

Investigação da Variação no Número de Cópias Gênicas em Crianças com Defeito Cardíaco Conotruncal

Investigation of Copy Number Variation in Children with Conotruncal Heart Defects

Carla Marques Rondon Campos¹, Evelin Aline Zanardo³, Roberta Lelis Dutra³, Leslie Domenici Kulikowski^{2,3}, Chong Ae Kim²

Universidade Federal de Mato Grosso¹, Cuiabá, MT; Universidade de São Paulo²; Departamento de Patologia – Laboratório de Citogenômica – LIM 03 – Universidade de São Paulo³, São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: Os defeitos cardíacos congênitos são o grupo de anormalidades estruturais mais prevalentes ao nascimento e uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil. Estudos têm mostrado a contribuição da variação no número de cópias na gênese das malformações cardíacas.

Objetivos: Investigar a variação no número de cópias gênicas em crianças com defeito cardíaco conotruncal.

Métodos: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)* foi realizado em 39 pacientes com defeito cardíaco conotruncal. Avaliação clínica e laboratorial foi realizada em todos os pacientes. Os pais dos probandos que apresentaram alterações também foram investigados.

Resultados: Variação no número de cópias foi detectada em 7/39 pacientes: deleção 22q11.2, duplicação 22q11.2, duplicação 15q11.2, duplicação 20p12.2, deleção 19p, duplicação 15q e 8p23.2 com duplicação 10p12.31. As características clínicas foram compatíveis com o relatado na literatura associadas com microdeleção/microduplicação encontrada. Nenhuma dessas alterações foi herdada dos pais.

Conclusões: Nossos resultados demonstram que a técnica de MLPA é útil na investigação de microdeleções e microduplicações em defeitos cardíacos congênitos conotruncais. O diagnóstico precoce das variações no número de cópias em pacientes com defeito cardíaco congênito auxilia na prevenção de morbidade e diminuição da mortalidade nesses pacientes. (*Arq Bras Cardiol.* 2015; 104(1):24-31)

Palavras-chave: Cardiopatias Congênitas; Variação Genética; DNA; Tronco Arterial; Comunicação Interventricular.

Abstract

Background: Congenital heart defects (CHD) are the most prevalent group of structural abnormalities at birth and one of the main causes of infant morbidity and mortality. Studies have shown a contribution of the copy number variation in the genesis of cardiac malformations.

Objectives: Investigate gene copy number variation (CNV) in children with conotruncal heart defect.

Methods: Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed in 39 patients with conotruncal heart defect. Clinical and laboratory assessments were conducted in all patients. The parents of the probands who presented abnormal findings were also investigated.

Results: Gene copy number variation was detected in 7/39 patients: 22q11.2 deletion, 22q11.2 duplication, 15q11.2 duplication, 20p12.2 duplication, 19p deletion, 15q and 8p23.2 duplication with 10p12.31 duplication. The clinical characteristics were consistent with those reported in the literature associated with the encountered microdeletion/microduplication. None of these changes was inherited from the parents.

Conclusions: Our results demonstrate that the technique of MLPA is useful in the investigation of microdeletions and microduplications in conotruncal congenital heart defects. Early diagnosis of the copy number variation in patients with congenital heart defect assists in the prevention of morbidity and decreased mortality in these patients. (*Arq Bras Cardiol.* 2015; 104(1):24-31)

Keywords: Heart Defects Congenital; Genetic Variation; DNA, Truncus Arteriosus; Heart Septal Defects, Ventricular.

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

Correspondência: Universidade Federal de Mato Grosso Faculdade de Medicina – Departamento de Pediatria •

Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367. CEP 78060-900. Boa Esperança, Cuiabá, MT – Brasil

E-mail: carlamcampos@uol.com.br; fcmmcampos@uol.com.br

Artigo recebido em 31/05/14, revisado em 30/08/14, aceito em 04/09/14.

DOI: 10.5935/abc.20140169

Introdução

Os defeitos cardíacos congênitos (DCC) são o grupo de anormalidades estruturais mais comuns ao nascimento, com prevalência estimada de 1-5% dos nascidos vivos, constituindo uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil^{1,2}.

Os fatores genéticos são importantes na etiologia complexa dos DCC³. Síndromes mendelianas e cromossômicas ocorrem em 20% dos casos de DCC. Os mecanismos genéticos subjacentes que representam os 80% restantes são pouco compreendidos^{4,5}.

As malformações conotruncais representam um grupo heterogêneo de malformações cardíacas envolvendo o sistema de saída dos ventrículos e o polo arterial do coração. Essas malformações comprometem o desenvolvimento das vias de saída do coração e são responsáveis por cerca de 10-25% de todos os DCC diagnosticados ao nascimento^{1,6}.

Após o sequenciamento do genoma humano, um novo tipo de alteração genômica foi descoberto – a variação no número de cópias – e sua associação com malformações cardíacas foi estabelecida^{7,8}.

As variações no número de cópias (CNVs) são definidas como fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA), maior ou igual a um quilobase (kb), presentes em número variável em um genoma^{9,10}.

As CNVs constituem uma parte importante da diversidade genética em relação à evolução e suscetibilidade a doenças; conseqüentemente, sua detecção e associação com características e fenótipos constituem importante passo para melhor entender a etiologia da afecção^{11,12}. CNVs que abrangem vários genes podem afetar outros órgãos importantes, além do coração. Como o DCC pode ser o primeiro defeito a ser detectado no paciente, a CNV em pacientes com DCC pode levar ao diagnóstico precoce e tratamento de sintomas extracardíacos¹³.

Análise molecular pela técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) tem sido utilizada para determinar variação no número de cópias. Essa técnica detecta várias síndromes de microdeleções/microduplicações associadas ao DCC e poderia ser usada como teste de diagnóstico para detectar relevantes variações no número de cópias e identificar pacientes sindrômicos¹³.

Este estudo investigou a presença de variação no número de cópias em crianças com cardiopatia conotruncal e seus pais, e relacionou os achados genéticos e clínicos com os descritos na literatura.

Métodos

Para o estudo prospectivo e descritivo foram incluídos 39 pacientes portadores de cardiopatia congênita do tipo conotruncal e coartação da aorta. A amostragem utilizada foi de conveniência.

Os pacientes eram oriundos do ambulatório de cardiologia pediátrica e unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal do Hospital Universitário Júlio Müller e outros hospitais localizados em Cuiabá, Mato Grosso. O período de coleta dos dados foi de março a novembro de 2012.

O critério de inclusão foi a presença das lesões ao exame ecocardiográfico: *truncus arteriosus*, tetralogia de Fallot, interrupção do arco aórtico, atresia pulmonar e defeito do septo ventricular, transposição de grandes artérias e coartação da aorta. Foram excluídos os pacientes com cariótipo de banda G alterado.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Júlio Müller da Universidade Federal de Mato Grosso. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos pacientes ou pais, dependendo da idade do paciente.

Foi preenchida uma ficha clínica para cada indivíduo. A avaliação de aspectos dismórficos foi analisada posteriormente por meio de fotografias ou pessoalmente por um geneticista.

Nos pacientes com variação no número de cópias foi incluída avaliação clínica e laboratorial de seus pais.

Foi coletado sangue venoso periférico dos probandos e de seus familiares para a realização de citogenética clássica e MLPA.

Estudo molecular por *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA)

As amostras de sangue foram encaminhadas para o laboratório de citogenômica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foi realizada a técnica de MLPA.

As reações de MLPA foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante utilizando os kits SALSA P036, P070, P064 e P250 (MRC-Holland®, Amsterdã, Holanda) com algumas modificações para maior rendimento dos reagentes.

Os kits P036 e P070 detectam alterações subteloméricas. O kit P064 é indicado para as principais síndromes de microdeleções, detectando alterações em 22q11.2 e em outras regiões críticas para algumas síndromes.

O kit P250 é específico para a síndrome de DiGeorge, detectando microdeleções/duplicações em 22q11.2. Contém sondas para outras regiões envolvidas na formação das cardiopatias.

Foram utilizados 250 ng de DNA genômico (5 µL) de cada paciente, sendo adicionados a um microtubo e levados ao termociclador (Veriti® ThermalCycler – Life Technologies) para desnaturação a 98°C por 15 minutos. Em seguida, uma mistura das sondas (específicas para cada *kit*) e solução tamponada foi adicionada ao DNA desnaturado, para o processo de hibridação das sondas de MLPA ao DNA a 60°C por três horas. Soluções tamponadas, juntamente com a enzima ligase, foram adicionadas à solução de hibridação para a ligação das sondas em cada região-alvo específica a 54°C por 15 minutos. Na última etapa, os reagentes para a reação de PCR foram adicionados à solução de ligação, para a amplificação somente dos fragmentos unidos pela ligase. Assim, os produtos amplificados foram colocados em microplacas juntamente com marcador de peso molecular (LIZ GS600) e Hi-DiFormamide (Life Technologies) e levados ao sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies) para as reações de análise de fragmentos.

Em todas as reações de MLPA foram utilizados pelo menos três controles normais. Os dados foram gerados pelo sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies), da Rede de Equipamento Multiusuário no laboratório de imunologia do Instituto do Coração – Incor – HC/FMUSP.

A análise dos resultados da reação de MLPA foi realizada utilizando o *software* Gene Marker® (Softgenetics LLC, StateCollege, PA www.softgenetics.com). Os resultados foram considerados alterados quando o tamanho do pico relativo era menor que 0,75 (deleção) ou maior que 1,25 (duplicação) quando comparado a amostras normais.

Resultados

Participaram do estudo 39 pacientes portadores de cardiopatia congênita, dos quais 23 (59%) eram do sexo masculino e 16 (41%) do sexo feminino. A idade variou de dois dias a 19 anos, e a média foi de cinco anos e sete meses. Somente duas mães relataram diagnóstico prévio por meio de ultrassonografia gestacional do feto com cardiopatia congênita.

Entre as cardiopatias observadas, a maioria dos pacientes apresentava tetralogia de Fallot, presente em aproximadamente 56% da casuística. As outras cardiopatias foram: transposição de grandes artérias (23%), coarctação da aorta (10,3%), dupla via de saída de ventrículo direito (7,7%), atresia pulmonar e defeito de septo ventricular (2,6%) – Tabela 1.

Pacientes sem alteração de MLPA

Não foi detectado CNV em 32/39 pacientes (82,05%). Recorrência familiar de cardiopatia congênita foi verificada em 2/32 pacientes.

Em 15/32 pacientes (46,8%) com MLPA normal, foram observadas anormalidades extracardíacas e os sinais e sintomas clínicos observados foram: dismorfias faciais, fissura palatal, estrabismo, acidente vascular cerebral, convulsão, paralisia facial, déficit auditivo, vitiligo, epilepsia, autismo, estenose subglótica, asma, infecções de vias aéreas inferiores e superiores frequentes, onfalocelo, daltonismo, dificuldade de alimentação, déficit de crescimento, refluxo gastroesofágico, criptorquidismo, distúrbio da fala, dificuldade de aprendizado e hipocalcemia. As infecções de vias aéreas frequentes ocorreram em seis casos; as outras alterações extracardíacas ocorreram de forma esporádica nos pacientes.

Dos 32 pacientes, cinco foram a óbito, e todos que foram a óbito estiveram internados em unidade de terapia

intensiva neonatal aguardando transferência para um centro especializado em cirurgia cardíaca.

Pacientes com alteração no MLPA

Com a técnica de MLPA utilizando quatro *kits*, foi possível detectar microdeleções/microduplicações em 7/39 pacientes (17,9%), sendo dois casos de deleção (deleção 19p, deleção 22q) e cinco casos de duplicação (dois casos de duplicação 15q, duplicação 20p, duplicação 22q, duplicação 8p com duplicação 10p).

Quadro clínico

Dos sete pacientes que apresentaram CNVs, a idade variou de 19 dias a 10 anos. Três apresentavam tetralogia de Fallot, dois tinham dupla via de saída de ventrículo direito, um tinha transposição de grandes artérias e um tinha coarctação de aorta. Os sete pacientes apresentavam alterações extracardíacas.

Dos sete pacientes, três estavam internados em unidade de terapia intensiva neonatal e foram a óbito (Tabela 2).

Investigação dos pais

A investigação dos pais foi realizada em seis famílias dos pacientes com alteração no MLPA. Destas, em quatro famílias obtivemos material de ambos os genitores (pai e mãe) e, em dois casos, apenas material materno. Nenhum deles apresentou alterações semelhantes às CNVs de seus filhos.

Descrição de sete casos com alterações

Duplicação 15q11.2

Paciente do sexo feminino, pais não consanguíneos, pai com 30 anos de idade e mãe de origem indígena, 31 anos, com quatro filhos, o terceiro filho apresentou cardiopatia congênita complexa e foi a óbito. Nasceu de parto cesárea, com 38 semanas de idade gestacional, pesando 2.165 g (abaixo do percentil 3 para a idade), medindo 44 cm (percentil 3 para a idade), perímetro cefálico de 32 cm (entre os percentis 3-10 para a idade) e Apgar 9 e 9. O ecocardiograma identificou coarctação grave da aorta, canal arterial pérvio, comunicação interatrial e inúmeras comunicações interventriculares.

Com três meses de idade apresentava peso de 3.030 g (entre os percentis 3-15 para a idade), comprimento de 49 cm (entre os percentis 3-15 para a idade) e perímetro cefálico de 36 cm (muito abaixo do percentil 3 para a idade). As alterações faciais observadas foram: olhos pequenos, amendoados, lábio superior fino, micrognatia, microcefalia, presença de dente neonatal e canal de ouvido estreito.

As outras alterações apresentadas foram: atresia duodenal, apêndice à esquerda, constipação, dificuldade de alimentação, déficit de crescimento, hipertonia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, alteração na regulação da temperatura corporal e infecções de vias aéreas frequentes. A tomografia computadorizada de crânio evidenciou atrofia e displasia de cortical. Foi a óbito com quatro meses de idade, logo após receber alta da UTI para casa.

Tabela 1 – Distribuição dos tipos de defeitos cardíacos da amostra

Tipo de defeito cardíaco	N (%)
Tetralogia de Fallot	22 (56,4%)
Transposição de grandes artérias	9 (23%)
Coarctação da aorta	4 (10,3%)
Dupla via de saída de ventrículo direito	3 (7,7%)
Atresia pulmonar e defeito do septo ventricular	1 (2,6%)
Total	39 (100%)

Tabela 2 – Características dos pacientes com CNV

N	Idade	Sexo	DCC	Alterações clínicas	CNV	Destino	Idade atual/óbito
MC001	3 m	F	Co. aorta	Dismorfismo facial Atresia duodenal Doente neonatal, Atrofia, displasia cerebral IVAI frequente, RDNPM	Dup15q11.2	Óbito	5 m
MC003	6 a	M	TOF	Dismorfismo facial Asma	Del 19p	Amb	8 a
MC006	19 d	M	DVSVD	Dismorfismo facial	Dup 20p12.2	Óbito	23 d
MC011	2 a	M	TOF	Dismorfismo facial Déficit de crescimento RDNPM	Dup 15q	Amb	4 a
MC015	6 a	F	TOF	Fronte ampla Dedos das mãos fusiformes	Dup 8p23.2 e dup10p12.31	Amb	8 a
MC030	10 a	M	TGA	Dismorfismo facial RGE IVAI frequente Dificuldade de aprendizado	Dup2 2q11	Amb	12 a
MC039	5 m	F	DVSVD	Dismorfismo facial Hérnia umbilical Dificuldade de alimentação Déficit de crescimento RGE Insuficiência velofaríngea Aplasia de timo RDNPM	Del 22q11	Óbito	6 m

a: anos; amb: ambulatório; Co aorta: coartação de aorta; d: dia; DCC: defeito cardíaco congênito; del: deleção; dup: duplicação; DVSVD: dupla via de saída de ventrículo direito; F: feminino; IVAI: infecção de vias aéreas inferiores; m: mês; M: masculino; RDNPM: retardo no desenvolvimento neuropsicomotor; RGE: refluxo gastroesofágico; TGA: transposição de grandes artérias; TOF: tetralogia de Fallot.

Duplicação 20p12.2

Neonato de 19 dias de vida, sexo masculino, primeiro filho de pais saudáveis, não consanguíneos, de 20 e 24 anos, mãe e pai, respectivamente. Nasceu de parto cesárea, idade gestacional de 39 semanas, peso de 3.800 g (percentil 75 para a idade), comprimento de 52 cm (percentil 50 para a idade), perímetro cefálico de 34 cm (percentil 25 para a idade) e Apgar 10. Diagnóstico ecocardiográfico de dupla via de saída de ventrículo direito, comunicação interatrial ampla, câmara ventricular rudimentar, hipoplasia do arco aórtico, canal arterial persistente e estenose aórtica.

O exame físico detectou alterações faciais, como achatamento bitemporal, face alongada, hipertelorismo ocular, dorso nasal alargado, ponta nasal achatada, narinas antevertidas e micrognatia, observando-se também pescoço curto, dedos das mãos e pés alongados.

Permaneceu internado em UTI e foi a óbito aguardando transferência para realizar cirurgia cardíaca.

Deleção 19p

Paciente do sexo masculino, segundo filho de pais saudáveis, não consanguíneos, mãe e pai com idades de 32 e 33 anos, respectivamente.

Nasceu de parto cesárea, 39 semanas de idade gestacional, pesando 3.450 g (percentil 50 para a idade), medindo 49 cm

(entre os percentis 25-50 para a idade), perímetro cefálico de 33,5 cm (percentil 50 para a idade), com diagnóstico de tetralogia de Fallot.

Aos seis anos idade pesava 26.500 g (entre os percentis 85-97 para a idade) e media 123 cm (no percentil 85 para a idade).

Ao exame físico foram observadas características faciais dismórficas, como dorso nasal alargado, ponte nasal achatada, olhos amendoados. Como alteração extracardíaca relatava asma. O desenvolvimento neuropsicomotor foi normal.

Duplicação 15q

Paciente do sexo masculino, filho único, mãe e pai saudáveis, com 36 e 26 anos, respectivamente, não consanguíneos, sem relato de cardiopatia na família. Nasceu de parto cesárea, com 30 semanas de idade gestacional, pesando 1.015 g (percentil 10 para a idade), medindo 38 cm (percentil 10 para a idade).

Aos dois anos e 11 meses apresentava os seguintes dados antropométricos: peso de 14.000 g (entre os percentis 50-85 para a idade), altura de 82 cm (abaixo do percentil 3 para a idade) e perímetro cefálico de 46 cm (abaixo do percentil 3 para a idade).

Ao ecocardiograma, apresentava tetralogia de Fallot. Ao exame físico foram detectadas características faciais dismórficas: hipertelorismo ocular, dorso nasal alargado, ponte nasal achatada, narinas antevertidas, filtro nasolabial longo com os pilares apagados e microcefalia.

As alterações clínicas evidenciadas foram déficit de crescimento e retardo no desenvolvimento neuropsicomotor.

Deleção 22q11.2

Lactente do sexo feminino, primeira filha de pais saudáveis, não consanguíneos, com idades de 29 e 24 anos, mãe e pai, respectivamente, sem relato de cardiopatia na família. Durante a gestação, a mãe apresentou diabetes gestacional, tendo havido uso de insulina, e a única alteração observada na ultrassonografia gestacional foi polidrâmnio.

Nasceu de parto cesárea com 37 semanas de idade gestacional, pesando 2.500 g (entre os percentis 10-25 para a idade), medindo 44 cm (percentil 10 para a idade), perímetro cefálico de 33,5 cm (percentil 50 para a idade) e Apgar de 8 e 8. Com cinco dias de vida, foi detectado sopro cardíaco, o ecocardiograma evidenciou dupla via de saída de ventrículo direito, comunicação interatrial, comunicação interventricular ampla e estenose pulmonar discreta. Foi internada em UTI e realizada a primeira cirurgia cardíaca.

Aos cinco meses de idade pesava 4.200 g (entre os percentis 15-50 para a idade), media 55 cm (abaixo do percentil 3 para a idade) e o perímetro cefálico era de 36,5 cm (abaixo do percentil 3 para a idade).

Ao exame físico foram detectadas características faciais dismórficas: hipertelorismo ocular, olhos grandes, dorso nasal alargado, ponta nasal achatada com narinas antevertidas, filtro nasolabial longo, lábio superior fino e em formato de "V" invertido, micrognatia, lóbulo da orelha achatado, dedos das mãos afilados e alongados, e hérnia umbilical.

As alterações clínicas evidenciadas foram dificuldade de alimentação, déficit de crescimento, retardo no desenvolvimento neuropsicomotor (somente sustentava a cabeça).

Os exames de imagem evidenciaram refluxo gastroesofágico e aplasia de timo. Avaliação com otorrinolaringologista diagnosticou insuficiência velofaríngea. Os exames laboratoriais identificaram cálcio sérico dentro da normalidade.

Foi a óbito logo após cirurgia cardíaca com seis meses de idade.

O paciente apresentava uma deleção de 3,0 Mb, portanto deleção típica *de novo* para a síndrome de DiGeorge, pois o MLPA dos pais foi normal.

Duplicação 22q11.2

Paciente do sexo masculino, filho único, mãe solteira, saudável, 35 anos, sem relato de cardiopatia na família, nasceu de parto cesárea, com 40 semanas e seis dias de idade gestacional, pesando 4.425 g (acima do percentil 90 para a idade), medindo 50 cm (entre os percentis 10-25 para a idade), com perímetro cefálico de 37,5 cm (acima do percentil 97 para a idade) e Apgar 8 e 10.

O ecocardiograma detectou transposição de grandes artérias, comunicação interatrial e persistência do canal arterial. A cirurgia cardíaca foi realizada com dez dias de vida.

Aos 10 anos pesava 40 kg (entre os percentis 85-90 para a idade), altura 142 cm (entre os percentis 50-85 para a idade) e perímetro cefálico de 52,5 cm.

Ao exame físico foram observadas alterações fenotípicas sutis, como base nasal alargada, filtro nasolabial longo e lábio superior fino, com diagnóstico de refluxo gastroesofágico e frequentes infecções de vias aéreas. O desenvolvimento neuropsicomotor foi normal, mas apresentava dificuldade de aprendizado.

Duplicação 8p23.2 e 10p12.31

Paciente do sexo feminino, com seis anos de idade, filha única de pais separados, sem história de consanguinidade ou cardiopatia na família, mãe saudável, 23 anos.

Nasceu de parto normal, com 40 semanas de idade gestacional, pesando 3.150 g (percentil 25 para a idade), com diagnóstico de tetralogia de Fallot, insuficiência tricúspide leve e insuficiência pulmonar moderada. Foi submetida a cirurgia cardíaca com quatro anos de idade.

Atualmente, está com peso de 20,7 kg (entre os percentis 15-50 para a idade), altura de 117 cm (entre os percentis 15-50 para a idade) e perímetro cefálico de 51 cm. Ao exame físico foram evidenciados fronte ampla e dedos fusiformes. O desenvolvimento neuropsicomotor foi normal e não manifestava outras alterações clínicas.

Discussão

Estudos recentes têm mostrado que CNVs ocorrem em significativa proporção de pacientes com DCC. Em síndromes envolvendo DCC como parte do espectro clínico, a malformação cardíaca é frequentemente o primeiro sintoma a surgir¹³.

No presente estudo detectamos CNVs em 7/39 casos: deleção 22q11.2, duplicação 22q11.2, duplicação 15q11.2, duplicação 20p12.2, deleção 19p, duplicação 15q e duplicação 8p23.2 concomitante com duplicação 10p12.31.

Atualmente, vários estudos têm estabelecido a relevância de CNVs na etiologia de DCC. Demonstrou-se associação tanto de DCC síndrômico como DCC isolado e desequilíbrios cromossômicos¹³⁻¹⁵.

O cariótipo resultou normal em todos os indivíduos dessa pesquisa, o que também foi observado por Thiempont e cols.¹⁶, que detectaram 30% de CNVs raras em pacientes com DCC e outras anomalias ao nascimento com cariótipos normais.

CNVs são também conhecidas por estarem envolvidas na gênese de patologias do neurodesenvolvimento e neurocognição, como deficiência intelectual, esquizofrenia e espectro autístico¹⁷. Neste estudo observamos a presença de retardo no desenvolvimento neuropsicomotor em apenas dois dos sete pacientes que apresentaram CNV. Richards e cols.¹⁸, estudando CNV em 40 indivíduos com DCC, observaram que o risco de ter CNV causal aumentou para 45% naqueles indivíduos com anormalidades neurológicas ou atraso no desenvolvimento. Cooper e cols.¹⁹, confirmando essa relação ao analisar CNV em 575 crianças com DCC e deficiência intelectual, mostraram aumento significativo do número de CNVs em crianças com DCC.

Nosso estudo identificou cinco casos de duplicação e apenas dois casos de deleção, de modo semelhante ao estudo

realizado por Erdogan e cols.²⁰, que, ao pesquisarem CNV em 150 indivíduos com DCC isolada, detectaram 18 CNVs raras, sendo que a maioria foi duplicação, em contraste com aquelas encontradas nos DCC síndrômicos, que são predominantemente deleções. Adicionalmente, 44% foram familiares, também ocorrendo nos pais sem evidência de DCC, talvez indicando que essas CNVs aumentem a suscetibilidade para DCC, mas requerem outros fatores para manifestar o fenótipo. Isso demonstra que CNV rara pode ser um importante contribuidor genético para DCC isolado.

Inicialmente, os pacientes deste estudo pareciam ter apenas DCC, contudo exame clínico e avaliação fenotípica mais cuidadosa evidenciaram alterações extracardíacas possíveis de fazerem parte de uma síndrome. Vários estudos têm demonstrado a presença de CNVs em DCC não síndrômico²¹.

Recentemente, Warburton e cols.¹⁵, estudando 223 crianças com cardiopatia conotruncal e síndrome do coração esquerdo hipoplásico, encontraram deleção 22q11.2 em nove crianças e 33 CNVs *de novo*. No nosso estudo detectamos a deleção 22q11.2 em apenas um paciente (2,5%).

A síndrome da deleção 22q11.2 (SD22q11), também conhecida como síndrome de DiGeorge ou velocardiofacial, é considerada a mais comum das síndromes de microdeleção humana e contém múltiplos genes. A prevalência estimada é de 1:4.000 nascidos vivos⁸.

Uma deleção cromossômica submicroscópica é detectada por FISH, MLPA ou análise cromossômica por *microarray*. A grande maioria dos casos (90%) apresentando deleção do tamanho aproximado de três milhões de bases (Mb) leva à deleção de aproximadamente 45 genes, como a apresentada pelo paciente deste estudo⁸.

O único paciente deste estudo com deleção 22q11 era inicialmente portador de cardiopatia conotruncal isolada. Após exame físico detalhado, foram observadas várias alterações fenotípicas que fazem parte da síndrome da deleção 22q11.2. Na maioria dos trabalhos que têm como amostra uma população de indivíduos com cardiopatia conotruncal isolada observa-se posteriormente, em exame clínico mais detalhado, a presença de alterações fenotípicas sutis não evidentes no primeiro exame²².

A apresentação clínica da síndrome da deleção do 22q11 pode ser extremamente variável. Detecção precoce da deleção é importante para o tratamento das anomalias e para a investigação de malformações associadas e prevenção dos problemas neuropsicológicos e imunodeficiência. Na maioria dos casos, a deleção 22q11 ocorre *de novo* na família, contudo herdar a microdeleção dos pais pode ocorrer em 6-28%. Pais afetados podem apresentar fenótipo leve. Por essa razão, teste para deleção 22q11 deve ser oferecido a todos os pais de crianças afetadas com o propósito de aconselhamento genético^{23,24}. No paciente deste estudo, os pais também foram pesquisados, e o MLPA de ambos resultou normal.

A paciente em questão apresentava como defeito cardíaco a dupla via de saída de ventrículo direito e foi a óbito após a segunda cirurgia. Defeito cardíaco congênito é uma das mais frequentes manifestações da síndrome da deleção 22q11.2; além disso, é a maior causa de óbito na grande maioria dos pacientes com essa síndrome.

A identificação de etiologia genética para o DCC é importante para proporcionar aconselhamento genético para pais que planejam ter outros filhos. O risco de recorrência para muitos DCC é de 2-6%, e o risco de recorrência de DCC aumenta significativamente quando os pais são portadores de deleção/duplicação¹⁸, informação que adquire relevância para se realizar o aconselhamento genético desses pais ou do paciente que, ao atingir a idade adulta, decide começar uma família.

Nos últimos anos, dezenas de microdeleções e microduplicações cromossômicas clinicamente relevantes têm sido descritas em seres humanos, frequentemente associadas com deficiência mental, autismo e/ou malformações físicas. Uma vez que esses pequenos arranjos genômicos são geralmente abaixo do limite de detecção da microscopia óptica, é essencial utilizar procedimentos de diagnóstico molecular para fornecer uma explicação para os sintomas e sinais observados e proporcionar prognósticos clínicos e genéticos para os pacientes e seus familiares. Nos países desenvolvidos, testes moleculares, particularmente *Comparative Genomic Hybridization* (CGH) *array*, tornaram-se o padrão-ouro para tal diagnóstico laboratorial. No entanto, esses testes são muito dispendiosos e dependem da disponibilidade de equipamento caro e que tem de ser frequentemente atualizado. Como resultado desses altos custos, os pacientes dos países em desenvolvimento não têm acesso a testes e não são frequentemente diagnosticados, com grande prejuízo para sua família²⁵.

O MLPA é uma técnica estabelecida para detecção de conhecidas CNVs. O custo do MLPA é substancialmente menor que o CGH *array* e, com relação ao *Fluorescence in Situ Hybridization* (FISH), é mais rápido, fácil e econômico, com um simples *kit* capaz de realizar pesquisa simultânea de múltiplas anomalias. Com isso pode ser utilizado para detecção de variação no número de cópias clinicamente relevantes em pacientes com DCC aparentemente não síndrômico, ocasionando identificação precoce de pacientes com desordens genômicas^{13,26,27}.

Se o diagnóstico do DCC é realizado precocemente, isto é, intraútero, melhor preparação para o nascimento com o tratamento mais cedo melhoraria o prognóstico em termos de morbidade e mortalidade, contudo observamos que a maioria das mães dos pacientes, neste estudo, mesmo tendo realizado pré-natal e ultrassom gestacional, desconhecia o diagnóstico de defeito cardíaco fetal. Em um estado que apresenta escassez de leitos de unidade de terapia intensiva neonatal para o tratamento desses recém-nascidos e não dispõe de cirurgias cardíacas de maior complexidade, esses pacientes provavelmente estão indo a óbito sem diagnóstico e tratamento. Isso pôde ser evidenciado em nossa amostra, pela qual todos os pacientes que estavam internados em unidade de terapia intensiva foram a óbito aguardando transferência para um centro especializado em cirurgia cardíaca, demonstrando a importância do diagnóstico precoce no impacto da alta morbimortalidade desses indivíduos.

Ainda há controvérsias na literatura sobre em qual grupo de indivíduos deve ser promovida a investigação rotineira para variação no número de cópias – em pacientes com defeito cardíaco isolado ou naqueles que apresentam outras alterações extracardíacas. O que se pode observar de consenso é que uma avaliação física

minuciosa à procura de sinais dismórficos, principalmente em crianças portadoras de defeito cardíaco conotruncal, pode auxiliar na decisão de realizar testes moleculares. Os benefícios proporcionados seriam aconselhamento genético adequado, avaliação e manejo dos problemas de forma mais eficaz, ocasionando melhoria na qualidade de vida do indivíduo e da família.

Conclusões

A técnica de MLPA é útil na investigação de microdeleções e microduplicações em defeitos cardíacos congênitos conotruncais.

O diagnóstico precoce das CNVs em pacientes com DCC auxilia na prevenção de morbidade e diminuição da mortalidade nesses pacientes. Uma avaliação clínica minuciosa em todo paciente com DCC é imprescindível para detectar outras anomalias congênitas associadas.

Este trabalho ressalta a necessidade de o médico, frente a uma criança com defeito cardíaco, estar atento à possibilidade de alterações genéticas, com conhecimento das novas técnicas que possibilitam esse diagnóstico.

A limitação deste estudo se deve tanto ao método de amostragem empregado, o de conveniência, quanto ao pequeno número amostral, que permite considerar os resultados encontrados apenas para a população em questão.

Referências

- Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(12):1890-900.
- Wang E, Sun S, Qiao B, Duan W, Huang G, An Y, et al. Identification of functional mutations in GATA4 in patients with congenital heart disease. *PLoS One.* 2013;8(4):e62138.
- Pierpont ME, Basson CT, Benson Jr DW, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, et al; American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young. Genetic basis for congenital heart defects – current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young; endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation.* 2007;115(27):3015-38.
- Bittel DC, Butler MG, Kibiryaeva N, Marshall JA, Chen J, Lofland GA et al. Gene expression in cardiac tissues from infants with idiopathic conotruncal defects. *BMC Med Genomics.* 2011; 4:1-10.
- Soemedi R, Wilson IJ, Bentham J, Darlay R, Töpf A, Zelenika D, et al. Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Gen.* 2012;91(3):489-501.
- Vaidyanathan B, Kumar S, Sudhakar A, Kumar RK. Conotruncal anomalies in the fetus: referral patterns and pregnancy outcomes in a dedicated fetal cardiology unit in South India. *Ann Pediatr Cardiol.* 2013;6(1):15-20.
- Gelb BD, Seidman CE. The good SHP2 association: a porthole into the genetics of congenital heart disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(3):271-3.
- Ware SM, Jefferies JL. New genetic insights into congenital heart disease. *J Clin Exp Cardiol.* 2012 Jun; 15; S8. pii:003.

Agradecimentos

Nós agradecemos aos cardiologistas que permitiram que os seus pacientes fossem estudados e aos pacientes e pais que aceitaram participar do estudo.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Campos CMR, Kulikowski LD, Kim CA; Obtenção de dados e Redação do manuscrito: Campos CMR; Análise e interpretação dos dados: Campos CMR, Zanardo EA, Dutra RL.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP 2009-53105 e CNPq: 401910/2010-5.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Carla Marques Rondon Campos pela Universidade de São Paulo e Universidade Federal de Mato Grosso.

- Castellani CA, Melka MG, Wishart AE, Locke ME, Awamleh Z, O Reilly L, et al. Biological relevance of CNV calling methods using familial relatedness including monozygotic twins. *BMC Bioinformatics.* 2014;15:114.
- Li X, Chen S, Xie W, Vogel I, Choy KW, Chen F, et al. PSCC: sensitive and reliable population-scale copy number variation detection method based on low coverage sequencing. *PLoS One.* 2014;9(1):e85096.
- Xu Y, Peng B, Fu Y, Amos CI. Genome-wide algorithm for detecting CNV associations with disease. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:331.
- Valsesia A, Macé A, Jacquemont S, Beckmann J, Kutalik Z. The growing importance of CNVs: new insights for detection and clinical interpretation. *Front Genet.* 2013;4:92.
- Sorensen KM, El-Segaler M, Fernlund E, Errami A, Bouvagnet P, Nehme N, et al. Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: early diagnosis of syndromic patients. *Am J Med Genet.* 2012;158A(4):720-5.
- Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC, Vermeesch JR, Moreau Y, et al. Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):251-9.
- Warburton D, Ronemus M, Kline J, Jobanputra V, Williams I, Anyane-Yeboah K, 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 hipoplastic left heart disease. *Human Genet.* 2014;133(1):11-27.
- Thienpont B, Mertens I, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cases of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J.* 2007;28(22):2778-84.

17. Silversides CK, Lionel AC, Constain G, Merico D, Migita O, Liu B, et al. Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002843.
18. Richards AA, Santos IJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, et al. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res.* 2008;64(4):358-63.
19. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011;43(9):838-46.
20. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tumer Z, Tommerup N, Chen W, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridization in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet.* 2008;45(11):704-9.
21. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, DePalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated, sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet.* 2009;41(8):931-5.
22. Goldmuntz E, Clark B, Mitchel LA, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, et al. Frequency of 22q11 deletion in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(2):492-8.
23. Cuturilo CA, Drakulic D, Stevanovic M, Jovanovic I, Djukic M, Miletic-Grkovic S, et al. A rare of interrupted aortic arch type C and microdeletion 22q11.2. *Eur J Pediatr.* 2008;167(10):1195-8.
24. McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11.2 deletion syndrome. *Gene Reviews.* Last update: 16 December 2005. [Cited in 2014 Jan 28]. Available from: http://peds.stanford.edu/rotations/genetics_article_22q11_2_deletion_sys.
25. Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha PS, Pena PS, Vianna-Morgante AM, Pena SD. Simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for detection of microdeletion and microduplication syndromes. *PLoS One.* 2013;8(4):e61328.
26. Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, Garcia-Guereta L, Elorza D, et al. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet.* 2005;68(4):373-8.
27. Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, Fonseca FM, Pieri PC, Jehee FS, et al. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Res Notes.* 2012;5:13.