

Investigação citogenômica em pacientes com
cardiopatias congênitas

THÁRSIS GABRYEL GOMES

**BOTUCATU – SP
2018**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Investigação citogenômica em pacientes com
cardiopatias congênitas

THÁRSIS GABRYEL GOMES

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU – SP
2018**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Gomes, Thársis Gabryel.

Investigação citogenômica em pacientes com cardiopatias congênitas / Thársis Gabryel Gomes. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo

Coorientador: Danilo Moretti-Ferreira

Capes: 20200005

1. Anomalias humanas. 2. Coração - Anomalias. 3. Genética.

Palavras-chave: Anomalias congênitas; Coração; Desequilíbrios citogenômicos; Etiologia genética; Malformações cardíacas congênitas.

Dedico à minha família, em especial aos meus pais, pilares da minha existência e da minha formação enquanto indivíduo; e a todos os cidadãos brasileiros que, assim como eu, sonham com dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu **Pai Celestial** por ser a minha razão de viver e por estar colocando, dia após dia, a Sua essência em mim. Tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser é teu!

À Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro - Bicudo, minha orientadora, por acreditar em mim e por me dar a oportunidade de aprender tanto profissional como pessoalmente. Obrigado por ser essa professora humana, compreensiva, resiliente e extremamente competente. Nunca vou me esquecer de seus ensinamentos, dos seus puxões de orelha (risos!) e de sua admirável humildade. Obrigado por não desistir de mim!

Ao Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, meu co-orientador, por me receber em seu laboratório aqui em Botucatu, mesmo eu não tendo nenhum tipo de vínculo formal contigo na época. Obrigado por me fornecer o espaço para que eu realizasse atividades cruciais desta pesquisa. Muito grato pela colaboração, por receber e avaliar todos os pacientes que compõem essa investigação, e pelas parcerias firmadas na realização de *arrays-CGH*. Muito grato!

Ao Programa de Pós-graduação em Genética do IBB-UNESP, por me permitir desenvolver habilidades e aprender com os desafios!

À Dra. Deise Helena de Souza e à Rosana Bicudo, do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) da Unesp-Botucatu, pela realização dos cariótipos e FISH dos pacientes, além de todo apoio administrativo e laboratorial. Obrigado também pelo carinho com que sempre me trataram. Sentirei saudades das risadas, das conversas e dos abraços! Eu amo vocês!

Ao Dr. Rossano César Bonatto, médico responsável pelo Ambulatório de Cardiologia Pediátrica do HCFMB – UNESP, por todo o apoio no recrutamento e seleção dos pacientes com cardiopatia congênita. O senhor é um médico ímpar, pois além de competência profissional no exercício da profissão, ainda é uma pessoa com um coração enorme, sempre disposto a ajudar. Serei eternamente grato ao senhor!

A todos os pacientes e seus familiares, que tornaram a presente investigação possível. Obrigado aos pais e responsáveis que aceitaram de bom grado ceder seu tempo para irem ao SAG contribuir com a realização destas pesquisas. Eu aprendi muito com todos vocês! Foi uma experiência incrível e enriquecedora. Obrigado por doarem as amostras de sangue, pelas conversas, pelas dúvidas e pelas várias histórias compartilhadas. Grato a cada um!

Aos professores Dr. Robson Francisco Carvalho, Dr. Rossano César Bonatto e Dra. Cláudia Rainho, pelas valiosas contribuições no exame geral de qualificação. Sou muito grato a vocês por cada comentário, sugestão e crítica. Vocês contribuíram na construção deste trabalho!

À minha amiga Amanda Rodrigues Tanamachi, por ter sido minha parceira no recrutamento, agendamento, coleta de sangue, e consulta dos pacientes que fazem parte deste trabalho e do banco de dados de amostras de cardiopatas do SAG. Obrigado por todo o apoio, e por muitas vezes ficar sozinha no ambulatório do hospital e do SAG nos dias em que eu não pude ir!

À Dra. Leslie Kulikowski e à MsC. Évelin Aline Zanardo, do Laboratório de Citogenômica – Faculdade de Medicina da USP – São Paulo, pela parceria na realização dos *arrays* de dois pacientes e dos pais de um deles! Obrigado por toda a ajuda nas análises e interpretação dos resultados!

À Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi (IB – USP), pela parceria na realização de análises de *array-CGH* para amostras do presente trabalho!

À MsC. Roberta Frota Curado, do Laboratório de Genética Humana e Molecular da UFG – Goiânia, por todo o apoio na realização da técnica de MLPA. Você foi incrível Rô, e sou muito grato por toda a ajuda e pela paciência!

Ao Dr. Bruno Faulin Gamba, pelos conselhos, ideias e orientações nas análises de alguns resultados! Muito obrigado!

A todos os colegas do SAG – UNESP, por terem me recebido tão bem quando cheguei no ano de 2016! Obrigado pela parceria, risadas, bons momentos regados a chá e café!

Guardo boas lembranças!

Aos meus amigos Dimitrio Schievenin, Priscila Medeiros, Camila Cristina, Jakeline Oliveira, Rômulo Pedro, Stéfany Empke, Camila Baldin e Amanda Tanamachi, por serem a minha família aqui em Botucatu e por tantos momentos bons compartilhados! Vocês foram meu alicerce nessa cidade!

A todos os outros amigos e colegas da Pós-graduação em Genética que direta ou indiretamente contribuíram com o trabalho: **Paulinha Freire, Andréia Souza (Déia), Bárbara e João Henrique Maia.**

Aos amigos Rafael Marques e Gustavo Mota, por terem sido minha primeira família aqui na saudosa república Babilônia! Obrigado por tudo meus companheiros!

Ao Erasmo Carvalho, por ter me dado muito apoio durante um período do mestrado. Você tem um coração enorme. Grato por sua prestatividade e generosidade. Não me esquecerei! Obrigado!

Ao amigo Rodolph Sartin, por ser presente mesmo com a distância física! Você é uma das pessoas mais valiosas que a UFG me deu o privilégio de conhecer! Obrigado pela força nesse período do mestrado!

Aos companheiros da atual república “Meriquei”, pela cumplicidade e companheirismo!

A toda minha família: meus pais, meu irmão, meu avô e todos os demais! Vocês são minha inspiração e minha alegria! Obrigado por sempre acreditarem em mim e por me apoiarem sempre! Amo vocês!

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito [...]”*

- Martin Luther King Jr.

*“Não sou quem eu gostaria de ser.
Não sou quem eu deveria ser.
Ainda não sou quem poderia ser.
Mas, graças a Deus, não sou mais quem eu era.”*

- Martin Luther King Jr.

RESUMO

GOMES, TG. **Investigação citogenômica em pacientes com cardiopatias congênitas.** 2018, 129 p. Dissertação de mestrado – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

As cardiopatias congênitas (CCs) podem ser definidas como qualquer anormalidade na estrutura e/ou na função cardiocirculatória presente ao nascimento. Constituem as malformações congênitas mais comuns entre recém-nascidos vivos, podendo se apresentar de duas formas: isoladas (ou não sindrômicas) e sindrômicas. De caráter multifatorial, o surgimento de CCs envolve fatores ambientais, genéticos e epigenéticos. A etiologia genética de CCs ainda é pouco conhecida. Entre as causas genéticas conhecidas, podemos destacar: aneuploidias, alterações na estrutura dos cromossomos, desequilíbrios citogenômicos (perdas e ganhos genômicos ou variações no número de cópias genômicas – CNVs), mutações pontuais, variações em um único nucleotídeo, entre outras. Dentre essas, as CNVs contribuem com aproximadamente 10% na etiologia genética de CCs não sindrômicas, e cerca de 20% entre as sindrômicas. O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis desequilíbrios citogenômicos em pacientes diagnosticados com CCs sindrômicas e não sindrômicas idiopáticas. Foram recrutados 31 pacientes, sendo 13 sindrômicos e 18 não sindrômicos. Todos foram submetidos à avaliação genético-clínica. As amostras foram coletadas a partir do sangue periférico, e realizou-se o cariótipo convencional para todos os sindrômicos. A análise por MLPA foi realizada em 27 pacientes. O DNA genômico dos pacientes sindrômicos selecionados foi submetido a duas plataformas de CMA (*array-CGH/SNP arrays*): *SNP-array 850K HumanCytoSNP* (Illumina®) e *SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K* (Agilent Technologies®). Os resultados foram analisados através de bancos de dados *online*. A análise pela MLPA na região cromossômica 22q11.2 não evidenciou alterações, exceto para uma paciente não sindrômica que apresentou duplicação envolvendo o gene *TOP3B*, uma alteração sem relevância clínica até o momento. Dos 6 pacientes analisados pela CMA, 4 foram normais e 2 apresentaram alterações (pacientes 8325 e 8362). O paciente 8325 apresentou uma deleção de 159,11 kb em 1p36.11 envolvendo 4 genes, e uma ausência de heterozigossidade (AOH) em 2p13.2p12, abrangendo 45 genes e indicando uma dissomia uniparental. A deleção encontrada é benigna, enquanto a AOH possui genes que, quando em presença de mutações recessivas, podem ser causais. Já o paciente 8362 apresentou trissomia parcial de 15q25.2q26.3 (tamanho de 18,4 Mb e envolvendo 124 genes) e simultânea monossomia parcial de 18p11.32p11.22 (tamanho de 8,7 Mb, contendo 40 genes). Na região de 15q25.2q26.3 foram identificados 12 genes possivelmente candidatos à CC encontrada no paciente, entre eles *ADAMTSL3*, *MCTP2*, *MESF2A*, *MESP1*, *MESP2* e *NTRK3*. Outros 6 genes nessa região podem estar associados às alterações neurológicas encontradas no paciente. Em relação à perda genômica em 18p11.32p11.22, apenas um gene (*TYMS*) parece estar relacionado à CC, enquanto outros 10 genes apresentam relação com algumas alterações extracardíacas. Os resultados evidenciam a contribuição de fatores genéticos na gênese das anomalias congênitas observadas. Entretanto, não explicam todas as alterações de forma holística, havendo a necessidade de mais investigações para a definição de uma correlação genótipo-fenótipo mais robusta e mais sinérgica.

Palavras-chave: desequilíbrios citogenômicos; malformações cardíacas congênitas; etiologia genética; coração; anomalias congênitas; alterações cromossômicas.

ABSTRACT

GOMES, TG. **Cytogenomic investigation in patients with congenital heart defects.** 2018, 129p. Master's degree in Science – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

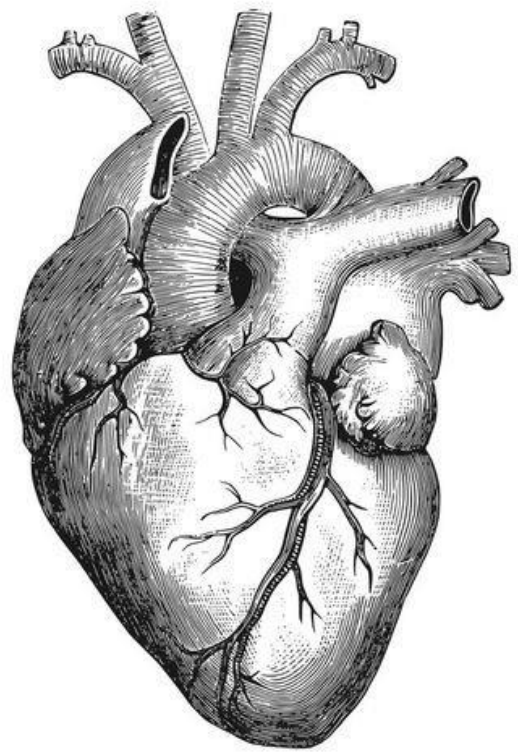
Congenital heart defects (CHD) can be defined as any abnormality in the structure and /or cardiocirculatory function present at birth. Congenital malformations are more common among live newborns. CHD can be presented at two forms: isolated (or non syndromic) and syndromic ones. Of multifactorial spectrum, the emergence of CHD involves environmental, genetic and epigenetic factors. The genetic etiology of CHD is still poorly understood. Among the known genetic causes, we can highlight: aneuploidies, changes in chromosome structure, cytogenetic imbalances (losses and genomic gains, can be also called copy number variations - CNVs), point mutations, variants in a single nucleotide, among others. Among these, CNVs contribute to approximately 10% in the genetic etiology of non-syndromic CHD, and about 20% among syndromic ones. The aim of this study was to investigate possible cytogenetic imbalances in patients diagnosed with idiopathic syndromic and non-syndromic CHD. Thirty one patients were recruited, of which 13 syndromic and 18 non-syndromic. Each patient were submitted to genetic-clinical evaluation. Only patients with an undefined syndromic condition were included in cytogenetic investigations. Samples were collected from the peripheral blood, and the conventional karyotype was performed for all syndromic patients. MLPA analysis was performed in 27 patients. The genomic DNA of the selected patients was analyzed into two CMA (array-CGH / SNP arrays) platforms: SNP-array 850K HumanCytoSNP (Illumina®) and SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K (Agilent Technologies®). All results were analyzed through online databases. The MLPA analysis in the 22q11.2 chromosomal region did not show alterations, except for a non-syndromic patient who presented a duplication involving the *TOP3B* gene, an alteration with no known clinical relevance. Of the 6 patients analyzed by CMA, 4 were normal and 2 presented alterations (patients 8325 and 8362). Patient 8325 had a deletion of 159.11 kb in 1p3611 involving 4 genes, and an absence of heterozygosity (AOH) in 2p13.2p12, spanning 45 genes and indicating an uniparental disomy (UPD). The deletion found is benign, whereas AOH has genes that, if they are carriers of recessive mutations, may be causal. Patient 8362 presented partial trisomy of 15q25.2q26.3 (size of 18.4 Mb and involving 124 genes) and simultaneous partial monosomy of 18p11.32p11.22 (size of 8.7 Mb, containing 40 genes). In the region of 15q25.2q26.3 we identified 12 possibly candidate CHD genes in the patient, among them we can highlight: *ADAMTSL3*, *MCTP2*, *MESF2A*, *MESPI1*, *MESP2* and *NTRK3*. Another 6 genes in this region may be associated with the neurological changes found in the patient. Regarding genomic loss in 18p11.32p11.22, only one gene (*TYMS*) appears to be related to CHD, while another 10 genes are related to some extracardiac features. Results evidenced the contribution of genetic factors (in this case, cytogenetic imbalances) in the genesis of the observed congenital anomalies. However, they do not fully explain all the clinical phenotype. It is necessary to perform further investigations to define a more robust and synergistic genotype-phenotype correlation.

Keywords: cytogenomic imbalances; congenital cardiac malformations; genetic etiology; heart; congenital anomalies; chromosomal alterations.

SUMÁRIO

1. Introdução e Revisão de Literatura	14
1.1 Embriologia do coração (cardiogênese).....	14
1.2 Cardiopatias congênitas.....	18
1.3 Etiologia das cardiopatias congênitas.....	21
1.3.1 A síndrome de deleção 22q11.2	30
1.4 Investigações genéticas das CCs e tecnologias citogenômicas	31
1.4.1 MLPA	31
1.4.2 Análise cromossômica por microarranjos	32
1.5 Justificativa.....	38
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Aspectos éticos.....	43
3.2 Grupo amostral.....	43
3.3 Critérios de seleção dos pacientes.....	48
3.3.1 Critérios de inclusão	48
3.3.2 Critérios de exclusão.....	48
3.4 Análises citogenéticas e citogenômicas	49
3.4.1 Obtenção do DNA genômico	49
3.4.2 Cariótipo convencional	49
3.4.3 Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência	49
3.4.4 MLPA	50
3.4.5 Análise por CMA	54

4. RESULTADOS	59
4.1 Paciente 8325	63
4.2 Paciente 8362	68
5. DISCUSSÃO	79
5.1 Paciente 8325	81
5.2 Paciente 8362	85
6. CONCLUSÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	115



***INTRODUÇÃO E REVISÃO DE
LITERATURA***

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Embriologia do coração (cardiogênese)

Em humanos, o desenvolvimento do coração começa entre o 15º e o 16º dia de gestação, sendo o primeiro órgão funcional a se desenvolver no embrião humano. Trata-se de um processo complexo e dinâmico composto por eventos morfogênicos, celulares e moleculares altamente organizados. Esses eventos acarretam a transformação de um tubo linear em uma estrutura multicâmaras completa com quatro válvulas fibrosas (Figura 1), sendo um processo de diferenciação relativamente rápido (BARTMAN; HOVE, 2005; SRIVASTAVA; OLSON, 2000).

A compreensão da biologia funcional e estrutural do desenvolvimento cardíaco pode nos fornecer um panorama sobre como algumas Cardiopatias Congênitas (CCs) podem surgir. Por se tratar de um processo que requer a cooperação espacial e temporal concomitantemente na proliferação, diferenciação e migração das células cardíacas, qualquer interrupção ou alteração nesta etapa pode comprometer a adequada formação do coração (RAMSON; SRIVASTAVA, 2007).

Segundo Kloesel et al. (2016), os eventos da cardiogênese se dão em uma série de eventos que pode ser dividida sumariamente em nove etapas, a saber: (1) formação das três camadas germinativas (gastrulação), (2) estabelecimento do primeiro e segundo campos cardíacos, (3) formação do tubo cardíaco, (4) dobramento ou *looping* cardíaco, (5) formação dos septos (átrio comum, canal atrioventricular), (6) desenvolvimento das vias de saída, (7) formação das valvas cardíacas, (8) formação da vasculatura (artérias coronárias, arcos aórticos, seio venoso) e (9) formação do sistema de condução. Para que cada etapa ocorra de maneira coordenada, é necessária a ativação temporal de genes específicos que são protagonistas em determinar a diferenciação adequada e canônica (MITCHELL et al., 2007).

Estudos funcionais têm elucidado genes que contribuem diretamente na diferenciação cardíaca, evidenciando-os como peças-chave numa estreita relação com a cardiogênese (Tabela 1). Estas pesquisas se utilizam, por exemplo, de técnicas de *knock-out* e expressão gênica diferencial em organismos-modelo como o camundongo, investigando o intrínseco e possível papel desses genes na regulação, diferenciação e função cardíacas (KLOESEL et al., 2016).

Além de fatores genéticos, sabe-se que fatores epigenéticos e ambientais podem interferir no processo normal da cardiogênese, o que pode resultar em um amplo espectro de doenças cardíacas congênitas (FAHED et al., 2013; HUHTA; LINASK, 2013; VECOLI et al.,

2014). Ademais, a elucidação de quais genes atuam diretamente no processo de formação do coração ainda é um assunto a ser mais explorado pela comunidade científica e que apresenta várias lacunas. Quanto mais entendermos os componentes genético-bioquímicos responsáveis pela diferenciação normal do sistema cardiocirculatório, mais evidências teremos sobre a dinâmica dos eventos moleculares e celulares durante o desenvolvimento do coração, além de contribuir na elucidação de como as diferentes CCs podem surgir (BRUNEAU, 2008).

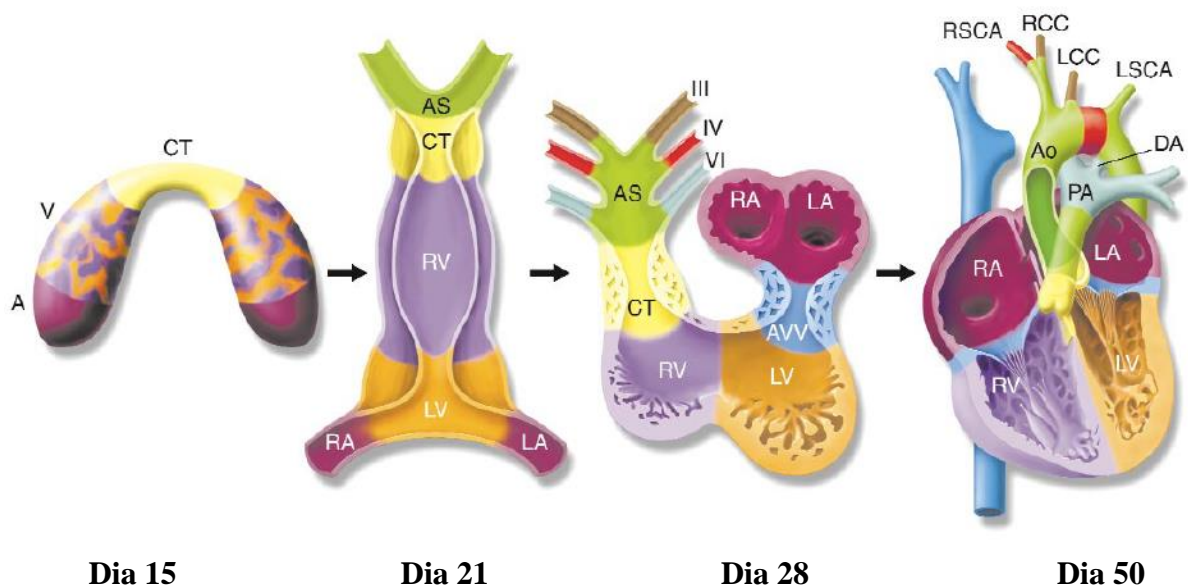


Figura 1. Esquema da cardiogênese em humanos com os dias correspondentes do desenvolvimento embrionário. As cores representam a especificação de que cada região irá se transformar no coração maduro, destacando a distribuição dessas regiões ao longo do processo de desenvolvimento até a formação da estrutura final do coração (Dia 50). Percebe-se também o curto período em que isso ocorre – aproximadamente 35 dias. Durante esse desenvolvimento, células da crista neural povoam os arcos aórticos arteriais bilaterais e simétricos (III, IV e VI) e o Saco Aórtico (AS). Estes, juntos, contribuem na maturação dos segmentos específicos do Arco Aórtico. As valvas cardíacas são formadas por células mesenquimais a partir dos segmentos Conotruncal (CT) e Valva Atrioventricular (AVV). V – ventrículo; A – átrio; RV – ventrículo direito; LV – ventrículo esquerdo; RA – átrio direito; LA – átrio esquerdo; RSCA – artéria subclávia direita; RCC – carótida comum direita; LCC – carótida comum esquerda; LSCA – artéria subclávia esquerda; Ao – aorta; DA – ducto arterioso; PA – artéria pulmonar. Modificado de Srivastava e Olson (2000).

Tabela 1. Panorama de alguns genes envolvidos diretamente no processo da morfogênese cardíaca*.

Gene	Localização Cromossômica	Papel conhecido na cardiogênese	Proteína	Classificação funcional
<i>NKX2.5</i>	5q35	Diferenciação terminal do miocárdio; Formação do septo interventricular.	NK2 Homeobox 5	Fatores de Transcrição
<i>TBX-5</i>	12q24	Diferenciação do primeiro e segundo campos cardíacos; Formação do Septo interventricular; Diferenciação de segmento posterior cardíaco e atrial, e precursores do ventrículo esquerdo.	T-Box 5	Fatores de Transcrição
<i>ISL-1</i>	5q11.1	Diferenciação do mesoderma cardiogênico em primeiro campo cardíaco.	ISL LIM Homeobox 1	Fatores de transcrição
<i>GATA-4</i>	8p23.1	Regulação inicial da diferenciação cardíaca; Formação do septo interventricular.	GATA4 Binding Protein	Fatores de Transcrição
<i>SMAD4</i>	18q21.2	Atuação conjunta com <i>GATA4</i> é relevante para a formação dos septos cardíacos.	SMAD Family Member 4	Transdutores de sinais
<i>JARID2</i>	6p22.3	Atuação conjunta com <i>NKX2.5</i> regula o desenvolvimento das vias de saída.	Jumonji - AT-Rich Interaction Domain (ARID) Protein	Repressores transcripcionais
<i>SHOX2</i>	3q25.3	Inibição da expressão de <i>NKX2.5</i> , necessária para a formação do nó sinoatrial ou sinusal.	Short Stature Homeobox 2	Reguladores transcripcionais

Continuação Tabela 1

<i>MEF2C</i>	5q14.3	Estabelecimento da identidade da estrutura ventricular.	Myocyte Enhancer Factor 2C	Fatores de transcrição
<i>ZIC3</i>	Xq26.3	Atuação na formação do eixo direito-esquerdo do embrião.	Zinc Finger Transcription Factor Protein	Fatores de Transcrição
<i>CITED2</i>	6q24.1	Relação com a formação dos septos cardíacos.	Cbp/p300- interacting Transactivator.	Coativadores transcripcionais
<i>FOXH1</i>	8q24.3	Associação com a formação do eixo direito-esquerdo do embrião.	Forkhead Activin Signal Transducer	Fatores de Transcrição
<i>NOTCH1</i>	9q34.3	Formação das valvas aórticas; Divisão simétrica do eixo direito-esquerdo.	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1	Transdutores de sinais
<i>MYH6</i>	14q11.2	Formação dos septos cardíacos.	Myosin Heavy Chain 6	Proteínas estruturais
<i>TBX-1</i>	22q11.2	Regulação da diferenciação cardíaca.	T-BOX 1	Fatores de Transcrição
<i>ACTC1</i>	15q14	Codificação de actinas indispensáveis na fisiologia contrátil de células cardíacas.	Alpha-cardiac actin 1	Proteínas Estruturais
<i>TFAP2B</i>	6p12	Estimula a diferenciação de células cardíacas.	AP2-Beta	Fatores de Transcrição

*Baseada nos artigos de Chung e Rajakumar (2016); Kloesel et al. (2016); Fahed et al. (2013); Srivastava e Olson (2000).

1.2 Cardiopatias congênitas

As CCs podem ser definidas como qualquer anormalidade na estrutura e/ou na função cardiocirculatória presente ao nascimento, mesmo quando são descobertas mais tarde (WEBB et al., 2010; MITCHELL et al., 1971). Afetam de 0,5 – 1 % de todos os nativos (FAHED et al., 2013; TREVISAN et al., 2014), constituindo-se como as principais causas de morbidade e mortalidade infantil ao redor do mundo (HOFFMAN; KAPLAN, 2002). Cerca de 27% dos recém-nascidos que vão a óbito devido a defeitos do nascimento apresentam anomalias cardiovasculares (GO et al., 2014). Além disso, as CCs estão presentes em aproximadamente 24% de todos os recém-nascidos com anomalias congênitas que vêm a óbito (ROGER et al., 2011).

Vale ressaltar que a epidemiologia das CCs é norteada por debates (relativos aos critérios adotados nos diagnósticos ao redor do mundo) e carece de uma padronização quanto à inclusão de determinadas alterações no espectro das CCs, havendo estatísticas contrastantes acerca de sua incidência mundial (VAN DER BOM et al., 2011). Além de divergências nos conceitos adotados, um outro fator relevante levou a uma mudança drástica na epidemiologia das CCs: há cerca de 80 anos, dificilmente um indivíduo portador de algum tipo de CC moderada ou grave chegava à vida adulta. Nos últimos anos, com o aprimoramento dos procedimentos diagnósticos durante o período pré-natal, e de métodos cirúrgicos e compreensão científica da medicina cardiovascular, constatou-se um aumento da expectativa de vida de pacientes com a doença (VAN DER BOM et al., 2011). Esta situação traz desafios, principalmente no que tange à triagem clínica/genética e o acompanhamento desses indivíduos, posto que muitos são assintomáticos e podem ser portadores de alguma CC que tenha herança autossômica dominante, podendo transmitir à sua prole uma alteração genética semelhante que contribua na manifestação dessa patologia (LEE; CHUNG, 2015).

Em relação à classificação clínica, as CCs são enquadradas em pelo menos 21 categorias diferentes com lesões anatômicas específicas, entre as quais podemos citar: Comunicação Interventricular (CIV), Comunicação Interatrial (CIA), Tetralogia de Fallot (T4F), Persistência do Canal Arterial (PCA), Estenose Aórtica Valvar (EAo), Estenose da Valva Pulmonar (EVP), Estenose Aórtica Supravalvular (EASV), Defeitos do Septo Atrioventricular (DSAV), Dupla Via de Saída do Ventrículo Direito (DVSVD), Tronco Arterioso (TrA), Transposição de Grandes Artérias (TGA), Coarctação da Aorta (CoAo), Interrupção do Arco Aórtico (IAA), Drenagem Anômala das Veias Pulmonares (DAVP), Janela Aorticopulmonar, Válvula Aórtica Bicúspide (VAB), Anomalia na Artéria Coronária,

Síndrome do Coração Esquerdo Hipoplásico (SCEH), entre outras. Dentre essas, CIV e CIA são os tipos com maior incidência nos recém-nascidos (Figura 2), enquanto a T4F é o tipo mais comum entre as CCs cianóticas (GO et al.,2014; KÄLLEN et al., 1996). A figura 3 ilustra alguns tipos de CCs mais frequentes.

Lopes, Damiano e Zugaib (2005) destacam um estudo onde 8.315 fetos foram analisados pelo exame de ecocardiografia fetal, onde 15,9 % (1.326) apresentaram alterações na forma e/ou função de algum sistema, estando as CCs presentes em 690 desses casos com anomalias (52%). Dentro dessa porcentagem, a Comunicação Interventricular (CIV), uma alteração caracterizada por defeitos no septo ventricular, foi o tipo mais frequente (136 casos em 690). Isso evidencia, juntamente com outras estimativas, a presença dessa alteração entre o grupo com maior incidência.

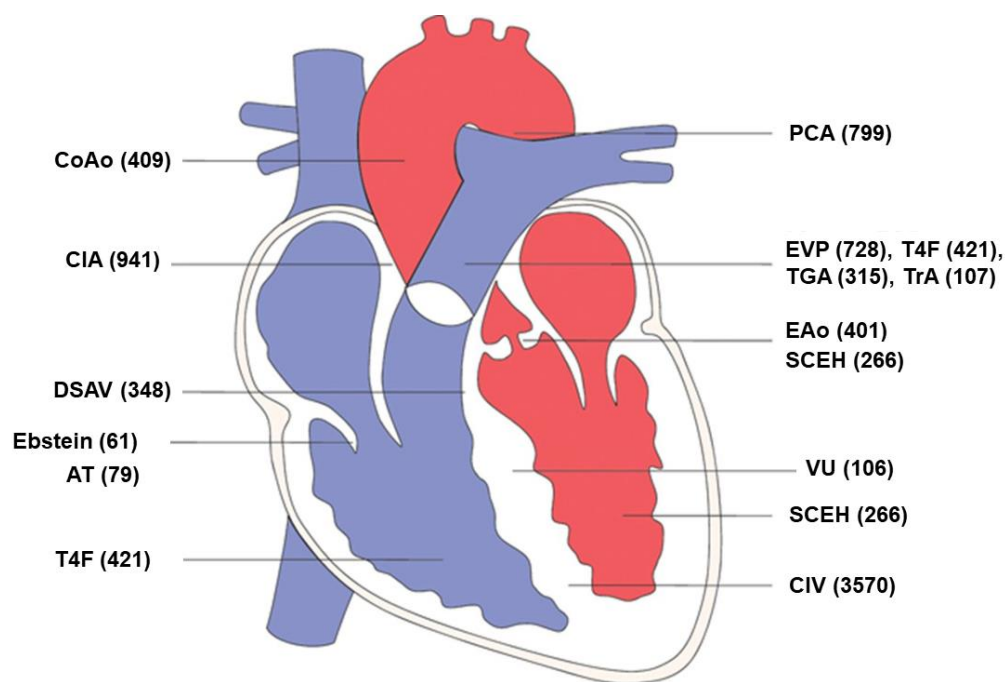


Figura 2. Estimativa da frequência de diferentes tipos de cardiopatias congênitas. Os valores são com base na prevalência de um banco de dados holandês, o CONCOR (que reúne informações epidemiológicas sobre as CCs na Holanda, contando atualmente com 16.600 pacientes cadastrados). São indicadas as localizações anatômicas de cada alteração no coração e os números entre parênteses indicam a prevalência numa proporção para cada 1 milhão de nascidos vivos. Abreviações (língua inglesa): CoAo- Coarctação da Aorta; PCA- Persistência do Canal Arterial; CIA- Comunicação Interatrial; EVP- Estenose Pulmonar; T4F -Tetralogia de Fallot; DSAV - Defeitos do septo atrioventricular; TGA -Transposição de Grandes Artérias; TrA- Tronco Arterioso Persistente; EAO – Estenose Aórtica; SCEH – Síndrome do Coração Esquerdo Hipoplásico; Ebstein – Anomalia de Ebstein; AT – atresia tricúspide; VU – ventrículo único; CIV – Comunicação Interventricular. Modificado de FAHED et al. (2013).

Várias CCs podem ocorrer separada ou concomitantemente com outras levando à diminuição na qualidade de vida, redução da tolerância a exercícios físicos, atraso no desenvolvimento cerebral, hipertensão pulmonar, disfunção muscular, atividade anormal dos nervos, tromboembolia, endocardite, arritmia ou morte (ALONSO-GONZALEZ et al., 2013; DEMIR et al., 2013; DIMOPOLOUS et al., 2014; HOFFMAN et al., 2010; KRÖÖNSTRÖM et al., 2014; ZOMER et al., 2013).

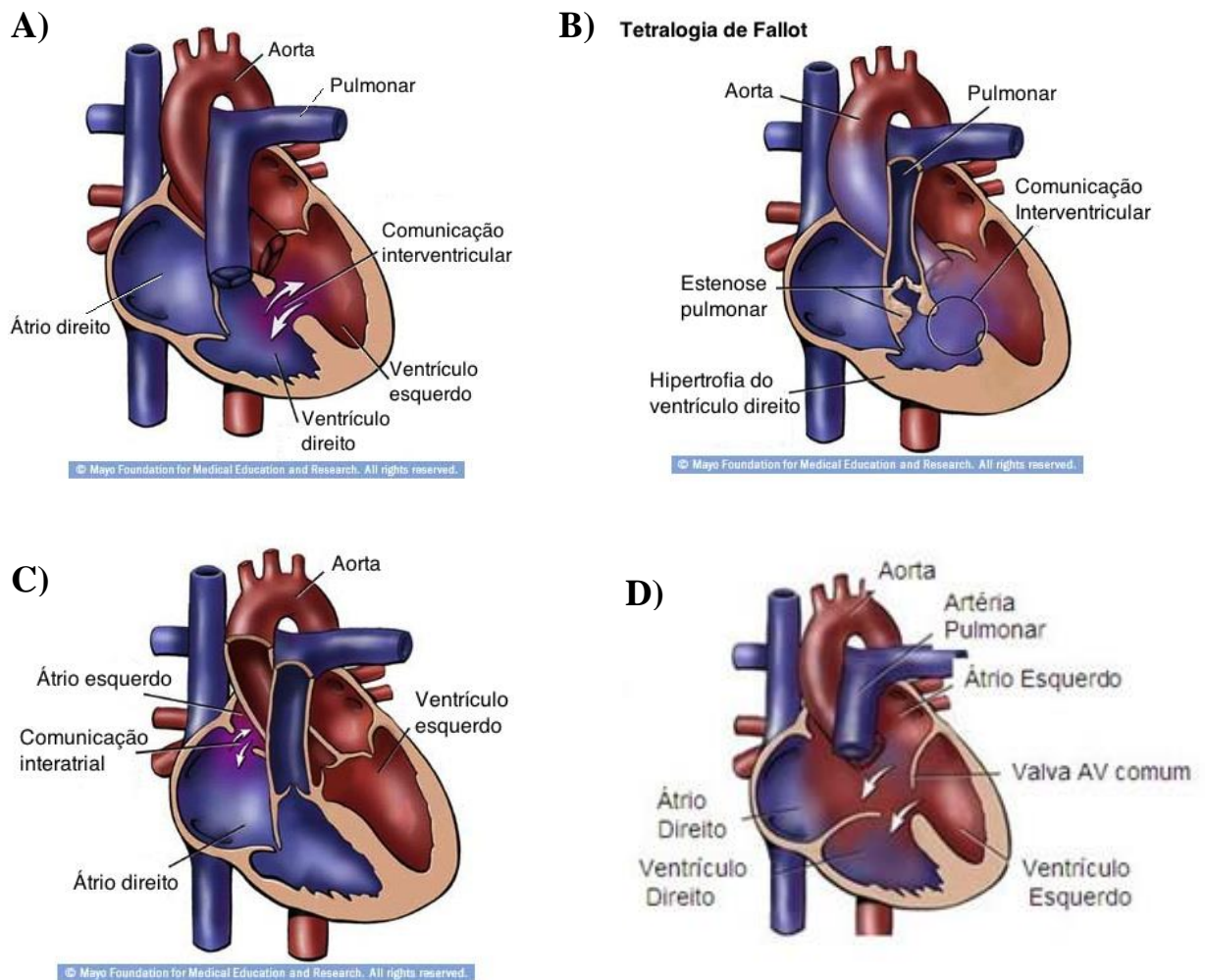


Figura 3. Alterações estruturais em alguns tipos de CCs. Imagens: A) Comunicação interventricular (CIV); B) T4F; C) Comunicação Interatrial e D) Defeitos do Septo Atrioventricular. Destas, a CIV é a mais frequente em recém-nascidos vivos. Modificado de MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION (2017).

As CCs podem ocorrer de maneira isolada (não sindrômicas) ou em conjunto com outras alterações extracardíacas (sindrômicas). Nestas últimas, além da cardiopatia, o paciente pode apresentar sinais dismórficos, alterações craniofaciais, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, além de várias outras alterações congênitas (AZAMIAN; LALANI, 2016).

1.3 Etiologia das cardiopatias congênitas

A etiologia genética de muitas CCs permanece desconhecida. Dentro do que é conhecido até o momento, as CCs surgem devido ao desenvolvimento anormal do coração, podendo ser induzidas por: fatores ambientais (JENKINS et al, 2007); alteração na função gênica (BRUNEAU, 2008); alterações cromossômicas e desequilíbrios citogenômicos (LANDER; WARE, 2014); fatores epigenéticos (VALLASTER et al., 2012); fatores estocásticos (KURNIT et al., 1987); ou pela combinação de múltiplos fatores (PULIGNANI et al., 2013). As alterações estruturais citogenéticas/genômicas e genéticas descritas para as CCs incluem: variação no número de cópias (CNVs) genômicas; mutações *de novo*; um grande número de mutações pontuais; alteração na expressão de genes específicos e mutações somáticas, evidenciando mais de 60 genes associados às CCs (AL TURKI et al., 2014; BRECKPORT et al., 2012; DIGILIO et al., 2013; FAHED et al., 2013; JIANG et al., 2013; LAN et al., 2013; LIU et al., 2014; SANCHEZ-CASTRO et al., 2013; WEI et al., 2014). Além disso, as causas genéticas conhecidas exibem extrema heterogeneidade de *loci* e representam menos de 15 % das CCs (GROSSMAN et al., 2011; HITZ et al., 2012; YUAN et al., 2013; ZAIDI et al., 2013), indicando que ainda existem grandes lacunas sobre a compreensão da etiologia dessas cardiopatias (MITCHELL et al., 2007).

Aneuploidias, desequilíbrios citogenômicos e alterações cromossômicas microscópicas, por exemplo, estão subjacentes à etiologia genética de CCs (AZAMIAN; LALANI, 2016). Muitas dessas alterações apresentam quadro sindrômico clínico e genético mais bem definidos e, conseqüentemente, a causalidade da alteração cardíaca presente pode ter uma explanação mais evidente. As principais síndromes genéticas associadas às CCs estão sumarizadas na Tabela 2, onde há a descrição tanto de síndromes de microdeleção/microduplicação conhecidas, quanto de alterações cromossômicas estruturais e numéricas em escala microscópica. Adicionalmente, alterações em genes únicos (*Single – gene disorders*) podem ser cruciais na etiologia de CCs sindrômicas (Tabela 2). No que diz respeito às CCs que ocorrem de forma isolada (não sindrômicas), elas são relatadas na literatura científica por

serem mais frequentes quando comparadas às de espectro síndrômico. Muitas dessas anormalidades estão relacionadas também com alterações monogênicas, onde mutações em apenas um gene pode desencadear o desenvolvimento de algum tipo da doença (Tabela 3). Destaca-se que muitos desses genes estão envolvidos na morfogênese cardíaca (vide tabela 1).

Tabela 2. Resumo das principais alterações genéticas conhecidas associadas às CCs síndrômicas*.

ANEUPLOIDIAS			
Síndrome	Tipo de CCs**	Frequência de CCs (%)	Anomalias extracardíacas
Trissomia do 21 (Síndrome de Down)	DSAV, CIV, CIA, T4F	45 – 50	Características faciais típicas, hipotireoidismo, deficiência intelectual, hipotonia, atresia duodenal, doença de Hirschsprung
Síndrome de Turner (45, X)	VAB, CoAo, SCEH	30-32	Baixa estatura, disgênese gonadal, pescoço alado, anomalias renais
Trissomia do 18 (Síndrome de Edwards)	Doença Polivalvular, CIV, CIA, PCA, DVSVD, Defeitos dos coxins endocárdicos	80-100	Atraso no crescimento, mãos e punhos cerrados, pés dismórficos (tipo <i>Rocker – Feet</i>), onfalocele, deficiência intelectual severa
Trissomia do 13 (Síndrome de Patau)	CIA, CIV, PCA, DVSVD, T4F, CoAo	80	Fissura labiopalatina, microftalmia, defeitos no couro cabeludo, holoprosencefalia, polidactilia pós-axial, atraso no crescimento, deficiência intelectual severa

Continuação Tabela 2

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS MICROSCÓPICAS			
Síndrome	Tipo de CCs**	Frequência de CCs (%)	Anomalias extracardíacas
Deleção 4p16.3 (Síndrome de Wolf-Hirschhorn)	CIA, EVP, T4F, CIV, PCA	50	Dismorfismos craniofaciais (do tipo “capacete de guerreiro grego”), deficiência intelectual, dificuldades na alimentação, convulsões, malformações no trato urinário, anomalias cerebrais estruturais
Monossomia de 5p (Síndrome de Cri-du-chat)	PCA, CIV, CIA, T4F, Atresia pulmonar	29	Choro agudo e semelhante a miado de gatos, fácies arredondadas, hipertelorismo, micrognatia, microcefalia, deficiência intelectual
Deleção de 11q (Síndrome de Jacobsen)	CIV, CIA, TrA, DVSVD, VAB, EAo, SCEH, Estenose Mitral, CoAo	56	Sinais dismórficos, trombocitopenia, estenose pilórica, atresia anal, pâncreas anular, malrotação intestinal, atraso no crescimento, deficiência intelectual
Tetrassomia Parcial de 22q Inv dup (22) (q11) (Síndrome <i>Cat eye</i> – Olho de gato)	DAVP, T4F, EVP, Atresia tricúspide, SCEH	50 – 67	Coloboma, atresia anal, atresia biliar, malrotação intestinal, sinus ou apêndices preauriculares, malformações renais

Continuação Tabela 2

DESEQUILÍBRIOS CITOGENÔMICOS (SUBMICROSCÓPICOS)			
Síndrome	Tipo de CCs**	Frequência de CCs (%)	Anomalias extracardíacas
Deleção de 22q11.2 (Síndrome de DiGeorge)	IAA Tipo B, Anomalias do Arco Aórtico, TrA, T4F	75	Paratireóide e timo hipoplásicos, hipocalcemia, imunodeficiência, dismorfismo, insuficiência palatina, anomalias renais, transtornos na aprendizagem e psiquiátricos
Deleção de 7q11.23 (Síndrome de Williams – Beuren)	EASV, Estenose Pulmonar Periférica	75	Personalidade bem sociável, hipercalcemia, sinais dismórficos, deficiência intelectual
Deleção 8p23.1	DSAV, CIA, EVP, T4F	75 – 94	Hérnia diafragmática congênita
Deleção 1p36	Defeitos nos septos, PCA, CoAo, T4F, Cardiomiopatias	70	Características dismórficas, perda auditiva neurossensorial, convulsões, deficiência intelectual, anomalias no cérebro
Deleção 1q21.1	CoAo, IAA Tipo A, IAA Tipo B, VAB, Aortopatias, CIV, TrA, TGA, CoAo, PCA	10 – 25	Microcefalia, atraso global do desenvolvimento
Duplicação 1q21.1	T4F	20	Macrocefalia, atraso global do desenvolvimento
Deleção 17p11.2 (Síndrome de Smith – Magenis)	Defeitos nos Septos Cardíacos, T4F, EVP, Atresia Pulmonar, DAVP	~30	Dismorfismos, falhas no crescimento, hipotonia, deficiência intelectual, distúrbios do sono, comportamentos autoinjuriantes
Duplicação 17p11.2 (Síndrome de Potocki – Lupski)	Defeitos nos septos, Anomalias de condução, VAB, SCEH	40	Dismorfismos, hipotonia, deficiência intelectual, transtorno do espectro autista
Deleção 17p13.3 (Síndrome de Miller-Dieker)	Defeitos nos Septos Cardíacos, T4F, PCA	20	Paquigiria e agiria cerebrais, lissencefalia Tipo 1,

Continuação Tabela 2

			agenesia/disgenesia do corpo caloso, microcefalia, convulsões, dismorfismos, deficiência intelectual
Deleção 9q34.3 (Síndrome de Kleeftstra)	Defeitos nos Septos, EVP, VAB, PCA	40	Braquicefalia, sinofre, lábio superior “arco de cupido”, mandíbula proeminente, hipotonia, deficiência intelectual, epilepsia, anormalidades do comportamento
Deleção 15q26qter	CIV, CIA, CoAo, SCEH, Eao	~66	Atraso no crescimento, microcefalia, deficiência intelectual, hérnia diafragmática congênita
Deleção 17q21.31 (Síndrome de Koolen-de Vries)	Defeitos nos Septos, EVP, VAB	39	Fácies longas, fendas palpebrais oblíquas para cima, pregas epicânticas, nariz tubular, orelhas grandes e proeminentes, deficiência intelectual

SÍNDROMES POR MUTAÇÕES EM GENES ÚNICOS (*Single-Gene Disorders*)

Síndrome	Tipo de CCs**	Frequência de CCs (%)	Anomalias extracardíacas
Alagille	Hipoplasia pulmonar periférica, EVP, T4F	>90	Escassez de ductos biliares e colestase, anormalidades esqueléticas, doenças oculares, características faciais distintas
Noonan	EVP, CIA, CIV, PCA	80	Características faciais dismórficas, baixa estatura, pescoço alado, deformidade em <i>pectus</i> , <i>cubitus valgus</i>
Holt-Oram	CIA, CIV, PCA	85	Disformismos nos membros superiores
Char	PCA	100	Dismorfismos faciais distintos, anomalias nos membros
Ellis-van Creveld	Átrio único, CIA	60	Displasias esqueléticas (membros curtos, costelas curtas, polidactilia)

			pós-axial, unhas e dentes displásicos
Costello	EVP, Hipertrofia cardíaca, Alterações no ritmo cardíaco	63	Dismorfismos faciais típicos, baixa estatura, falhas no crescimento, doenças cardíacas, atraso no desenvolvimento
Cardiofaciocutânea	EVP, CIA, Cardiomiopatia hipertrófica	71	Disformismos faciais distintivos, deficiência intelectual
CHARGE	T4F, CIA, CIV	85	Atresia de coanas, coloboma, deficiência intelectual
Duane (Síndrome de Okihiro)	CIV, Forame oval patente, T4F	Não conhecida	Malformações renais, malformações no antebraço, anomalia ocular de Duane
Kabuki	CIV, CIA, T4F, Ventrículo Único, CoAo, PCA, TGA, Bloqueio do Ramo Direito	31-55	Deficiência intelectual, nanismo pós-natal, dismorfismos faciais típicos, anomalia espinhal, fissura palatal, otite recorrente AD (à direita)
Cornelia de Lange	EVP, DSAV	33	Atraso global do desenvolvimento, microcefalia, deficiência intelectual, dismorfismos faciais, sinofre, micrognatia
Smith-Lemli-Opitz	CIA, DAVP	44	Múltiplas anomalias congênitas, genitália ambígua, etc.

*Baseada nos artigos de AZAMIAN e LALANI (2016); LALANI (2015); RUSSEL e HANNIBAL (2015); FAHED et al. (2013).

** Destaca-se que nem todas as alterações se enquadram como Cardiopatias Congênitas (CCs). CIA= comunicação interatrial; CIV= comunicação interventricular; CoAo = coarctação aorta; DAVP = drenagem anômala das veias pulmonares; DSAV = defeitos do septo atrioventricular; DVSVD = dupla via de saída do ventrículo direito; EAo = estenose aórtica valvar; EASV = estenose aórtica supra-avalvular; EVP = estenose da valva pulmonar; IAA=interrupção do arco aórtico; PCA = persistência do canal arterial; SCEH = síndrome do coração esquerdo hipoplásico; T4F = tetralogia de Fallot; TGA = transposição das grandes artérias; TrA = tronco arterioso; VAB = válvula aórtica bicúspide.

Tabela 3. Alterações em genes específicos (*Single-gene disorders*) associados às CCs não sindrômicas ^a

Gene	OMIM ^b	Locus	Cardiopatía Congênita^c
<i>GATA4</i>	600576	8p23.1	CIV, T4F, DSAV, CIA
<i>GATA5</i>	611496	20q13.33	DSAV
<i>GATA6</i>	601656	18q11.2	CIA, DSAV, T4F, TAC
<i>NKX2.5</i>	600584	5q35.1	CIA, CIV, T4F, TAC, SCEH
<i>NKX2.6</i>	611770	8p21.2	TAC, Defeitos Conotruncais
<i>TBX1</i>	602054	22q11.21	T4F
<i>TBX20</i>	606061	7p14.2	CIA
<i>NODAL</i>	601265	10q22.1	Heterotaxia
<i>GDF1</i>	602880	19p13.11	T4F, TGA
<i>NOTCH1</i>	190198	9q34.3	Doenças da Valva Aórtica
<i>JAG1</i>	601920	20p12.2	T4F
<i>ZFPM2</i>	603693	8q23.1	T4F
<i>ELN</i>	130160	7q11.23	EASV
<i>GJA1</i>	121014	6q22.31	DSAV, SCEH
<i>MED13L (PROSIT240)</i>	608771	12q24.21	TGA

^a Modificado de MUNTEAN, TOGANEL e BENEDEK (2016).

^b *Online Mendelian Inheritance in Man* (disponível em www.omim.org)

^c CIA= comunicação interatrial; CIV= comunicação interventricular; DSAV = defeitos do septo atrioventricular; EASV = estenose aórtica supra-avalvular; SCEH = síndrome do coração esquerdo hipoplásico; T4F = tetralogia de Fallot; TAC = tronco arterioso *communis*; TGA = transposição das grandes artérias.

As CNVs, e sua relação com as CCs, têm obtido maior investigação da comunidade científica nos últimos anos, principalmente pela disponibilidade de novas tecnologias que possibilitam a sua caracterização com maior acurácia (COSTAIN; SILVERSIDES; BASSETT, 2016). Segundo Zarrei et al. (2015), uma CNV pode ser definida como “um segmento genômico de no mínimo 50 pares de bases (pb) que difere em número de cópias quando comparado com um ou mais genomas de referência”. Carvalho e Lupski (2016) complementam essa definição destacando que CNVs são variantes estruturais que incluem deleções, duplicações, triplicações e até quadruplicações, que variam de tamanho desde o tamanho médio de um éxon (50-200 pb) até vários megabases (Mb) de sequências de DNA. As CNVs podem conter genes, por exemplo, que sejam haploinsuficientes (sendo afetados quando há deleções) e/ou que são sensíveis ao aumento da dosagem (no caso de duplicações, triplicações e quadruplicações), possuindo importância em alterações fenotípicas. Esses autores ainda acrescentam que uma característica dessas variantes é não serem detectadas por estudos cromossômicos que se utilizam de cariótipos convencionais (que possuem um limiar de detecção maior ou igual a 5 Mb).

Dentro dos fatores etiológicos genéticos conhecidos, estima-se que as CNVs contribuem com aproximadamente 10% na etiologia genética de CCs esporádicas (LEE; CHUNG, 2015) e aproximadamente 20% nas síndromicas (AZAMIAN; LALANI, 2016). Investigações de alguns grupos mostram que aproximadamente 78% das causalidades das CCs ainda são desconhecidas (MARIAN, 2014; LEE; CHUNG, 2015). Isto sugere que esse valor pode estar subestimado e que podem haver outras CNVs relacionadas ao espectro fenotípico da patologia, considerando as evidências de pesquisas recentes que têm demonstrado essas variações como uma causa genética extremamente importante na etiologia das mesmas, sendo detectadas em muitos estudos e em diferentes populações (AL-HASSNAN et al., 2018; SVIRSKY et al., 2018; WANG et al., 2018; SHANSHEN; ROSENBERG; BERGEN, 2017; WU et al., 2017; AZAMIAN; LALANI, 2016; COSTAIN et al., 2016; COSTAIN; SILVERSIDES; BASSETT, 2016; MLYNARSKI et al., 2016; CAMPOS et al., 2015; EL MALTI et al., 2015; ZHU et al., 2016; HUBER et al., 2014; LANDER; WARE, 2014; PIRES et al., 2014; WARBURTON et al., 2014; SYRMOU et al., 2013; HITZ et al., 2012; PRIEST et al., 2012; BRECKPOT et al., 2011; FAKHRO et al., 2011; GREENWAY et al., 2009).

Outro fator para tal afirmação se embasa na evidência de que a triagem de deleções exônicas pequenas em genes específicos (relacionados ao espectro síndromico de CCs) pode estar abaixo do limiar detectável pelas plataformas de *array CGH* disponíveis comercialmente no momento em que algumas pesquisas foram realizadas, sugerindo que a porcentagem de

CNVs causais pode ser maior (AZAMIAN; LALANI, 2016).

Muitas CNVs raras na população têm sido identificadas como patogênicas em uma variedade de doenças humanas, sendo também associadas aos defeitos congênitos. Uma CNV comum é a duplicação do gene *SLC2A3*, a qual foi associada o risco aumentado para CCs na Síndrome de Deleção 22q11 (22q11SD) (MLYNARSKI et al., 2015). No entanto, não está claro, por exemplo, se CNVs raras estão envolvidas na etiologia das CCs em indivíduos com 22q11SD (MLYNARSKI et al., 2016).

Estudos genéticos mostram a associação de mutações em diversos genes e regiões cromossômicas a CC sindrômicas e não sindrômicas (ØYEN et al, 2009). Assim, já foram identificadas mutações em mais de 20 genes associados às CC esporádica ou familiar (não sindrômica), e duas vezes mais nas CC sindrômicas (BARRIOT et al, 2010). As mutações pontuais têm sido descritas como um importante fator etiológico na gênese de CCs, envolvendo genes que estão ligados ao processo da cardiogênese. Tais alterações genéticas podem gerar, por exemplo, perda de função (*loss-of-function mutations*) das proteínas codificadas por esses genes, interferindo na normalidade do desenvolvimento cardíaco. Investigações de alteração ao nível da sequência nucleotídica de amostras de coortes com CCs têm evidenciado mutações nos genes *MEF2C* (LU et al., 2018), *HNRNPA1* (YU et al., 2018), *TBX1* (ZHANG et al., 2017), *NKX2.5* (XU et al., 2017), *MESP1* (ZHANG, et al., 2017), *TBX20* (HUANG et al., 2017), *HAND2* (LU et al., 2015), *GATA6* (ZHENG et al., 2012), *GATA4* (LIU et al., 2011), *GDF1* (KARKERA et al., 2007), entre outros, levando ao surgimento de diversos tipos de CCs.

Adicionalmente, fatores epigenéticos (metilação do DNA, modificações nas histonas), RNAs não codantes (por exemplo, microRNAs) e fatores ambientais (exposição ao álcool, fumo, e outros agentes tóxicos e/ou mutagênicos) podem contribuir na gênese de diversos tipos de CCs, evidenciando a multifatorialidade desta patologia e uma modulação extremamente complexa de vias biológicas durante a cardiogênese (MUNTEAN et al., 2016; POSTMA et al., 2016; VECOLI et al., 2014).

1.3.1 A síndrome de deleção 22q11.2

A síndrome de deleção na região 22q11.2 (22q11.2DS; “Velocardiofacial/DiGeorge Syndrome”; VCFS/DGS; OMIM #192430; #188400) é a deleção mais comum associada a anomalias cardíacas congênicas (Figura 4) (McDONALD-McGINN et al., 2015). A apresentação fenotípica da 22q11DS é altamente variável, sendo os Defeitos Conotruncais e do Arco Aórtico as principais CCs encontradas. Aproximadamente 60 – 75 % dos pacientes com 22q11.2DS apresentam CCs (MLYNARSKI et al., 2016). Por ser uma síndrome de deleção com um espectro fenotípico altamente variável, a literatura científica nos permite também hipotetizar que há pacientes diagnosticados com cardiopatias não sindrômicas e que podem apresentar a deleção em 22q11.2 (McDONALD-McGINN et al., 2015). Mesmo que não apresentem outras alterações relacionadas à deleção, os filhos dos indivíduos que possuem a deleção têm a probabilidade aumentada de herdar tal alteração estrutural e apresentar os outros traços fenotípicos característicos.

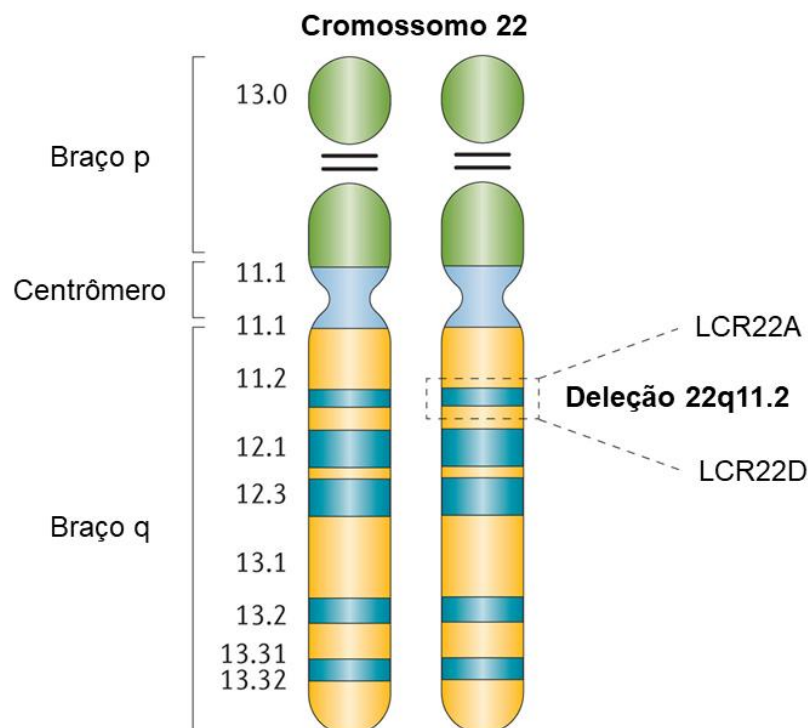


Figura 4. Representação esquemática do cromossomo 22. A região tracejada (22q11.2) evidencia a típica deleção, resultante de recombinação homóloga não alélica (NAHR) entre as LCRs (*Low Copy Repeats*) A e D. Geralmente esta deleção apresenta o tamanho típico de 3 Mb (Modificado de McDONALD-McGINN et al., 2015).

1.4 Investigações genéticas das CCs e tecnologias citogenômicas

Os recentes avanços nas tecnologias genômicas e suas aplicações em grandes coortes levaram a uma melhor compreensão das anomalias genéticas específicas que fundamentam as CCs. Dentre as ferramentas que podemos utilizar no estudo da arquitetura genética das CCs, podemos destacar: a MLPA (“*Multiplex Ligand-Dependent Probes Amplification*”), o Sequenciamento de Exoma (*Exome Sequencing*) e as plataformas de *array* CGH e SNP *arrays* (Análise Cromossômica por Microarranjos – CMA). Estas ferramentas permitem detectar desequilíbrios genômicos submicroscópicos (menores que 5 Mb), não detectáveis no cariótipo convencional. Os princípios, aplicações e limitações de cada técnica estão a seguir.

1.4.1 MLPA – *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*

Esta técnica se baseia na ligação e consequente amplificação de múltiplas sondas em diferentes regiões do genoma, permitindo a detecção de deleções e duplicações, simultaneamente, de CNVs já conhecidas (SCHOUTEN et al., 2002). Através da hibridação de sondas específicas e amplificação por PCR, esta técnica permite a identificação do número de cópias de uma dada sequência de DNA. Essas sondas apresentam dois segmentos complementares às sequências-alvo de DNA: um oligonucleotídeo sintético curto e um oligonucleotídeo sintético longo derivado do bacteriófago *M13*. Este contém uma sequência *stuffer* que varia de tamanho nas diferentes sondas, permitindo a separação dos diferentes fragmentos por eletroforese capilar. Os kits utilizados são compostos de até 40 pares de sondas permitindo assim a análise simultânea de diversas regiões. Inicialmente as sondas são hibridizadas ao DNA e em seguida os fragmentos são ligados por uma ligase. Após uma nova desnaturação, o fragmento formado pela junção das sondas é amplificado por PCR. A reação de PCR é realizada com um único par de primers, comum a todas as sondas (SCHOUTEN et al., 2002). Em seguida os fragmentos são submetidos à eletroforese capilar e os resultados analisados com *software* específico.

A limitação da técnica é amplificar somente as regiões que são cobertas pelas sondas, não permitindo a detecção de outras regiões que possam estar alteradas e que não recebam a ligação das respectivas sondas. Esta técnica é semiquantitativa e pode detectar alterações no número de cópias genômicas, identificando aberrações genéticas muito pequenas que escapam a outras técnicas mais convencionais (SELLNER; TAYLOR, 2004).

Estudos recentes identificaram CNVs em pacientes com CCs através da técnica de MLPA, evidenciando o monitoramento relativo do número de CNVs que podem estar

relacionadas aos fenótipos observados (EL MALTI et al., 2015; ZHANG et al., 2015; CAMPOS et al., 2015; D'ANGELO et al., 2014; PIRES et al., 2014; MADEMONT-SOLER et al., 2012; SØRENSEN et al., 2012; SØRENSEN et al., 2010). Estes trabalhos ressaltaram a MLPA como uma das técnicas que podem ser utilizadas em uma triagem inicial de deleções/duplicações. O diagnóstico precoce de CNVs patogênicas em indivíduos com cardiopatias congênitas sindrômicas e não sindrômicas contribui para uma prevenção da morbidade e consequente redução da mortalidade de pacientes com essa patologia (CAMPOS et al., 2015). Adicionalmente, é uma técnica relativamente acurada e eficiente na confirmação de muitas alterações encontradas por hibridação genômica comparativa em microarranjos (*array-CGH*), por exemplo, sendo uma possibilidade mais acessível economicamente em estudos que visem determinar a origem de CNVs presentes em regiões de conhecida relevância clínica, além de permitir uma aferição no que se refere à herança parental ou à origem *de novo* (HILLS et al., 2010).

1.4.2 Análise cromossômica por microarranjos (CMA – *Chromosomal Microarray Analysis*)

A análise cromossômica por microarranjos (CMA, do inglês “*Chromosomal Microarrays Analysis*”) é um método de detecção de CNVs (deleções e duplicações), sendo capaz de apontar genes e/ou regiões candidatas, além de fornecer pontos de quebra das alterações (Figura 5) (localização genômica – início e término de uma dada região genômica com base em um genoma de referência) e, conseqüentemente, o tamanho exato dessas alterações (SANCHEZ-CASTRO et al., 2014). Existem, basicamente, dois tipos de CMA: o *array-CGH* (Hibridação Genômica Comparativa em *arrays*) e as plataformas baseadas em SNPs, os denominados *SNP arrays* (do inglês “*Single Nucleotide Polymorphisms*”). Com o aperfeiçoamento da resolução de cobertura destas sondas, essas plataformas têm sido disponibilizadas comercialmente de maneira conjugada, como um *aCGH-SNP arrays*, sendo capaz de detectar tanto o número, tamanho e a localização das CNVs, quanto a perda de heterozigidade (LOH) de regiões genômicas (KRUZKA et al., 2015).

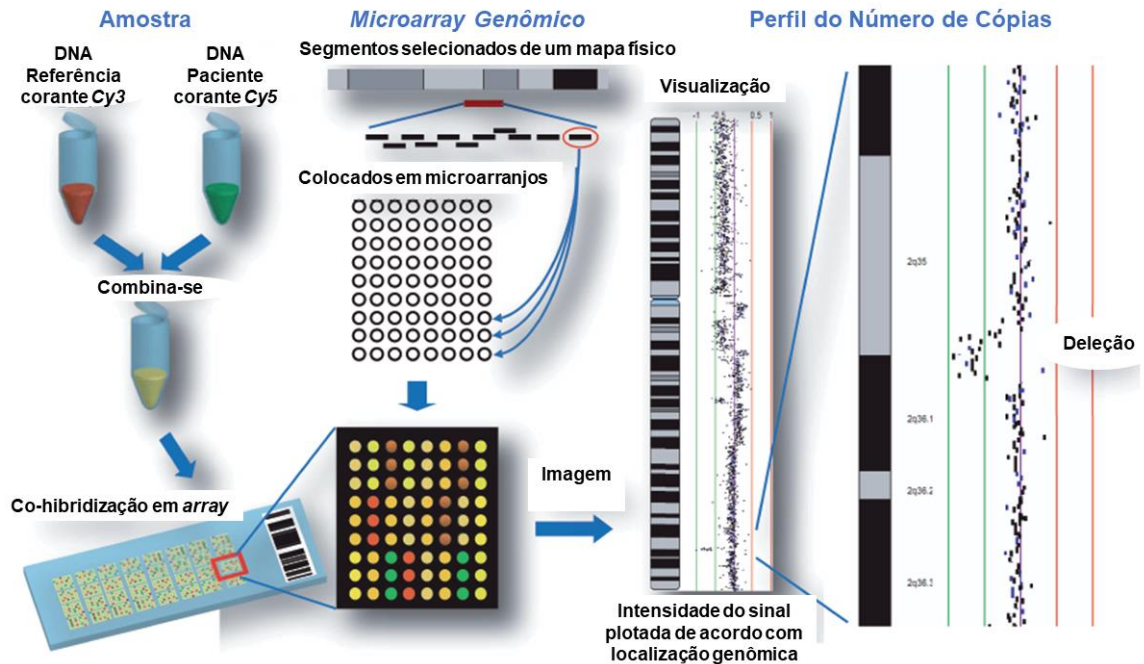


Figura 5. Princípios gerais da técnica de array - CGH. As amostras do paciente e a referência são coradas diferencialmente: o corante *Cyanine-3* é utilizado para a referência, enquanto *Cyanine-5* marca a amostra do paciente. Após a coloração, as duas amostras são misturadas em um mesmo tubo e co-hibridizadas em uma lâmina contendo microarranjos de um genoma de referência. Esses microarranjos, pequenos oligonucleotídeos de DNA, estão espalhados por vários “pocinhos” nessa lâmina. As amostras hibridizam, por complementação de sequência, com sondas dispostas na lâmina. Cada “pocinho” possui uma intensidade de sinal, emitida conforme a presença ou ausência de determinadas sequências de DNA. Essa emissão de sinal é traduzida em escala logarítmica e gera uma imagem com a localização genômica das alterações encontradas (deleções ou duplicações). Modificada de CHARI et al. (2005).

A utilização da técnica de CMA tem levado ao aumento da detecção de desequilíbrios genômicos, colocando-os como fatores que influenciam diretamente na manifestação de muitas CCs (PIRES et al., 2014). Além do mais, essa metodologia permite a identificação de rearranjos cromossômicos submicroscópicos com uma alta resolução (5 kb) em todo o genoma do indivíduo, sendo uma ferramenta adequada na caracterização de regiões genômicas que sofreram alterações estruturais e que não foram detectadas pela citogenética convencional ou mesmo por outras técnicas moleculares como a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) (CARTER; VETRIE, 2004; FERGUSON-SMITH, 2008; SHARKEY et al., 2005). Além disso, permite a determinação dos tamanhos de CNVs em pacientes com patologias específicas, sendo utilizados em diversas pesquisas com pacientes portadores de CCs, maioritariamente em indivíduos com alterações sindrômicas, mas também alguns casos de pacientes não sindrômicos (XIE et al., 2017; WANG et al., 2017; JANSEN et al., 2016; LANDIS; WARE, 2016; MLYNARSKI et al., 2016; ZHU et al., 2016; SYRMOU et al., 2013; PRIEST et al., 2012). Ademais, possibilita a proposição e inferência de genes e *loci*

candidatos (FAHED et al., 2013).

Um grande desafio tem sido a interpretação da relevância clínica das CNVs encontradas nos resultados dessas plataformas de CMA. Geralmente, as empresas que comercializam essas plataformas disponibilizam *softwares* para a realização da etapa denominada *CNV Calling*, onde há uma seleção prévia e análise das CNVs que apresentem alguma relevância para serem reportadas. Entretanto, esses resultados precisam ser reanalisados um a um por outras ferramentas disponíveis na Internet, a fim de contribuir para uma análise e confiabilidade mais acuradas (NOOR e STAVROPOULOS, 2015).

Ferramentas de bioinformática e Bancos de Dados disponíveis *online* têm sido utilizados na interpretação da relevância clínica das CNVs (Tabela 4) que podem ser classificadas principalmente como: benignas, patogênicas ou de significado clínico incerto (VOUS) (KRUSZKA et al., 2015; LEUNG et al., 2010). Essas análises consideram, por exemplo, a localização genômica dessas CNVs (com base em um genoma de referência), seu conteúdo gênico, a função dos genes ali presentes, a sobreposição com regiões já conhecidas por terem relevância clínica, a frequência dessas CNVs em indivíduos saudáveis, a sensibilidade dos genes à alteração de sua dosagem, entre outros aspectos (MacARTHUR et al., 2014; DE LEEUW et al., 2012; BRECKPOT et al., 2011). Os aspectos a serem considerados na classificação de CNVs podem variar consideravelmente conforme o espectro fenotípico que se está trabalhando. Dentro disso, Breckpot et al. (2011) apontam desafios na interpretação de CNVs associadas às CCs, enfatizando que alterações encontradas em pesquisas anteriores podem ser reclassificadas quando se considera o algoritmo que eles propõem. Esses autores chegaram à conclusão de que a frequência de CNVs causais (relevantes ao fenótipo patológico) em probandos não síndrômicos é mais baixa do que em síndrômicos, alertando que esses desequilíbrios genômicos devem ter os efeitos de seu tamanho e de sua penetrância considerados.

Tabela 4. Resumo dos principais bancos de dados *online* utilizados na classificação de CNVs*.

Plataforma	Tipo de dados	Nº de estudos/submissões	Nº de entradas	Links
DGV	Variantes estruturais genômicas vistas em controles normais da população	67	> 6 milhões	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home
ClinVar	Variações de Sequências e variantes estruturais com informações e relevância clínicas atribuídas pelo submetedor (se disponível)	> 350 submetedores	> 158,000	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
DECIPHER	Variações de Sequências e variantes estruturais com informações e relevância clínicas atribuídas pelo submetedor (se disponível)	>240 submetedores	>24,000 casos	https://decipher.sanger.ac.uk/
ECARUCA	Contém dados clínicos e citogenéticos de anomalias cromossômicas raras	Sete Centros que submetem os dados	>4800 casos, 6700 anomalias	http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp
ClinGen Dosage sensitivity map	Banco de dados curado, com regiões e genes sensíveis à dosagem	Não disponível	> 600 genes/regiões curadas	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/

*Modificado de NOOR e STAVROPOULOS (2015).

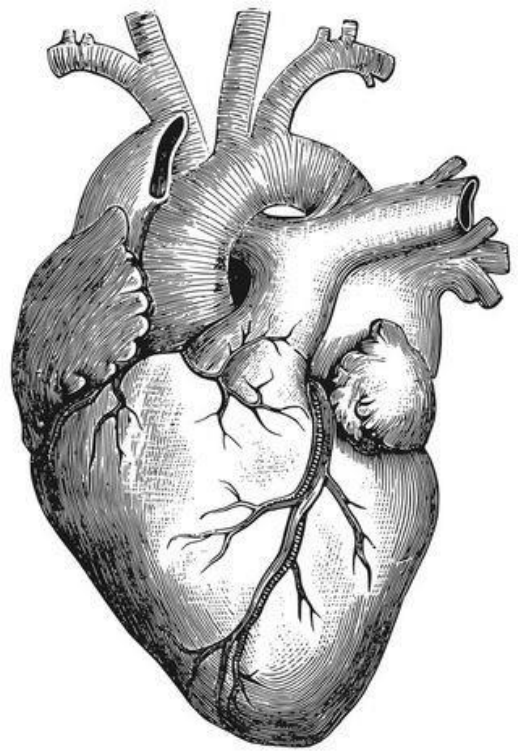
Vale ressaltar que uma limitação desta técnica é a não detecção de rearranjos cromossômicos equilibrados, inversões, níveis baixos de mosaicismo e nem de mutações pontuais (por exemplo do tipo *indels*). Muitas das alterações encontradas e descritas na literatura (caracterizadas pela CMA) podem conter mutações não detectada pela técnica, abrindo possibilidades de novas investigações futuras como o sequenciamento de exoma.

A disponibilidade de novas técnicas genômicas (especialmente de NGS – “*Next – Generation Sequencing*” ou Sequenciamento de Nova Geração) permitiu abordagens poderosas, eficientes e relativamente econômicas para discernir os fatores genéticos que contribuem para várias doenças humanas (COOPER et al., 2010; NG et al., 2009; NG et al., 2010; ROACH et al., 2010), incluindo as CCs (ZAIDI et al., 2013). Dentro dessas tecnologias, temos, por exemplo, o sequenciamento de exoma, direcionado a obter sequências

exônicas de genes específicos ou de todo o exoma (neste último caso chamado de *Whole Exome Sequencing* – WES).

Sifrim et al. (2016) realizaram o sequenciamento de exoma em 1891 probandos, em grupo de indivíduos com CCs síndrômicas e não síndrômicas, identificando uma arquitetura genética familiar distinta entre CCs síndrômicas e não síndrômicas. Eles evidenciaram que em cardiopatias síndrômicas muitas das variantes são majoritariamente *de novo* e associadas a genes conhecidos por sua relação com a doença. Enquanto muitas das variantes encontradas em não síndrômicos revelaram uma herança de pais não afetados e com conteúdo gênico associado mais diretamente à cardiogênese.

Em outro estudo, usando sequenciamento do exoma em trios (pai-mãe-probando) em uma série de casos de CCs e controles, foi observado um excesso substancial de variantes *de novo* patogênicas em genes que codificam proteínas envolvidas na modificação da histona, incluindo, por exemplo, o gene *SMAD2* (ZAIDI et al., 2013). Estes dados sugerem que mutações em genes envolvidos com a regulação epigenética podem ser a causa de 10% de todas as CCs, embora coortes muito maiores são necessárias para caracterizar as variantes causais específicas e suas correlações fenotípicas. Outros pesquisadores estão se concentrando na identificação de fenótipos subclínicos nos pais, o que pode facilitar a identificação de variantes causais e acelerar a atribuição de patogenicidade (WANG et al., 2013). Como a utilização de testes genéticos e o número de genes a serem testados para as CCs estão se expandindo, a detecção de múltiplas variantes raras em um indivíduo se torna mais factível, colocando as CNVs como alvos importantes na investigação por sequenciamento de exoma. Pfundt et al. (2016) destacam a relevância clínica da abordagem desse tipo de sequenciamento e sua poderosa capacidade de detecção de variantes raras, com relativa eficácia na caracterização de variantes em grandes coortes com doenças genéticas. Tal avanço tem permitido uma melhor definição da arquitetura genética das CCs.



JUSTIFICATIVA

1.5 Justificativa

Até o momento, poucos estudos foram realizados sobre as causas genéticas de CCs no Brasil (TREVISAN et al., 2014). De acordo com um estudo realizado por Guitti (2000), a prevalência de CCs no país é semelhante a outras partes do mundo, isto é, 5.5 por 1.000 nascidos vivos. Dentro da literatura científica analisada na revisão de literatura anterior, constata-se que evidências agregadas reforçam uma contribuição genética relevante na origem das CCs. Desse modo, são de grande importância as investigações sobre as possíveis causas genéticas que influenciam as CCs e seu relacionamento com erros no desenvolvimento humano precoce, os quais ainda são parcialmente desconhecidos. Ademais, é importante o estabelecimento de análises genômicas para o melhor entendimento da etiologia genética dessas patologias, e um acoplamento das técnicas genômicas mais recentes com os métodos de investigação mais tradicionais no diagnóstico.

Zhang et al. (2015) demonstraram que a técnica de MLPA pode, de maneira rápida e eficiente, detectar CNVs patogênicas associadas às CCs na região cromossômica 22q11.2. Nesse sentido, a aplicação da referida técnica na presente pesquisa torna-se relevante por permitir a investigação de CNVs em 22q11.2 nos pacientes síndrômicos e não síndrômicos, avaliando quais desses indivíduos podem apresentar a síndrome de deleção 22q11.2. Dessa forma, a triagem citogenômica nessa região será importante para verificar se a etiologia genética das CCs apresentadas pelos pacientes possuem como causalidade deleções em 22q11.2. Isto será importante para uma melhor definição clínica e consequente aperfeiçoamento no prognóstico dos pacientes que apresentem a referida perda genômica.

Adicionalmente, muitas CNVs ao longo do genoma têm sido associadas à etiologia de CCs. Sendo assim, torna-se relevante investigar por meio de CMA possíveis perdas e ganhos genômicos que contribuam na patogênese de CCs síndrômicas, avaliando quais genes podem estar envolvidos no fenótipo observado.

Dentro disso, surgem as seguintes questões:

- Qual a prevalência de deleções na região cromossômica 22q11.2 em um grupo de pacientes com CCs síndrômicas e não síndrômicas?
- As CCs e as alterações extracardíacas possuem o fator genético “CNVs” como componente etiológico?
- Qual o tamanho e a localização genômica dessas CNVs?
- Quais os possíveis genes envolvidos?
- Algum (s) gene (s) candidato (s) possivelmente relacionado às CC ainda não descrito (s) na

literatura?

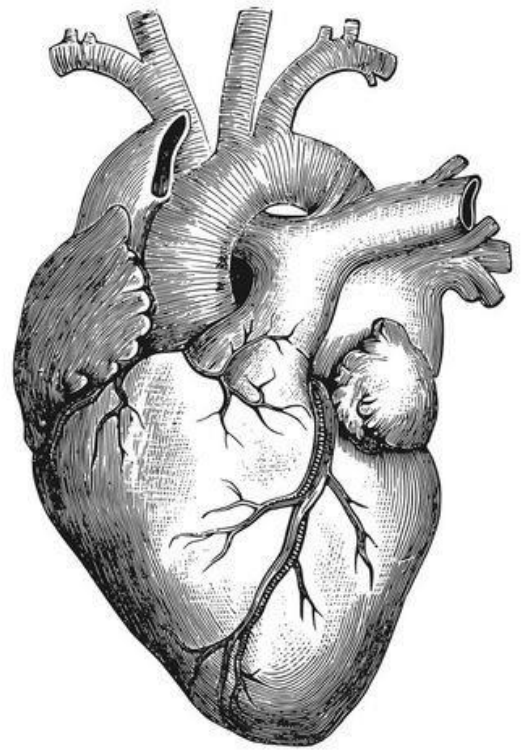
- O quadro sindrômico apresentado pelo paciente pode ser relacionado às alterações genéticas encontradas?

- São polimorfismos ou alterações com algum nível de patogenicidade?

Essas questões levam à percepção de que a ampliação do potencial de determinação da etiologia genética de CCs utilizando técnicas moleculares permitirá possível identificação de desequilíbrios citogenômicos, além de contribuir para o conhecimento parcial dessa condição nos pacientes investigados com a patologia. Nesse sentido, a investigação de alterações genéticas por técnicas citogenômicas se constituem como uma ferramenta primordial na pesquisa. Neste estudo, a utilização da técnica de MLPA na investigação de CNVs na região 22q11.2 nos pacientes com CCs se mostra oportuna, uma vez que muitos desses indivíduos considerados como “não sindrômicos”, por exemplo, podem apresentar deleções nessa região, apesar de serem diagnosticados com CC isolada.

Já a utilização de CMA poderá caracterizar alterações genéticas não detectadas pelos métodos investigativos tradicionais, abrindo possibilidades de geração de dados que subsidiem o papel de CNVs na arquitetura genética do surgimento de CCs em pacientes sindrômicos. Além disso, subsidia o direcionamento para outros tipos de investigações moleculares como o sequenciamento, por exemplo. Desequilíbrios citogenômicos podem gerar consequências na dosagem de genes específicos (seja em ganhos, com genes triplosensíveis; ou em perdas, com genes haploinsuficientes), na disrupção de genes, na junção de genes e em efeitos de posição genômica. Tais genes envolvidos nesses desequilíbrios podem estar diretamente relacionados a vias moleculares indispensáveis ao desenvolvimento embrionário. Assim, realizar a caracterização de tais alterações genéticas em indivíduos com anomalias congênitas pode nos fornecer pistas da contribuição de tais desequilíbrios ao fenótipo clínico. Além disso, a caracterização do conteúdo gênico de tais CNVs permite, parcialmente, a busca por uma correlação genótipo-fenótipo, sugerindo genes e regiões candidatas à etiologia genética das CCs associadas.

Além da abordagem investigativa e científica, o presente estudo também pode contemplar o estabelecimento de um diagnóstico clínico e citogenômico. O direcionamento para um aconselhamento genético especializado, destinado a pessoas que tenham alguma CC ou aos seus familiares, pode ter resultados notórios na informação e no aperfeiçoamento do conhecimento das famílias sobre as variadas causas de CCs, contribuindo para uma prática de cuidado mais personalizada (BLUE et al., 2015). Dessa forma, pode-se aprimorar o processo diagnóstico e o aconselhamento genético para os probandos e familiares envolvidos.



OBJETIVOS

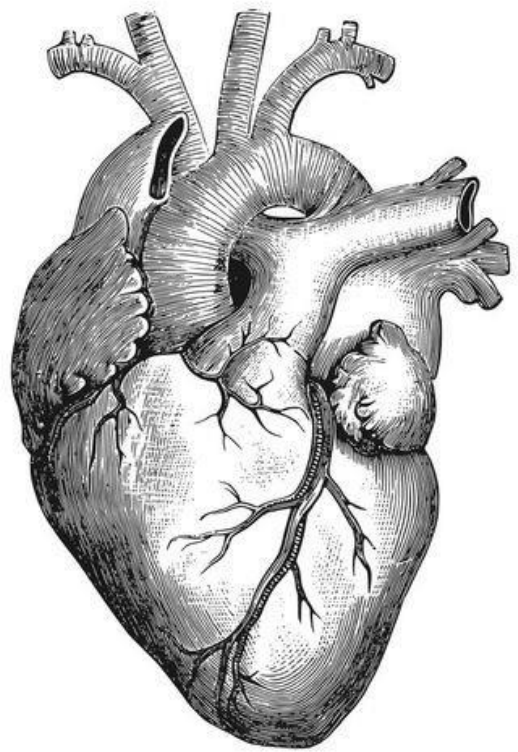
2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis desequilíbrios citogenômicos (microdeleções/duplicações) e sua relação com o fenótipo em pacientes diagnosticados com cardiopatias congênitas idiopáticas.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar triagem para microdeleções/duplicações na região cromossômica 22q11.2 em todos os pacientes;
2. Identificar CNVs no DNA genômico de pacientes sindrômicos selecionados;
3. Caracterizar o tamanho e o conteúdo gênico de cada CNV;
4. Classificar as CNVs encontradas quanto à relevância clínica;
5. Sugerir genes candidatos que possam estar envolvidos com a etiologia genética de CCs nos pacientes investigados;
6. Investigar uma possível correlação genótipo-fenótipo para as alterações extracardíacas observadas.



MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa referente a este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP (sob o número CAAE:67186817.9.0000.5411 e número do parecer: 2.048.352) (Anexo 1). Todos os pais/responsáveis pelos pacientes que concordaram em participar da pesquisa preencheram e receberam uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2), enquanto a outra via foi anexada junto ao prontuário do paciente no Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) - UNESP.

3.2 Grupo amostral

Os pacientes que fazem parte deste trabalho foram recrutados no Ambulatório de Cardiologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB), UNESP, entre os meses de abril de 2016 a abril de 2017. A casuística foi composta por pacientes que receberam diagnóstico de CCs síndrômicas e não síndrômicas, totalizando um conjunto de 31 pacientes no grupo amostral inicial (13 pacientes síndrômicos e 18 pacientes não síndrômicos). Os indivíduos foram atendidos por um médico cardiologista no HCFMB, onde foram realizados exames subsidiários, tais como eletrocardiograma, ecocardiograma e outros exames complementares conforme os aspectos clínicos do paciente.

Os pacientes e seus responsáveis foram encaminhados ao SAG para avaliação genético-clínica por um geneticista. A análise se deu por meio de uma ficha de anamnese específica (Anexo 3). Depois da anamnese dos pacientes, foram coletados 6 mL de sangue periférico dos pacientes e de seus pais biológicos. Esse volume de sangue foi destinado às análises citogenéticas e moleculares. Foram revisados também seus prontuários junto ao HCFMB, a fim de verificar exames complementares e todo o histórico clínico dos pacientes. A Tabela 5 traz os pacientes com CCs de espectro síndrômico, e a tabela 6 contempla o grupo de não síndrômicos que compõe a casuística deste trabalho, destacando dados clínicos e diagnósticos de CCs recebidos, entre outras informações.

Tabela 5. Descrição clínica dos 13 pacientes com cardiopatias congênitas de espectro sindrômico recrutados inicialmente para esta pesquisa.

Paciente/Sexo ^a	Idade [#]	Diagnóstico de CC*	Histórico Familiar	Alterações extracardíacas	Diagnóstico clínico
8325/M	2 anos e 11 meses	Estenose da valva pulmonar	Irrelevante	Atraso global do desenvolvimento; macrocrania; macrossomia; obesidade; estrabismo; hepatomegalia homogênea	Síndrome de MOMO*
8450/M	3 anos e 9 meses	Estenose da valva Pulmonar	Irrelevante	ADNPM*; epilepsia frontal; déficit auditivo à direita; múltiplas manchas lentiginosas ; hipermetropia visual; criptorquidia à direita	Síndrome de Noonan com lentigos múltiplos
8468/F	8 anos	Insuficiência da valva mitral; pós-operatório de correção de CIA, CIV* e estenose pulmonar	Avó (paterna) tem Alzheimer	Atraso global do desenvolvimento; desvios de aprendizagem; baixa estatura	Não definido
8362/M	2 meses	CIA e CIV*	Mãe com Cariótipo 46,XX,add(18p11.3)	Asplenia; ventriculomegalia de ventrículos laterais e do terceiro ventrículo; ptose renal; deficiência intelectual; dismotilidade esofageana	Não definido
8429/F	9 anos	CIV, CIA* e forame oval pérvio	Irrelevante	Sinais dismórficos faciais; plagiocefalia; craniossinostose	Não definido

8391/M	10 anos	Estenose aórtica valvar	Irrelevante	Atraso global do desenvolvimento	Não definido
8417/M	2 anos e 6 meses	CIA, estenose da valva pulmonar	Irrelevante	Microcefalia, orelhas grandes, hipertelorismo, hipoplasia nasal, micrognatia, aracnodactilia, dedos afilados.	Não definido
8397/F	1 ano e 2 meses	Estenose da valva pulmonar	Avó materna com sopro na infância	Fácies triangulares, hipertelorismo, microretrognatia, pescoço curto, hipotonia muscular, atraso global do desenvolvimento.	Não definido
8426/F	1 ano e 10 meses	CIA	Irrelevante	Braquicefalia; dolicocefalia; fendas palpebrais com inclinação para cima; pregas epicânticas	Síndrome de Down
8337/F	3 anos e 9 meses	Variância anatômica dos vasos de base do coração; CIA*	Irrelevante	Macrocefalia; sobrancelhas largas esparsas; sinofre; hemangiomas em asa nasal; pescoço largo e curto (<i>pterygium colli</i>); mamilos antevertidos, hirsutismo em membros superiores (MMSS), costa e testa	Síndrome de Noonan

Continuação tabela 5

8514/F	4 anos e 1 mês	CIA; CIV*	Irrelevante	Sobrancelhas arqueadas, sinofre leve, boca com cantos inferiores voltados para baixo (formato de carpa), dentição alterada (diástase), nariz pequeno com narinas antevertidas, hirsutismo leve nas costas e ausência de fala.	Síndrome Cornélia de Lange
8314/F	14 anos	Coarctação da aorta	Pai com esclerose múltipla. Irmã gêmea com hipoacusia	ADNPM; perda auditiva bilateral; micrognatia; pele com lesões do tipo hiperqueratose;	Síndrome cardio-facio-cutânea
8430/F	15 anos	Insuficiências mitral e tricúspide	Irrelevante	Escoliose congênita	Não definido

Idade com a qual os pacientes foram avaliados no SAG.

^a M = Masculino; F = Feminino.

* ADNPM = atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; CIA = comunicação interatrial; CIV = comunicação interventricular; MOMO = acrônimo para macrossomia, obesidade, macrocrania e anormalidades oculares.

Tabela 6. Descrição clínica dos 18 pacientes com CCs não sindrômicas que compõe a casuística da investigação.

Paciente/Sexo^a	Idade[#]	Diagnóstico de CC*	Histórico Familiar
8347/F	4 anos	Atresia tricúspide	Irrelevante
8350/F	7 anos	CoAo	Mãe com CoAo
8353/M	8 anos	Insuficiência tricúspide	Avô e bisavô maternos com defeitos nos septos interventriculares
8356/F	9 anos	DSAV e CIV	Tia (lado materno) com anomalia na válvula tricúspide
8359/M	1 ano e 3 meses	CIV	Casos de CCs na família (não especificado)
8385/M	11 anos	Prolapso da valva mitral	Casos de CCs na família (não especificado)
8388/M	17 anos	EVP	Irrelevante
8394/F	1 mês	CIA e CIV	Irrelevante
8400/M	11 anos	EAO	Irrelevante
8403/F	3 meses	Permeabilidade do canal arterial	Mãe com disfunções cardiovasculares
8419/M	12 anos	CIV e CIA	Irrelevante
8433/M	3 meses	CIA e CIV	Irrelevante
8438/M	4 anos	Tetralogia de Fallot (T4F)	Irrelevante
8453/F	6 anos	CIA	Mãe teve defeito nos septos interventriculares (fechado espontaneamente).
8456/M	2 anos	CIA	Irrelevante
8459/M	15 anos	EVP	6 casos de CCs na família. Alguns vieram a óbito devido à patologia.
8462/M	8 anos	CIV	Irrelevante
8465/F	2 anos	CIV	Irrelevante

Idade com a qual os pacientes foram avaliados no SAG.

^a M = Masculino; F = Feminino.

* CC = cardiopatia congênita; CIA = comunicação interatrial; CIV = comunicação interventricular; CoAo = coarctação da aorta; DSAV = defeitos dos septos interventriculares; EAO = estenose aórtica valvar; EVP = estenose da valva pulmonar.

3.3 Critérios de seleção dos pacientes

3.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com CCs sindrômicas: consideramos indivíduos que, além da cardiopatia congênita, apresentaram alguma alteração extracardíaca congênita (com base na análise genético – clínica e revisão dos prontuários dos pacientes). A inclusão para as análises citogenômicas se deu com base em: presença de um diagnóstico clínico sindrômico não definido, síndrome clinicamente estabelecida com etiologia genética não definida, e cariótipo convencional não específico para qualquer síndrome genética conhecida;
- Pacientes com CCs não sindrômicas: presença de cardiopatias congênitas Isoladas, sem alterações extracardíacas detectadas.
- Concordância e Assinatura do TCLE pelos pais e/ou responsáveis e assentimento (TALE) para maiores de 12 anos.

3.3.2 Critérios de exclusão

- Síndromes bem caracterizadas geneticamente, como por exemplo Down, Klinefelter, entre outras;
- Mães com históricos gestacionais ligados ao uso de drogas/álcool, infecções virais (Zika, Rubéola, etc) e qualquer outro problema que tenha relação conhecida com a manifestação de anomalias congênitas;
- Não concordância na assinatura do TCLE ou do Termo de Assentimento.

3.4 Análises citogenéticas e citogenômicas

3.4.1 Obtenção do DNA genômico

A extração de DNA genômico foi feita a partir das amostras de sangue periférico (coletado em tubos VACUTAINER® com EDTA) e foi realizada estritamente segundo as recomendações do fabricante do kit comercial *Flexigene Genomic Purification Kit* (QIAGEN®, Germany).

O DNA obtido foi quantificado por absorvância da luz UV em espectrofotômetro NanoDrop (UNISCIENCE®) e, então, estocado a -20°C até o momento da utilização. Todas as amostras de DNA obtidas foram analisadas em gel de agarose (INVITROGEN®, USA) a 1%, a fim de verificar a integridade do DNA genômico. Só foram incluídas nas análises moleculares as amostras íntegras.

3.4.2 Cariótipo convencional

O estudo citogenético foi realizado nos pacientes de espectro síndrômico, a fim de verificar possíveis alterações estruturais e numéricas nos cromossomos metafásicos. As culturas de linfócitos de sangue periférico foram realizadas segundo a técnica proposta por Moorhead e colaboradores (1960), e a obtenção de cromossomos prometáfásicos pela técnica descrita por Yunis (1976), ambas modificadas.

O bandamento GTG foi realizado na resolução de aproximadamente 550 bandas e seguiu protocolo padronizado proposto por Seabright (1971), com modificações.

3.4.3 Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) para as sondas comerciais seguiu os padrões do protocolo que acompanham cada produto e foram utilizadas para confirmar as alterações presentes nos resultados de CMA de um dos pacientes síndrômicos. Neste estudo foram empregadas as seguintes sondas: COATASOME 15 (ONCOR®), uma sonda para o cromossomo 15 total e com marcação de digoxigenina (coloração em verde); sonda 18pter – *Texas Red* (específica para a região subtelomérica do cromossomo 18, marcação em vermelho) da CYTOCELL®; *Alpha Satellite DNA Probe* CYTOCELL® para marcação centromérica do cromossomo 18 (corado em verde) e *TelVysion 15q SpectrumOrange* da VYSIS® para marcação de região subtelomérica do cromossomo 15.

As análises da técnica de FISH foram realizadas em fotomicroscópio de fluorescência *Olympus® BX61*.

3.4.4 Amplificação *multiplex* de sondas dependentes de ligação – MLPA

O método de MLPA foi empregado nas amostras de 27 pacientes (sendo 9 síndrômicos e 18 não síndrômicos) com o objetivo de realizar uma triagem para deleções na região cromossômica 22q11.2. Em relação aos pacientes síndrômicos, só foram incluídos na análise de MLPA aqueles com quadro síndrômico não definido, excluindo-se os que receberam diagnóstico clínico de síndromes genéticas caracterizadas.

Utilizamos o kit SALSA® MLPA® P250 (B2-0316) DiGeorge (MRC® Holland, Amsterdã, Holanda), específico para detecções de deleções e duplicações na região 22q11.2. A tabela 7 mostra os genes detectados pelas sondas no kit utilizado, assim como seus tamanhos e respectivas localizações genômicas das sondas (de acordo com o genoma de referência NCBI36 / hg18). As sequências completas de cada sonda podem ser consultadas em: www.mlpa.com. A reação da MLPA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, e seguiu as instruções do fabricante (MRC®-Holland, www.mlpa.com) e do protocolo original descrito por Schouten et al. (2002), com modificações detalhadas a seguir:

1) Denaturação do DNA: antes de iniciar a reação, todas as 27 amostras de DNA dos probandos, mais 4 amostras controle de indivíduos normais, foram diluídas em água ultrapura, com o objetivo de padronizar a concentração de todas na faixa de 15-20 ng/ul. Foram adicionados 5 ul de cada amostra (média de 100ng/ul nesse volume) a tubos do tipo “eppendorf” de 0.2 ml. Para fins de controle, em um tubo foi colocado água ultrapura (controle sem DNA). Os tubos foram colocados no termociclador (*Applied Biosystems®*, *Veriti 96-Well Thermal Cycler*, USA) e as amostras foram denaturadas por 5 minutos a 98°C e, após, resfriadas a 25°C. Os tubos foram mantidos no termociclador.

2) Reação de hibridação: Foram vortexados os tubos *MLPA Buffer* (tampa amarela no kit) e *MLPA Probemix* (tampa preta), a fim de preparar um mix para a reação de hibridização. Para cada amostra, foram adicionados 1,5 ul de *MLPA Buffer* + 1,5 ul de *MLPA Probemix*. A solução foi homogeneizada com a pipeta e com o vórtex. À cada tubo no termociclador, foram adicionados 3 ul dessa solução, homogeneizando suavemente pipetando para cima e para

baixo. Prosseguiu-se com o programa do termociclador: incubou-se as amostras por 1 minuto a 95°C e depois 18 horas a 60°C.

3) Reação de Ligação: os tubos *Ligase Buffer A* e *Ligase Buffer B* foram vortexados. O preparo da solução da Ligase-65 (presente no kit) se deu da seguinte maneira, considerando para cada amostra:

- 25 ul de água ultrapura + 3 ul de *Ligase Buffer A* (tampa transparente no kit) + 3 ul de *Ligase Buffer B* (tampa branca). Após, adicionou-se 1 ul da enzima *Ligase-65* (tampa verde). Essa mistura foi homogeneizada levemente com a pipeta.

O programa do termociclador continuou, agora com uma pausa e um resfriamento para 54°C. Quando alcançada esta temperatura, foram adicionados 32 ul da solução contendo *Ligase-65* à cada tubo. Homogeneizou-se suavemente com a pipeta. O programa continuou para o seguinte passo: incubação por 15 minutos a 54°C (para a ligação) e posteriormente 5 minutos a 98°C (inativação da enzima). O programa foi pausado na temperatura de 20°C. Os tubos foram mantidos no termociclador.

4) Reação da PCR (*Polymerase Chain Reaction*): o tubo contendo os *primers* foi vortexado (*PCR Primer Mix*, tampa marrom). Para o preparo da solução de *Master Mix* contendo a enzima polimerase, procedeu-se da seguinte maneira (para cada amostra):

- 7,5 ul de água ultrapura + 2 ul de *SALSA PCR Primer Mix* + 0.5 ul da *SALSA Polymerase* (tampa laranja). Misturou-se bem e suavemente com a pipeta.

Foram adicionados 10 ul dessa solução à cada tubo no termociclador e seguiu-se para o seguinte programa da reação de PCR:

$$\text{Ciclo de 35 x } \left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} - 30 \text{ segundos} \\ 60^{\circ}\text{C} - 30 \text{ segundos} \\ 72^{\circ}\text{C} - 60 \text{ segundos} \end{array} \right. \\ \text{(vezes)}$$

Após os ciclos da PCR, o programa continuou a 72°C por 20 minutos e pausa a 15°C, finalizando a reação de PCR.

5) Separação dos produtos da PCR por Eletroforese Capilar: para a separação dos produtos da PCR por eletroforese capilar, as amostras foram transferidas para uma placa (96 *wells*), seguindo a adição com os seguintes volumes e reagentes para cada poço:

- 0,7 ul do produto de PCR de cada tubo;
- 0,3 ul de ROX e
- 9 ul de formamida HiDi

A placa foi selada com fita adesiva própria e aquecida no termociclador a 86°C por 3 minutos. Imediatamente após, foi resfriada a 4° C por 2 minutos. Posteriormente, a placa foi analisada no ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, USA), seguindo a voltagem de injeção, o tempo de corrida e demais parâmetros conforme o protocolo do fabricante. Foi utilizado o polímero *POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems™)*.

6) Visualização e análise dos resultados: os resultados da eletroforese capilar foram analisados através do *software* Cofallyser.Net (MRC-Holland®, Holanda, www.mlpa.com). Para a confirmação das alterações, os resultados também foram checados pelo *software* GeneMarker® v2.2.0 (SoftGenetics – www.softgenetics.com). Em ambos os programas, foram adotados os seguintes valores: deleções (abaixo de 0,7) e duplicações (acima de 1,3). Dentro do referido intervalo, considera-se normal. No caso de pacientes que apresentaram alterações na técnica da MLPA, a reação foi repetida para confirmação e as amostras dos pais foram analisadas para verificação de segregação.

Tabela 7. Sondas de SALSA® P250 B2-0316 DiGeorge (MLPA). Localização de acordo com NCBI36/hg18

Tamanho (pb)	Gene	Éxon (GenBank)	Locus	Início	Fim
129	PPIL2	20	22q11.21	20379682	20379748
136	EHMT1	3	09q34.3	139731001	139731062
142	SLC25A18	1	22q11.21	16423313	16423380
148	DGCR8	2	22q11.21	18453612	18453678
154	EHMT1	17	09q34.3	139805146	139805210
160	HIRA	25	22q11.21	17699015	17699079
166	SNRPD3	2	22q11.23	23283701	23283765
172	TBX1	2	22q11.21	18127111	18127178
178	MICAL3	20	22q11.21	16704656	16704728
184	KLKB1	3	04q35.2	187390319	187390398
191	CLTCL1	3	22q11.21	17621597	17621661
196	CLDN5	1	22q11.21	17891318	17891378
202	ZNF74	2	22q11.21	19079428	19079495
208	GP1BB	2	22q11.21	18091521	18091580
214	GNAZ	3	22q11.22	21795392	21795456
220	SMARCB1	1	22q11.23	22459370	22459434
226	USP18	1	22q11.21	17012924	17012985
232	SHANK3	22	22q13.33	49507581	49507645
238	TXNRD2	9	22q11.21	18266225	18266285
245	TBX1	7	22q11.21	18133286	18133352
255	RPH3AL	5	17p13.3	169259	169330
261	RTDR1	6	22q11.22	21734047	21734115
267	GATA3	3	10p14	8140560	8140624
274	GATA4	7	08p23.1	11653542	11653609
283	KLHL22	2	22q11.21	19173307	19173367
292	TOP3B	7	22q11.22	20652996	20653065
301	GATA3	6	10p14	8155803	8155870
308	HIC2	2	22q11.21	20129442	20129511
316	MED15	10	22q11.21	19266745	19266813
326	SLC25A4	2	04q35.1	186303263	186303335
335	IL17RA	4	22q11.1	15959666	15959739
342	RAB36	1	22q11.22	21817561	21817617
350	TCEB1P3 REGION	Down	10p14	10588971	10589047
357	BID	4	22q11.21	16606684	16606759
364	CELF2-region	6	10p14	11017023	11017090
373	SNAP29	5	22q11.21	19572014	19572084
382	CELF2	4	10p14	11247522	11247596
391	YWHAE	5	17p13.3	1211255	1211325
400	SMARCB1	9	22q11.23	22506362	22506429
409	GEMIN4	2	17p13.3	596607	596671
418	LZTR1	16	22q11.21	19679191	19679261
427	MSRA	4	08p23.1	10102752	10102819
434	RPH3AL	2	17p13.3	183588	183659
445	ARSA	1	22q13.33	49413270	49413327
454	RTDR1	2	22q11.22	21812539	21812602
466	CDC45	1	22q11.21	17847478	17847540
472	PPP1R3B	3	08p23.1	9036240	9036313
487	NEBL	5	10p12.31	21226273	21226342

3.4.5 Análise por CMA

A análise de CMA foi realizada em parceria com o Laboratório de Citogenômica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) - São Paulo (nas amostras dos pacientes 8325, e de seus pais, e 8362), e em parceria com o Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP (nas demais amostras). A técnica de CMA foi utilizada para buscar possíveis perdas (deleções) e ganhos (duplicações) submicroscópicos no genoma de 6 pacientes com CCs sindrômicas sem diagnóstico clínico definido (vide tabela 5). Neste estudo, foram empregadas duas plataformas: SNP – array 850K HumanCytoSNP – 8x1 HD (Illumina®, Inc., San Diego, California, USA) (amostras 8362 e 8325); e SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4x180K (Agilent Technologies®, Inc., Santa Clara, CA, USA) (demais amostras).

A plataforma da Illumina possui cerca de 850.000 sondas que permitem uma alta resolução tanto de variações no número de cópias quanto da perda de heterozigosidade (LOH), identificando também um nível mínimo de mosaicismos e Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs). Adicionalmente, essa plataforma cobre regiões de CNVs com conhecida relevância clínica. Todo o protocolo foi realizado estritamente segundo instruções do fabricante, sem modificações (disponível em: https://www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/infinium-cytosnp_850k.html). As lâminas hibridadas com o DNA teste foram analisadas no sistema de scanner iScan® System (Illumina).

Já a plataforma da Agilent contém cerca de 180.000 sondas distribuídas pelo genoma humano, detectando simultaneamente perdas e ganhos genômicos. Todo o protocolo foi realizado segundo as instruções do fabricante, sem modificações (disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4410-90020_CGH_ULS_3.5.pdf).

3.4.6 Análise dos resultados de CMA

A visualização e a análise dos resultados da técnica de CMA na plataforma Illumina foram realizadas por dois *softwares*: *KaryoStudio v1.4.3.0 Build37*® (CNV Plugin v3.0.7.0) e *BlueFuse™ Multi Analysis Software*. Na plataforma da Agilent, foi utilizado o *software Genomic Workbench 6.9* (Agilent Technologies).

Todas as posições genômicas foram mapeadas de acordo com GRC37/hg19 *genome build*. Todas as CNVs encontradas foram checadas uma a uma utilizando bancos de dados públicos disponíveis. As CNVs foram classificadas em: benignas; patogênicas ou de significado clínico incerto (VOUS), seguindo as recomendações de Kearney et al. (2011)

(*American College of Medical Genetics*). No caso do paciente 8325, as amostras dos pais foram incluídas para verificar se as CNVs são *de novo* ou se foram herdadas.

A classificação das CNVs seguiu princípios e fluxogramas propostos por Breckpot et al. (2011), Kearney et al. (2011), Leung et al. (2010) e Miller et al. (2010). A tabela 7 explicita os critérios adotados.

Tabela 8. Critérios adotados na caracterização das CNVs encontradas nos probandos investigados.

Fator	Patogênica	Benigna	VOUS (Significado clínico incerto)
Estrutural			
CNV idêntica e herdada de um pai/mãe não afetado	✓		
Idêntica à CNV de um parente saudável		✓	
CNV se sobrepõe a coordenadas genômicas de um desequilíbrio conhecido	✓		
CNV totalmente contida dentro de um desequilíbrio genômico definido em um banco de dados de pacientes afetados	✓		
CNV é uma duplicação (sem a presença de genes sensíveis à dosagem conhecidos)		✓	
CNV relatada em um banco de dados de CNVs de indivíduos saudáveis		✓	
Funcional			
CNV contém genes mórbidos descritos no OMIM e é uma deleção	✓		
CNV tem um fenótipo associado em camundongos <i>knock-out</i>	✓		

Continuação Tabela 8

CNV apresenta genes que exibem haploinsuficiência	✓	✓
Modo de Herança		
CNV associada a fenótipos clínicos variáveis que foram descritos	✓	✓
CNV herdada em associação com síndrome de deleção/duplicação bem caracterizada ou que tenha sido publicada	✓	
CNV alterada ou expandida que tenha sido herdada de um dos pais, mas que não esteja dentro de uma região de CNVs conhecidas		✓

* Modificada de LEUNG et al. (2010).

Os seguintes bancos de dados públicos *online** foram utilizados na classificação das CNVs encontradas:

- *Database of Genomic Variants* (DGV) (disponível em: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), a fim de verificar se as CNVs encontradas são descritas em indivíduos saudáveis;

- *Database of Genomic Variation and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER) (disponível em: <https://decipher.sanger.ac.uk/index>), para a verificação de CNVs patogênicas em associação com as descrições clínicas de pacientes;

- *UCSC Genome Browser* (disponível em: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), para a análise de sobreposição com outras regiões conhecidas, conteúdo gênico e a descrição integrada de CNVs em outros bancos de dados, como o OMIM e RefSeq Genes (NCBI);

- *ClinGen Dosage Sensitivity Map* (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>), para análise de haploinsuficiência de genes em caso de deleções (*Haploinsufficiency Score*), e sensibilidade a três cópias genômicas no caso de duplicações (*Triplosensitivity Score*);

- *ClinVar* (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), para análise de CNVs descritas nas regiões de sobreposição com os resultados encontrados nos pacientes;

Após a análise da relevância clínica das CNVs, foram caracterizados todos os genes contidos nos ganhos e perdas genômicas encontradas, além das suas funções e possíveis envolvimento com os fenótipos clínicos observados nos pacientes. Para esta caracterização, foram utilizados os seguintes bancos e ferramentas *online**:

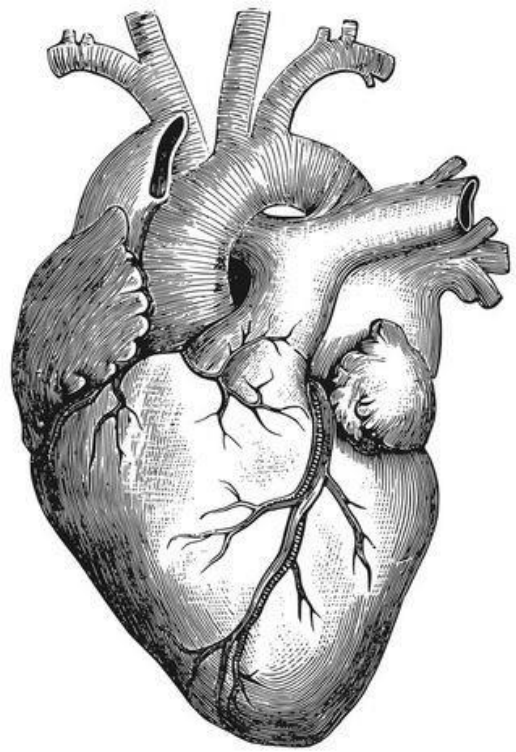
- *Table Browser* – UCSC Genome Browser (disponível em: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>), na geração de tabelas com todos os genes contidos em uma dada localização genômica (foi utilizado com base em GRC37/hg19), e recuperação de informações sobre a relevância clínica já descrita para os genes;

- *OMIM* (*Online Mendelian Inheritance in Man*, disponível em: www.omim.org), na caracterização funcional dos genes contidos nas CNVs e suas relações com patologias já conhecidas;

- *GeneCards* (disponível em: www.genecards.org), para caracterização das funções já conhecidas dos genes; e

- *PUBMED* (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), a fim de buscar literatura científica mais recente sobre os genes contidos nas CNVs e sua possível relação com o fenótipo. Foram realizadas buscas (sem restrição de período) para cada um dos genes presentes nas regiões de perdas e ganhos genômicos encontradas nos pacientes.

* *Para fins de contextualização temporal (dado que muitos desses bancos são atualizados com periodicidade), o último acesso aos mesmos foi realizado no dia 11 de abril de 2018.*



RESULTADOS

4. RESULTADOS

Dos 27 pacientes analisados pela técnica da MLPA, apenas uma paciente não sindrômica apresentou alteração no número de cópias genômicas na região cromossômica 22q11.2. A paciente 8356 apresentou uma duplicação na sonda que envolve o gene *TOP3B* (região 22q11.2) (Figuras 6 e 7). Trata-se de uma menina, sendo a segunda filha de pais saudáveis não consanguíneos. Nasceu a termo, pesando 1,585 kg (percentil < 3 para a idade) e medindo 41 cm (percentil < 3 para a idade). Foi diagnosticada com defeito do septo atrioventricular. Na avaliação genético-clínica da menor, aos 9 anos de idade, não foram verificados distúrbios ou outras alterações extracardíacas relevantes. Seu histórico familiar revelou uma tia (do lado materno) com insuficiência tricúspide. As amostras de DNA genômico dos pais da paciente 8356 também foram avaliadas pela MLPA, e os resultados indicaram uma duplicação na mesma região em *TOP3B* na amostra do pai, indicando a possível origem da duplicação na paciente em questão.

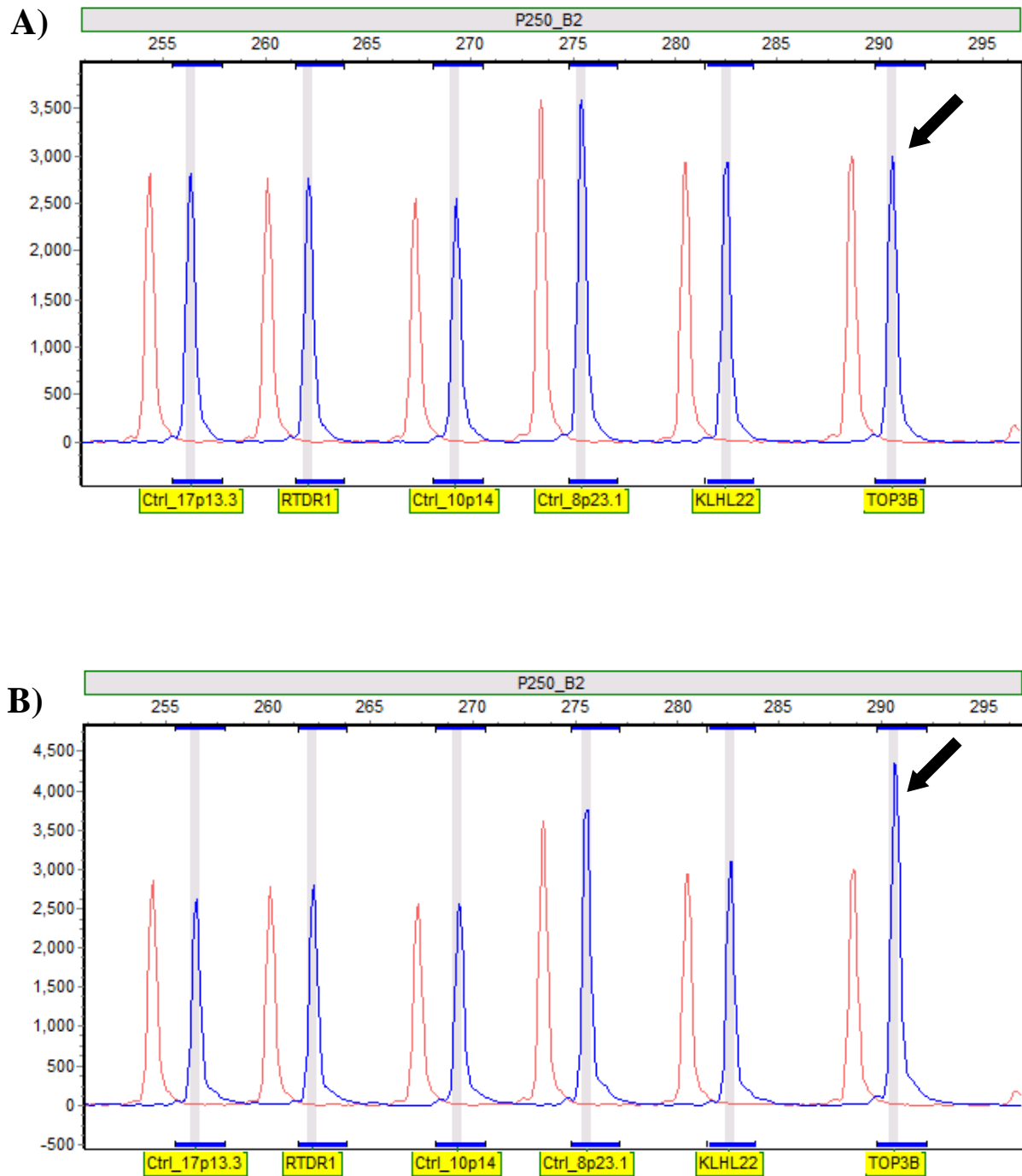


Figura 6. Eletroferogramas parciais, mostrando as amostras-controle em vermelho e a da paciente em azul normalizadas pelo programa GeneMarker. A) Eletroferograma de um indivíduo normal, evidenciando os tamanhos dos picos azuis (indivíduo normal) semelhantes aos dos picos vermelhos (controles) (seta preta). B) Amostra da paciente 8356 (seta preta) com ganho no número de cópias para a sonda que envolve o gene *TOP3B*. Destaca-se o tamanho do pico azul (seta preta) em relação ao controle (pico vermelho).

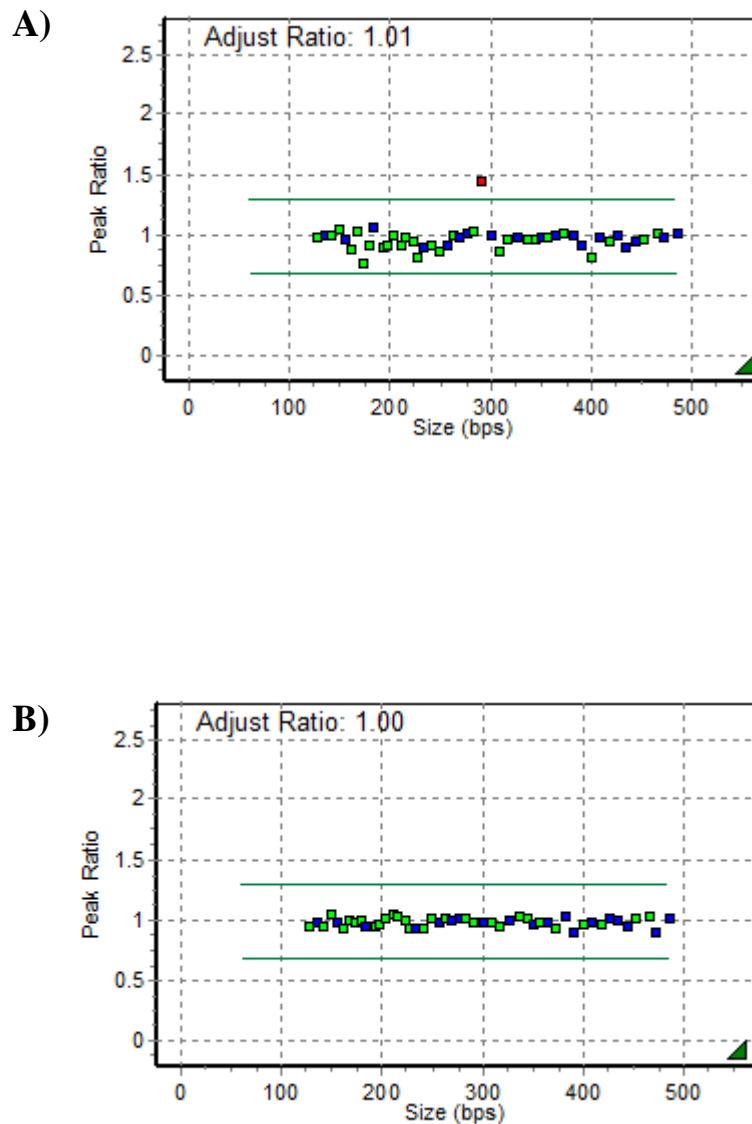


Figura 7. Distribuição das sondas detectadas na reação da MLPA da paciente 8356. A) Razão de plotagem gerado pelo GeneMarker, onde as linhas verdes correspondem aos limites de duas cópias. Os quadrados pequenos verdes correspondem às sondas para a região 22q11.2 e os azuis às sondas controles (vide tabela 7). Observe a duplicação na sonda que envolve o gene *TOP3B* (seta preta). B) Plotagem das sondas em um indivíduo controle (normal), evidenciando a distribuição das sondas dentro do limite de duas cópias gênicas.

As análises por MLPA, cariótipo convencional e os resultados gerais da análise por CMA na casuística dos 6 pacientes sindrômicos analisados estão sumarizados na tabela 9. Os detalhes das alterações genômicas encontradas nos 2 pacientes estão explanados adiante.

Tabela 9. Resultados gerais das análises genéticas dos 6 pacientes com cardiopatias congênitas de espectro sindrômico incluídos na análise por CMA.

Paciente/Sexo	Cariótipo	MLPA	CMA (<i>arrays</i>)	Cardiopatía Congênita
8325/M	46,XY	Normal	Deleção e AOH	Estenose da valva pulmonar
8397/F	46,XX	Normal	Normal	Estenose da valva pulmonar
8468/F	46,XX	Normal	Normal	Insuficiência da valva mitral; pós-operatório de correção de CIA, CIV e estenose pulmonar
8362/M	46,XY,add (18) (p11.3)	Normal	Deleção e Duplicação	CIA e CIV
8391/M	46,XY	Normal	Normal	Estenose aórtica valvar
8430/F	46,XX	Normal	Normal	Insuficiência mitral e tricúspide

AOH = ausência de heterozigidade; CIA = comunicação interatrial; CIV= comunicação interventricular; CMA = análise cromossômica por microrranjos; MLPA= amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação.

4.1 PACIENTE 8325

O paciente 8325 (Figura 8), filho único de casal jovem e não consanguíneo, sexo masculino, nasceu a termo pesando 4,170 Kg (percentil = 94,1) e comprimento de 54 cm (percentil >97,5). Aos dois meses de vida apresentou icterícia colestática, recebendo acompanhamento em gastropediatra. Em exames complementares, apresentou elevação dos níveis de enzimas hepáticas e de marcadores de necrose muscular.

Avaliado aos 2 anos e 5 meses, revelou estatura de 105 cm (percentil > 97), peso de 30 Kg (percentil > 97), envergadura de 110 cm, PC de 53 cm (percentil = 99, 9). Foi diagnosticado com estenose da valva pulmonar. Apresentou ainda, macrocrania, macrossomia, hipotonia muscular, atraso global do desenvolvimento, estrabismo, nariz em sela, ponte nasal baixa, microretrognatismo, mãos com dedos afilados e pés gordos com dedos afilados. Exames de ultrassonografia do abdômen total revelaram a presença de hepatomegalia homogênea. Recebeu o diagnóstico clínico de Síndrome de MOMO (Macrossomia; Obesidade; Macrocrania e anormalidades Oculares).

O resultado do cariótipo foi normal (figura 9), sendo 46,XY.

A análise por CMA revelou as seguintes alterações (Tabela 10): uma deleção de 159,11 kb em 1p36.11 (figura 10), envolvendo 4 genes (RefSeq): *RSRP1*, *RHD*, *TMEM50A* e *RHCE*, sendo descritos no OMIM os genes com destaque em negrito; e uma ausência de heterozigosidade (AOH) em 2p13.2p12 (figura 11), abrangendo 45 genes (RefSeq), entre os quais 32 (em negrito) estão descritos no OMIM: *ACTG2*, *ALMS1*, *AUPI*, *BOLA3*, *C2orf78*, *C2orf81*, *CCDC142*, *CCT7*, *CYP26B1*, *DCTN1*, *DGUOK*, *DOK1*, *DQX1*, *DUSP11*, *EGR4*, *EMX1*, *EXOC6B*, *FBXO41*, *HTRA2*, *INO80B*, *LBX2*, *LOXL3*, *MIAP*, *MOB1A*, *MOGS*, *MRPL53*, *MTHFD2*, *NAT8*, *NOTO*, *PCGF1*, *PRADC1*, *RAB11FIP5*, *RTKN*, *SEMA4F*, *SFXN5*, *SLC4A5*, *SMYD5*, *SPR*, *STAMBP*, *TET3*, *TLX2*, *TPRKB*, *TTC31*, *WBPI* e *WDR54*. Tal alteração de AOH revela uma dissomia uniparental em 2p13.2p12, evidenciada pelo longo trecho de homozigose em questão.

Análises em bancos de dados de indivíduos saudáveis (DGV) evidenciaram várias sobreposições de perdas benignas com a deleção em 1p36.11 do paciente 8325 (figura 12).



Figura 8. Paciente 8325 aos 2 anos e 5 meses de idade. A: Presença de estrabismo; **B e C:** nota-se a macrocrania e **D:** pés gordos com dedos afilados.

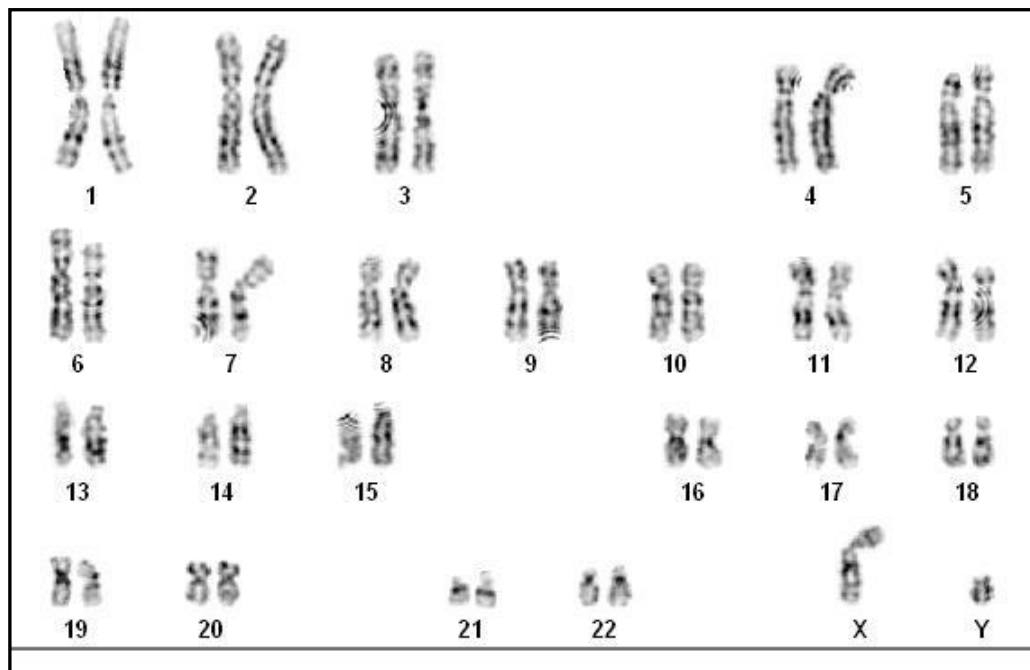


Figura 9. Resultado da análise citogenética do paciente 8325. Padrão cromossômico normal para o sexo masculino (46, XY). O bandamento GTG foi realizado na resolução de aproximadamente 550 bandas.

Tabela 10. Resultados da técnica de CMA do paciente 8325 na plataforma *BeadChip Illumina 850K® Array*. Localização de acordo com GRC37/hg19.

Amostras	Região Cromossômica (ISCN) ^a	Alteração*	Tamanho (kb)	Classificação*	Origem	Sondas ^b	Observação
Paciente 8325	arr[hg19] 2p13.2p12 (72,014,622 – 75,014,622) x2	AOH	3,024,993	VOUS	<i>De novo</i>	729	Dissomia uniparental (UPD)-
	arr[hg19] 1p36.11 (25,570,081 – 25,729,198) x1	Perda	159,118	Benigna	<i>De novo</i>	33	Não se sobrepõe à região crítica da síndrome de deleção 1p36
Mãe de 8325	Sem alterações (normal)	-	-	-	-	-	-
Pai de 8325	arr[hg19]7p11.1q11.21 (58,019,061 -62,168,735) x1	Perda	4,149,675	Benigna	-	76	Região centromérica e sem sobreposição de genes conhecidos
	arr[hg19]19p12q12 (21,806,125 – 28,636232) x2	AOH	6,830,108	Benigna	-	604	Região centromérica
	arr[hg19] 11p11.2q12.1 (47,360,069 – 56,549,319) x2	AOH	9,189,251	Benigna	-	804	Região Centromérica

*AOH= *Absence of heterozygosity* (ausência de heterozigosidade); VOUS = variante de significado clínico incerto.

^a Nomenclatura citogenômica de acordo com ISCN 2013 (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*)

^b Número de sondas detectadas na hibridização dessas regiões na técnica de CMA (*Chromosomal Microarray Analysis*)

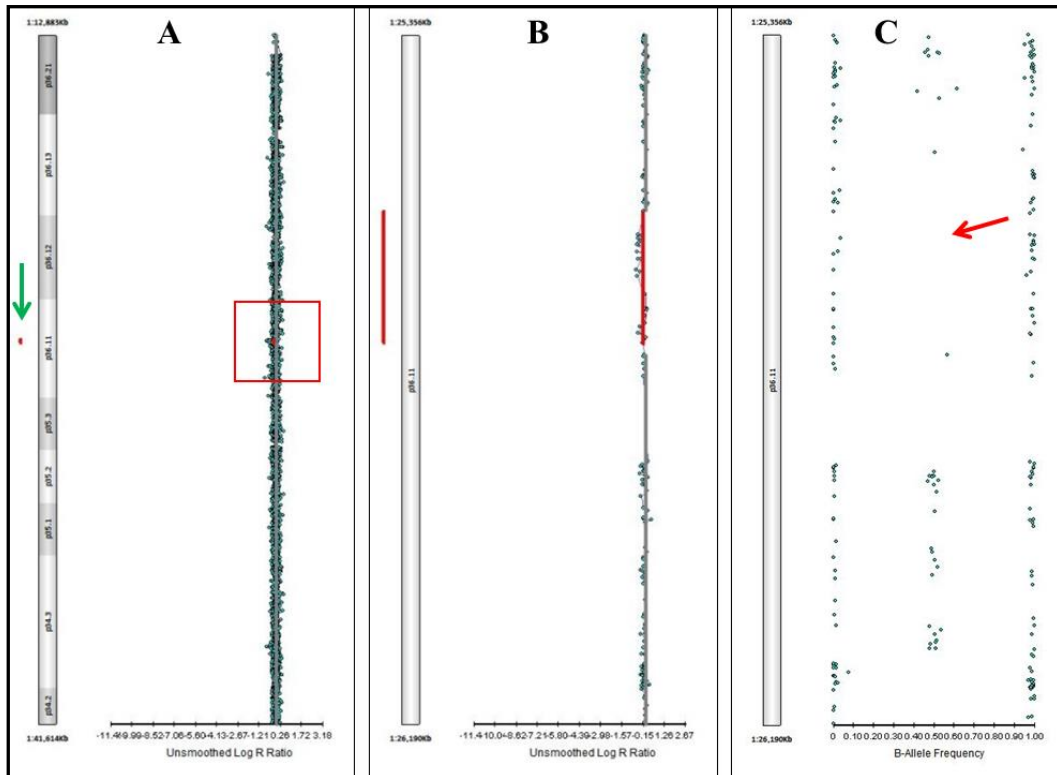


Figura 10. Perfil do resultado de CMA indicando uma deleção no paciente 8325. A análise revelou uma deleção em 1p36.11 (plataforma *SNP-array* 850K Illumina®). **A)** deleção de 159,11 kb evidenciada pela seta verde e quadrado vermelho. **B)** Um aumento na região evidencia a extensão da alteração, **C)** com a deleção indicada pela seta vermelha (ausência de sondas). Imagem obtida pelo *BlueFuse™ Multi Analysis Software*.

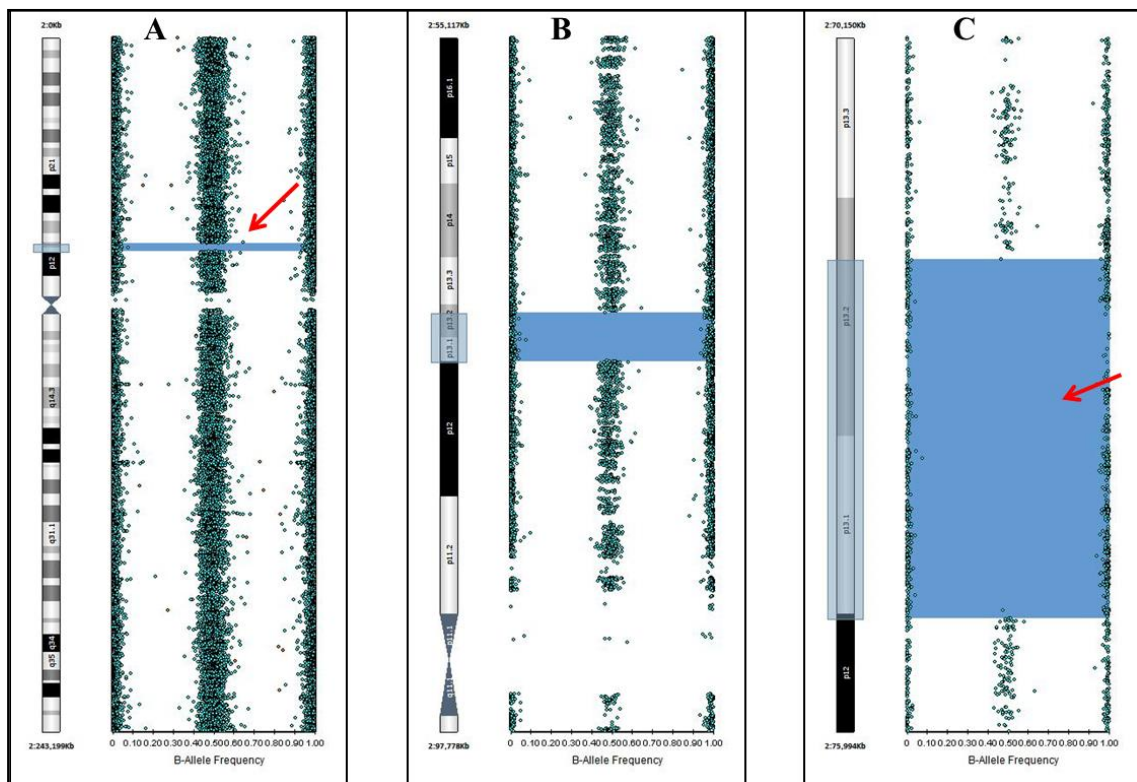


Figura 11. Resultado de CMA evidenciando uma ausência de heterozigosidade (AOH) no paciente 8325. A, B e C: região com AOH em 2p13.2p12 (em azul) indicada pela seta vermelha (plataforma *SNP-array* 850K Illumina®). Imagem obtida no *software BlueFuse™ Multi Analysis Software*.

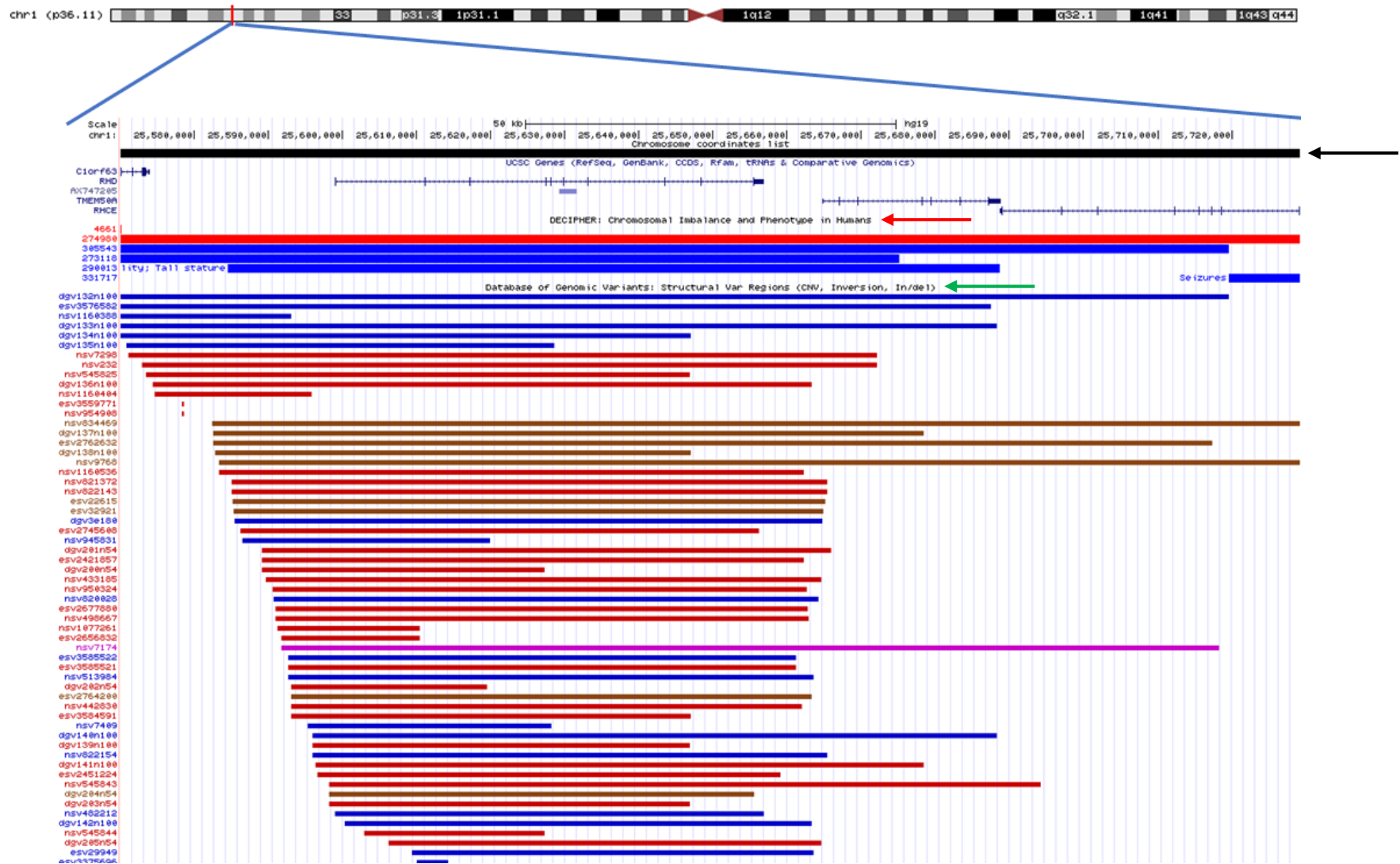


Figura 12. Análise da deleção em 1p36.11 na plataforma UCSC Genome Browser (GRC37/hg19). A deleção do paciente (seta preta) em comparação com casos do DECIPHER (seta vermelha) e DGV (*Database of Genomic Variants*) (seta verde), evidenciando uma maior quantidade de CNVs descritas como benignas no DGV (linhas em vermelho - deleções) em comparação com casos do DECIPHER (deleções em vermelho e duplicações em azul).

4.2 PACIENTE 8362

O paciente 8362 (figura 13) foi encaminhado ao SAG (IBB-Unesp) por apresentar ptose renal, hipotonia e comunicação interventricular (com insuficiência cardíaca congestiva – ICC). Trata-se de um filho único de um casal saudável, jovem e não consanguíneo.

Seu histórico gestacional revelou intercorrências: hemorragia, infecção urinária e pré-eclâmpsia.

O paciente nasceu a 36 semanas, por cesariana, ficando internado durante 45 dias em UTI neonatal. Apresentou ao nascimento: peso de 3.395g (percentil < 50), comprimento de 50cm (percentil < 50), pouca sucção, icterícia, dificuldade em se alimentar, refluxo gastroesofágico, comunicação interatrial, asplenia (baço não identificado no exame de ultrassonografia do abdômen total), ventriculomegalia lateral e do terceiro ventrículo (visto em ultrassonografia do crânio), dismotilidade esofageana e *pectus excavatum*.

Na avaliação genético-clínica, com 1 ano e 4 meses de idade, foi observado: peso de 8.800g (percentil < 15), comprimento de 74cm (percentil < 3), perímetro torácico de 48cm, perímetro cefálico de 46cm (percentil < 50), distância intercantal interna de 2,5cm (percentil < 97), distância intercantal externa de 9cm (percentil = 95), microcefalia, dolicocefalia, bossas frontais, orelhas rotadas anteriormente, fendas palpebrais descendentes, blefarofimose, nariz largo e proeminente, ponte nasal alta e larga, narinas antevertidas, filtro nasal longo, micrognatismo, lábio inferior com linha média em formato de “V”, palato alto e arqueado, dentes irregulares com diástema dos incisivos centrais, pescoço curto, *pectus excavatum*, hérnia umbilical, fimose e hipotonia. Ademais, estava com traqueostomia devido a severo refluxo gastroesofágico.

O resultado do exame citogenético (figura 14) foi 46,XY, add (18) (p11.3).

O cariótipo da mãe (figura 21) revelou 46, XX, t(15q;18p)(q25;p11.3), e o cariótipo do pai foi normal (46,XY).

A análise por CMA revelou (figuras 15 e 16): uma duplicação em 15q25.2q26.3, com tamanho de 18,4 Mb e envolvendo 124 genes (RefSeq) (tabela 11), entre os quais 69 são descritos no OMIM (em negrito): **ABHD2**, **ACAN**, **ADAMTS17**, **ADAMTSL3**, **AEN**, **AGBL1**, **AKAP13**, **ALDH1A3**, **ALPK3**, **ANPEP**, **AP3S2**, **ARPIN**, **ARRDC4**, **ASB7**, **ASB9P1**, **BLM**, **C15orf32**, **C15orf38-AP3S2**, **CERS3**, **CHD2**, **CHSY1**, **CIB1**, **CRAT37**, **CRTC3**, **DETI**, **DNM1P41**, **DNM1P46**, **EFL1P1**, **FAM169B**, **FAM174B**, **FANCI**, **FES**, **FURIN**, **GABARAPL3**, **GDPGP1**, **GOLGA2P7**, **GOLGA6L3**, **GOLGA6L4**, **GOLGA6L5P**, **HAPLN3**, **HDDC3**, **HSP90B2P**, **IDH2**, **IGF1R**, **IQGAP1**, **IRAIN**, **ISG20**, **KIF7**, **KLHL25**, **LINS1**,

LRRC28, LRRK1, LUNAR1, LYSMD4, MAN2A2, MCTP2, MEF2A, MESP1, MESP2, MFGE8, MIR1179, MIR1276, MIR1469, MIR3174, MIR3175, MIR3529, MIR4714, MIR5009, MIR5094, MIR548AP, MIR6766, MIR7-2, MIR7706, MIR9-3, MIR9-3HG, MRPL46, MRPS11, NGRN, NMB, NR2F2, NTRK3, OR4F13P, OR4F15, OR4F6, PCSK6, PDE8A, PEX11A, PGPEP1L, PLINI, POLG, PRC1, PRKXP1, RCCD1, RGMA, RHCG, RLBP1, SCAND2P, SEC11A, SELENOS, SEMA4B, SH3GL3, SLC28A1, SLCO3A1, SNRPA1, SPATA41, SPATA8, ST8SIA2, SV2B, SYNM, TARSL2, TICRR, TM2D3, TTC23, TLL13P, UBE2Q2L, UBE2Q2P1, UNC45A, VPS33B, WDR73, WDR93, ZNF592, ZNF710, ZNF774 e ZSCAN2.

Além da duplicação, também foi identificada uma deleção em 18p11.32p11.22, com tamanho de 8,7 Mb e contendo 40 genes (RefSeq), dos quais 27 são descritos no OMIM (em negrito): *ADCYAP1, AKAIN1, ARHGAP28, CBX3P2, CETNI, CLUL1, COLEC12, DLGAP1, EMILIN2, ENOSF1, EPB41L3, GACAT2, GAPLINC, L3MBTL4, LAMA1, LPIN2, LRRC30, METTL4, MIR3976, MIR3976HG, MIR4317, MIR6718, MIR8078, MTCL1, MYL12A, MYL12B, MYOM1, NDC80, PTPRM, RAB12, ROCK1P1, SMCHD1, TGIF1, THOC1, TMEM200C, TYMS, TYMSOS, USP14, YES1 e ZBTB14.*

Os resultados do CMA encontrados foram confirmados por FISH (Figura 20). A translocação balanceada entre os cromossomos 15 e 18 (na mãe do paciente 8362) foi confirmada também por FISH (Figura 22).

Portanto, o resultado citogenômico final para o paciente 8362 é: 46, XY, add (18) (15q25.2→q26.3::18p11.22).

A comparação de casos descritos no DECIPHER com sobreposições fenotípicas à duplicação em 15q e a perda genômica em 18p está esquematizada nas figuras 18 e 19, respectivamente.



Figura 13. Fotos do paciente 8362, avaliado com 1 mês e 5 dias de idade (superior esquerda) e com 1 ano e 4 meses de idade (demais fotos).

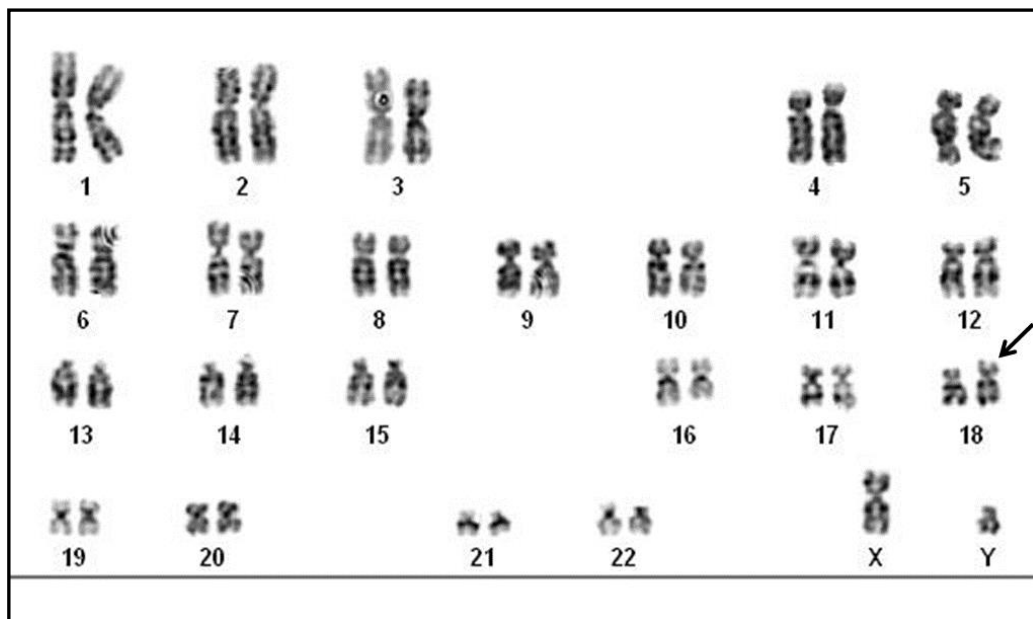


Figura 14. Resultado da análise citogenética do paciente 8362. A análise revelou cariótipo 46, XY, add(18) (p11.3), revelando material adicional no braço curto do cromossomo 18 (seta preta). O bandamento GTG foi realizado na resolução de aproximadamente 550 bandas.

Tabela 11. Resultados da técnica de CMA do paciente 8368 na plataforma *BeadChip Illumina 850K® Array*. Localização de acordo com GRC37/hg19.

Amostra	Região Cromossômica (ISCN) ^a	Alteração	Tamanho (kb)	Classificação	Origem	Sondas ^b	Observação ^c
Paciente 8362	arr[hg19]15q25.2q26.3 (84,041,308 – 102,461,162) x3	Ganho	18,419,855	Patogênica	Mãe com translocação balanceada	7242	124 RefSeq genes e 69 deles descritos no OMIM
	arr[hg19] 18p11.32p11.22 (13,034 – 8,763,596) x1	Perda	8,750,596	Patogênica	Mãe com translocação balanceada	3248	40 genes RefSeq , dos quais 27 são descritos no OMIM. Envolve genes haploinsuficientes

^a Nomenclatura citogenômica de acordo com ISCN 2013 (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*).

^b Número de sondas detectadas na hibridização dessas regiões na técnica de CMA (*Chromosomal Microarray Analysis*).

^c OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man* (disponível em www.omim.org).

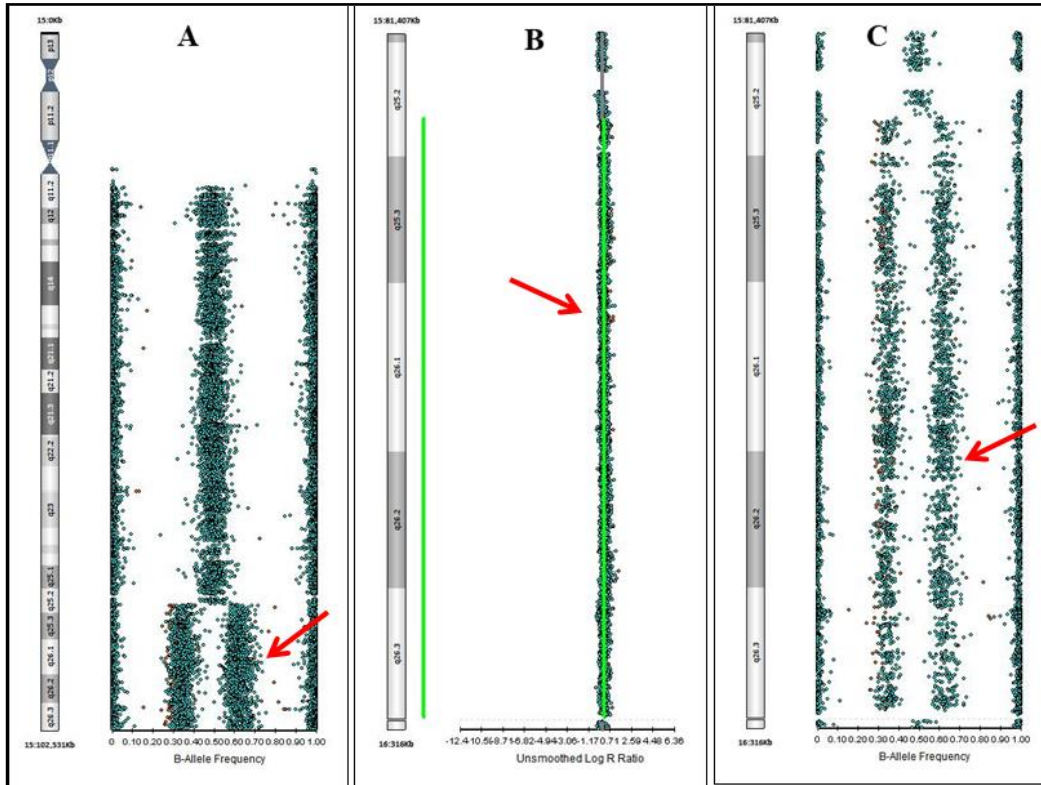


Figura 15. Perfil do resultado de CMA indicando uma duplicação (ganho) no paciente 8362. A análise revelou duplicação em 15q25.2q26.3 (plataforma *SNP-array* 850K Illumina®). **A)** duplicação de 18,4 Mb evidenciada pela seta vermelha. **B)** Um aumento na região evidencia a extensão da alteração (em verde), **C)** com a duplicação indicada pela seta vermelha. Imagem obtida pelo *BlueFuseTM Multi Analysis Software*.

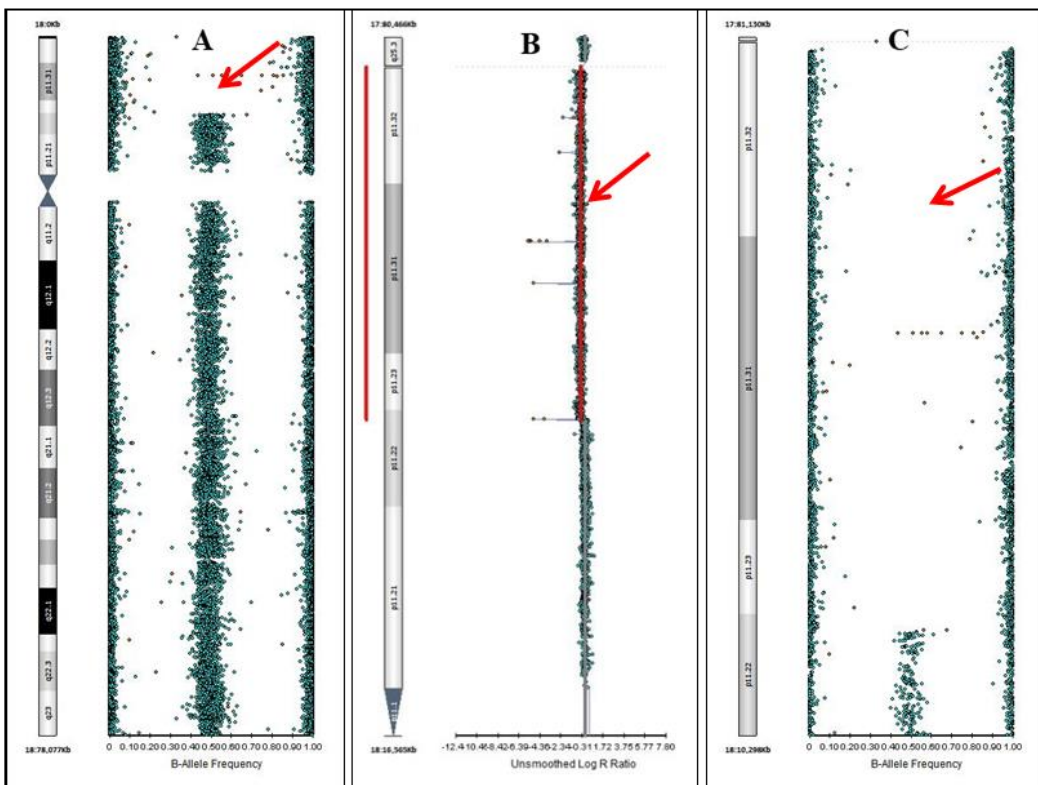


Figura 16. Resultado do CMA evidenciando uma perda (deleção) no paciente 8362. **A)** Deleção em 18p11.32p11.22 (seta vermelha), **B)** com a extensão da alteração até a extremidade do braço p do cromossomo 18 (em vermelho). **C)** Ausência de sondas na região com a deleção (seta vermelha). Imagem obtida pelo *BlueFuse MultiTM Analysis Software*.

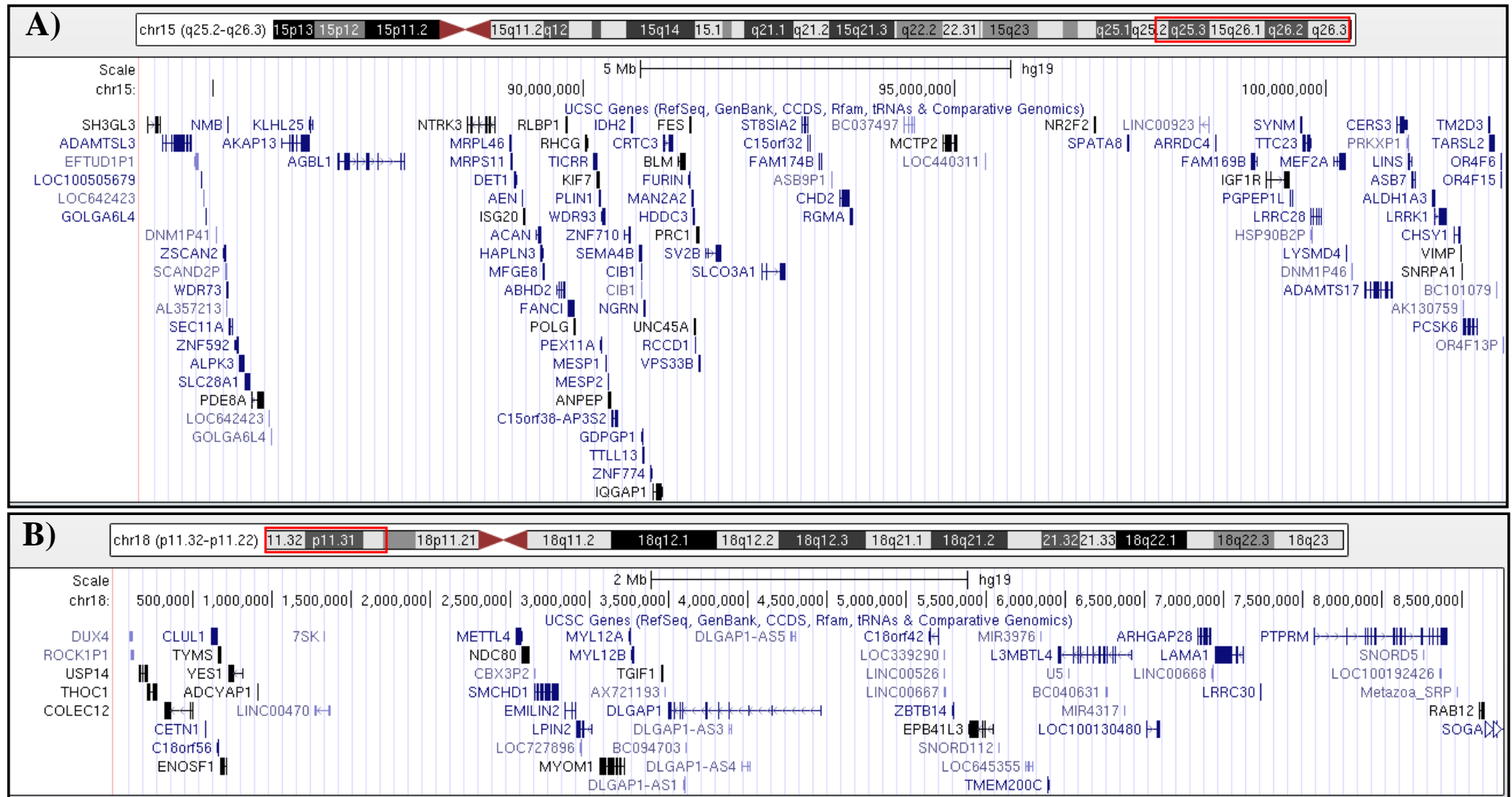


Figura 17. Visualização dos genes presentes em cada alteração encontrada no paciente 8362, através do UCSC Genome Browser (GRC37/hg19). A) Genes (RefSeq) presentes na localização genômica da duplicação em 15q25.2q26.3, e B) os genes presentes na localização genômica da deleção em 18p11.32p11.22.

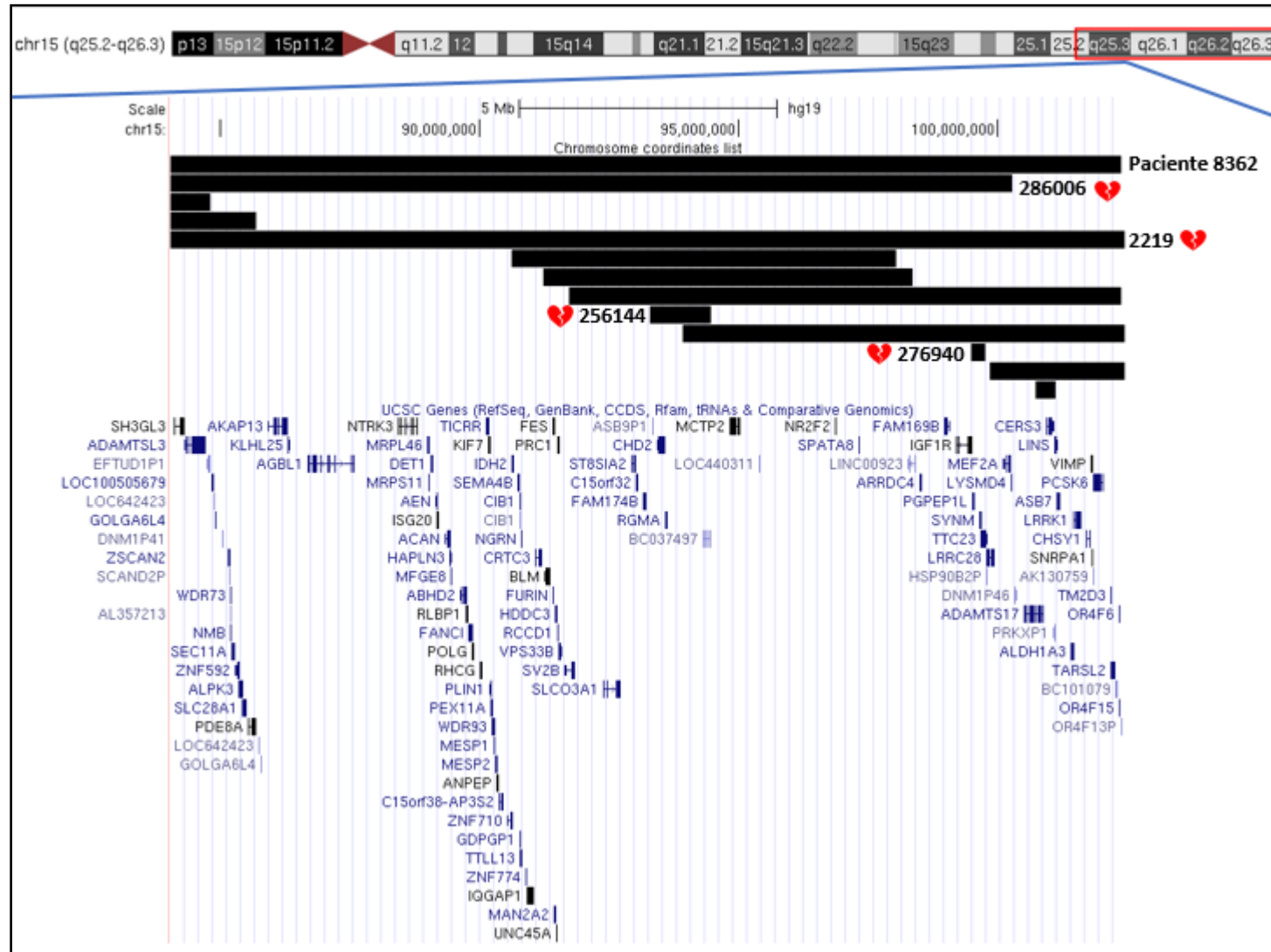


Figura 18. Análise das coordenadas genômicas de duplicações em 15q25.2q26.3 de 12 pacientes do DECIPHER em comparação com o paciente 8362. A duplicação em 15q25.2q26.3 do paciente 8362 em comparação com 12 casos que possuem, pelo menos, dois sinais clínicos em comum com nosso paciente. Os pacientes com numeração (registro no DECIPHER) e com um desenho de um coração partido são indivíduos com algum tipo de CC. As coordenadas genômicas estão todas mapeadas conforme GRC37/hg19. Observe os genes que se sobrepõem às coordenadas dos pacientes com CCs.



Figura 19. Análise das coordenadas genômicas de deleções em 18p11.32p11.22 de 21 pacientes do DECIPHER em comparação com o paciente 8362. A deleção em 18p11.32p11.22 do paciente 8362 em comparação com 21 casos que possuem, pelo menos, dois sinais clínicos em comum com nosso paciente. Os pacientes com numeração (registro no DECIPHER) e com um desenho de um coração partido são indivíduos com algum tipo de CC. As coordenadas genômicas estão todas mapeadas conforme GRC37/hg19. Observe os genes que se sobrepõem às coordenadas dos pacientes com CCs.

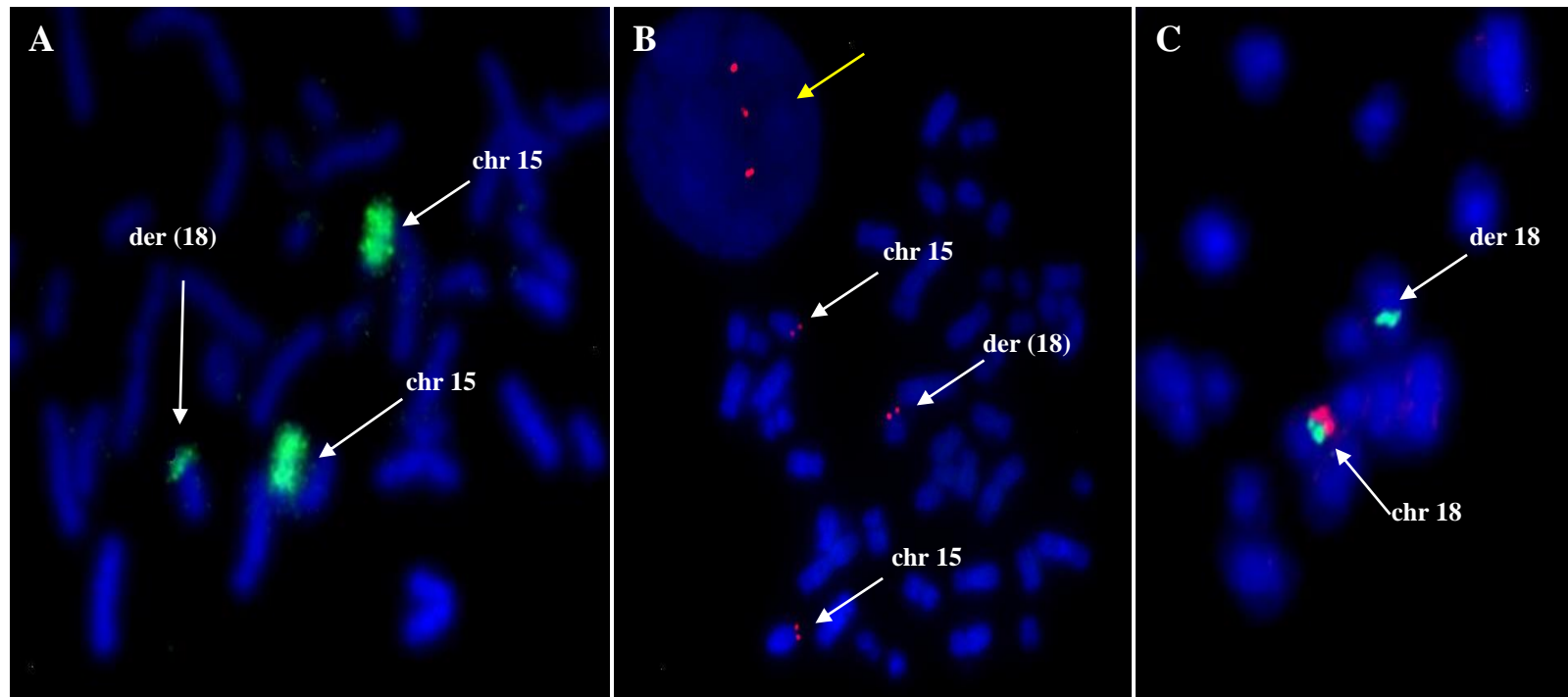


Figura 20. Resultado da técnica de FISH confirmando resultados de CMA no paciente 8362. A) utilizando a sonda *Coatsome 15* (ONCOR®) com marcação em verde para os cromossomos 15 e evidenciando a presença de uma região do 15 no braço curto do cromossomo 18. B) Sonda *TelVysion 15q SpectrumOrange* da VYSIS® para marcação de região subtelo mérica do cromossomo 15 (em vermelho), evidenciando essa região presente também no cromossomo 18. A seta amarela destaca a detecção de três cromossomos com regiões subtelo méricas do cromossomo 15. C) Utilizando sonda específica para marcação de regiões subtelo méricas e centroméricas do cromossomo 18 (sonda 18pter – *Texas Red* CYTOCELL®; *Alpha Satellite DNA Probe* CYTOCELL® para marcação centromérica do cromossomo 18 - corado em verde), evidenciou-se a deleção de uma região do braço curto do cromossomo 18 (der 18), confirmando assim, a deleção detectada no CMA

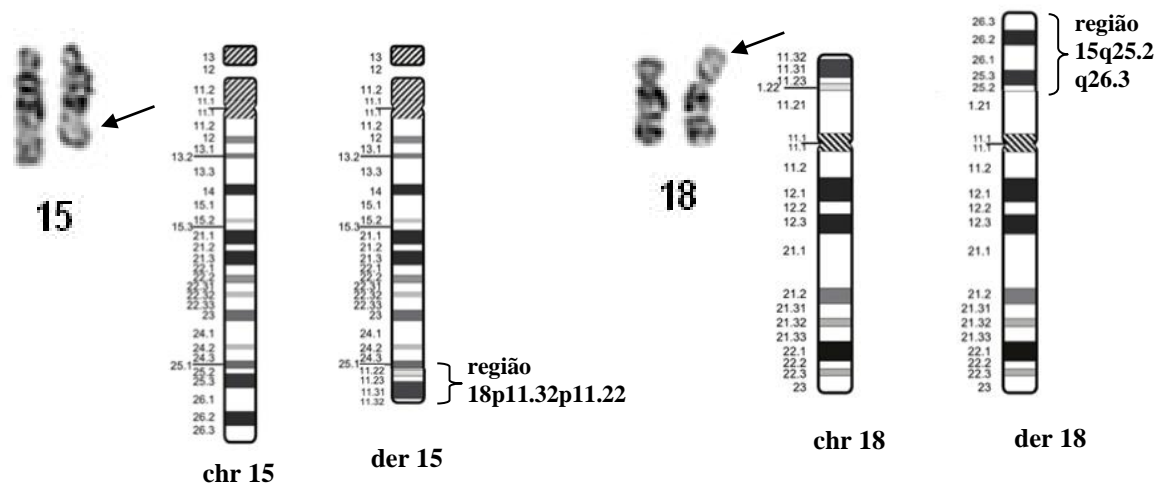


Figura 21. Cromossomos 15 e 18 resultantes do exame de cariótipo da mãe do paciente 8362 e esquemas de ideogramas explicitando a translocação balanceada entre os cromossomos 15 e 18. Os demais cromossomos são de padrões normais. **A)** Observe, na ponta da seta preta, um encurtamento do braço longo do cromossomo 15 em comparação com o seu homólogo do lado esquerdo. **B)** Adição de material no braço curto do cromossomo 18 (seta preta), evidenciando aumento dessa região em comparação com o seu homólogo do lado esquerdo. Os esquemas representam o seguinte resultado na mãe: 46, XX, t (15;18) (q25.2→q26.3; p11.32→p11.22).

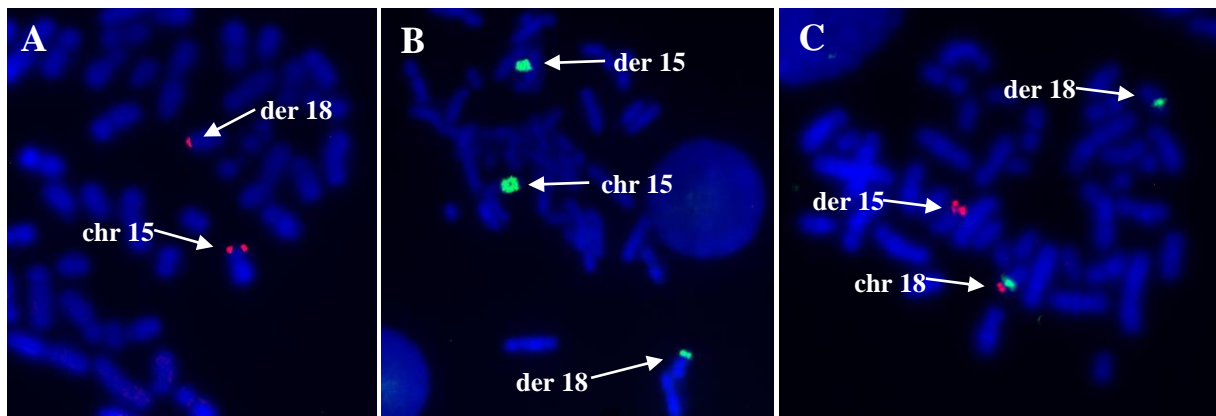
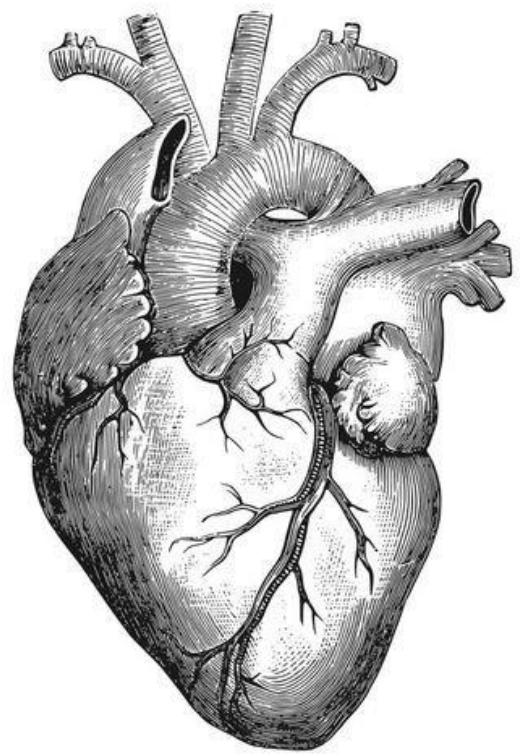


Figura 22. Resultados da técnica de FISH realizada em linfócitos metafásicos da mãe do paciente 8362, evidenciando a translocação balanceada entre os cromossomos 15 e 18 e indicando a não perda de material genômico, o que justifica a mãe ser normal e saudável. **A)** Sonda *TelVysion 15q SpectrumOrange* da VYSIS® para marcação de região subtelo mérica do cromossomo 15 (em vermelho), evidenciando essa região presente também no cromossomo 18. **B)** Sonda *Coatasome 15 (ONCOR®)* com marcação em verde para os cromossomos 15, evidenciando um cromossomo 15 com menor intensidade de coloração (der 15) e a presença de uma região do 15 no cromossomo 18, indicando a translocação entre esses dois cromossomos. **C)** sonda específica para marcação de regiões subtelo méricas e centroméricas do cromossomo 18 (sonda 18pter – *Texas Red CYTOCELL®*) e *Alpha Satellite DNA Probe CYTOCELL®* para marcação centromérica do cromossomo 18, evidenciando a presença de região do 18p no cromossomo 15 e a ausência dela em um dos cromossomos 18 (der 18). Esse resultado confirma a hipótese de translocação balanceada na mãe do paciente em questão.



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, analisamos clinicamente um grupo amostral de 31 pacientes diagnosticados com CCs, sendo 18 pacientes não síndrômicos e 13 síndrômicos (tabelas 5 e 6). Desse total, 27 pacientes foram investigados por análises genéticas moleculares, onde 37% foram diagnosticados com CIA e CIV, sendo esta última a mais frequente. Apesar do presente grupo amostral ser pequeno, essa frequência vai de acordo com o descrito por Fahed et al. (2013), onde se evidencia a CIV como a alteração mais frequente em recém-nascidos vivos. Quando se analisa o histórico familiar dos pacientes estudados em relação à manifestação de algum tipo de CC nas famílias, evidencia-se entre os não síndrômicos uma frequência maior de CCs em pessoas da mesma família (considerando pais não consanguíneos). Segundo Lee e Chung (2015), entre as causas genéticas bem estabelecidas para a etiologia de CCs não síndrômicas estão mutações que possuem uma herança autossômica dominante, indicando a provável explicação de alta recorrência familiar da doença no espectro não síndrômico.

A triagem para deleções na região 22q11.2 pela MLPA visou avaliar e detectar possíveis alterações no número de cópias genômicas nessa região dos pacientes analisados, pois se constitui como um desequilíbrio genômico frequente na manifestação de CCs (GOLDMUNTZ et al., 1998). Nos pacientes analisados pela MLPA, nenhum apresentou deleção na região cromossômica 22q11.2. Um fator a se considerar diz respeito à existência de poucos estudos que investigaram a prevalência de deleções em 22q11.2 em pacientes com CCs não conotrunciais e não síndrômicas. Um estudo brasileiro realizado por Huber et al. (2014) avaliou 392 pacientes com CCs não síndrômicas e não conotrunciais, evidenciando uma baixa prevalência de deleções em 22q11.2 (apenas 1,27% dos pacientes).

No que tange à paciente 8356 (não síndrômica), a técnica da MLPA mostrou uma duplicação na sonda que envolve o gene *TOP3B* e sugestiva de uma herança paterna da alteração. O pai da paciente não apresenta nenhuma alteração relacionada à CC, o que já a exclui como patogênica nos critérios de classificação de CNVs adotados. O gene *TOP3B* (OMIM #603582) codifica a proteína topoisomerase IIIB e evidências de investigação recentes sugeriram o seu papel na redução de supertorção do DNA (diminuindo *loops*), promoção da transcrição gênica, proteção contra danos ao DNA e redução da frequência de translocações cromossômicas (YANG et al., 2014). Além disso, níveis diferenciados de sua expressão sugerem uma relação com a metástase de câncer de mama (OLIVEIRA-COSTA et al., 2010), o que não se correlaciona com o presente caso.

Outros estudos que utilizaram MLPA em pacientes com cardiopatias congênitas evidenciaram ganhos genômicos em 22q11.2. É o caso da investigação realizada por Pires et al. (2014), onde houve uma triagem para CNVs na região 22q11.2 em 87 pacientes com CCs, constatando uma duplicação de 288 kb que envolve o gene em questão. Porém, a paciente relatada por esse estudo apresentou também duplicações maiores em outras regiões de 22q11.2 e possuía alterações extracardíacas (sendo de espectro síndrômico, o que já difere da paciente 8356). A análise de sua mãe (saudável) pela MLPA revelou a mesma duplicação em *TOP3B*, sugerindo a benignidade dessa CNV no fenótipo de cardiopatia congênita, o que vai de encontro ao caso da paciente 8356 do presente estudo. Na análise de sensibilidade à dosagem no *ClinGen Dosage Sensitivity Map*, o gene *TOP3B* ainda não foi evidenciado como sensível à presença de três cópias de sua sequência, além de haver a descrição de muitas duplicações na região em bancos de dados de indivíduos saudáveis. Ademais, não foi encontrada, até o momento, uma relação direta desse gene com a cardiogênese e/ou com cardiopatias congênitas na literatura científica disponível. Essas evidências colocam a duplicação encontrada na paciente 8356 como benigna, aliada à herança da mesma por um pai saudável.

No que se refere ao grupo de síndrômicos do presente trabalho, 5 receberam um diagnóstico clínico definido, a saber: síndrome de Noonan (paciente 8337), síndrome cardiofaciocutânea (paciente 8314), síndrome de Down (paciente 8426), síndrome de LEOPARD (paciente 8450) e síndrome Cornélia De Lange (paciente 8514). Com exceção da síndrome de Down, caracterizada canonicamente pela trissomia do cromossomo 21 (OMIM 190685), as demais síndromes possuem etiologia genética definida relacionada a mutações de ponto que envolvem genes específicos: a síndrome de Noonan (OMIM 163950) por mutações em algum (s) dos seguintes genes: *PTPN11* (OMIM 176876), *SOS1* (OMIM 182530), *RAF1* (OMIM 164760), *KRAS* (OMIM 190070), *NRAS* (OMIM 164790), *SHOC2* (OMIM 602775) e *CBL* (OMIM 165360); a síndrome de LEOPARD (Noonan com Múltiplas Manchas Lentiginosas, OMIM 151100) por mutações nos genes *PTPN11* e *RAF1*; a síndrome cardiofaciocutânea (CFC, OMIM 115150) devido a mutações em *BRAF* (OMIM 164757) e *MAP2K1* (OMIM 176872) ou *MAP2K2* (OMIM 601263) (RAUEN, 2013); e a síndrome de Cornélia De Lange (OMIM 122470) por mutações nos genes *NIPBL* (OMIM 608667), *SMC1A* (OMIM 300040), *SMC3* (OMIM 606062), *RAD21* (OMIM 606462) ou *HDAC8* (OMIM 300269) (ROHATGI et al., 2010).

Pela definição do diagnóstico clínico envolvendo síndromes com etiologia genética conhecida (item dos critérios de exclusão de amostras neste estudo), estes pacientes não foram

analisados pelo CMA na presente investigação (*array-CGH/SNP-arrays*), já que esta técnica não detecta mutações pontuais ou do tipo *indel*. Tais mutações podem, por exemplo, ser caracterizadas por técnicas de sequenciamento. Ademais, vale ressaltar que as síndromes de Noonan, LEOPARD e cardiofaciocutânea fazem parte das denominadas “*RASopathies*”, um conjunto de síndromes genéticas que têm em comum alterações que causam desregulação na via Ras/MAPK, indispensável no desenvolvimento embrionário e também em estágios posteriores do desenvolvimento (RAUEN, 2013). Desta forma, a etiologia genética para as alterações fenotípicas observadas nestes pacientes está mais evidenciada, inclusive para as CCs associadas a estas síndromes (CALCAGNI et al., 2017).

Dentro disto, os pacientes avaliados por CMA neste trabalho não possuem um diagnóstico sindrômico definido ou a síndrome definida clinicamente não apresenta, até o momento, uma etiologia genética estabelecida. Discutimos adiante os resultados dos dois pacientes que apresentaram alterações citogenômicas na investigação por CMA.

5.1 Paciente 8325

O paciente 8325 recebeu o diagnóstico clínico de Síndrome de MOMO (OMIM 157980) com base na combinação dos quatro sinais clínicos principais característicos (Macrossomia, Obesidade, Macrocefalia e Anormalidades Oculares - MOMO). Essa síndrome foi descrita por Moretti-Ferreira et al. (1993), onde analisaram dois pacientes independentes para a caracterização e proposição da nova síndrome. Posteriormente, foram publicados mais 6 trabalhos (até o presente momento) relatando casos de pacientes com MOMO. No total, foram descritos 9 pacientes até o momento, e nenhum deles em associação com algum tipo de cardiopatia congênita (DI DONATO et al., 2012; VU et al., 2012; SHARDA et al., 2011; WALLERSTEIN; SUGALSKI, 2010; GIUNCO et al., 2008; ZANNOLLI et al., 2000; MORETTI-FERREIRA et al., 1993).

A etiologia genética da síndrome de MOMO ainda não é caracterizada, sendo o primeiro gene candidato proposto por Vu et al. (2012). Neste trabalho, os pesquisadores encontraram que a disrupção do gene *LINCOO237* (OMIM 614992, um gene que codifica um RNA não codante), por meio de uma translocação balanceada entre os cromossomos 16 e 20, leva ao aumento de transcritos desse gene no cérebro (propondo a causa da deficiência intelectual), e uma diminuição da expressão em linfoblastos no paciente MOMO analisado. Entretanto, nenhum outro trabalho corroborou ainda tal proposição.

Na análise por CMA, o paciente 8325 apresentou uma deleção em 1p36.11 e uma ausência de heterozigiosidade (AOH) em 2p13.2p12. A deleção em 1p36.11, com tamanho de 159,1 kb de tamanho, envolve 3 genes relevantes: *RHD* (OMIM 111680), *TMEM50A* (OMIM 605348) e *RHCE* (OMIM 111700). O *ClinVar* (NCBI) descreve três pacientes com deleções nessa região, onde apenas uma é considerada clinicamente relevante (por envolver muito mais genes, em especial o gene *MACO1* que codifica a macoilina, uma proteína conhecida por seu papel na regulação da excitabilidade neuronal). Já o DECIPHER descreve apenas dois casos com sobreposição a essa região, mas com o envolvimento de um número maior de genes. Adicionalmente, o DGV descreve 45 deleções nessa região (benignas), envolvendo pelo menos 1 éxon dos 3 genes supracitados.

O gene *RHD* codifica a proteína RHD, o antígeno D do grupo sanguíneo Rh. Esse gene é altamente polimórfico, sendo a classificação Rh-positivo e Rh-negativo dada pela presença e ausência dessa proteína na superfície dos eritrócitos, respectivamente. Deleções pequenas que envolvem esse gene são caracterizadas como polimorfismos relacionados ao grupo sanguíneo do sistema Rh (LOPEZ et al., 2018), sendo parte da variabilidade genética desse sistema mesmo em deleções um pouco maiores (SRIVASTAVA et al., 2018).

Similarmente ao gene *RHD*, os genes *TMEM50A* e *RHCE* também estão relacionados ao sistema sanguíneo. Os genes *TMEM50A* (*Transmembrane 50A*) e *RHCE* (codifica a proteína *Blood group Rh – CE pelypeptide*) fazem parte do chamado *RH group*, estando ligados ao sistema sanguíneo Rh (WAGNER; FLEGEL, 2000). Adicionalmente, a análise da deleção do presente caso em bancos de dados de indivíduos saudáveis revelou: 45 deleções que se sobrepõe à região do paciente 8325 (figura 12), envolvendo pelo menos um éxon dos 4 genes presentes na respectiva localização genômica de nosso paciente; e apenas um caso descrito no DECIPHER (figura 12), colocando tal alteração como benigna. Desta forma, esta deleção não está relacionada - devido ao seu tamanho, conteúdo e localização genômicas - com o fenótipo de cardiopatia observado.

Ainda em relação à deleção na região 1p36 detectada no probando, vale ressaltar que essa alteração não se sobrepõe a regiões críticas descritas na literatura para a conhecida síndrome de deleção 1p36 (OMIM 607872), que envolve CNVs com tamanhos variáveis na escala de megabases (JORDAN; ZAVERI; SCOTT, 2015; D'ANGELO et al., 2010). A análise da região no *UCSC Genome Browser* (GRC37/hg19) não mostrou sobreposição com genes clinicamente relevantes, divergindo das deleções descritas de 1p36 na literatura científica. Entretanto, o paciente possui algumas características fenotípicas que se sobrepõe aos sinais clínicos da deleção de 1p36, a saber: deficiência intelectual, atraso no

desenvolvimento, dificuldade na fala, hipotonia, cardiopatia congênita e problemas oculares (BATTAGLIA et al., 2008).

Os resultados de CMA também revelaram uma ausência de heteroziguidade (AOH) em 2p13.2p12, envolvendo 45 genes RefSeq. Esta AOH pode surgir por deleção da região em um dos cromossomos ou pela perda de alelos “selvagens” (*wild type alleles*) devido a mutações que mudam o estado de uma região genômica em heterozigose para homozigose durante o processo de meiose. Estas alterações podem “desmascarar” alelos recessivos antes “encobertos” pela presença de marcadores polimórficos (como os SNPs) que definiam a heteroziguidade dos *loci* (RYLAND et al., 2015). No presente caso, tal AOH indica uma dissomia uniparental (UPD) na região cromossômica 2p13.2p12. Por isso, esta alteração pode revelar possíveis mutações recessivas presentes nesta região. Entre os genes possivelmente relevantes ao fenótipo do paciente localizados nesta região genômica, podemos citar: *ALMS1* (OMIM 606844), *DGUOK* (OMIM 601465), *ACTG2* (OMIM 102545), *BOLA3* (OMIM 613183), *CYP26* (OMIM 605207) e *SMYD5* (sem registro no OMIM), sendo os dois primeiros descritos como haploinsuficientes no banco de dados *ClinGen Dosage Sensitivity Map*. Mutações recessivas nestes genes estão relacionadas a variados fenótipos clínicos, como podemos ver a seguir. Vale ressaltar que a técnica de CMA, ao apontar regiões com ausência de heteroziguidade, não nos fornece as possíveis mutações recessivas na região (o que só é possível por técnicas de sequenciamento). Portanto, as discussões dos genes a seguir são pautadas no panorama do que mutações recessivas nessa região, se presentes, podem causar.

O gene *ALMS1* codifica uma proteína que desempenha papel na organização dos microtúbulos, especialmente no que diz respeito à formação e manutenção de estruturas celulares denominadas cílios. Mutações recessivas nesse gene são conhecidas por causar a síndrome de Alström (OMIM 203800) (MARSHALL et al., 2011). Entre os sinais clínicos característicos desta síndrome que apresentam sobreposição fenotípica com o presente caso destacam-se: obesidade infantil, deficiência intelectual e defeitos cardíacos (cardiomiopatia dilatada, geralmente).

Descrito como tendo um papel essencial na fosforilação de desoxirribonucleosídeos de purina na matriz mitocondrial, o gene *DGUOK* (*deoxyguanosine kinase*) é haploinsuficiente e está relacionado a alterações recessivas. Há a descrição de 4 pacientes no OMIM com mutações em homozigose (envolvendo o gene *DGUOK*), com os quais o paciente 8325 tem as seguintes sobreposições fenotípicas: hipotonia, hepatomegalia e elevação do nível de enzimas hepáticas. O paciente 8325, quando submetido a um exame complementar aos 2 meses de idade, também apresentou elevação de marcadores de necrose muscular.

Em relação ao gene *ACTG2*, este possui um papel conhecido na codificação de uma actina (*actin gamma-enteric smooth muscle*) importante na manutenção da estrutura de músculos lisos entéricos. Mutações nesse gene foram evidenciadas em associação com miopatia visceral, pseudo-obstrução intestinal crônica e megacistis (MILUNSKY et al., 2017). Porém, não foi diagnosticado no presente caso nenhuma alteração relacionada com tais patologias.

Mutações recessivas no gene *BOLA3* (*bola-like protein 3*) estão associadas a disfunções mitocondriais, posto que *BOLA3* possui um papel crucial no sistema de transporte de elétrons e *clusters* de ferro-enxofre (Fe – S) indispensáveis ao amadurecimento de complexos protéicos relevantes nas cadeias respiratórias mitocondriais. Nishioka et al. (2018) descrevem uma paciente com cardiomiopatia hipertrófica, atraso no desenvolvimento, dificuldades em se alimentar, atrofia nas fibras musculares esqueléticas, lesões no cérebro e medula espinhal, entre outras anomalias. Os pesquisadores atribuíram tais alterações à presença de uma mutação em homozigose em *BOLA3*, enfatizando a importância de alelos normais desse gene para o devido funcionamento de vias biossintéticas de enzimas e lipídeos. Além desta investigação, outra pesquisa evidenciou que mutações nesse gene podem causar atrofia óptica, leucodistrofia, neurodegeneração pós - desenvolvimento normal, cardiomiopatia, surdez e níveis elevados de alanina e lactato no sangue (BAKER et al., 2014).

Outro gene de importância clínica nessa região de AOH em nosso paciente é *CYP26B1*. Este gene codifica um membro da superfamília do citocromo P450, tendo papel na regulação da síntese de colesterol, esteróides e outros lipídeos, especialmente ácido retinóico. Wen et al. (2013) avaliaram pacientes com deficiência intelectual, atraso na linguagem, assimetrias faciais, malformações nas orelhas, e anomalias craniofaciais. Estes pesquisadores destacaram que a haploinsuficiência de *CYP26B1* (por mutações ou por deleções da região que o envolve) contribui para a manifestação de tais anomalias vistas em seus pacientes, dada a importância de vias em que o produto desse gene atua.

Por último, o gene *SMYD5* (membro da família *SMYD*) é conhecido por atuar, juntamente com outros membros de sua família, na regulação do desenvolvimento e da função dos sistemas musculares cardíaco e esquelético, especificamente na organização e ajuntamento de miofibrilas que compõem a estrutura desses músculos. Alguns membros dessa família, como o gene *SMYD2*, são indispensáveis na adequada formação do coração em camundongos (DU; TAN; ZHANG, 2014). Ademais, o gene *SMYD5* controla a atividade da heterocromatina e a integridade cromossômica durante a diferenciação embrionária de células estaminais. Mutações que levam à depleção desse gene podem desregular a diferenciação

embrionária normal dessas células, influenciando até no crescimento de alguns tipos de câncer na vida adulta (KIDDER et al., 2017).

Dado o contexto destes genes que se localizam na região de AOH encontrada em nosso paciente, cabe reforçar que são necessárias mais investigações (por exemplo, o sequenciamento) para verificar se há a presença de tais mutações em alguns dos genes supracitados que estão contidos na região 2p13.2p12. Tal investigação adicional permitirá testar a hipótese de que mutações nessa localização genômica podem estar associadas aos sinais clínicos identificados no presente caso (incluindo a cardiopatia congênita), além de identificar possíveis mutações em outros genes e/ou outros tipos de alterações genéticas não detectadas pela CMA, visto que a perda em 1p36 não possui relação com o fenótipo de nosso paciente. Caso fossem identificadas mutações recessivas em alguns dos genes supracitados, os genes *SMYD5*, *ALMS1* e *BOLA3* seriam plausíveis candidatos à possibilidade de relação com a cardiopatia congênita em nosso paciente.

5.2 Paciente 8362

O paciente 8362 nasceu com múltiplas malformações, incluindo a cardiopatia congênita. Com as análises genéticas realizadas, tanto de sua amostra quanto as amostras de seus pais, avaliamos que o material adicional presente no braço curto do cromossomo 18 tem origem em uma translocação balanceada na mãe. A mãe do probando apresenta histórico de perdas gestacionais recorrentes, devido à presença da translocação balanceada entre os cromossomos 15 e 18. Quando consideramos o mecanismo que levou à herança desequilibrada da translocação balanceada da mãe na geração do paciente 8362, podemos sugerir que o mecanismo de segregação adjacente-1 está envolvido na forma como essa alteração foi transmitida ao probando em questão, visto que a herança do cromossomo derivado 18 (contendo uma parte da região distal de 15q) gerou o desequilíbrio genômico. Uma outra possibilidade desbalanceada seria a herança do cromossomo derivado 15 (contendo a região de 18p11.32p11.22), o que resultaria em trissomia parcial de 18p e monossomia parcial de 15q25.2q26.3. o que provavelmente resultaria em abortamento espontâneo.

A trissomia parcial de 15q e simultânea monossomia de 18p observadas no paciente estão relacionadas ao fenótipo apresentado pelo presente caso, havendo sobreposição clínica com duas alterações citogenômicas já descritas na literatura: síndrome de deleção 18p ou monossomia de 18p (OMIM 146390) e duplicação ou trissomia de 15q (foram consideradas aqui as descrições de duplicações que envolvem a região de sobreposição com 15q25.2q26.3,

já que alguns casos descritos na literatura com trissomias envolvendo 15q são proximais. Um exemplo de uma síndrome envolvendo duplicação em 15q, mas sem relação e nem sobreposição à região genômica com o presente caso, é a síndrome de duplicação 15q11-q13, conhecida por estar envolvida na susceptibilidade ao espectro do autismo).

Duplicações ou trissomias que envolvem a região distal de 15q são extremamente raras e há poucos casos descritos na literatura científica disponível. Há diferenças entre os sinais clínicos descritos nas publicações existentes, visto que abrangem porções cromossômicas diferentes entre si e também alguns relatos de tetrassomia de 15q. Apesar disso, evidencia-se a presença de sinais clínicos característicos encontrados na maioria dos casos descritos, onde destacam-se: crescimento excessivo pré e pós natal, malformações craniofaciais, fâcies assimétricas e alongadas, nariz largo e proeminente, ponte nasal larga, filtro nasal longo, micrognatia, cardiopatia congênita, entre outros (KRISTOFFERSON; BERGWALL, 1984; SCHNATTERLY et al., 1984; TATTON-BROWN et al., 2009; KIM et al., 2011). Muitos dos casos descritos envolvem, além da trissomia ou duplicação de 15q, uma monossomia (maioritariamente) ou outra alteração genética de outros cromossomos. Ademais, um número considerável de casos possui tal alteração em 15q devido à uma translocação balanceada em um dos pais envolvendo o cromossomo 15 (TZANCHEVA; KRACHOUNOVA; DAMJANOVA, 1981; KANEKO; KATABUCHI; MARUTA, 1986; SINGLA et al., 2014; COX; BUTTLER, 2015), o que é algo em comum com o presente caso de nosso estudo. Desta forma, o paciente 8362 apresenta sinais clínicos que se sobrepõe com os casos de trissomia de 15q descritos na literatura científica.

O banco de dados *ClinVar* (NCBI) descreve 28 casos com duplicações patogênicas que se sobrepõem à região duplicada de 15q do presente caso. Além disso, 172 pacientes com ganhos genômicos que também se sobrepõem ao presente caso são descritos no DECIPHER. Destes, 3 ganhos são classificados como patogênicos e outros 10 como provavelmente patogênicos. A figura 18 ilustra a comparação entre as duplicações de 12 casos (que possuem pelo menos dois sinais clínicos relevantes em comum com o nosso caso) e a duplicação encontrada no paciente 8362.

A duplicação em 15q25.2q26.3 encontrada no paciente 8362, revelada pela análise de CMA, contém 21 genes relevantes em possível associação com o fenótipo apresentado pelo presente caso. Deste total, 12 genes estão relacionados, direta ou indiretamente, a processos da cardiogênese ou em associação com fenótipos de CCs descritos na literatura. Estes últimos são: *ADAMTSL3* (OMIM 609199), *MCTP2* (OMIM 616297), *MEF2A* (OMIM 600660), *MESPI1* (OMIM 608689), *MESP2* (OMIM 605195), *NR2F2* (OMIM 107773), *NTRK3*

(OMIM #191316), *PCSK6* (OMIM 167405), *PDE8A* (OMIM 602972), *IGF1R* (OMIM 147370), *CIB1* (OMIM 602293), *ALPK3* (OMIM 617608) e *UNC45A* (OMIM 611219).

O gene *ADAMTSL3* (*ADAMTS-like protein 3*) codifica uma proteína envolvida em processos de metabolismo de proteínas, sendo parte de um grupo de peptidases. Este gene não está descrito na literatura científica como tendo uma relação direta com o processo de cardiogênese, mas em associação com pacientes que apresentaram CCs e duplicação de 15q simultaneamente. Hall et al. (2003) demonstraram, por análises de *Northern blot*, que o gene *ADAMTSL3* é altamente expresso em tecidos hepáticos, renais, musculares esqueléticos e cardíacos, além de desempenhar um possível papel na angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos). Unindo esta última evidência com malformações cardíacas congênitas encontradas em pacientes com tetrassomia de 15q (com sobreposição genômica ao presente caso), Xu et al. (2014) e George-Abraham et al. (2012) propõem uma explicação de que o aumento na dosagem de *ADAMTSL3* (devido ao aumento de seu número de cópias genômicas) pode estar relacionado à patogênese da malformação cardíaca observada, colocando tal gene como um componente a ser melhor investigado em pesquisas futuras.

O gene *MCTP2*, responsável por codificar a proteína *multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2*, é descrito por ter um papel na ligação de íons cálcio e em processos do desenvolvimento embrionário. Mais especificamente, foi evidenciado por estar diretamente relacionado a processos da cardiogênese, sendo relevante no desenvolvimento de vias de saída do coração. Uma investigação analisou pacientes com coarctação da aorta, síndrome do coração esquerdo hipoplásico e defeitos obstrutivos nas vias de saída esquerdas do coração. Além disso, utilizaram embriões do organismo-modelo *Xenopus laevis* para verificar o efeito da alteração de dosagem do gene *MCTP2* no desenvolvimento das vias de saída cardíacas. Os resultados evidenciaram que o gene em questão é sensível à alteração de sua dosagem, corroborando a evidência de que uma superexpressão pode levar à malformações nas vias de saída cardíacas. Ademais, os pacientes com CCs investigados apresentaram duplicações intragênicas em *MCTP2* (LALANI et al., 2013). Estas evidências caracterizam as alterações na expressão desse gene como relacionadas ao surgimento de CCs, colocando-o como mais um candidato à causalidade de CC em nosso paciente.

Associado com diversos processos celulares ligados ao desenvolvimento embrionário do tecido muscular, diferenciação neuronal, controle do crescimento celular e apoptose, o gene *MEF2A* é responsável por codificar um fator de transcrição denominado *myocyte enhancer factor 2A*. Esse gene está ligado também ao processo da cardiogênese, sendo integrante da rede de genes que modula o conjunto de fatores transcricionais ligados ao

transcriptoma do desenvolvimento cardíaco (SCHLESINGER et al., 2011). Ademais, estudos utilizando *knockdown* desse gene em camundongos sugeriram um relevante papel de *MEF2A* na manutenção de miofibrilas cardíacas na citoarquitetura de cardiomiócitos, demonstrando a relevância desse gene para a integridade estrutural cardíaca (PENG et al., 2008; EWEN et al., 2011). Mutações nesse gene podem gerar também, por exemplo, doença arterial coronariana (BHAGAVATULA et al., 2004). Estas evidências colocam o gene em questão no rol de candidatos ao surgimento de alterações estruturais cardíacas congênitas.

Entre os primeiros genes que começam a atuar no processo inicial de diferenciação embrionária cardíaca está *MESPI* (*Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1*). Este gene possui o papel de controlar a velocidade, polaridade e direcionalidade da migração de células progenitoras cardíacas (CHIAPPARO et al., 2016), regulando também outros genes envolvidos na especificação de células cardíacas e sua migração (LESCROART et al., 2018; CUNNINGHAM et al., 2017; KELLY, 2016). Mutações em *MESPI* estão associadas à etiologia genética de CCs (WERNER et al., 2016). Membro da mesma família, o gene *MESP2* também é crucial na cardiogênese desde o seu início na mesoderme, atuando junto com *MESPI* (KITAJIMA et al., 2000). Estas evidências, em conjunto, reforçam a tese de que alterações na dosagem desses genes (como na duplicação ocorrida em nosso paciente) podem influenciar no desenvolvimento estrutural cardíaco, já que eles atuam em momentos cruciais da diferenciação cardíaca e ainda interagem com diversos outros genes. Corroborando com esta prerrogativa, Xu et al. (2014) e George-Abraham et al. (2012), ao descrever pacientes com tetrassomia de 15q, apontaram a duplicação desses genes como relacionada às CCs.

O gene *NR2F2* (*Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2*) codifica um fator de transcrição envolvido na regulação de muitos genes e que se caracteriza por ser um receptor nuclear, estando relacionado a vias de diferenciação ectodérmica e regulação da telomerase. Muitas investigações têm evidenciado alterações genéticas envolvendo esse gene como uma das causas no surgimento de CCs. Mutações que levam à perda de função gênica (*loss-of-function*) têm sido associadas à predisposição para o desenvolvimento de CCs (BASHAMBOO et al., 2018; QIAO et al., 2017). Já no caso de deleções que envolvem *NR2F2*, foi evidenciado que a haploinsuficiência do gene causa malformações cardíacas e hérnia diafragmática congênitas (BRADY et al., 2013). Adicionalmente, esse gene é atuante na diferenciação de células cardíacas através de *down-regulation* de outros genes (PURSANI et al., 2017), levando-nos a pensar que a dosagem do produto gênico de *NR2F2* pode influenciar na maneira como outros genes são regulados por ele. Li et al. (2017) e Al Turki et al. (2014) realizaram sequenciamento em pacientes com CCs e detectaram mutações e

variantes raras envolvendo o gene *NR2F2*, evidenciando-o como relacionado ao desenvolvimento de CCs.

Quanto ao gene *NTRK3* (*Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3*), Werner et al. (2014) destacaram a sua importância no desenvolvimento normal do coração em modelos animais. Em um estudo com 467 pacientes com defeitos do septo ventricular (comunicações interventriculares), os pesquisadores encontraram mutações *missense* em *NTRK3* de alguns casos e correlacionaram tal alteração com o desenvolvimento de defeitos nos septos ventriculares. Além do envolvimento com a cardiogênese, esse gene também possui um papel no desenvolvimento e plasticidade neuronais, atuando no crescimento dendrítico e ramificação das células de Purkinje em camundongos (JOO; HIPPENMEYER; LUO, 2014).

Descrito por Flaquer et al. (2013) como um novo *loci* relacionado às CCs, o gene *PCSK6* está envolvido na interação com outros genes durante a formação do segundo campo cardíaco, importante para a septação atrial do coração em desenvolvimento. Desta forma, evidências experimentais colocaram alterações em tal gene como associadas às malformações nos septos atriais (comunicações interatriais) (ZHANG et al., 2016), uma alteração detectada no paciente 8362 (CIA) em nossa investigação.

No que se refere aos genes *PDE8A*, *UNC45A*, *IGF1R*, *CIB1* e *ALPK3*, destacam-se, respectivamente, as seguintes relações com a cardiogênese e CCs: regulação iônica e acoplamento de excitabilidade-contração em cardiomiócitos (PATRUCCO et al., 2010); formação dos arcos aórticos (ANDERSON et al., 2007); proliferação e regeneração de cardiomiócitos (GAN et al., 2015); hipertrofia cardíaca patológica devido a superexpressão do gene (HEINEKE et al., 2009); e mutações no gene que levam à cardiomiopatia congênita e dismorfismos (ÇAGLAYAN et al., 2017; VAN SLIGTENHORST et al., 2012), além de atuação na diferenciação de cardiomiócitos (HOSODA et al., 2001).

Dentro dos genes expostos acima, apesar de terem relação com algum tipo de CC ou com processos da cardiogênese, vale ressaltar que o paciente 8362 possui também uma CIV (além da CIA) e o gene descrito na literatura científica em associação direta com defeitos do septo interventricular é *NTRK3*, não desconsiderando o envolvimento dos outros genes supracitados com o surgimento de CC em nosso paciente.

O paciente 8362 também apresentou deficiência intelectual e ventriculomegalia lateral e do terceiro ventrículo. Além dos genes envolvidos com a cardiopatia congênita, a duplicação em 15q25.2q26.3 também abrangeu outros genes com relevância clínica e associação com o sistema nervoso. São eles: *LINS1* (OMIM 610350), *NGRN* (OMIM 616718), *POLG* (OMIM 174763), *RGMA* (OMIM 607362), *ST8SIA2* (OMIM 602546) e *KIF7* (OMIM 611254). O

envolvimento desses genes com o sistema nervoso central está evidenciado, respectivamente, por: desempenhar papel crucial na cognição humana e em vias de sinalização do desenvolvimento do cérebro e de sua função (AKAWI et al., 2013), além de ser candidato à causalidade de deficiência intelectual (NAJMABADI et al., 2011); atuar no desenvolvimento do tubo neural (YU et al., 2017); expressão do gene durante o desenvolvimento do eixo neural (OLDEKAMP et al., 2003), havendo associação com o surgimento de deficiência intelectual quando deletado (CAPELLI et al., 2011); promover a diferenciação de oligodendrócitos e da integridade da mielina e axônios (SZEWCZKY et al., 2016); mutações nesse gene estarem envolvidas na etiologia genética das síndromes hidroletal (OMIM 236680) e acrocalosal (OMIM 200990) (ALI et al., 2012; PUTOUX et al., 2010).

Os sinais clínicos apresentados pelo paciente 8362, como exposto nos parágrafos anteriores, possuem relevante sobreposição com o ganho genômico em 15q25.2q26.3. Porém, não explicam todo o fenótipo clínico identificado no paciente. Além da duplicação, o paciente apresentou uma perda genômica no braço curto do cromossomo 18. A deleção em 18p11.32pter se sobrepõe consideravelmente com a conhecida Síndrome de Deleção 18p (ou Monossomia de 18p, OMIM 146390). Os sinais clínicos descritos para esta síndrome de deleção incluem: atraso global do desenvolvimento, dismorfismos craniofaciais com um rosto arredondado, ouvidos displásicos, boca grande e com anomalias nos dentes, além de anomalias congênitas nas costelas, genitais, cérebro, olhos e coração (TURLEAU, 2008). Wester et al. (2006) examinaram 7 pacientes com deleções em 18p e verificaram que a deleção mais próxima do centrômero (18p11.2) causou uma severidade maior na manifestação de deficiência intelectual, enquanto deleções mais distais estavam associadas à ausência de deficiência intelectual ou a sua manifestação de forma moderada. Além disso, seis dos sete pacientes apresentaram hipotonia muscular.

Há cerca de 47 perdas genômicas patogênicas descritas no *ClinVar* com sobreposição à região de nosso paciente. Além disso, o DECIPHER apresenta 123 pacientes com deleções nessa região, onde 26 são classificadas como patogênicas e, dentre estas, 9 apresentaram cardiopatia congênita. A figura 19 ilustra a comparação entre as deleções de 21 casos (que possuem pelo menos dois sinais clínicos relevantes em comum com o nosso caso) e a perda genômica em 18p11.32p11.21 encontrada no paciente 8362.

A região deletada no paciente 8362 apresenta 40 genes, e entre estes três estão bem caracterizados quanto à haploinsuficiência e relacionados a alterações recessivas: *TGIF1* (OMIM 602630), *LPIN2* (OMIM 605519) e *LAMA1* (OMIM 150320). Além destes, outros genes são relevantes clinicamente: *ADCYAP1* (OMIM 102980), *DLGAP1* (OMIM 665445),

MTCL1 (OMIM 615766), *MYOM1* (OMIM 603508), *RAB12* (OMIM 616448), *SMCHD1* (OMIM 614982), *THOC1* (OMIM 606930) e *TYMS* (OMIM 188350).

O gene *TGIF1* codifica um repressor transcricional que pode inibir a expressão de outros genes ligando-se diretamente ao DNA. Mutações nesse gene que levem à perda de função podem gerar holoprosencefalia em humanos, sendo um gene importante durante o desenvolvimento embrionário (MELHUIH; TANIGUCHI; WOTTON, 2016; TANIGUCHI et al., 2012; POWERS et al., 2010). Apesar de não apresentar holoprosencefalia, o presente caso possui dismorfismos craniofaciais, evidenciados pelas assimetrias faciais e pelos resultados de exames de imagem por ressonância magnética do crânio.

Abu-Amero et al. (2010) investigaram uma paciente com deleção em 18p e que apresenta características semelhantes ao do paciente 8362. Os sinais clínicos dessa paciente que estão em sobreposição com o nosso paciente são: deficiência intelectual, dismorfismos faciais e ventriculomegalia lateral e do terceiro ventrículo. Os pesquisadores deste trabalho destacam que a haploinsuficiência dos genes *ADCYAPI* e *LPIN2* (ocasionada por suas deleções) explicam, parcialmente, o fenótipo de ventriculomegalia lateral e do terceiro ventrículo, o que vai de encontro ao paciente de nosso estudo. Quando analisamos as funções desses dois genes, constatamos que as suas relações com o desenvolvimento e maturação do cérebro humano são cruciais para a adequada diferenciação estrutural desse órgão (ABU-AMERO et al., 2010). Além dessa relação com o aspecto neurológico, o gene *LPIN2* possui também uma forte relação com processos fisiológicos do fígado (PETERFY et al. 2001). Entretanto, não foram observadas alterações hepáticas no paciente 8362.

No que se refere ao gene *LAMAI*, ele é conhecido por desempenhar um papel no desenvolvimento do cerebelo, além de possuir expressão gênica considerável em membranas epiteliais de tecidos específicos como túbulos seminíferos, rins, tireoide, glândulas mamárias/salivares, cérvix e estroma endometrial (HENG ET AL., 2011; VIRTANEN et al., 2000). Mutações nesse gene estão associadas com displasia cerebelar e cistos com ou sem distrofia na retina (ALDINGER et al., 2014). Sun et al. (2018) descrevem uma paciente com deleção em 18p e que possui as seguintes alterações: anomalias craniofaciais, deficiência intelectual e baixa estatura. Correlacionando genótipo-fenótipo, os autores atribuíram as alterações clínicas observadas a deleções de três genes, entre eles *LAMAI*. Devido à haploinsuficiência desse gene, a deleção que o envolve no paciente 8362 compõe, muito possivelmente, a lista de genes que estão envolvidos com as alterações neurológicas observadas no paciente.

O gene *DLGAPI* está envolvido com funções ligadas ao sistema nervoso central, havendo pesquisas que corroboram alterações nesse gene como associadas a doenças neurológicas (RASMUSSEN; RASMUSSEN; SILAHTAROGLU, 2017). Coba e colaboradores (2018) realizaram o *knockout* desse gene em camundongos e constataram que estes apresentaram alterações na densidade pós-sináptica e consequente redução de sociabilidade. Além disso, Rasmussen e colaboradores (2017) destacam que *DLGAPI* pode estar envolvido, dentre vários outros *loci*, no desenvolvimento de esquizofrenia e outras alterações neurológicas.

Em relação ao gene *MTCL1* (*microtubule crosslinking factor 1*), ele é conhecido por atuar na dinâmica de regulação de estruturas do citoesqueleto celular conhecidas como microtúbulos (polímeros indispensáveis a diversas funções celulares). Satake e colaboradores (2017) realizaram uma investigação onde evidenciaram que esse gene é expresso em células do sistema nervoso chamadas de “células de Purkinje”, sugerindo que este gene é importante nas vias de desenvolvimento do sistema nervoso ao atuar não apenas na diferenciação do segmento inicial axônico destas células, mas também na função de outras células neuronais. O paciente de nosso estudo apresentou deficiência intelectual, e apesar de não termos uma evidência diretamente ligada ao fator cognitivo, a deleção de um dos alelos do gene *MTCL1* (e de outros genes supracitados que estão relacionados ao sistema nervoso) pode contribuir possivelmente com a disrupção do funcionamento normal neurológico.

O paciente 8362 também apresentou hipotonia. Dentre os genes localizados na região deletada de 18p11.32p11.22 que estão associados a disfunções neuromusculares, podemos destacar *MYOM1* e *RAB12*. O primeiro codifica a proteína *myomesin 1*, componente estrutural importante de miofibrilas do tecido muscular. Nasir e colaboradores (2016) investigaram uma mãe e um filho com distonia (doença caracterizada por contrações musculares anormais e repetitivas, podendo também apresentar posturas rígidas), e verificaram que ambos apresentaram deleção em 18p, envolvendo o gene *MYOM1*. Dentro desses resultados, eles sugeriram a deleção desse gene como uma das causas à manifestação da patologia, visto que *MYOM1* está envolvido no desenvolvimento muscular.

O gene *RAB12* (*Member RAS Oncogene Family*) codifica proteínas que são reguladoras-chave em processos de tráfego molecular em membranas intracelulares, desde a formação de vesículas de transporte até a sua fusão com membranas. Em investigação realizada por Hebert e colaboradores (2017), encontra-se a descrição de mutações *missense* em *RAB12* em associação com distonias, enquadrando tal gene como mais um candidato à etiologia genética desta alteração.

No que se refere ao gene *SMCHD1* (*Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1*), sua função está envolvida em vias que mediam a metilação de um conjunto de ilhas CpG, apresentando uma função crucial em mecanismos de regulação epigenética (JANSZ et al., 2017; MASON et al., 2017). Mutações nesse gene têm sido associadas à distrofia fácio-escápulo-umeral (DFEU) e à arinia (Bosma) (GORDON et al., 2017; SHAW et al., 2017). Adicionalmente, outros trabalhos destacaram a haploinsuficiência do gene *SMCHD1* em associação com a etiologia genética da DFEU (DE GREEF et al., 2018), incluindo casos com monossomia de 18p (BALOG et al., 2018).

O gene *THOC1* (*THO Complex 1*) faz parte de um complexo que atua no transporte de RNAs que possuem a adição de poliadeninas. Wang e colaboradores (2006) realizaram uma pesquisa onde houve a geração e a caracterização fenotípica de camundongos com um alelo nulo do gene *THOC1* (também chamado de *HPRI* e *P84*). Os camundongos com uma deleção heterozigota não apresentaram fenótipo distinguível dos tipos selvagens, enquanto os animais com uma deleção homozigota do gene não sobreviveram, indicando que *THOC1* é requisito para o desenvolvimento embrionário normal. Como o paciente 8362 apresentou uma deleção heterozigota, não é possível atribuir a deleção desse gene às suas anomalias congênicas.

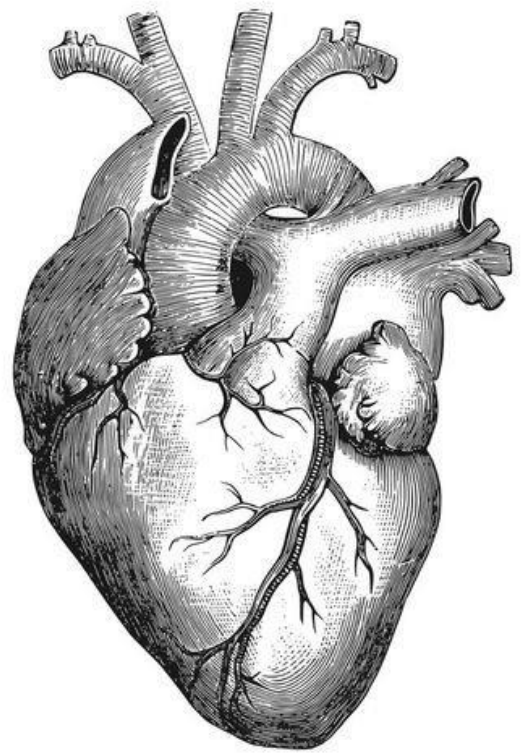
Por último, o gene *TYMS* (*Thymidylate synthetase*) codifica um cofator que atua na catalisação da metilação de determinadas moléculas associadas ao reparo e replicação do DNA. Polimorfismos nesse gene podem estar associados à neoplasia (como no câncer de mama, por exemplo) e resposta à quimioterápicos, além de serem descritas associações à cardiomiopatia nesse contexto (SAIF; SMITH; MALONEY, 2016). Além disso, Lupo e colaboradores (2011) associam mutações nesse gene com um possível risco de se desenvolver defeitos cardíacos congênicos conotrunciais. Dentre os genes com deleção heterozigota em 18p11.32p11.22, apenas *TYMS* apresentou uma relação com CCs, apesar deste envolvimento ainda não estar claro.

Os genes discutidos acima apresentam relevância clínica e mostraram alguma relação com alterações clínicas do paciente 8362, principalmente as alterações que envolvem as malformações cardíacas congênicas, o sistema nervoso central e o sistema muscular. Contudo, nosso paciente apresentou alterações com as quais não foi possível associar algum gene: asplenia e ptose renal. Quando avaliamos os casos de trissomia parcial de 15q (envolvendo a região distal) e monossomia de 18p disponíveis na literatura científica, não encontramos algum caso que tenha, entre as anomalias congênicas apresentadas, associação com asplenia. Será esta alteração resultante da combinação (ainda não bem compreendida) simultânea de

uma trissomia parcial de 15q e uma monossomia parcial de 18p? São necessárias mais investigações acerca desse panorama.

Ao analisarmos a literatura, constatamos outros casos descritos envolvendo perdas e ganhos genômicos resultantes de uma translocação balanceada entre os cromossomos 15 e 18 ou com translocação similar *de novo*. Entre os trabalhos encontrados, destacam-se casos que resultaram em: monossomia de 18p (ADACHI; HAYASHI, 1981; GARCIA-ESQUIVEL et al., 1987); deleções em 15q22, 15pter e 18p11 (KIEFER et al., 2010); translocação entre 15 e 18, mas de forma maioritariamente balanceada (recíproca) (FREDGA, 1967); monossomia de 18q (SCOTT et al., 1973); deleção de 15pter-15q11.2 e 18q23-18qter (LECLERCQ et al., 2010); trissomia parcial de 15pter-q13.3 e de 18q23-qter (CALZOLARI et al., 1996); e cromossomos dicêntricos envolvendo um complexo mosaicismos com translocação entre 15 e 18 (BOVA; SINGH-KAHLON; SERRA, 1977). Portanto, apesar do mecanismo de translocação balanceada (ou não balanceada) envolvendo os cromossomos 15 e 18 estar descrito em outros casos na literatura científica, a combinação resultante caracterizada por simultânea trissomia parcial de 15q25.2q26.3 e monossomia parcial de 18p11.32p11.22 não foi encontrada na literatura até o momento. Além disso, este é, ao nosso conhecimento, o primeiro caso que define por CMA as alterações simultâneas de 15q e 18p.

Vale ressaltar, por fim, que são necessárias mais investigações a fim de estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo mais ampla e mais robusta, visto que há vários outros fatores genéticos (por exemplo, RNAs não codantes, regulação epigenética, mutações pontuais, entre outros) e ambientais que podem estar subjacentes à etiologia das anomalias congênitas apresentadas pelos pacientes investigados. Ademais, apesar de existir envolvimento de genes específicos nas alterações fenotípicas apresentadas pelo paciente 8362 no presente estudo, é relevante considerar o sinergismo existente entre as diversas redes de interações gênicas e proteicas em processos do desenvolvimento. Isto abre novas perspectivas de investigação sobre a etiologia genética de tais anomalias congênitas (incluindo as CCs), utilizando análises *in silico* (por exemplo, biologia de sistemas) aliadas às investigações moleculares como o sequenciamento de exoma e outras.



CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A etiologia genética das CCs dos pacientes analisados neste trabalho não está relacionada a microdeleções/microduplicações na região cromossômica 22q11.2;

2. O CMA permitiu a caracterização de desequilíbrios citogenômicos presentes em dois pacientes. No paciente 8325 foram caracterizadas uma perda genômica em 1p36.11, além de uma ausência de heterozigosidade (AOH) em 2p13.2p12. No paciente 8362 foram caracterizados um ganho genômico em 15q25.2q26.3 e uma perda genômica em 18p11.32p11.22;

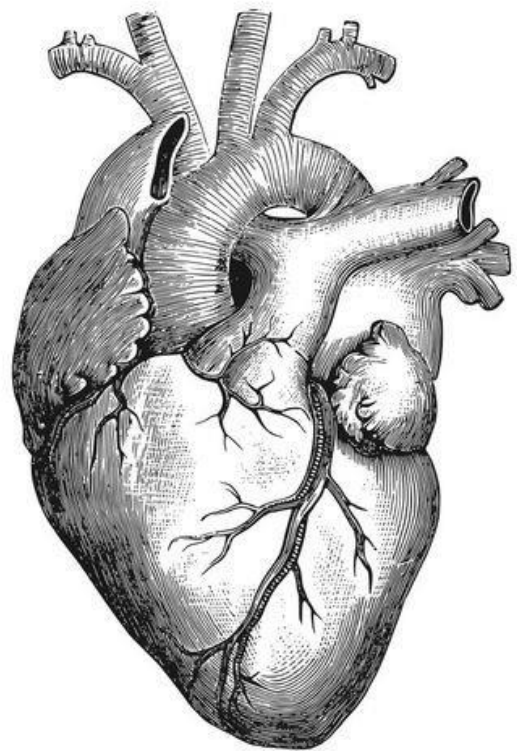
3. No paciente 8325, a perda genômica em 1p36.11 tem tamanho de 159,11 kb e contém 4 genes RefSeq. A AOH em 2p13.2p12 tem 3,024 Mb e abrange 45 genes RefSeq, indicando uma dissomia uniparental (UPD). Já no paciente 8362, o ganho genômico em 15q25.2q26.3 possui um tamanho de 18,4 Mb e abrange 124 genes RefSeq, e a perda em 18p11.32p11.22 contém 40 genes RefSeq e uma extensão física de 8,7 Mb;

4. Em relação ao paciente 8325, a deleção em 1p36.11 é benigna. Já a ausência de heterozigosidade (AOH) indica uma dissomia uniparental, não havendo ainda uma evidência clara desta alteração com a etiologia genética de CC e das alterações extracardíacas observadas. Porém, a AOH nos forneceu possíveis genes que, em presença de mutações recessivas, podem contribuir para o fenótipo clínico observado, direcionando a investigações futuras por meio do sequenciamento. No que tange ao paciente 8362, a duplicação em 15q25.2q26.3 e a deleção em 18p11.32p11.22 são patogênicas. Ambas envolvem genes sensíveis à alteração de dosagem. Portanto, o componente genético “desequilíbrio citogenômico” está subjacente à etiologia genética das alterações observadas neste paciente;

5. Os desequilíbrios citogenômicos identificados no paciente 8362 contêm genes candidatos à etiologia genética de CC. O ganho genômico em 15q25.2q26.3 engloba 13 genes que possuem associação com a cardiogênese e CCs, a saber: *ADAMTSL3*, *MCTP2*, *MEF2A*, *MESPI1*, *MESP2*, *NR2F2*, *NTRK3*, *PCSK6*, *PDE8A*, *IGF1R*, *CIB1*, *ALPK3* e *UNC45A*. A perda em 18p11.32p11.2 envolveu apenas um gene possivelmente relacionado à CC: *TYMS*;

6. As alterações neurológicas observadas no paciente 8362 podem ser parcialmente atribuídas ao desequilíbrio citogenômico em 15q25.2q26.3, envolvendo os genes *LINS1*,

NGRN, *POLG*, *RGMA*, *ST8SIA2* e *KIF7*. A perda genômica em 18p11.32p11.22 abrangeu genes haploinsuficientes e relacionados a alterações recessivas, tendo *MYO1e* e *RAB12* envolvidos com a hipotomia muscular, e 6 genes relacionados com as alterações neurológicas: *TGIF1*, *ADCYAP1*, *LPIN2*, *DLGAP1*, *MTCL1* e *LAMA1*.



REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ABU-AMERO, K. K. et al. Optic disk and white matter abnormalities in a patient with a de novo 18p partial monosomy. **Ophthalmic Genetics**, v. 31, n. 3, p. 147–154, 2010.
- ADACHI, K.; HAYASHI, M. An 18p- Syndrome due to 15 / 18 with Facial Palsy and Deafness. p. 307–311, 1981.
- ALDINGER, K. A. et al. Mutations in LAMA1 cause cerebellar dysplasia and cysts with and without retinal dystrophy. **American Journal of Human Genetics**, v. 95, n. 2, p. 227–234, 2014.
- AL-HASSNAN, Z. N. et al. Identification of novel genomic imbalances in Saudi patients with congenital heart disease. **Molecular Cytogenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.
- AL TURKI, S. et al. Rare variants in NR2F2 cause congenital heart defects in humans. **American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 4, p. 574–585, 2014.
- ALI, B. R. et al. A mutation in KIF7 is responsible for the autosomal recessive syndrome of macrocephaly, multiple epiphyseal dysplasia and distinctive facial appearance. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 7, n. 1, 2012.
- ALONSO-GONZALEZ, R. et al. Abnormal lung function in adults with congenital heart disease: Prevalence, relation to cardiac anatomy, and association with survival. **Circulation**, v. 127, n. 8, p. 882–890, 2013.
- AKAWI, N. A. et al. LINS, a modulator of the WNT signaling pathway, is involved in human cognition. **Orphanet J Rare Dis**, v. 8, p. 87, 2013.
- AMORIM, L. F. P. et al. Presentation of congenital heart disease diagnosed at birth: analysis of 29,770 newborn infants. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 1, p. 83–90, 2008.
- ANDERSON, M. J. et al. Loss of unc45a precipitates arteriovenous shunting in the aortic arches. **Developmental Biology**, v. 318, n. 2, p. 258–267, 2008.
- AZAMIAN, M.; LALANI, S. R. Cytogenomic Aberrations in Congenital Cardiovascular Malformations. **Molecular Syndromology**, v. 7, p. 51-61, 2016.
- BAKER, P. R. et al. Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5. **Brain**, v. 137, n. 2, p. 366–379, 2014.
- BALOG, J. et al. Monosomy 18p is a risk factor for facioscapulohumeral dystrophy. **Journal of Medical Genetics**, p. jmedgenet-2017-105153, 2018.
- BARRIOT, R. et al. Collaboratively charting the gene-to-phenotype network of human congenital heart defects. **Genome Medicine**, v. 2, n. 3, p. 16, 2010.
- BARTMAN, T.; HOVE, J. Mechanics and function in heart morphogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 2, p. 373–381, 2005.

BASHAMBOO, A. et al. Loss of Function of the Nuclear Receptor NR2F2, Encoding COUP-TF2, Causes Testis Development and Cardiac Defects in 46,XX Children. **American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 3, p. 487–493, 2018.

BATTAGLIA, A. et al. Further Delineation of Deletion 1p36 Syndrome in 60 Patients: A Recognizable Phenotype and Common Cause of Developmental Delay and Mental Retardation. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. 404–410, 2008.

BHAGAVATULA, M. R. et al. Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease. **Hum Mol Genet**, v. 13, n. 24, p. 3181–3188, 2004.

BLUE, G. M. et al. Genetic counselling in parents of children with congenital heart disease significantly improves knowledge about causation and enhances psychosocial functioning. **International Journal of Cardiology**, v. 178, p. 124–130, 2015.

BOVA, R. A complex mosaic with D / E oligospermic male with apparently total infertility. p. 342–348, 1977.

BRADY, P. D. et al. Identification of dosage-sensitive genes in fetuses referred with severe isolated congenital diaphragmatic hernia. **Prenatal Diagnosis**, v. 33, n. 13, p. 1283–1292, 2013.

BRECKPOT, J. et al. BMPR1A is a candidate gene for congenital heart defects associated with the recurrent 10q22q23 deletion syndrome. **European Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 1, p. 12–16, 2012.

BRUNEAU, B. G. The developmental genetics of congenital heart disease. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 943–948, 2008.

CAĞLAYAN, A. O. et al. Alpk3 Gene Mutation in a Patient With Congenital Cardiomyopathy and Dysmorphic Features. **Molecular Case Studies**, n. Dcm, p. mcs.a001859, 2017.

CALCAGNI, G. et al. Data on cardiac defects, morbidity and mortality in patients affected by RASopathies. CARNET study results. **Data in Brief**, v. 16, p. 649–654, 2018.

CALZOLARI, E. et al. Psychiatric disorder in a familial 15;18 translocation and sublocalization of myelin basic protein to 18q22.3. **American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics**, v. 67, n. 2, p. 154–161, 1996.

CAMPOS, C. M. R. et al. Investigation of copy number variation in children with conotruncal heart defects. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 104, n. 1, p. 24–31, 2015.

CAPELLI, L. P. et al. Deletion of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency. **European Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 2, p. 132–134, 2012.

CARTER, N. P.; VETRIE, D. Applications of genomic microarrays to explore human chromosome structure and function. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 2, p. 297–302, 2004.

CARVALHO, C. M. B.; LUPSKI, J. R. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 4, p. 224–238, 2016.

- CHARI, R.; LOCKWOOD, W. W.; LAM, W. L. Computational methods for the analysis of array comparative genomic hybridization. **Cancer Inform**, v. 2, p. 48–58, 2006.
- CHIAPPARO, G. et al. Mesp1 controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 4, p. 463–477, 2016.
- CHUNG, I. M.; RAJAKUMAR, G. Genetics of congenital heart defects: The NKX2-5 gene, a key player. **Genes**, v.7, n.6, 2016.
- COBA, M. P. et al. Dlgap1 knockout mice exhibit alterations of the postsynaptic density and selective reductions in sociability. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- COOPER, G. M. et al. Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 250–251, 2010.
- COSTAIN, G. et al. Genome-wide rare copy number variations contribute to genetic risk for transposition of the great arteries. **International Journal of Cardiology**, v. 204, p. 115–21, 2016.
- COSTAIN, G.; SILVERSIDES, C. K.; BASSETT, A. S. The importance of copy number variation in congenital heart disease. **Genomic Medicine**, v. 1, n. August, p. 16031, 2016.
- COWAN, J. R.; WARE, S. M. Genetics and Genetic Testing in Congenital Heart Disease. **Clinics in Perinatology**, v. 42, n. 2, p. 373–393, 2015.
- COX, D. M.; BUTLER, M. G. Distal Partial Trisomy 15q26 and Partial Monosomy 16p13.3 in a 36-Year-Old Male with Clinical Features of Both Chromosomal Abnormalities. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 145, n. 1, p. 29–34, 2015.
- CUNNINGHAM, T. J. et al. Id genes are essential for early heart formation. **Genes and Development**, v. 31, n. 13, p. 1325–1338, 2017.
- D'ANGELO, C. S. et al. Extending the phenotype of monosomy 1p36 syndrome and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 152, n. 1, p. 102–110, 2010.
- D'ANGELO, C. S. et al. Investigation of selected genomic deletions and duplications in a cohort of 338 patients presenting with syndromic obesity by multiplex ligation-dependent probe amplification using synthetic probes. **Molecular cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 75, 2014.
- DEMIR, M. The relationship between atrial septal aneurysm and autonomic dysfunction. **Experimental and Clinical Cardiology**, v. 18, n. 2, p. 104–106, 2013.
- DE GREEF, J. C. et al. Smchd1 haploinsufficiency exacerbates the phenotype of a transgenic FSHD1 mouse model. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 4, p. 716–731, 2018.
- DI DONATO, N. et al. Macrocephaly, obesity, mental (intellectual) disability, and ocular abnormalities: Alternative definition and further delineation of MOMO syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 11, p. 2857–2862, 2012.
- DIGILIO, M. C. et al. Congenital heart defects in recurrent reciprocal 1q21.1 deletion and duplication syndromes: Rare association with pulmonary valve stenosis. **European Journal of Medical Genetics**, v. 56, n. 3, p. 144–149, 2013.

DIMOPOULOS, K.; WORT, S. J.; GATZOULIS, M. A. Pulmonary hypertension related to congenital heart disease: A call for action. **European Heart Journal**, 2014.

DU, S. J.; TAN, X.; ZHANG, J. SMYD Proteins: Key Regulators in Skeletal and Cardiac Muscle Development and Function. **The Anatomical Record**, v. 297, n. 9, p. 1650–1662, 2014.

EL MALTI, R. et al. A systematic variant screening in familial cases of congenital heart defects demonstrates the usefulness of molecular genetics in this field. **European Journal of Human Genetics**, October, p. 1–9, 2015.

EWEN, E. P. et al. The Mef2A transcription factor coordinately regulates a costamere gene program in cardiac muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 29644–29653, 2011.

FAHED, A.C. et al. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. **Circulation Research**, v. 112, n. 4, 2013.

FAKHRO, K. A. et al. Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 2915–20, 2011.

FERGUSON-SMITH, M. A. Cytogenetics and the evolution of medical genetics. **Genetics in medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 10, n. 8, p. 553–559, 2008.

FLAQUER, A. et al. Genome-wide linkage analysis of congenital heart defects using MOD score analysis identifies two novel loci. **BMC Genetics**, v. 14, p. 1–8, 2013.

FREDGA, K. *Journal of HERE*. v. 4, n. 5, p. 5–7, 1967

GAN, J. et al. Integrative Analysis of the Developing Postnatal Mouse Heart Transcriptome. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0133288, 2015.

GARCIA-ESQUIVEL, L. et al. Dissociation of tdc chromosomes: About A (t15;18)(p11;p11) leading to 18p monosomy. **Annales de Genetique**, v. 30, n. 2, 1987.

GEORGE-ABRAHAM, J. K. et al. Tetrasomy 15q25.2 ??? qter identified with SNP microarray in a patient with multiple anomalies including complex cardiovascular malformation. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 8, p. 1971–1976, 2012.

GIUNCO, C.T. et al. MOMO syndrome associated with autism: A case report. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1223–1225, 2008.

GO, A. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 129, n. 3, 2014.

GOLDMUNTZ, E. et al. CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 3, p. 776–80, 2002.

GOLDMUNTZ, E. et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 2, p. 492–498, 1998.

- GOLDMUNTZ, E. et al. Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patients with congenital conotruncal cardiac defects. **Journal of Medical Genetics**, v.30, p. 807–812, 1993.
- GORDON, C. T. et al. De novo mutations in SMCHD1 cause Bosma arhinia microphthalmia syndrome and abrogate nasal development. **Nature Genetics**, v. 49, n. 2, p. 249–255, 2017.
- GREENWAY, S. C. et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. **Nature Genetics**, v. 41, n. 8, p. 931–935, 2009.
- GROSSMAN, T. R. et al. Over-expression of DSCAM and COL6A2 cooperatively generates congenital heart defects. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 11, 2011.
- GUITTI, J. C. Epidemiological characteristics of congenital heart diseases in Londrina, Paraná south Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 74, n. 5, p. 395–404, 2000.
- HALL, N. G. et al. ADAMTSL-3/punctin-2, a novel glycoprotein in extracellular matrix related to the ADAMTS family of metalloproteases. **Matrix Biology**, v. 22, n. 6, p. 501–510, 2003.
- HEBERT, E. et al. Functional characterization of rare RAB12 variants and their role in musician's and other dystonias. **Genes**, v. 8, n. 10, p. 1–18, 2017.
- HEINEKE, J. et al. CIB1 is a regulator of pathological cardiac hypertrophy. **Nature Medicine**, v. 16, n. 8, p. 872–879, 2010.
- HEVER, A. M.; WILLIAMSON, K. A.; VAN HEYNINGEN, V. Developmental malformations of the eye: The role of PAX6, SOX2 and OTX2. **Clinical Genetics**, 2006.
- HILLS, A. et al. MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance. **Molecular Cytogenetics**, v. 3, n. 1, p. 19, 2010.
- HITZ, M. P. et al. Rare Copy Number Variants Contribute to Congenital Left-Sided Heart Disease. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 9, 2012.
- HOFFMAN, J. I. E.; KAPLAN, S. The incidence of congenital heart disease. **Journal of the American College of Cardiology**, 2002.
- HOFFMANN, A. et al. Cerebrovascular accidents in adult patients with congenital heart disease. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 96, n. 15, p. 1223–1226, 2010.
- HOSODA, T. et al. A Novel Myocyte-specific Gene Midori Promotes the Differentiation of P19CL6 Cells into Cardiomyocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35978–35989, 2001.
- HUANG, R. T. et al. TBX20 loss-of-function mutation responsible for familial tetralogy of Fallot or sporadic persistent truncus arteriosus. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 323–332, 2017.
- HUBER, J. et al. Molecular Screening for 22Q11.2 Deletion Syndrome in Patients with Congenital Heart Disease. **Pediatric Cardiology**, v. 35, n. 8, p. 1356–1362, 2014.
- HUHTA, J.; LINASK, K. K. Environmental origins of congenital heart disease: The heart-placenta connection. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 245–250, 2013.

JANSEN, F. A. R. et al. Chromosomal abnormalities and copy number variations in fetal left-sided congenital heart defects. **Prenatal Diagnosis**, v. 36, n. 2, p. 177–185, 2016.

JANSZ, N. et al. The Epigenetic Regulator SMCHD1 in Development and Disease. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 4, p. 233–243, 2017.

JENKINS, K. J. et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: Current knowledge - A scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young. **Circulation**, v. 115, n. 23, p. 2995–3014, 2007.

JIANG, J. Q. et al. Prevalence and spectrum of GATA5 mutations associated with congenital heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 165, n. 3, p. 570–573, 2013.

JOO, W.; HIPPENMEYER, S.; LUO, L. Dendrite morphogenesis depends on relative levels of NT-3/TrkC signaling. **Science**, v. 346, n. 6209, p. 626–629, 2014.

JORDAN, V. K.; ZAVERI, H. P.; SCOTT, D. A. 1P36 Deletion Syndrome: an Update. **The application of clinical genetics**, v. 8, p. 189–200, 2015.

KÄLLEN, B.; MASTROIACOVO, P.; ROBERT, E. Major congenital malformations in Down syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 65, p. 160–166, 1996.

KANEKO, K.; KATABUCHI, H.; MARUTA, H. **Partial trisomy for the distal part of the long arm of chromosome 15--a new syndrome?** *Nippon Sanka Fujinka Gakkai zasshi*, 1986.

KEARNEY, H. M. et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. **Genetics in Medicine**, v. 13, n. 7, p. 680–685, 2011.

KELLY, R. G. How Mesp1 makes a move. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 4, p. 411–413, 2016.

KIDDER, B. L. et al. SMYD5 controls heterochromatin and chromosome integrity during embryonic stem cell differentiation. **Cancer Research**, v. 77, n. 23, p. 6729–6745, 2017.

KIEFER, Y. et al. An unbalanced t(15;18)(q21-q22;p11) as the sole cytogenetic aberration in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 200, n. 1, p. 65–69, 2010.

KIM, E. Y. et al. A case of de novo duplication of 15q24-q26.3. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 54, n. 6, p. 267–271, 2011.

KITAJIMA, S. et al. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 15, p. 3215–3226, 2000.

KLOESEL, B.; DINARDO, J. A.; BODY, S. C. Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease: A Primer for Anesthesiologists. **Anesthesia and Analgesia**, v. 123, n. 3, p. 551–569, 2016.

KRISTOFFERSSON, U.; BERGWALL, B. Partial trisomy 15(q25qter) in two brothers. **Hereditas**, v. 100, n. 1, p. 7–10, 1984.

KRÖONSTRÖM, L. A. et al. Muscle function in adults with congenital heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 170, n. 3, p. 358–363, 2014.

- KRUSZKA, P. S. et al. The Genetic Workup for Congenital Structural Heart Disease: From Clinical to Genetic Evaluation. **Congenital Heart Disease**, p. 238–256, 2015.
- KURNIT, D. M.; LAYTON, W. M.; MATTHYSSE, S. Genetics, chance, and morphogenesis. **American Journal of Human Genetics**, v. 41, n. 6, p. 979–95, 1987.
- LALANI, S. R. et al. MCTP2 is a dosage-sensitive gene required for cardiac outflow tract development. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 21, p. 4339–4348, 2013.
- LALANI, S. R. Other Genomic Disorders Causing Congenital Cardiovascular Malformations. **Congenital Heart Disease**, v. 1, p. 112–120, 2015.
- LAN, F. et al. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 1, p. 101–113, 2013.
- LANDER, J.; WARE, S. M. Copy Number Variation in Congenital Heart Defects. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 2, n. 3, p. 168–178, 2014.
- LANDIS, B. J.; WARE, S. M. The Current Landscape of Genetic Testing in Cardiovascular Malformations: Opportunities and Challenges. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 3, n. July, 2016.
- LECLERCQ, S. et al. Sperm FISH analysis in two healthy infertile brothers with t(15;18) unbalanced translocation: Implications for genetic counselling and reproductive management. **European Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 3, p. 127–132, 2010.
- LEE, T.M; CHUNG, W.K. Molecular Genetics of Isolated Cardiovascular Formations. In: MUENKE, M. et al. (eds). **Congenital Heart Diseases: Molecular Genetics, Principles of Diagnosis and Treatment**, Basel, Karger, p.178-185, 2015.
- DE LEEUW, N. et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. **Human Mutation**, v. 33, n. 6, p. 930–940, 2012.
- LEUNG, T. Y. et al. Classification of pathogenic or benign status of CNVs detected by microarray analysis. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 717–721, 2010.
- LESCROART, F. et al. Defining the earliest step of cardiovascular lineage segregation by single-cell RNA-seq. **Science**, n. March, p. 1–8, 2018.
- LI, A. H. et al. Whole exome sequencing in 342 congenital cardiac left sided lesion cases reveals extensive genetic heterogeneity and complex inheritance patterns. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2017.
- LIU, X. Y. et al. Involvement of a novel GATA4 mutation in atrial septal defects. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, n. 1, p. 17–23, 2011.
- LIU, A. P. Y. et al. Under-recognition of 22q11.2 deletion in adult Chinese patients with conotruncal anomalies: Implications in transitional care. **European Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 6, p. 306–311, 2014.
- LOPES, L.M.; DAMIANO, A.P.; ZUGAIB, M. Ecocardiografia fetal. In: **Cardiopatas Congênitas no Recém-nascido – diagnóstico e tratamento**. Editora Atheneu, São Paulo, 2005.

- LOPEZ, G. H. et al. A DEL phenotype attributed to *RHD* Exon 9 sequence deletion: slipped-strand mispairing and blood group polymorphisms. **Transfusion**, v. 58, n. 3, p. 685–691, 2018.
- LUPO, P. J.; MITCHELL, L. E.; GOLDMUNTZ, E. NAT1, NOS3, and TYMS genotypes and the risk of conotruncal cardiac defects. **Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, n. 1, p. 61–65, 2011.
- MACARTHUR, D. G. et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. **Nature**, v. 508, n. 7497, p. 469–476, 2014.
- MADEMONT-SOLER, I. et al. MLPA: A prenatal diagnostic tool for the study of congenital heart defects? **Gene**, v. 500, n. 1, p. 151–154, 2012.
- MARIAN, A. J. Copy number variants and the genetic enigma of congenital heart disease. **Circulation Research**, v. 115, n. 10, p. 821–823, 2014.
- MARSHALL, J. D. et al. Alstrom syndrome: genetics and clinical overview. **Curr Genomics**, v. 12, n. 3, p. 225–235, 2011.
- MASON, A. G. et al. SMCHD1 regulates a limited set of gene clusters on autosomal chromosomes. **Skeletal Muscle**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- MCDONALD-MCGINN, D. M. et al. 22Q11.2 Deletion Syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. November, p. 15071, 2015.
- MELHUIH, T. A.; TANIGUCHI, K.; WOTTON, D. Tgif1 and Tgif2 regulate axial patterning in mouse. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.
- MILLER, D. T. et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 5, p. 749–764, 2010.
- MILUNSKY, A. et al. Diagnosis of Chronic Intestinal Pseudo-obstruction and Megacystis by Sequencing the ACTG2 Gene. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 384–387, 2017.
- MITCHELL, S.C. et al. Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history. **Circulation**, v.43, p. 323-332, 1971.
- MITCHELL, M. E. et al. The Molecular Basis of Congenital Heart Disease. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 19, n. 3, p. 228–237, 2007.
- MIYAGUE, N. I. et al. Epidemiological study of congenital heart defects in children and adolescents. Analysis of 4,538 cases. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. 3, p. 269–278, 2003.
- MOORHEAD, P. S. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, n. 3, p. 613–616, 1960.
- MORETTI-FERREIRA, D. et al. Macrosomia, obesity, macrocephaly and ocular abnormalities (MOMO syndrome) in two unrelated patients: Delineation of a newly recognized overgrowth syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 5, p. 555–558, 1993.

- MLYNARSKI, E. E. et al. Copy-number variation of the glucose transporter gene SLC2A3 and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 96, n. 5, p. 753–764, 2015.
- MLYNARSKI, E. E. et al. Rare copy number variants and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. **Human Genetics**, v. 135, n. 3, p. 273–285, 2016.
- MUNTEAN, I.; TOGĂNEL, R.; BENEDEK, T. Genetics of Congenital Heart Disease: Past and Present. **Biochemical genetics**, p. 1–19, 2016.
- NAJMABADI, H. et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 57–63, 2011.
- NASIR, J. et al. Unbalanced whole arm translocation resulting in loss of 18p in dystonia. **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 859–863, 2006.
- NG, S. B. et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. **Nature Genetics**, v. 42, n. 1, p. 30–35, 2010.
- NG, S. B. et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 272–6, 2009.
- NISHIOKA, M. et al. An infant case of diffuse cerebrospinal lesions and cardiomyopathy caused by a BOLA3 mutation. **Brain and Development**, p. 2–6, 2018.
- NOOR, A.; STAVROPOULOS, D. J. Current Tools for Interpretation of Genomic Copy Number Variants. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 3, n. 4, p. 202–208, 2015.
- OLDEKAMP, J. et al. Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. **Gene Expression Patterns**, v. 4, n. 3, p. 283–288, 2004.
- OLIVEIRA-COSTA, J. P. et al. Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: Strong associations with disease-specific survival and metastasis. **Human Pathology**, v. 41, n. 11, p. 1624–1630, 2010.
- ØYEN, N. et al. Recurrence of congenital heart defects in families. **Circulation**, v. 120, n. 4, p. 295–301, 2009.
- PATRUCCO, E. et al. Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, n. 2, p. 330–333, 2010.
- PENG, X. et al. Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 18, p. 6638–6643, 2008.
- PETERFY, M. et al. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 121–4, 2001.
- PEYVANDI, S. et al. 22q11.2 deletions in patients with conotruncal defects: data from 1,610 consecutive cases. **Pediatric Cardiology**, n. 34, p. 1687–1694, 2013.
- PFUNDT, R. et al. Detection of clinically relevant copy-number variants by exome sequencing in a large cohort of genetic disorders. **Genetics in Medicine**, 2016.

- PIRES, R. et al. Screening of copy number variants in the 22q11.2 region of congenital heart disease patients from the São Miguel Island, Azores, revealed the second patient with a triplication. **BMC Genetics**, v. 15, n. 1, p. 115, 2014.
- POSTMA, A. V.; BEZZINA, C. R.; CHRISTOFFELS, V. M. Genetics of congenital heart disease: the contribution of the noncoding regulatory genome. **Journal of Human Genetics**, v. 61, n. 1, p. 13–19, 2016.
- POWERS, S. E. et al. Tgif1 and Tgif2 regulate Nodal signaling and are required for gastrulation. **Development**, v. 137, n. 2, p. 249–259, 2010.
- PRIDDLE, T. H.; CROW, T. J. Protocadherin 11X/Y a human-specific gene pair: An immunohistochemical survey of fetal and adult brains. **Cerebral Cortex**, v. 23, n. 8, p. 1933–1941, 2013.
- PRIEST, J. R. et al. Rare copy number variants in isolated sporadic and syndromic atrioventricular septal defects. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 6, p. 1279–1284, 2012.
- PULIGNANI, S.; CRESCI, M.; ANDREASSI, M. G. Genetics of congenital heart defects: Is it not all in the DNA? **Translational Research**, v. 161, n. 1, p. 59–61, 2013.
- PURSANI, V. et al. Genetic and Epigenetic Profiling Reveals EZH2-mediated Down Regulation of OCT-4 Involves NR2F2 during Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- PUTOUX, A. et al. KIF7 mutations cause fetal hydroletharus and acrocallosal syndromes. **Nature Genetics**, v. 43, n. 6, p. 601–606, 2011.
- QIAO, X.-H. et al. A novel NR2F2 loss-of-function mutation predisposes to congenital heart defect. **European Journal of Medical Genetics**, n. December, p. 1–0, 2017.
- RANSOM, J.; SRIVASTAVA, D. The genetics of cardiac birth defects. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 18, n. 1, p. 132–139, 2007.
- RASMUSSEN, A. H.; RASMUSSEN, H. B.; SILAHTAROGLU, A. The DLGAP family: Neuronal expression, function and role in brain disorders. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.
- RAUEN, K. A. The RASopathies. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 14, n. 1, p. 355–369, 2013.
- ROACH, J. C. et al. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5978, p. 636–639, 2010.
- ROGER, V. L. et al. Heart disease and stroke statistics-2011 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, 2011.
- ROHATGI, S. et al. Facial diagnosis of mild and variant CdLS: Insights from a dysmorphologist survey. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 152, n. 7, p. 1641–1653, 2010.
- RUSSELL, M. W.; HANNIBAL, M. Other Single-Gene Disorders Causing Congenital Heart Disease. **Congenital Heart Disease**, p. 186–195, 2015.

- RYLAND, G. L. et al. Loss of heterozygosity: what is it good for? **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 1, p. 45, 2015.
- SAIF, M. W.; SMITH, M.; MALONEY, A. The First Case of Severe Takotsubo Cardiomyopathy Associated with 5-Fluorouracil in a Patient with Abnormalities of Both Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPYD) and Thymidylate Synthase (TYMS) Genes. **Cureus**, v. 8, n. 9, 2016.
- SANCHEZ-CASTRO, M. et al. Congenital Heart Defects in Patients with Deletions Upstream of SOX9. **Human Mutation**, v. 34, n. 12, p. 1628–1631, 2013.
- SANCHEZ-CASTRO, M. et al. Disruption of the SEMA3D gene in a patient with congenital heart defects. **Human Mutation**, v. 36, n. 1, p. 30–33, 2014.
- SANDRIN-GARCIA, P. et al. Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 303, n. 1-2, p. 9–17, 2007.
- SATAKE, T. et al. MTCL1 plays an essential role in maintaining Purkinje neuron axon initial segment. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 9, p. 1227–1242, 2017.
- SCHLESINGER, J. et al. The cardiac transcription network modulated by gata4, mef2a, nkx2.5, srf, histone modifications, and microRNAs. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 2, 2011.
- SCHNATTERLY, P. et al. Distal 15q trisomy: phenotypic comparison of nine cases in an extended family. **American journal of human genetics**, v. 36, n. 2, p. 444–51, 1984.
- SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 12, p. e57, 2002.
- SCOTT, C. I. Identification of a D / E (15 / 18) Translocation Chromosome by Quinacrine Fluorescence and Urea Banding Techniques. v. 321, p. 317–321, 1973.
- SEABRIGHT, M. A Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. **The Lancet**, 1971.
- SELLNER, L. N.; TAYLOR, G. R. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. **Human Mutation**, v. 23, n. 5, p. 413–419, 2004.
- SHARDA, S.; PANIGRAHI, I.; MARWAHA, R. K. MOMO Syndrome with Holoprosencephaly and Cryptorchidism: Expanding the Spectrum of the New Obesity Syndrome. **Case reports in genetics**, v. 2011, n. May 2016, p. 839650, 2011.
- SHARKEY, F. H.; MAHER, E.; FITZPATRICK, D. R. Chromosome analysis: what and when to request. **Archives of Disease in Childhood**, v. 90, n. 12, p. 1264–9, 2005.
- SHAW, N. D. et al. SMCHD1 mutations associated with a rare muscular dystrophy can also cause isolated arhinia and Bosma arhinia microphthalmia syndrome. **Nature Genetics**, v. 49, n. 2, p. 238–248, 2017.
- SIFRIM, A. et al. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. **Nature Genetics**, v. 48, n. 9, p. 1060–1065, 2016.

SINGLA, S. et al. Partial trisomy of chromosome 15q and partial monosomy of 6q due to maternal balanced translocation. **Journal of Pediatric Neurosciences**, v. 9, n. 2, p. 178, 2014.

SØRENSEN, K. M. et al. Detecting 22q11.2 Deletions by Use of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification on DNA from Neonatal Dried Blood Spot Samples. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 2, p. 147–151, 2010.

SØRENSEN, K. M. et al. Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: Early diagnosis of syndromic patients. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 4, p. 720–725, 2012.

SRIVASTAVA, D.; OLSON, E. N. A genetic blueprint for cardiac development. **Nature**, v. 407, n. September, p. 221–226, 2000.

SRIVASTAVA, K. et al. Two large deletions extending beyond either end of the RHD gene and their red cell phenotypes. **Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 1, p. 27–35, 2018.

SUN, H. et al. Genotype-Phenotype Analysis, Neuropsychological Assessment, and Growth Hormone Response in a Patient with 18p Deletion Syndrome. **Cytogenetic and genome research**, 2018.

SYRMOU, A. et al. Array comparative genomic hybridization as a clinical diagnostic tool in syndromic and nonsyndromic congenital heart disease. **Pediatric Research**, v. 73, n. 6, p. 772–6, 2013.

SWABY, J.-A. M. et al. Complex congenital heart disease in unaffected relatives of adults with 22q11.2 deletion syndrome. **The American Journal of Cardiology**, v. 107, n. 3, p. 466–71, 1 fev. 2011.

SZEWCZYK, L. M. et al. ST8SIA2 promotes oligodendrocyte differentiation and the integrity of myelin and axons. **Glia**, v. 65, n. 1, p. 34–49, 2017.

TATTON-BROWN, K. et al. 15q overgrowth syndrome: A newly recognized phenotype associated with overgrowth, learning difficulties, characteristic facial appearance, renal anomalies and increased dosage of distal chromosome 15q. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 149, n. 2, p. 147–154, 2009.

TREVISAN, P. et al. Congenital heart disease and chromosomalopathies detected by the karyotype. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 32, n. 2, p. 262–271, 2014.

TURLEAU, C. Monosomy 18p. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 3, n. 1, p. 4, 2008.

TUTAREL, O. et al. Congenital heart disease beyond the age of 60: Emergence of a new population with high resource utilization, high morbidity, and high mortality. **European Heart Journal**, v. 35, n. 11, p. 725–732, 2014.

TZANCHEVA, M.; KRACHOUNOVA, M.; DAMJANOVA, Z. Two familial cases with trisomy 15q dist due to a rcp(5;15)(p14;q21). **Human genetics**, v. 56, n. 3, p. 275–7, 1981.

VALLASTER, M.; VALLASTER, C. D.; WU, S. M. Epigenetic mechanisms in cardiac development and disease. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 44, p. 92–102, 2012.

- VAN DER BOM, T. et al. The changing epidemiology of congenital heart disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 8, n. 1, p. 50–60, 2011.
- VAN SLIGTENHORST, I. et al. **Cardiomyopathy in α -kinase 3 (Alpk3)-deficient mice** **Veterinary Pathology**, 2012.
- VECOLI, C. et al. Congenital Heart Disease: The Crossroads of Genetics, Epigenetics and Environment. **Current Genomics**, v. 15, n. 5, p. 390–399, 2014.
- VIRTANEN, I. et al. Laminin α 1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. **Experimental Cell Research**, v. 257, n. 2, p. 298–309, 2000.
- VU, P. Y. et al. A homozygous balanced reciprocal translocation suggests LINC00237 as a candidate gene for MOMO (macrosomia, obesity, macrocephaly, and ocular abnormalities) syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 11, p. 2849–2856, 2012.
- XIA, C. et al. A Novel MEF2C Loss-of-Function Mutation Associated with Congenital Double Outlet Right Ventricle. **Pediatric Cardiology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.
- XIE, H. M. et al. Rare copy number variants in patients with congenital conotruncal heart defects. **Birth Defects Research**, 2017.
- XU, H. et al. Nonmosaic tetrasomy 15q25.2→qter identified with SNP microarray in a patient with characteristic facial appearance and review of the literature. **European Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 7, p. 329–333, 2014.
- WAGNER, F. F.; FLEGEL, W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 245, 2001.
- WALLERSTEIN, R.; SUGALSKI, R. D. A new case of MOMO syndrome. **Clinical Dysmorphology**, v. 19, n. 1, p. 1–4, 2010.
- WANG, X. et al. Thoc1/Hpr1/p84 Is Essential for Early Embryonic Development in the Mouse. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 11, p. 4362–4367, 2006.
- WANG, J. et al. Prevalence and spectrum of PITX2c mutations associated with congenital heart disease. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 12, p. 708–716, 2013.
- WANG, H. et al. Clinical and molecular cytogenetic analyses of four families with 1q21. 1 microdeletion or microduplication. **The Journal of Gene Medicine**, n. December 2016, p. 1–9, 2017.
- WANG, Y. et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in fetuses with congenital heart disease: A prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 218, n. 2, p. 244.e1-244.e17, 2017.
- WARBURTON, D. et al. The contribution of de novo and rare inherited copy number changes to congenital heart disease in an unselected sample of children with conotruncal defects or hypoplastic left heart disease. **Human Genetics**, v.133, p. 11–27, 2014.
- WEBB, G.D. et al. Cardiopatía Congênita. In: **Braunwald Tratado de Doenças Cardiovasculares**, Elsevier, 8ª edição, Rio de Janeiro, 2010.

WEI, D. et al. Novel PITX2c loss-of-function mutations associated with complex congenital heart disease. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 5, p. 1201–8, 2014.

WEN, J. et al. Phenotypic and functional consequences of haploinsufficiency of genes from exocyst and retinoic acid pathway due to a recurrent microdeletion of 2p13.2. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2013.

WERNER, P. et al. Mutations in NTRK3 suggest a novel signaling pathway in human congenital heart disease. **Human Mutation**, v. 35, n. 12, p. 1459–1468, 2014.

WESSELS, M. W.; WILLEMS, P. J. **Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations** **Clinical Genetics**, 2010.

WESTER, U. et al. Clinical and molecular characterization of individuals with 18p deletion: a genotype-phenotype correlation. **American Journal of Medical Genetics**, v.140A, p. 1164–1171, 2006.

YANG, Y. et al. Arginine methylation facilitates the recruitment of TOB3B to chromatin to prevent R-loop accumulation. **Mol Cell**, v. 53, n. 3, p. 484–497, 2014.

YU, J. et al. Transcriptomic profile analysis of mouse neural tube development by RNA-Seq. **IUBMB Life**, v. 69, n. 9, p. 706–719, 2017.

YU, Z. et al. Mutations in Hnrnpa1 cause congenital heart defects. **JCI insight**, v. 3, n. 2, p. 1–21, 2018.

YUAN, S.; ZAIDI, S.; BRUECKNER, M. Congenital heart disease: emerging themes linking genetics and development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 23, n. 3, p. 352–9, 2013.

ZAIDI, S. et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. 220–3, 2013.

ZARREI, M. et al. A copy number variation map of the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 3, p. 172–183, 2015.

ZHANG, J. et al. Analysis of chromosome 22q11 copy number variations by multiplex ligation-dependent probe amplification for prenatal diagnosis of congenital heart defect. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 1, p. 100, 2015.

ZHANG, K. K. et al. Gene network and familial analyses uncover a gene network involving Tbx5/Osr1/Pcsk6 interaction in the second heart field for atrial septation. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 6, p. 1140–1151, 2016.

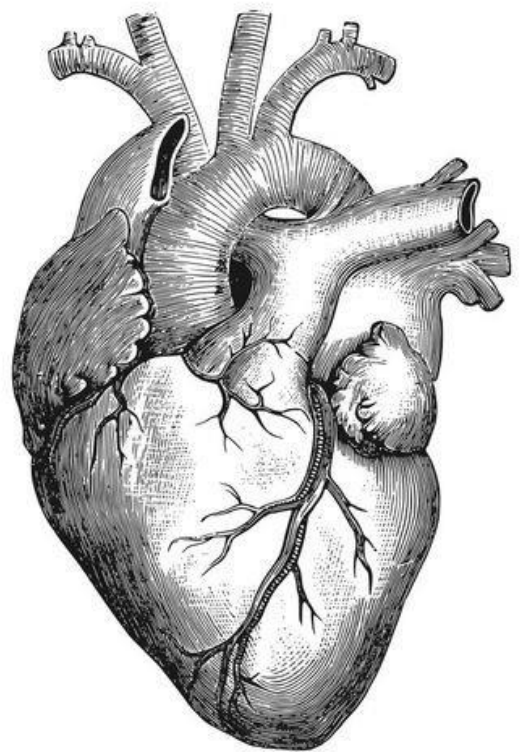
ZHANG, M. et al. **TBX1 loss-of-function mutation contributes to congenital conotruncal defects** **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2018.

ZHENG, G. F. et al. A novel GATA6 mutation associated with congenital ventricular septal defect. **Int J Mol Med**, v. 29, n. 6, p. 1065–1071, 2012.

ZHU, X. et al. Identification of copy number variations associated with congenital heart disease by chromosomal microarray analysis and next-generation sequencing. **Prenatal Diagnosis**, v. 36, n. 4, p. 321–327, 2016.

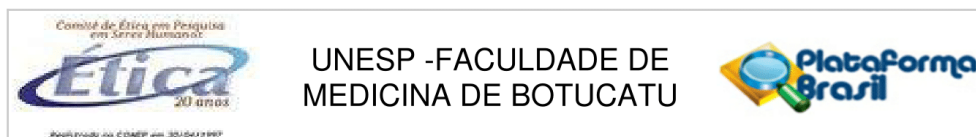
ZIOLKOWSKA, L. et al. Chromosome 22q11.2 microdeletion in children with conotruncal heart defects: Frequency, associated cardiovascular anomalies, and outcome following cardiac surgery. **European Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 10, p. 1135–1140, 2008.

ZOMER, A. C. et al. Heart failure admissions in adults with congenital heart disease; Risk factors and prognosis. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 3, p. 2487–2493, 2013.



ANEXOS

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de Variação do Número de Cópias Genômicas em Pacientes com Cardiopatias Congênitas

Pesquisador: THARSIS GABRYEL GOMES

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 67186817.9.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Genética

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.048.352

Apresentação do Projeto:

As Cardiopatias Congênitas são as malformações congênitas mais comuns e afetam de 1% a 2% da população no Brasil e no mundo, sendo a principal causa não infecciosa de morte na infância. Cerca de 27% dos recém-nascidos que vão a óbito devido a defeitos do nascimento apresentam anomalias cardiovasculares, contribuindo com aproximadamente 25% de todas as anormalidades congênitas humanas. As Cardiopatias Congênitas surgem devido ao desenvolvimento anormal do coração induzido por fatores ambientais, genéticos, epigenéticos, estocásticos ou pela combinação destes. Embora a etiologia de muitas Cardiopatias Congênitas permaneça desconhecida, os recentes avanços na tecnologia genômica e sua aplicação em grandes grupos de pacientes levaram a uma melhor compreensão das anomalias genéticas específicas que fundamentam as Cardiopatias Congênitas, dentre elas as mutações de novo e variação do número de cópias (CNVs). Como a utilização de testes genéticos e o número de genes a ser testado na doença cardiovascular congênita estão se expandindo, a detecção de múltiplas variantes raras (CNVs) em um indivíduo se torna mais factível.

Metodologia: Os indivíduos que farão parte deste trabalho serão recrutados no Ambulatório de

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

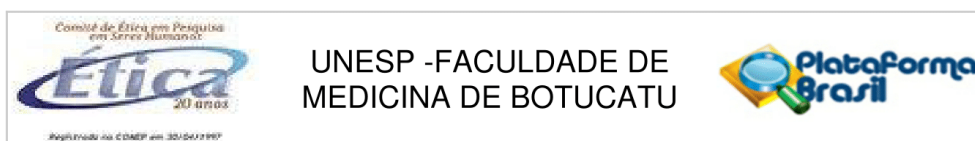
UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.048.352

Cardiologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UNESP. Serão investigados 150 indivíduos, sendo 50 pacientes diagnosticados com Cardiopatias Congênitas (25 síndrômicos e 25 não síndrômicos), mais as amostras de pai e mãe biológicos de cada paciente (100 indivíduos). Os indivíduos serão atendidos por um médico cardiologista no Ambulatório de Cardiologia Pediátrica do HCFMB, onde também serão realizados exames subsidiários, tais como eletrocardiograma, ecocardiograma, além da descrição clínica dos pacientes. Serão colhidos 6 ml de sangue no Serviço de Aconselhamento Genético (SAG), do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) - UNESP, a fim de realizar as análises genéticas. O DNA genômico será obtido a partir desse volume de sangue, seguindo protocolo do fabricante (QIAGEN). As amostras serão quantificadas e terão suas integridades analisadas por gel de eletroforese. Posteriormente, serão submetidas à análise da técnica de MLPA, a fim de fazer uma triagem para possíveis deleções na região genômica 22q11.2 (uma região conhecida por estar relacionada à cardiopatias congênitas). Seguidamente, será realizada uma análise em uma plataforma de CMA (Análise Cromossômica por Microarrays), com o objetivo de verificar as possíveis variações no número de cópias (CNVs) genômicas em todo o genoma dos pacientes selecionados. Essas variações incluem microdeleções e microduplicações. Após isso, as CNVs encontradas serão analisadas e classificadas, mediante análise de bancos de dados públicos, em: benignas (polimorfismos); provavelmente benignas; provavelmente patogênicas; patogênicas ou de significado clínico incerto (VOUS).

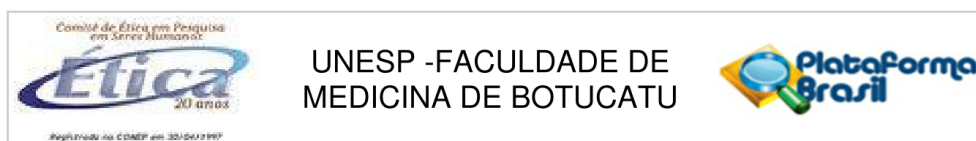
Critério de Inclusão: Pacientes com Cardiopatias Congênitas síndrômicas (não bem estabelecidas e com cariótipo normal) e não síndrômicas; Disponibilidade dos pais em participar do estudo (trio: pai, mãe e paciente); Concordância e Assinatura do TCLE pelos pais e/ou responsáveis e assentimento (TALE) para maiores de 12 anos.

Critério de Exclusão: Pacientes com Cardiopatias Congênitas associadas a síndromes bem estabelecidas (ex. Down, Williams...) já elucidadas por outros exames; Indisponibilidade de um dos pais biológicos; Não concordância na assinatura do TCLE ou do Termo de Assentimento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: investigar as alterações genômicas submicroscópicas, aplicando as técnicas de MLPA e Análise Cromossômica em Microarranjos (CMA), em uma amostra de pacientes diagnosticados com Cardiopatias Congênitas síndrômicas e não síndrômicas do Estado de São Paulo.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.048.352

Objetivos Secundários: realizar triagem para deleções na região 22q11.2; identificar as CNVs em todo o DNA genômico dos pacientes selecionados; classificar as CNVs encontradas quanto à patogenicidade; estabelecer as CNVs potencialmente associadas às Cardiopatias Congênitas nos pacientes estudados; determinar a origem das CNVs encontradas; caracterizar a extensão física e o número de genes presentes em cada CNV; relatar os genes que possam estar envolvidos com os fenótipos de Cardiopatias Congênitas observados, mediante análise de bancos de dados públicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: a coleta de sangue pode gerar algum desconforto físico, podendo ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta que desaparece bem rapidamente. Poderá ser sugerido aos pacientes por meio do profissional responsável pela coleta, em casos onde haja hematoma, a aplicação de uma pomada (por ex. TromboFob) no local, a fim de contribuir no desaparecimento de possíveis hematomas.

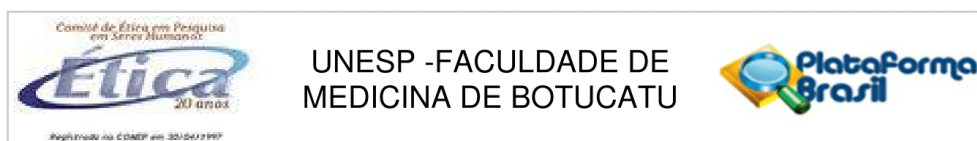
Benefícios: a investigação molecular proposta para as amostras de DNA genômico dos pacientes trará resultados de um diagnóstico molecular mais preciso e mais detalhado das possíveis alterações que essas amostras podem conter. Em casos onde os resultados dessas técnicas moleculares modernas sejam claramente associados aos fenótipos de cardiopatias congênitas dos pacientes, e também em casos onde haja resultados positivos para deleções na região genômica 22q11.2, será elaborado um aconselhamento genético apropriado aos pacientes e seus pais biológicos pelo responsável do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. Esse aconselhamento tem por objetivo informar aos pacientes e seus familiares sobre a natureza, a herança e as implicações genéticas dessas alterações com o intuito de auxiliá-los a respeito dos cuidados médicos e os riscos para as futuras gerações. Além disso, permitirá a geração de conhecimento sobre a condição de variantes genéticas que possam estar relacionadas às cardiopatias congênitas em uma amostra da população brasileira.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta objetivos claros, metodologia bem descrita, com critérios de inclusão e de exclusão bem definidos, avaliação de riscos e benefícios, sendo de relevância clínica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Chácara Butignolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.048.352

Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: preenchida corretamente;
- Termo de Anuência Institucional: preenchido corretamente;
- Declaração de ciência e autorização do Serviço de Aconselhamento Genético: anexado;
- Declaração de ciência e autorização do Departamento de Genética do Instituto de Biociências/UNESP: anexado;
- Regulamento Funcional do Biorrepositório: preenchido corretamente;
- Informações básicas do projeto e projeto completo: adequados e completos;
- TCLE e TALE: elaborados na forma de convite, linguagem clara, explica os objetivos da pesquisa e os procedimentos que serão realizados, garante o sigilo, descreve os riscos e benefícios, apresenta telefones, emails dos pesquisadores e telefones, endereço e horários de funcionamento do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB - UNESP;
- Cronograma de execução: adequado, programado para iniciar em 19/06/2017.

Recomendações:

Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução da presente pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 04 de Maio de 2.017, sem necessidade de envio à CONEP.

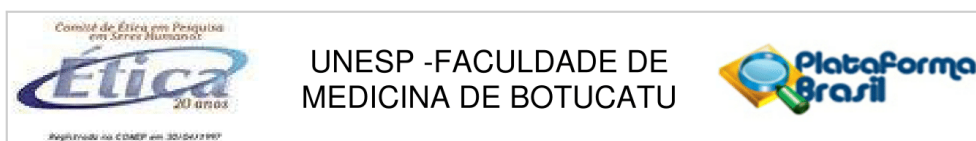
O CEP, no entanto, solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado para análise o respectivo "Relatório Final de Atividades", o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

OBS: LEMBRAMOS QUE A PRESENTE PESQUISA SOMENTE PODERÁ SER INICIADA APÓS DIA 04/05/2017 – DATA DA APROVAÇÃO DO CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_872629.pdf	13/04/2017 17:20:29		Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.048.352

Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_eap.pdf	13/04/2017 17:18:51	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_maiores_18.pdf	13/04/2017 17:18:34	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_ate_11_anos.pdf	13/04/2017 17:18:15	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_12_a_17.pdf	13/04/2017 17:17:58	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale_12_a_17.pdf	13/04/2017 17:17:25	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado.pdf	13/04/2017 17:16:58	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
Orçamento	orcamento_mlp_array.pdf	13/04/2017 17:15:52	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	regulamento_biorrepositorio.pdf	13/04/2017 17:14:42	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	13/04/2017 17:13:45	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_lvan.pdf	03/03/2017 00:56:37	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_sag.pdf	03/03/2017 00:54:53	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Assinada.pdf	03/03/2017 00:51:11	THARSIS GABRYEL GOMES	Aceito

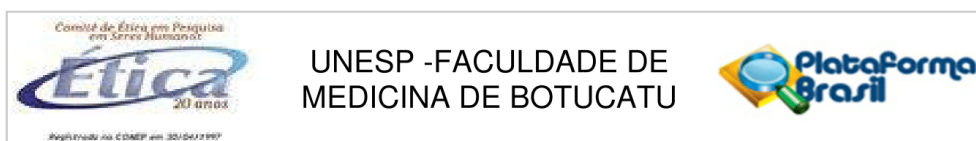
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU

Continuação do Parecer: 2.048.352

BOTUCATU, 05 de Maio de 2017

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

ANEXO 2



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(12 a 17 anos de idade)

Projeto de pesquisa:

**INVESTIGAÇÃO DE VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM
PACIENTES COM CARDIOPATIAS CONGÊNITAS**

Vocês são responsáveis por um paciente portador de Cardiopatia Congênita (definida como qualquer alteração na estrutura e função cardiocirculatórias presentes ao nascimento), que foi diagnosticado no Ambulatório de Cardiologia Pediátrica do HC-FMB/UNESP. Até o presente momento não são bem conhecidas as etiologias das cardiopatias congênitas, ou seja, as causas do surgimento desta anomalia em muitos indivíduos ainda permanecem incertas.

Nós estamos convidando vocês a participarem do projeto de pesquisa intitulado **“Investigação de Variação do Número de Cópias Genômicas em Pacientes com Cardiopatias Congênitas”**, cujos responsáveis são o Biólogo Thársis Gabryel Gomes, mestrando em Genética no Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – UNESP; a Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro – Bicudo, do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética) - Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) - UNESP; o Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG), Departamento de Genética – Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) - UNESP, e o Pesquisador Colaborador Dr. Rossano César Bonatto, do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), responsável pelo Ambulatório de Cardiologia Pediátrica do HC-FMB/UNESP.

Gostaríamos que vocês soubessem que:

- Participar deste projeto é uma opção de vocês, podendo decidir participar ou não;
- A participação neste projeto é totalmente independente do tratamento recebido no Ambulatório de Cardiologia Pediátrica (HCFMB) e a opção de não participação neste projeto não altera a sequência do tratamento do paciente sob sua responsabilidade;

- A qualquer momento vocês terão a liberdade de buscar, junto aos Pesquisadores do projeto, esclarecimentos de qualquer natureza, inclusive os relativos à metodologia de trabalho;
- A participação de vocês nesta pesquisa é total e completamente isenta de qualquer ônus financeiro;
- Haverá coleta de dados de seu (a) filho (a) para preenchimento da ficha de anamnese genético-clínica no nosso laboratório (SAG), contendo peso, altura, idade e outras características consideradas relevantes. Esta análise terá uma duração de 30 minutos;
- Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue a vocês devidamente rubricada, e a outra ia será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término desta pesquisa;
- O presente trabalho tem por **objetivo** investigar as possíveis Variações no Número de Cópias Genômicas em amostras de DNA, através da utilização de técnicas moleculares, e também pesquisar a possível relação dessa variação com a manifestação da cardiopatia congênita;

Caso vocês aceitem participar, gostaríamos de informá-los que:

- a) Será realizada a coleta de uma amostra de 6 ml de sangue (2 colheres de sopa) do portador de cardiopatia congênita.
- b) Será realizada a coleta de uma amostra de 6 ml de sangue (2 colheres de sopa) da mãe e do pai biológicos do portador de cardiopatia congênita.
- c) A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe um risco de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta que desaparecerá rapidamente.
- d) O material colhido não será usado em sua totalidade de imediato e parte dele será armazenada em um biorrepositório no Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, durante a vigência desta pesquisa.
- e) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família, mas poderá ajudá-lo na decisão de ter filhos (as) no futuro.
- f) Vocês estarão colaborando para aumentar os nossos conhecimentos sobre a etiologia (causas) das Cardiopatias Congênicas.

g) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos materiais biológicos armazenados no biorrepositório e aos dados completos, não sendo permitido, em nenhuma hipótese, o acesso por terceiros.

h) Todo material será codificado tendo, cada participante, recebido um número de registro no SAG.

i) Solicitamos também o consentimento para levantar o prontuário médico de seu filho (a), a fim de coletar informações lá contidas como: resultados de exames de eletrocardiograma, ecocardiograma e outros exames já feitos no hospital que possam nos fornecer informações importantes para a referida pesquisa científica.

Nós, (pai) _____
 portador do R.G. n° _____ -
 _____ e (mãe)

_____ do R.G.
 n° _____, pais do
 paciente _____,

autorizamos a participação de nosso (a) filho (a) no projeto de pesquisa **“Investigação de Variação do Número de Cópias Genômicas em Pacientes com Cardiopatias Congênitas”**.

Declaramos haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estarmos ciente sobre os itens acima mencionados e que a nossa participação é voluntária por opção própria.

Botucatu, ___ de _____ de 20__.

 Assinatura do Pai

 Assinatura da Mãe

 Assinatura do Pesquisador Responsável

Responsáveis pela pesquisa:

Pesquisador Responsável pela pesquisa: Biólogo e Mestrando Thársis Gabryel Gomes

Fone: (14) 3880 – 0372

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético Botucatu/SP – CEP:18.618-000
E-mail: tharsisgabryel@gmail.com

Pesquisadora (Orientadora) Responsável pela pesquisa: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro - Bicudo

Fone: (14) 3880-0372

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – CEP: CEP:18.618-000

e-mail: arilho@yahoo.com

Pesquisador Colaborador Responsável pela pesquisa: Dr. Danilo Moretti - Ferreira

Fone: (14) 3811-6274

Endereço: Rubião Júnior S/N – UNESP – Campus de Botucatu – Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético, Botucatu/SP - CEP: 18.618-000

e-mail: sag@fmb.unesp.br

Pesquisador Colaborador Responsável pela pesquisa: Dr. Rossano César Bonatto

Fone: (14) 3811-6274

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Pediatria – Faculdade de Medicina de Botucatu – CEP:18.618-000. E-mail: rcbonatto@gmail.com

**Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone (14) 3880-1608/3880-1609 ou pelo endereço: Chácara Butignoli s/n, Rubião Júnior – Botucatu – São Paulo, CEP: 18618-970 (Próximo a FAMESP).
Horário de funcionamento das 08:00 às 11:30/ 13:30 às 17:00.**

ANEXO 3



FICHA DE ANAMNESE GENÉTICO-CLÍNICA

**Projeto: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO TIPO COORTE RESTROSPECTIVO DE
PACIENTES PORTADORES DE CARDIOPATIA CONGÊNITA**

1. Identificação:

Nome: _____ SAG: _____
 _____ Nasc.: ____/____/____ Idade: _____ Local de nasc. :
 _____ Data de hoje: ____/____/____ RG-HC:

Mãe: _____ SAG: _____

Idade: _____ Profissão: _____

Escolaridade: _____

Pai: _____

SAG: _____

Idade: _____ Profissão: _____

Escolaridade: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone: _____

Encaminhado

por: _____

Diagnóstico: _____

Relatório: Sim () Não ()

Consanguinidade: Sim () Não ()

Cardiopatia na família: Sim () Não ()

Quem: _____

2. Heredograma:

3. Dados Gestacionais e antecedentes maternos:

Pré-natal: ()sim ()não

Início _____ meses

Duração da gravidez _____

Início dos movimentos fetais: _____ Intensidade _____ Ganho de peso com a gravidez _____kg Hemorragia() Processo febril() Contágio()

Edema ()

PA _____ Convulsões() Polidrâmnio() Oligodrâmnio()

Enfermidades

agudas/crônicas: _____

Fatores

físicos/químicos: _____

Obs.: _____

4. Parto:

Normal () Cesariana () Fórceps ()

Obs.: _____

Hospitalar () Domiciliar ()

Outro _____

Obs.: _____

5. Condições do RN

Peso _____ Comprimento _____ PC _____ PT _____

APGAR ____/____

Choro _____ Cianose: _____ Sucção: _____ Tônus:

_____ Icterícia _____

Fototerapia () Exsanguíneotransfusão ()

Permanência na maternidade: _____ dias Febre:

_____ Convulsões _____

Obs.: _____

6. Evolução

Firmou cabeça_____ Sorriso social_____ Sentou com apoio_____ Sentou sem apoio_____ Andou_____ 1ºs
 Palavras_____ Frases_____ Fechou fontanela: _____
 Controle vesical _____ Anos de escolaridade_____ Tipo de escola_____

Passado

mórbido:

Doenças _____ próprias _____ da Infância: _____

Complicações: _____

Convulsões (quantos episódios, tempo de duração, descrição): _____

Obs.: _____

7. Exame Físico

7.1. Biometria

Estatura: _____ cm (%) Peso _____ gr (%) Envergadura: _____ cm (%)
 PC: _____ cm (%) PT: _____ cm (%) DII: _____ mm (%) DIE: _____ mm (%)

Bregma: _____ AP: _____ cm BP _____ cm $\frac{BP \times 100}{AP} = I.C. =$

AP

7.2. Preencher caso possua dismorfias nos seguintes locais:

- Crânio e Face:
- Orelhas:
- Olhos:
- Nariz:

- Maxilar e Mandíbula
- Boca:
- Pescoço:
- Tórax:
- Coluna:
- Abdome:
- Membros Superiores:
- Membros Inferiores:
- Articulações:
- Genitália Externa:
- Tecido Celular Subcutâneo:
- Musculatura:
- Pele e Anexos:
- Exames Neurológicos:

8. Exames Solicitados e Resultados de Exames:

Atendido por: _____

em:

___/___/___