and environmental factors.⁶ Aneuploidies and microdeletions of chromosomal regions are associated with the development of CHD⁷, but how this chromosomal imbalance alters cardiogenesis is unclear and probably much more complex than a gene dosage effect. The majority of CHDs occur as isolated malformations, while 25-30% are associated with extracardiac abnormalities and often found in association with known genetic syndromes.⁸

Cardiac malformation caused by genetic or chromosomal abnormalities, such as Down syndrome, is found approximately 1 in 100 children.⁹ In the general population,

22q11.2 deletion is one of the most common detectable causes of several clinical conditions. A large number of individuals with CHD have 22q11.2 deletion, such as: individuals with interruption of the aortic arch type B (52%), truncus arteriosus (34%), tetralogy of fallot (ToF) (16%) and ventricular septal defects (5~10%).¹⁰

G-band karyotype is considered the gold standard for chromosomal diseases analysis such as aneuploidy, trisomy or monosomies, including large structural rearrangements (>5-10Mb). However, visualization of small sub-microscopic alterations, as microdeletions, can not be performed by this technique.¹¹ FISH was the first methodology applied in cytogenetic microdeletion research¹², and is currently one of the main techniques for clinical diagnosis as well as for microdeletions and microduplications analysis.¹³ Through hybridization probing using doubly labeled fluorescent probes, the identification of aneuploidies and chromosomal rearrangements can be obtained in 48 hours.¹⁴

Although genetic diseases are individually rare, their frequency, as a group, is an important field in medical care. Early diagnosis is extremely important and directly impact on infant morbidity and mortality when associated with congenital malformations, especially in the neonatal period. Chromosomal abnormalities identification is important in prenatal follow-up and in early diagnosis, contributing to family planning through adequate genetic counseling.

In Brazil, the Unified Health System (UHS) offers every Brazilian citizen full, universal and free access to health services. Considered one of the largest and best public health systems in the world, the UHS benefits about 180 million Brazilians and provides care, from simple outpatient procedures to highly complex care. However, molecular genetic tests are not routinely provided by this system, neglecting many

individuals who have some genetic disease. Thus, research works, such as this one, are essential to help in the diagnosis of patients who need molecular investigation.

Despite the phenotypic variability of 22q11.2DS, CHD has become the main finding for clinical suspicion along with the presence or absence of facial and vertebral dysmorphism.^{15,16,17,18} Thus, the aim of this work was to verify the profile of dysmorphism and heart defects found in patients referred to a reference center in Southern Brazil with clinical findings suggestive of 22q11.2DS.

MATERIALS AND METHODS

It was a prospective study with convenience sampling developed at the Cytogenetics Laboratory / Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) from January 2017 to December 2019. The sample consisted of patients cared by UHS presenting clinical findings suggestive of 22q11.2DS. The patients were followed up at the Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), Hospital Escola of Universidade de Pelotas (HE-UFPEL), Hospital Universitário de Santa Maria (HU-SM) and Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul (IC-FUC). After genetic evaluation, blood sample was collected in heparin tube and, then, sent to the Cytogenetics Laboratory / UFCSPA for cell culture and analysis by FISH.

Genetic evaluation consisted of a review of clinical data and medical history such as echocardiography, followed by a dysmorphological physical examination. Then, a peripheral blood sample was collected from all participants in a heparin tube for cell culture, which was based on Moorhead et al¹⁹ protocol. Molecular cytogenetic testing by FISH was performed using the commercial Vysis LSI DiGeorge/TUPLE1 (Abbott Molecular) region dual-color probe, which identifies deletions of band 22q11.2. This

probe mixture contains the OrangeSpectrum TUPLE 1 (HIRA) probe (30 regions without TUPLE 1, D22S553, D22S609 and D22S942 coding) and the GreenSpectrum LSI arylsulfatase A (ARSA) control probe that maps the telomeric end of 22q (22q13.3). The protocol suggested by the manufacturer was used to perform this methodology on fixed cell suspension samples. The analysis was performed under an Axio Imager Z2 Zeiss fluorescence microscope (Göttingen, Germany). In each case, 10 metaphases and 200 complete interphase nucleus were analyzed for respective hybridization signals of the probes. The pictures were captured using a high resolution digital camera coupled to the fluorescence microscope and processed using Isis Fluorescence Imaging System software. The described analysis, with the count of fluorescent signals per metaphase and per interphase nucleus, were performed in the laboratory standard form.

Research Ethics Committee of all participants Hospitals and UFCSPA approved the present study. Only patients whose parents consented to participate were included in the study.

RESULTS

Blood samples from 47 individuals aged 3 days to 14 years with clinical findings suggestive of 22q11.2DS were referred to the Cytogenetics Laboratory. Final sample was consisted of 46 individuals (23 females and 23 males). One patient was excluded due the absence of cellular growth.

In total, three suspected patients' profiles with 22q11.2DS were referred for analysis: individuals with only dysmorphia (n=4); individuals with isolated heart disease (n=7) and individuals with both dysmorphia and CHD (n=35). Of all individuals

analyzed, 56.52% (26/46) had karyotype results: 88.46% (23/26) with normal chromosomal constitution (46.XX/46.XY) and 11.53% (3/26) with altered chromosomal constitution. In addition, 46.47% (20/46) had no karyotype result. Alterations identified in the three altered karyotypes were: 46,XX,del(16)(q12.1q22); 47,XX,+mar and 46,XY,t(6;8)(q23.3;q22.1). FISH was performed in 46 patients with clinical findings of 22q11DS, including those with altered karyotype results. Of overall sample, 15.21% (7/46) showed a 22q11.2 deletion, consistent with the clinical diagnosis of 22q11.2DS. Among the three suspect individual's profiles, only patients with dysmorphism associated with CHD had the deletion (Table 1).

Dysmorphia and cardiac alterations analysis of patients with 22q11.2 deletion:

The main alterations found in patients with 22q11.2 deletion were: face dysmorphia (100%); skeletal abnormalities (57.14%); breast abnormalities (28.57%); skin abnormalities (14.28%); neurological alterations (14.28%); endocrine alterations (42.85%) and CHD (100%) (Table 2).

Considering the types of alterations, some dysmorphisms and cardiac defects were identified exclusively in patients with 22q11 deletion, such as: small anterior fontanel (1/7), ectopic calcifications in soft tissue (1/7), café au lait spots(1/7), pseudohypoparathyroidism (1/7),obstructive pulmonary valve ring (1/7), truncus arteriosus (1/7) and bicuspid aortic valve (2/7) (Table 2 and 3).

Unexpected results:

The three altered karyotypes identified by FISH did not show a 22q11 deletion. However, a idic(22)(q11.2) chromosome was identified in the individual with karyotype

47,XX,+mar. In addition, one of the patients without karyotype result showed a 22q13 (LSI ARSA x1) deletion by FISH. The FISH analyses of both patients are presented in **Figure 1**.

DISCUSSION

22q11.2DS is known for the heterogeneity of clinical findings and the difficulty of establishing a reliable analysis based only on phenotype. In Brazil, the diagnosis is still clinical due to the difficulty of performing genetic tests, especially in UHS, which if performed, could help in the better follow-up and treatment of these individuals. The main medical centers, when less experienced, are not exempt from underdiagnosing patients with 22q11.2DS.²⁰ The overall prevalence of clinical alterations detected may differ according to the age of the patient and the specialist's experience. Currently, 180 clinical features and symptoms, such as physical and behavioral abnormalities, have already been described. However, typical findings are not found in all cases²¹, corroborating the clinical findings of this study.

In our study, we classified the patients with clinical suspicion of 22q11.2DS referred for molecular analysis into three clinical profiles. Of these, only patients with dysmorphia associated with CHD had a 22q11.2 deletion (7/35). This result is compatible with literature. 22q11.2 deletion is more frequent in patients with CHD associated with other clinical findings (80-90%) than in patients with isolated conotruncal heart disease (29%).²² The interindividual variability of the 22q11.2 deletion phenotype is characteristic, once individuals with significant clinical expression of the syndrome can be found, as well as moderately affected individuals. The precise phenotypic evaluation of patients with deletion demonstrates that facial abnormalities, severely or slightly expressed, are detectable in all cases,²³ which

corroborates with our findings. All individuals with 22q11.2 deletion, besides heart defects, showed facial dysmorphia that ranged from skull, nose, eyes and ears alterations (Figure 2). Among the facial abnormalities found, the small anterior fontanel was exclusively seen in deleted patients (n=1, see Table 2).

In our sample, 91,3% of the patients had CHD, and in 16,7% the malformation was isolated. All individuals with 22q11.2 deletion showed extracardiac alterations and CHD (15,21%). Other studies found similar results. Fokstuen et al.¹⁵ investigated the incidence of 22q11.2 deletion in a series of patients with extracardiac alterations with CHD and isolated heart defects. All patients with the deletion presented major or minor additional extracardiac anomalies (8%). No deletion was detected in the group of isolated cardiac malformations. Wozniak et al.¹⁶ also analyzed children with CHD (conotruncal and non-conotruncal) who presented at least one additional characteristic of 22q11.2DS. The deletion was detected in 14.94% of the patients examined and, after CHD, face dysmorphism was the most evidenced clinical feature in the study (84.51%). Halder et al.¹⁷ also performed a study to determine the prevalence and capacity of clinical criteria to predict 22q11 deletion. In total, only 6.16% of individuals had the deletion and none of the cases with isolated heart defects was positive for 22q11.2DS. The most frequent alterations found in these individuals were also dysmorphic facial features. The differences in prevalence of patients with the deletion who have congenital heart disease and facial dysmorphia can be explained by the sample size.

When comparing our results with other studies, it can be seen that screening for 22q11.2 microdeletion in cases of cardiac malformations associated with extracardiac manifestations, in the form of facial dysmorphism, should be considered. It is also known that it is difficult to carry out an efficient dysmorphological assessment in newborns or in infants in the intensive care unit (ICU). These characteristics are often

subtle or less evident, making congenital heart disease one of the main clinical suspicions for SD22q11 in these individuals. In these situations, it is important to observe if the patient does not have any other alterations compatible with the syndrome, since isolated heart disease does not demonstrate to be a good parameter for molecular analysis referral.

Conotruncal heart defects are often found in these individuals. ToF is the most described alteration²⁴, but interruption of the aortic arch type B, truncus arteriosus and ventricular septal defects are also frequently observed¹⁰. We analyzed the types of heart defects present in patients with 22q11.2 deletion and verified if there were any exclusive alteration in these individuals. In total, twelve heart defects were observed (Table 3). Obstructive pulmonary valve ring, truncus arteriosus and bicuspid aortic valve were present only in patients with the deletion.

Study of specific "cardiac phenotype" in patients with 22q11.2 deletion shows that a particular cardiac anatomy can be identified.¹⁸ In fact, patients with conotruncal heart defect often have additional heart defects that may lead to the suspicion of the presence of the 22q11 deletion.²³ In our sample, the most frequent alterations in this individuals were ASD (5/7), followed by right aortic arch (4/7). However, these findings were also observed in the nondeleted individuals associated with other heart defects. Coincidentally, the three exclusive alterations in the deleted individuals were associated with an ASD and right aortic arch. Aortic arch alterations are observed in 85% of 22q11.2DS cases, and when there is an association with other heart defects, it is one of the main reasons for referral to 22q11DS investigation.⁷ Association between interruption of the aortic arch type B, persistent truncus arteriosus, ToF and ventricular septal defect with ASD have been described in patients with 22q11.2DS.²⁵

Other clinical features were also seen exclusively in the deleted patients, such as ectopic calcification in soft tissue (n=1), café au lait spots (n=1) and PHP (n=1). Ectopic calcification was a consequence of PHP in only one patient of this study, a rare case of association of PHP with 22q11.2 deletion.²⁶

FISH is the most widely used genetic diagnostic procedure for 22q11.2 deletion analysis.^{27,28,29} However, commercially available FISH probes cannot detect atypical deletions.³⁰ In total, seven deleted individuals (15.21%) were confirmed, but it is important to take into account that although the rest of the individuals have clinical signs of the syndrome and have no detectable deletion, other causes may be responsible for the phenotype. Mutations in genes associated with heart disease such as *TBX1* (located in the deleted region of chromosome 22)³¹, *GATA4* (8p23.1)³² and *DGS2* (10p13-14)³³, are other possible causes.

Others diagnostic methods can also be used to identify 22q11.2 deletion and determine microdeletion size and chromosomal breakpoints, such as high resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH), multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA), short tandem repeats (STR), as well as quantitative polymerase chain reaction (qPCR).³⁴ Kuo et al³⁵ described a case of a fetus with CHD diagnosed by ultrasonography (singleton fetus with heart defects including overriding aorta, small pulmonary artery, and ventricular septal defect) associated with extracardiac defects, and referred for molecular analysis for 22q11.2 deletion. MLPA, a-CGH and FISH techniques confirmed the deletion. Conventional cytogenetic analysis revealed a normal male karyotype. CHD's prenatal identification are beginning to play an important role, since early diagnosis is crucial for the treatment and follow-up of these individuals, improving the life quality and reducing premature deaths.³⁶

In our study, 22q11.2 deletion was not detected by karyotype analysis in any case, reinforcing the idea that this technique is ineffective for deletion research. However, karyotype examination is useful in order to detect other chromosomal alterations that may or may not be related to clinical findings that resemble 22q11.2DS. The three individuals with altered karyotype were referred to 22q11.2 deletion molecular cytogenetic analysis, as they had clinical findings compatible with 22q11.2DS. However, no deletion was detected by FISH.

Patients with altered karyotypes (46,XX,del(16)(q12.1q22), 46,XY,t(6;8)(q23.3;q22.1) e 47,XX,+mar) had heart defects and dysmorphia that were also observed in our deleted patients (IVC, ASD, PDA, right aortic arch, DORV, sacral anomalies; large anterior fontanel; wide nose; low ear implantation). We have not found any description in literature of 16q12.1q22 deletion cases, as well as t(6;8)(q23.3;q22.1). Interstitial deletions near 16q region (16q12.2q21³⁷ and 16q12.2-q13³⁸) have already been reported in cases of skeletal dysmorphia and cardiac malformations, respectively.

47,XX,+mar patient's karyotype revealed the presence of a non-defined chromosome origin isodicentric marker. Through FISH, it was observed that *TUPLE1/HIRA* probe hybridized on the marker chromosome allowing identification of the idic(22)(q11.2). This alteration may be associated with cat eye syndrome (CES; OMIM #115470), a rare malformative syndrome whose diagnosis is based on the presence of an extra marker chromosome derived from chromosome 22.³⁹

FISH also detected the 22q13 deletion in a patient with clinical characteristics similar to SD22q11.2. This region has been associated with Phelan-McDermid syndrome (OMIM #606232)⁴⁰ and Metachromatic leukodystrophy (OMIM #250100)⁴¹, but our patient did not have clinical characteristics compatible with these two disorders.

CONCLUSION

More assertive clinical criteria for molecular testing are crucial for optimizing spending on testing, better diagnostics, treatment and follow-up of the patients. Furthermore, appropriate genetic counseling can be offered to the families in order to aid them with risk of recurrence as well as prenatal care in future pregnancies.

Facial dysmorphism (skull, eyes, ear, and nose) associated with CHD proved to be a reliable clinical criteria for referral to molecular analysis. Among heart defects, we suggest that individuals with obstructive pulmonary valve ring, truncus arteriosus and bicuspid aortic valve associated with ASD and/or right aortic arch should perform FISH investigation for 22q11.2 deletion. Particularly in newborns, the detection of these cardiac defects is crucial for the early diagnosis of this syndrome, as dysmorphisms associated with 22q11.2DS are often slightly or lately expressed.

Authors' Contributions

B.L.D, A.S.S, A.B.G., and P.R.G.Z performed genetic testing and wrote the manuscript; B.L.D., and P.R.G.Z supervised genetic testing; B.L.D, B.B.G., and R.F.M.R reviewed clinical data and edited the manuscript; A.S.S, A.B.G., B.B.G, C.F.L and J.A.J reviewed the medical records; B.L.D, P.R.G.Z., and R.F.M.R designed the study, supervised genetic tests, wrote and edited the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank the patients and their family for their participation in this study. We are also thankful to the partners institutions that forwarded the samples for molecular analysis.

We thank MSc Desirée Deconte for her contribution to the language editing.

Funding Sources

This study was supported by Programa de Extensão Universitária do Ministério da Educação e Cultura (PROEXT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 302931/2019-8).

REFERENCES

1. McDonald-McGinn DM; Kirschner R; Goldmuntz E; Sullivan K; Eicher P, et al. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns.* 1999;10(1):11-24.
2. Shprintzen JR. Velo-Cardio-Facial Syndrome: 30 Years of Study. *Nat Inst Health.* 2008;14(1):3-10.
3. Mastroiacovo P, Rossi P, Cancrini C, Azzari C, DiGilio MC, et al. Chromosome 22q,11 deletion - Recommendations for Diagnosis and Treatment. Italian Primary Immunodeficiencies Strategic Scientific Committee. 2005.
4. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, 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(1):101-7.

5. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: The glass half empty. *CircRes*. 2013;112(4):707–720.
6. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*. 2008;451(7181):943–8.
7. Brennan P, Young ID. Congenital heart malformations: aetiology and associations. *Semin Fetal Neonat*. 2001; 6(1):17–25.
8. Blue GM, Kirk EP, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS. Congenital heart disease: Current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust*. 2012;197(3):155–159.
9. Sun R; Liu M; Lu L; Zheng Y; Zhang P. Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72(3):857-860.
10. Peyvandi S, Lupo PJ, Garbarini J, Woyciechowski S, Edman S, et al. 22q11.2 deletions in patients with conotruncal defects: data from 1,610 consecutive cases. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(7), 1687–1694.
11. Bui TH. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon!. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;30(3),247-251.
12. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci*. 1969;63(2):378-383.
13. El-Ella SS, El Gendy F, Tawfik MA, El Sobky E, Khattab A, et al. Chromosome 22 microdeletion in children with syndromic congenital heart disease by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Egypt J Med Hum Genet*. 2012;13(3):313-322.

14. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007;145(4):335-345.
15. Fokstuen S, Arbenz U, Artan S, Dutly F, Bauersfeld U, et al. 22q11.2 deletions in a series of patients with non-selective congenital heart defects: incidence, type of defects and parental origin. *Clin Genet.* 1998;53(1):63-69, 1998.
16. Wozniak A, Wolnik-Brzozowska D, Wisniewska M, Glazar R, Materna-Kirylyuk A, et al. Frequency of 22q11.2 microdeletion in children with congenital heart defects in western Poland. *BMC Pediatr.* 2010;10(1):88
17. Halder A, Jain M, Chaudhary I, Kabra M. Prevalence of 22q11.2 microdeletion in 146 patients with cardiac malformation in a referral hospital of North India. *BMC Med Genet.* 2010;11(1):101.
18. Marino B, Digilio MC, Toscano A, Anaclerio S, Giannotti A, et al. Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med.* 2001;3(1):45–48.
19. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DT, Hungerford DA, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960; 20(3):613-616
20. Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, et al. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr.* 2011;159(2):332–339.
21. Simmons MA, Brueckner M. The genetics of congenital heart disease... understanding and improving long-term outcomes in congenital heart

disease: a review for the general cardiologist and primary care physician.
Curr Opin Pediatr. 2017;29(5):520.

22. Belangero SIN, Bellucco FT, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach M C, et al. Deleção 22q11. 2 em pacientes com defeito cardíaco conotruncal e fenótipo da síndrome da deleção 22q11. 2. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92(4):307-311.
23. Digilio MC, Marino B, Capolino R, Dallapiccola B. Clinical manifestations of Deletion 22q11.2 syndrome (DiGeorge/Velo-Cardio-Facial syndrome) *Images Paediatr Cardiol.* 2005;7:23–34.
24. Grassi MS, Jacob CM, Kulikowski LD, Pastorino AC, Dutra RL, et al. Congenital Heart Disease as a Warning Sign for the Diagnosis of the 22q11.2 Deletion. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103:382–390.
25. Huber J, Peres VC, de Castro AL, dos Santos TJ, da Fontoura Beltrao L, et al. Molecular screening for 22Q11. 2 deletion syndrome in patients with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol.* 2014;35(8):1356-1362.
26. Diniz BL, Glaeser AB, Deconte D, Guaraná BB, Rosa RFM, et al. Pseudohypoparathyroidism with Ectopic Calcification and 22q11 Deletion Syndrome: A Rare Case. *J Pediatr Genet.* 2020. Article published online.
27. Rosa RF, Pilla CB, Pereira VL, Flores JA, Golendziner E, et al. 22q11.2 deletion syndrome in patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit in Brazil. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(13):1655-61.
28. Ramírez-Velazco A, Rivera H, Vásquez-Velázquez AI, Aguayo-Orozco TA, Delgadillo-Pérez S, et al. 22q11. 2 deletion detected by in situ hybridization in Mexican patients with velocardiofacial syndrome-like features. *Colomb Med.* 2018;49(3):219-222.

29. McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med.* 2001; 3(1):23–29.
30. Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, Martinez-Crespo JM, Shen Y, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings: evaluation of chromosomal microarray-based analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:375e82.
31. Jeromi LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet.* 2001;27(3):286-91.
32. Zhou L, Liu J, Xiang M, Olson P, Guzzetta A, et al. *Gata4* potentiates second heart field proliferation and Hedgehog signaling for cardiac septation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(8):e1422-31.
33. Lichtner P, König R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, et al. An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet.* 2000;37(1):33-37.
34. Fernandez L, Lapunzina P, Arjona D, Lopez Pajares I, Garcia-Guereta L, et al. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet.* 2005;68(4):373-378.
35. Kuo YL, Chen CP, Wang LK, Ko TM, Chang TY, et al. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of chromosome 22q11.2 deletion syndrome associated with congenital heart defects. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2014;53(2):248-251.

36. Moore JW, Binder GA, Berry R. Prenatal diagnosis of aneuploidy and deletion 22q11.2 in fetuses with ultrasound detection of cardiac defects. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;91:2068-2073.
37. Yamamoto T,Shimajima K, Yamazaki S, Ikeno K, Tohyama, J, et al. A 16q12. 2q21 deletion identified in a patient with developmental delay, epilepsy, short stature, and distinctive features. *Congenit Anom.* 2016;56(6):253-255.
38. Elder FFB, Ferguson JW, Lockhart LH. Identical twins with deletion 16q syndrome: evidence that 16q12. 2-q13 is the critical band region.*Hum Genet.* 1984;67(2):233-236.
39. Denavit, TM, Malan V, Grillon C, Sanlaville D, Ardalan A, et al. A new case of a severe clinical phenotype of the cat-eye syndrome.*Genet Counsel.* 2004;15(4):443-448.
40. Delahaye A,Toutain A, Aboura A, Dupont C, Tabet AC, et al. Chromosome 22q13. 3 deletion syndrome with a de novo interstitial 22q13. 3 cryptic deletion disrupting SHANK3.*Eur J Med Genet.* 2009;52(5):328-332.
41. Chen L, Yan H, Cao B, Wu Y, Gu Q, et al. Identification of novel ARSA mutations in Chinese patients with metachromatic leukodystrophy. *Int J Genomics.* 2018; 2018.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1. Figure 1. FISH analysis with/without contrast: Red signal – probe TUPLE1/HIRA specific to the 22q11.2 region. Green signal – control probe ARSA specific to the 22q13 region. The arrows indicates the signs of hybridization. a) FISH analysis in a patient with del 22q13. The normal chromosome 22 shows both red and green (marker) hybridization signal, while the deleted one shows only the green signal (marker). b) FISH analysis in a patient with 47,XX, + mar. The normal chromosome 22 shows both red and green (marker) hybridization signal. Here, we can identify that an extra signal from the red probe TUPLE1/HIRA hybridized in the marker identified in the karyotype (+ mar), concluding that this marker is idic(22)(q11.2).

Figure 2.Percentage of individuals with 22q11 deletion presenting face dysmorphia associated with CHD.

Table 3. Heart defects observed in patients with 22q11 deletion x patients without 22q11 deletion.

| <i>CHD</i> | <i>Individuals diagnosed with DS22q11</i> | | | | | | | | <i>Without DS22q11 diagnosis</i> |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|----------------------------------|
| | P12 | P13 | P15 | P22 | P23 | P29 | P31 | n | n |
| <i>Pulmonary valve agenesis</i> | | | | | | + | | 1 | 1 |
| <i>Right aortic arch</i> | + | + | + | | | + | | 4 | 5 |
| <i>Pulmonary atresia</i> | + | | | + | | | | 2 | 3 |
| <i>Atrial septal defects(ASD)</i> | | + | | + | + | + | + | 5 | 27 |
| <i>Interventricular communication(IVC)</i> | + | | | + | + | | | 3 | 19 |
| <i>Double outlet right ventricle (DORV)</i> | | | + | | | | | 1 | 5 |
| <i>Interruption of the aortic arch type B</i> | | | | | | | + | 1 | 1 |
| <i>Obstructive pulmonary valve ring</i> | | | | | | + | | 1 | 0 |
| <i>Patent ductus arteriosus (PDA)</i> | | | | | + | | | 1 | 14 |
| <i>Tetralogia of Fallot (ToF)</i> | | | | + | | + | | 1 | 12 |
| <i>Truncus Arteriosus</i> | | + | | | | | | 1 | 0 |
| <i>Bicuspid aortic valve</i> | | + | | | | | + | 2 | 0 |

Abbreviation: P= patient; n= number of patients;

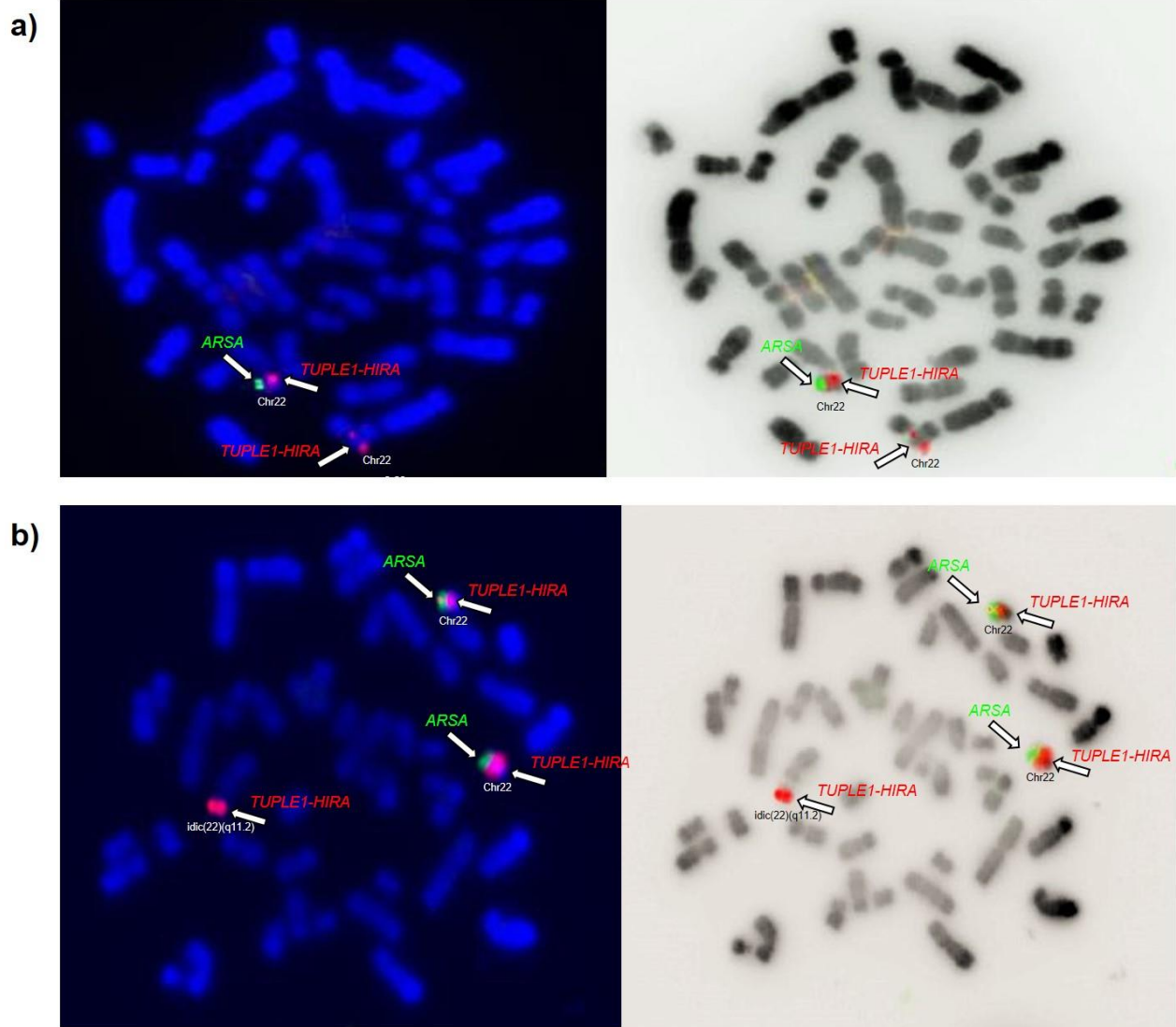


Figure 1. FISH analysis with/without contrast: Red signal – probe TUPLE1/HIRA specific to the 22q11.2 region. Green signal – control probe ARSA specific to the 22q13 region. The arrows indicates the signs of hybridization. **a)** FISH analysis in a patient with del 22q13. The normal chromosome 22 shows both red and green (marker) hybridization signal, while the deleted one shows only the green signal (marker). **b)** FISH analysis in a patient with 47,XX, + mar. The normal chromosome 22 shows both red and green (marker) hybridization signal. Here, we can identify that an extra signal from the red probe TUPLE1/HIRA hybridized in the marker identified in the karyotype (+ mar), concluding that this marker is idic(22)(q11.2).

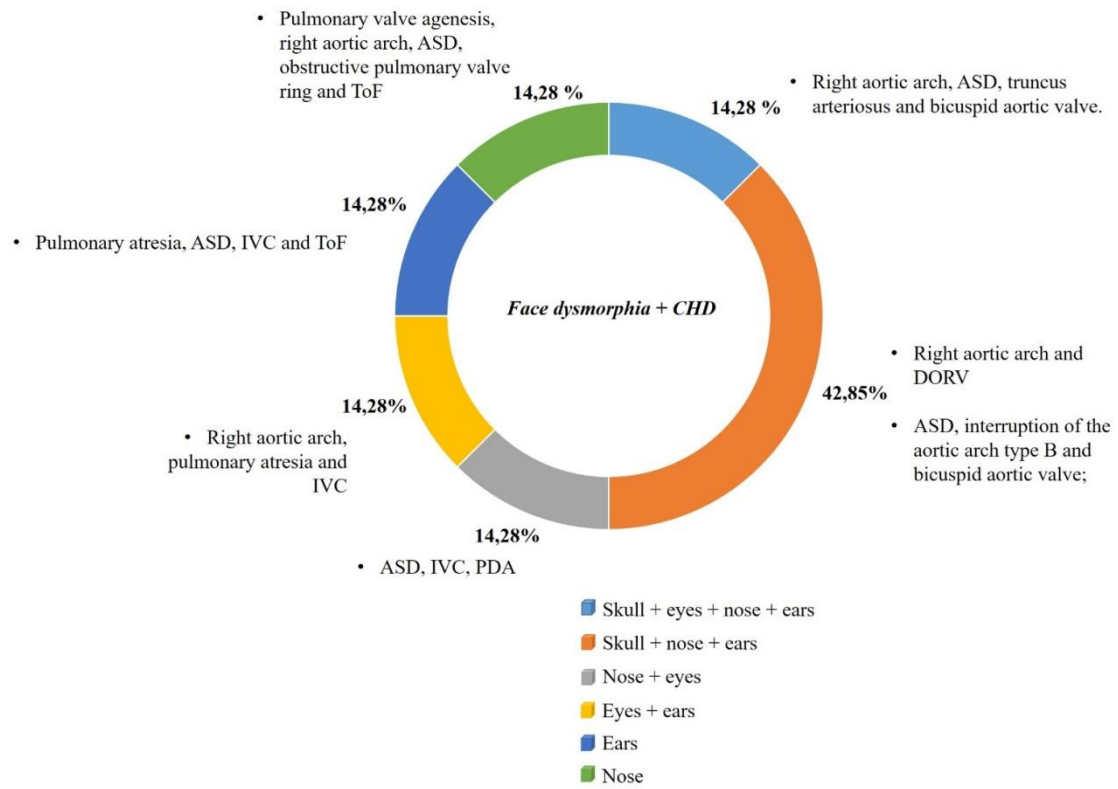


Figure 2. Percentage of individuals with 22q11 deletion presenting face dysmorphia associated with CHD.

6. CONCLUSÕES

As doenças genéticas representam um importante problema de saúde pública, pois, além de provocarem uma enorme proporção de mortes infantis, são a causa de grande parte das internações em hospitais pediátricos. Atualmente são poucos os exames genéticos realizados via SUS. O presente projeto visou a realização de uma abordagem clínica e genética em pacientes suspeitos de deleção 22q11.2.

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece a cada cidadão brasileiro acesso pleno, universal e gratuito aos serviços de saúde. Considerado um dos maiores e melhores sistemas públicos de saúde do mundo, o SUS beneficia cerca de 180 milhões de brasileiros e oferece atendimento, desde simples procedimentos ambulatoriais até atendimento de alta complexidade. Entretanto, os testes genéticos moleculares não são rotineiramente fornecidos por este sistema, negligenciando muitos indivíduos que têm alguma doença genética. Assim, trabalhos de pesquisa, como este, são essenciais para auxiliar no diagnóstico de pacientes que necessitam de investigação molecular.

Através deste estudo foi possível fornecer acesso as novas tecnologias diagnósticas para as síndromes de microdeleções, bem como a avaliação genética completa para os pacientes. Cada resultado obtido originou um laudo que foi entregue na consulta médica. Além disso, casos que não foram elucidados neste estudo, estão sendo encaminhados para investigação utilizando outras técnicas já realizadas no laboratório de Citogenética da UFCSPA. Além disso, de acordo com nossos resultados, conseguimos verificar

três perfis de pacientes que são encaminhados, baseado no diagnóstico clínico, para a investigação molecular. Porém destes, apenas indivíduos que apresentaram dismorfias de face e cardiopatia congênita continham a deleção. Importante salientar que, como a cardiopatia congênita é um dos principais achados encontrados para o encaminhamento a investigação molecular, os defeitos cardíacos demonstrados neste estudo como, anel valvar pulmonar obstrutivo, truncus arteriosus e valva aórtica bicúspide associada à CIA e/ou arco aórtico direito são melhores candidatos para a investigação por FISH para deleção 22q11.2.

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “**Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas.**”, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do HCSA (Parecer N° 2.315.917), UFCSPA (Parecer N° 2.729.168) e do IC-FUC (Parecer N° 3.604.989). Deste projeto maior estão sendo desenvolvidos diversos outros trabalhos e projetos. A realização de testes genéticos específicos possibilita a obtenção de diagnósticos mais precisos, levando a um planejamento terapêutico mais otimizado, além de diminuir o sofrimento de pacientes e suas famílias. Também gera reflexos em relação a diminuição de custos, agilizando o diagnóstico.

7. ANEXOS

7.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas

Pesquisador: Paulo Ricardo Gazzola Zen

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 86036418.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.729.168

Apresentação do Projeto:

Embora as doenças genéticas sejam individualmente raras, sua frequência conjunta faz com que elas representem um importante problema de saúde pública. De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos. As incidências de anomalias cromossômicas e distúrbios monogênicos em neonatos são de aproximadamente 1 em 200 e 1 em 100, respectivamente. A cardiopatia congênita é a alteração congênita mais comum e uma das principais causas de morbidade infantil relacionadas a malformações congênitas. Com incidência de 19 a 75 casos a cada mil nascidos vivos, possui etiologia complexa e multifatorial, com cerca de 80% das cardiopatias congênitas surgindo através da combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 20% dos casos podem ser atribuídos a anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, desordens genéticas não sindrômicas ou teratogênicos. As doenças genéticas representam um importante problema de saúde pública, pois, além de provocarem uma enorme proporção de mortes infantis, são a causa de grande parte das internações em hospitais pediátricos. Atualmente são poucos os exames genéticos realizados via SUS. O presente projeto visa a realização de uma abordagem clínica e genética em pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas. A amostra será composta por pacientes do SUS

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

7.2 Parecer do Comitê de Ética do HCSA

HOSPITAL DA CRIANÇA
SANTO ANTÔNIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas

Pesquisador: Paulo Ricardo Gazzola Zen

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 74971917.2.0000.5683

Instituição Proponente: Hospital da Criança Santo Antônio - Santa Casa/RS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.315.917

Apresentação do Projeto:

Avaliação etiológica de pacientes encaminhados para investigação no serviço de Genética da UFCSPA

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Realizar investigação clínica e genética de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas, atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA.

Objetivos específicos:

- Investigar anomalias genéticas utilizando técnicas como FISH, MLPA, arrayCGH e sequenciamento/exoma;
- Descrever relatos de caso e séries de casos envolvendo indivíduos portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas em periódicos científicos;
- Constituir um repositório de amostras de DNA de indivíduos suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas;
- Possibilitar o acesso a novas tecnologias aos pacientes suspeitos ou portadores de doenças

Endereço: Av. Independência,155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

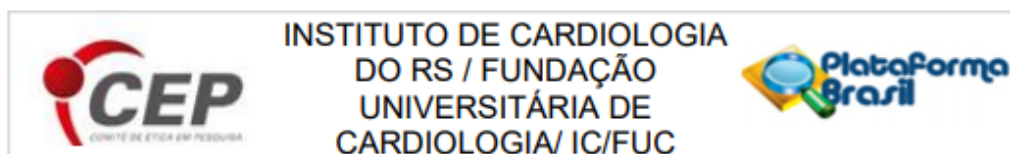
Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

7.3 Parecer do Comitê de Ética do IC-FUC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas

Pesquisador: Paulo Ricardo Gazzola Zen

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 86036418.4.3001.5333

Instituição Proponente: Instituto de Cardiologia do RS / Fundação Universitária de Cardiologia

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.604.989

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa a realização de uma abordagem clínica e genética em pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas, atendidos por médicos geneticistas em hospitais públicos.

Objetivo da Pesquisa:

- Realizar investigação genética de pacientes do SUS suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas, atendidos por médicos geneticistas em hospitais públicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco físico aos indivíduos está relacionado com a coleta do sangue. Como as coletas serão realizadas preferencialmente de modo associado com as coletas de rotina do hospital, não haverá risco adicional. O atendimento as possíveis complicações decorrentes da coleta de sangue se dará do mesmo modo rotineiramente realizado no hospital no qual o paciente é atendido, sempre assistido pelo médico geneticista colaborador.


O material coletado será preservado confidencial, sendo que será sempre assegurado o anonimato dos pacientes envolvidos na pesquisa .

Endereço: Av. Princesa Isabel, nº 370 - Centro Cultural Rubem Rodrigues - Ramal: 4136 e Av. Princesa Isabel, nº 395
Bairro: Santana **CEP:** 90.620-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3230-3600 **Fax:** (51)3223-2746 **E-mail:** cep.icfuc@cardiologia.org.br

7.4 Produção Bibliográfica

1. Pseudohypoparathyroidism with Ectopic Calcification and 22q11 Deletion Syndrome: A Rare Case (2020).
2. Increased levels of chitotriosidase in a patient with Alagille syndrome: association or coincidence? (2018).
3. Description of clinical aspects and microscopy of the hair shaft of a carrier of familial monilethrix. (2018).
4. Autopsy findings of a child with left atrial isomerism associated with pulmonary agenesis. (2018).

Pseudohypoparathyroidism with Ectopic Calcification and 22q11 Deletion Syndrome: A Rare Case

Bruna Lixinski Diniz¹ Andressa Barreto Glaeser¹ Desirée Deconte¹ Bruna Baierle Guaraná²
Rafael Fabiano Machado Rosa² Paulo Ricardo Gazzola Zen² 

¹ Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, Brazil

² Department of Internal Medicine, Clinical Genetics, UFCSA and Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence: Paulo Ricardo Gazzola Zen, PhD, Serviço de Genética Clínica, UFCSA, Rua Sarmento Leite, 245/403 Bairro Centro, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil (e-mail: paulozen@ufcsa.edu.br).

J Pediatr Genet

Abstract

Ectopic calcification in soft tissue is associated with several disorders including pseudohypoparathyroidism (PHP), which is characterized by resistance or nonresponse to parathyroid hormone (PTH) function. Association between PHP and 22q11DS, also known as DiGeorge syndrome, is rare, especially in children. We describe a newborn girl diagnosed with 22q11DS, presenting ectopic calcifications in soft tissue and suspicion of PHP. PTH function showed values close to the upper limit of the reference value. Radiology showed bone callus in the right wrist. PHP can be a new clinical finding associated with 22q11DS. Parathyroid function investigation in individuals with 22q11DS, presenting bone dysmorphisms and/or calcium metabolism alterations, should be considered.

Keywords

- ▶ ectopic calcification
- ▶ pseudo-hypoparathyroidism
- ▶ DiGeorge syndrome

Introduction

Ectopic calcifications in soft tissue occur sporadically or as a rare genetic condition and may be associated with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP; OMIM 135100), progressive osseous heteroplasia (POH; OMIM 166350), pseudohypoparathyroidism, type 1A/Albright hereditary osteodystrophy (PHP1A/AHO; OMIM 103580), hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis (HFTC; OMIM 211900), normophosphatemic familial tumoral calcinosis (OMIM 610455), and pseudohypoparathyroidism (PHP; OMIM 203330).¹

PHP is characterized by resistance to parathyroid hormone (PTH). Due to differences in pathogenesis and phenotype, PHP can be classified into four types: 1a, 1b, 1c, and II.^{2,3} Pseudo-pseudohypoparathyroidism (pseudo-PHP) is a PHP variant characterized by the development of isolated AHO without hormonal resistance. Pseudo-PHP is caused by mutations in the GNAS gene through paternal inheritance and it is genetically related to PHP-1a. Signs and symptoms of both conditions are similar; however, individuals with pseu-

do-PHP do not show resistance to PTH while individuals with PHP-1a do.⁴

The diagnosis of PHP type 1a (PHP1a) is challenging since clinical features such as osteodystrophy, brachydactyly, round face, and symptomatic hypocalcemia, are generally developed after childhood. Although ectopic calcification may be an early sign of PHP1a, there is no well-established evidence in the beginning of its development.^{2,3}

22q11 deletion syndrome (22q11DS, OMIM 611867), also known as DiGeorge syndrome, is caused by a microdeletion (1.5–3 Mb) on chromosome 22 and has an estimated prevalence of 1 per 4,500 live births.⁵ Phenotypic presentation is variable and endocrinopathies are commonly observed in patients with this deletion. Generally, 22q11DS can be diagnosed when the individual presents congenital heart diseases associated with other clinical manifestations. The spectrum of clinical features that compose 22q11DS has become well characterized and some endocrine abnormalities such as growth hormone deficiency and hypothyroidism have been reported. However, the association between 22q11DS and PHP

received
November 20, 2019
accepted after revision
January 8, 2020

Copyright © by Georg Thieme
Verlag KG, Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0040-1701640>.
ISSN 2146-4596.

is rare.^{6,7} We report a girl, diagnosed with 22q11DS, with ectopic calcifications in soft tissues and suspicion of PHP.

Case Description

We report a 2-month and 13 day-old girl with a history of congenital heart disease, presence of ectopic calcifications in soft tissues (periosteal region), and facial dysmorphism. The proband was the first child of young and nonconsanguineous parents, with a healthy maternal half-sister. Pregnancy was uneventful and the prenatal serologies were negative. The mother denied smoking or alcohol intake during pregnancy. The child was born by cesarean section at 39 weeks and 5 days of gestation, weighing 2,630 g, with meconium-stained amniotic fluid and Apgar scores of 8 and 10. The patient evolved with desaturation, requiring orotracheal intubation. She was immediately transferred to the neonatal intensive care unit. Her neonatal period was complicated with several episodes of sepsis that were treated by antibiotic therapy. Echocardiogram showed double outlet right ventricle with severe pulmonary hypoplasia and minimal ductus arteriosus persistence (patent ductus arteriosus [PDA]).

Neonatal screening revealed a subclinical hypothyroidism (thyroid stimulating hormone [TSH] 14.8 uIU/mL [VR 0.85–6.15 uIU/mL] and T4 1.28 mg/dL [VR 0.94–1.44 mg/dL]), hypocalcemia that remained in the following dosages (total calcium [CaT] 8.6 mg/dL; 6.6 mg/dL; 8.3 mg/dL [VR 8.7–10.5 mg/dL]) and calciuria (CaU 11 mg/L; 29 mg/L; 177 mg/L). Creatinine (<0.1 mg/dL) and urea (28 mg/dL) levels were normal. Renal diseases and immunoglobulinopathies were excluded. Sodium (140 mEq/L [VR 132–146 mEq/L]), potassium (4.9 mEq/L [reference value (RV) 3.5–5.5 mEq/L]), magnesium (2.1 mg/dL [RV 1.6–2.4 mg/dL]), ionic calcium (4.8 mg/dL [RV 4.0–4.8 mg/dL]), serum inorganic phosphorus (5.6 mg/dL [VR 3.5–6.6 mg/dL]), glucose (82 mg/dL [VR 70–99 mg/dL]), and 25-hydroxy vitamin D (27 ng/mL, [VR >20 ng/mL]) dosages were normal. Hormonal investigation of parathyroid function (PTH) initially showed values close to the limit of the reference value (PTH 77 pg/mL; 85.2 pg/mL [VR 18–88 pg/mL]). After supplementation with calcium phosphate, cholecalciferol, and calcitriol, PTH levels were elevated (156.8 pg/mL).

Physical examination revealed bone callus in the right wrist. Radiological examinations showed no morphological or structural alterations in the skull and face, cervical spine, dorsal spine, or sacral loin. However, a double cortical contour was observed in the proximal third of both femurs, suggesting cortical hyperostosis or periosteal calcification along the femoral diaphysis. Dysplasia of the left acetabular ridge was also observed, as well as signs of osteopenia in the long bones, upper and lower limbs, and pelvis. Signs of osteopenia were noticed in both hands and wrists. Ectopic calcifications in soft tissues were observed in the distal end of the right forearm, in the wrist bones and in the proximal end of the metacarpal (→ Fig. 1).

High-resolution karyotype showed a normal female chromosomal constitution (46,XX). Molecular cytogenetic testing by fluorescent in situ hybridization using the commercial Vysis LSI DiGeorge/TUPLE1 (Abbot Molecular) dual color probe set showed a deletion of 22q11.2.



Fig. 1 Ectopic calcification in the right wrist evidenced on radiography.

At 8 months of age, the patient was readmitted for bronchiolitis. Dosages of PTH levels remained elevated (123.7 pg/mL). Pathogenesis evaluation of hypocalcemia revealed repeatedly high or normal levels of PTH, which was consistent with the diagnosis of PHP. The proband was submitted to a correction surgery for her congenital heart disease. While being operated, the proband had an episode of cardiac arrest and remained on mechanical ventilation by tracheostomy, developing a severe neurological condition. She passed away on the same day. Thus, the patient was diagnosed with 22q11DS and with presence of ectopic calcifications that could be associated with PHP.

Discussion

This report aimed to show a newborn girl diagnosed with 22q11DS and suspicion of PHP. The suspicion was raised due to hypocalcemia and increased levels of PTH along with ectopic calcifications in soft tissues.

PHP is a rare condition characterized by resistance or nonresponse to PTH that may have normal and/or increased serum levels.⁶ As for the PHP type, biochemical and hormonal values verified in our case corroborate with the results found in other studies where the cases are diagnosed with PHP1a. Also, presence of hyperphosphatemia was not always evidenced (→ Table 1). PHP1a is also known as AHO and has a variety of clinical findings such as short stature, mental

Table 1 Clinical findings for PHP1a: our case and literature case reports

| Study | Patient age | Clinical findings for PHP1a | | | | | | | |
|----------------------------|---------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | | Seizures | Calcemia (N, ↑, ↓) | Hyperphosphatemia | Hypothyroidism | PTH (N, ↑, ↓) | TSH (N, ↑, ↓) | Ectopic calcification | AHO confirmed |
| Our case | 2 mo and 13 d | | ↓ | | x | ↑ | ↑ | x | |
| Liu et al ⁶ | 14 y | x | ↓ | x | | N | N | x | |
| Adachi et al ⁸ | P1: 13 d | | N | | | ↑ | N | x | |
| | P2: 9 d | | N | | x | N | N | x | |
| Riepe et al ⁹ | 7 mo | | | | | ↑ | | x | x |
| Lubell et al ¹⁰ | 2 y | | N | x | x | ↑ | ↑ | x | x |
| Zung et al ¹¹ | 3 y | | N | | | ↑ | ↑ | x | x |

Abbreviations: ↑, high; ↓, low; AHO, Albright hereditary osteodystrophy; N, normal; P, patient; PHP1a, pseudohypoparathyroidism, type 1a; PTH, parathyroid hormone; TSH, thyroid stimulating hormone.

retardation, short metacarpals and obesity. During childhood, the clinical manifestations of PHP1a are normally subtle and, therefore, tend to be easily ignored.⁶ Due to patient's death in the first month, it was not possible to identify dysmorphologies compatible with AHO.

Some individuals diagnosed with PHP1a have resistance to other hormones besides PTH, normally TSH and gonadotropins. Resistance to TSH, clinically indistinguishable from primary hypothyroidism, may become apparent before hypocalcemia and, occasionally, can be diagnosed through neonatal metabolic screening. The resistance to PTH and TSH is a possible explanation to justify the suspicion of PHP1a in our case.¹² Although ectopic calcification may be an early sign of PHP1a, there is no clear description about when it starts to develop. However, patients diagnosed with PHP1a and presence of subcutaneous calcification in the neonatal period have been reported.^{8,9}

Association between 22q11DS and PHP in children is rare, mainly due to the variety of clinical features.^{6,7} Abnormal parathyroid function was the first hormonal disorder related in 22q11DS: from a severe neonatal hypocalcemia to sub-clinical PTH failure. 22q11DS has an estimated prevalence of 1 per 4,500 live births and it is the most common autosomal deletion syndrome. In total, 30 to 50 genes are located in the deleted region of chromosome 22q11.2, which includes several transcription factors, that regulate thymus and parathyroid development.^{6,7} The limited number of reports associating PHP and 22q11DS is mainly due to the location of the Gs- α protein on chromosome 20. However, Craigen raised the hypothesis that a more extensive deletion of chromosome 22 may lead to PHP due to the haploinsufficiency of protein G. This haploinsufficiency would be a consequence of a Gs- α protein locus adjacent to the critical region of chromosome 22. Heterozygous mutations in the GNAS gene are the main cause of Gs- α protein-reduced activity.⁹ Liu et al described a patient diagnosed with 22q11DS that had a wide phenotypic spectrum with multiple dysmorphisms. The authors suggested, that when an individual is diagnosed with PHP, 22q11DS should be considered. It is not impossible that 22q11DS occurs simultaneously with PHP.⁶

Different age groups, diagnosed with PHP have been reported (→ **Table 1**). Therefore, it is important to note that the investigation for PHP, which may or may not be associated with 22q11DS, should be considered in all patients with hypocalcemia, independently of their age. PHP may be underdiagnosed in patients with 22q11DS since hormonal (hyper/hypothyroidism) and mineral (hypocalcemia) disorders are common in these individuals.⁶ However, ectopic calcifications are usually evidenced in PHP.³ Considering that the 22q11 region includes several transcription factors that regulate thymus and parathyroid development, we suggest that individuals diagnosed with 22q11DS and with bone dysmorphisms should be considered for parathyroid abnormal function investigation. Therefore, PHP could be a new clinical finding associated with 22q11 deletion.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, 17/2551-0001063-9), Programa de Extensão Universitária do Ministério da Educação e Cultura (PROEXT), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 301834/2016-4).

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgment

We thank the patient and her family for their participation in the study.

References

- Silengo M, Defilippi C, Belligni E, et al. Progressive extreme heterotopic calcification. *Am J Med Genet A* 2013;161A(07):1706–1713
- Bastepe M, Jüppner H. Pseudohypoparathyroidism. New insights into an old disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29(03):569–589
- Linglart A, Levine MA, Jüppner H. Pseudohypoparathyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2018;47(04):865–888
- Long DN, McGuire S, Levine MA, Weinstein LS, Germain-Lee EL. Body mass index differences in pseudohypoparathyroidism

Increased levels of chitotriosidase in a patient with Alagille syndrome: association or coincidence?

Aumento dos níveis de quitotriosidase em um paciente com síndrome de Alagille: associação ou coincidência?

Bruna L. Diniz; Maiara A. Floriani; Maria Angélica T. Ferreira; João Francisco O. Gonzales; Nathan H. Lisboa; André Ricardo Jakimiu; Janaina Yacy H. Ferreira; Rafael Fabiano M. Rosa; Paulo Ricardo G. Zen

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

We describe a case of a patient with Alagille syndrome (AS) presenting an increased level of the enzyme chitotriosidase (ChT), evaluating factors that could justify the relationship between AS and ChT. He was a male patient with cholestatic jaundice, facial dysmorphism and congenital heart disease who presented a brief septicemia. He underwent liver biopsy and analyses for inborn errors of metabolism that respectively showed ductopenia and increased levels of ChT. This increase could be potentially explained by inflammatory and infectious processes, or even by AS itself.

Key words: chitinase; cholestasis; inflammation; Alagille syndrome; sepsis.

INTRODUCTION

Alagille syndrome (AS; OMIM 118450), also known as Alagille-Watson syndrome or arteriohepatic dysplasia, is an autosomal dominant genetic disease with variable clinical manifestations that may involve different organs and systems^(1, 2). Its first description occurred in 1969, by Alagille *et al.*⁽³⁾, and it was also subsequently reported by Watson and Miller, in 1973⁽⁴⁾. However, the diagnostic criteria were only established by Alagille *et al.* in 1975⁽²⁾. Originally, the prevalence of the syndrome was estimated at 1:70,000 live births, but considering individuals without hepatic involvement, this frequency increases to 1:30,000^(1, 2). This disease is mainly caused by mutations in JAG1 (AS type 1) (about 90% of cases) and NOTCH2 genes (AS type 2)⁽²⁾. The first prominent clinical feature in most patients is the presence of neonatal liver disease, with conjugated hyperbilirubinemia (cholestasis)^(1, 2). Our aim was to describe a patient with AS presenting an increased level of chitotriosidase (ChT), evaluating factors that could explain the relationship between AS and ChT.

CASE REPORT

The patient was a boy aged 1 month and 3 days, with a history of cholestatic jaundice. He was the first child of a young and non-consanguineous couple, with no family history of genetic diseases. The mother has a previous history of a stillbirth and two gestational losses. The gestation of the patient was uneventful. His prenatal serologies were negative. The mother reported smoking throughout pregnancy (mean of 10 cigarettes per day) and occasional alcohol intake. The patient was born prematurely, at 33 weeks and 3 days, by cesarean section due to fetal distress, weighing 1,460 grams, measuring 42 cm, with head circumference of 24.5 cm and Apgar scores of 5 and 7 at first and fifth minutes, respectively. At birth, septicemia and respiratory failure were verified. Cholestasis was also diagnosed soon. Septicemia was treated with antibiotic therapy during 10 days. The patient presented alterations in liver function tests, with an increase in the levels of aspartate aminotransferase (AST or GOT) (150 U/l – reference values: 14 to 42 U/l), glutamic pyruvic

Description of clinical aspects and microscopy of the hair shaft of a carrier of familial monilethrix

Descrição dos aspectos clínicos e da microscopia da haste capilar de um portador de monilêtrix familiar

Maria Angélica T. Ferreira¹; João Francisco O. Gonzales¹; Bruna L. Diniz²; Malara A. Floriani¹; Ana Elisa K. Bau^{1, 2}; Rosana C. M. Rosa¹; Rafael Fabiano M. Rosa^{1, 3}; Paulo Ricardo G. Zen^{1, 3}

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Rio Grande do Sul, Brazil. 2. Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), Rio Grande do Sul, Brazil. 3. Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Monilethrix is a genetic condition that affects the hair shaft. We describe a family with this disease, focusing on its clinical aspects and microscopic hair characteristics. The patient was a 10-year-old female with history of hypotrichosis. In addition to diffuse alopecia, there was brittle hair, with ruptures in the hair shaft at different levels. The hair had a nodular appearance at naked eye. Other family members had the same symptoms, what indicates an autosomal dominant pattern of inheritance. Microscopic analysis revealed capillary fibers with areas of elliptical nodular appearance interspersed with regions of dystrophic constriction.

Key words: monilethrix; hair; hypotrichosis; inheritance patterns; microscopy.

INTRODUCTION

Hair abnormalities happen in childhood with some frequency due to acquired and congenital conditions. When the problem is in the hair shaft, these dysfunctions can be differentiated by the presence or not of increased fragility and breakage. Monilethrix is an abnormality characterized by increased fragility of the hair shaft⁽¹⁾. Its name originates from the combination of two words: the Latin word "monile" (necklace), and the Greek "thrix" (hair), referring to the beaded aspect of the hair, which can be observed under light microscopy⁽²⁾.

Monilethrix is a rare and non-syndromic genetic condition which can present two different patterns of inheritance: an autosomal dominant (OMIM 158000) and an autosomal recessive pattern (OMIM 252200)⁽³⁾. It is clinically characterized by short and fragile hair that breaks spontaneously or by friction^(1, 4, 5). Hair is normal at birth. However, the stem gains beaded or moniliform appearance during the first months of life^(1, 4, 5), leading to periodic changes in its diameter⁽³⁾. The hairline presents areas of normal thickness with elliptical nodes alternated with regions of dystrophic

constrictions. These internodal regions are prone to breakdown, which weakens the hair and may lead to alopecia⁽⁶⁾.

Our aim was to report the rare case of a family with monilethrix, highlighting their clinical findings and, mainly, the microscopic characteristics of the hair. A 10-year-old patient was referred for evaluation due to sparse hair. She was daughter of a 35-year-old father and a 33-year-old mother. The father had a similar hair disorder. In addition, the paternal grandfather, an aunt, and two paternal uncles were also affected (**Figure 1**). The child was born by vaginal delivery, at term, weighing 3,830 grams and measuring 50 cm. She was born cyanotic, requiring mechanical ventilation. Her neuropsychomotor and speech development was normal for her age. On physical examination, at the age of 10 years, she presented adequate anthropometric measurements (weight, height and head circumference), as well as diffuse and irregular alopecia with hair rupture at different levels, which gave an appearance of hypotrichosis. Her hair had a nodular appearance and was brittle (**Figure 2**). Her eyebrows and eyelashes were normal, as well as her nails and skin. Microscopic analysis of the hair showed stenosis areas, many of them close to the root.

First submission on 10/27/17; last submission on 01/26/18; accepted for publication on 07/31/18; published on 10/20/18

Autopsy findings of a child with left atrial isomerism associated with pulmonary agenesis

Acabados de autópsia de uma criança com isomerismo atrial esquerdo associado à agenesia pulmonar

Camilla M. V. Pereira¹; Larissa V. Cruz²; Marina C. Girotto¹; André C. Cunha²; Jorge Alberto B. Telles²; Bruna L. Diniz²; Rosana C. M. Rosa²; Paulo Ricardo G. Zen^{1,3}; Rafael Fabiano M. Rosa^{1,3}

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV), Rio Grande do Sul, Brazil.

3. Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Isomerism is a rare laterality defect. Our aim was to describe the autopsy findings of a child with left atrial isomerism (LAI) and pulmonary agenesis (PA), an association still not described in the literature. Fetal ultrasound revealed right renal agenesis, single umbilical artery and polyhydramnios. Echocardiography revealed a complex heart defect with LAI. The child died minutes after birth. Autopsy confirmed the prenatal findings and revealed the presence of unilateral PA, complex vascular abnormalities and polysplenia. Despite its rarity, health professionals should be aware for the possibility of such an association.

Key words: isomerism; heterotaxy syndrome; lung; congenital heart defects; autopsy.

CASE REPORT

Our aim was to describe for the first time the presence of pulmonary agenesis (PA) in a child with left atrial isomerism (LAI), whose identification was only possible after necropsy analysis. The patient's mother was a 24-year-old woman presenting fetal ultrasound with right renal agenesis and a single umbilical artery. Fetal ultrasound at 23 weeks of gestation also suspected of a congenital heart defect. Fetal echocardiography revealed LAI. The child was born by cesarean section at 38 weeks, weighing 2,840 g, and with Apgar scores of 2 and 0. She died shortly after birth. Autopsy revealed umbilical cord with two vessels; left PA with total absence of pulmonary tissue, bronchia and vascular supply, and tracheoesophageal fistula. In the topography of the right lung there was a nodular mass with bubbles, measuring $2.7 \times 2.5 \times 1.4$ cm, with a shiny grayish appearance at shear and without apparent lobulation, compatible with pulmonary parenchyma. There were two small vessels that are originated from it and that were connected to the heart. The main primary bronchus was connected to the pulmonary tissue located at right. There was LAI; persistent left

superior vena cava that drained into coronary sinus vein; absence of the supra-hepatic segment of the vena cava; direct drainage of hepatic veins and two right pulmonary veins draining to the left atrium that was located at right; ambiguous atrioventricular connection; hypoplastic and imperforate pulmonary valve; pulmonary trunk with no branches at left and severe hypoplasia of rights branches which communicated with the hypoplastic lung; absence of atrial septum and patent ductus arteriosus. There was also polysplenia, right renal agenesis and left ureteropelvic dilation. The liver was enlarged and located in the midline.

DISCUSSION

Isomerism is a rare defect in which a lateral symmetry becomes the mirror of the other. It is a kind of situs ambiguus (inversus) or heterotaxy⁽¹⁾. Pulmonary anomalies are common in LAI, in particular pulmonary segmentation abnormalities⁽²⁾. However, there is no description in the literature of patients presenting PA. PA is considered an extremely rare malformation.