



ARTIGO ORIGINAL

Genomic imbalances in syndromic congenital heart disease^{☆,☆☆}



Miriam Coelho Molck^a, Milena Simioni^a, Táris Paiva Vieira^a,
Ilária Cristina Sgardoli^a, Fabíola Paoli Monteiro^a, Josiane Souza^b,
Agnes Cristina Fett-Conte^c, Têmis Maria Félix^d, Isabella Lopes Monlléo^e
e Vera Lúcia Gil-da-Silva-Lopes^{a,*}

^a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Departamento de Genética Médica, Campinas, SP, Brasil

^b Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio Palatal (CAIF), Curitiba, PR, Brasil

^c Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Biologia Molecular, São José do Rio Preto, SP, Brasil

^d Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Genética Médica, Porto Alegre, RS, Brasil

^e Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Hospital Universitário, Faculdade de Medicina, Serviço de Genética Clínica, Maceió, AL, Brasil

Recebido em 27 de julho de 2016; aceito em 21 de novembro de 2016

KEYWORDS

DNA copy number variations;
Congenital heart defects;
22q11 deletion syndrome;
Comparative genomic hybridization;
Chromosome aberrations

Abstract

Objective: To identify pathogenic genomic imbalances in patients presenting congenital heart disease (CHD) with extra cardiac anomalies and exclusion of 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2 DS).

Methods: 78 patients negative for the 22q11.2 deletion, previously screened by fluorescence in situ hybridization (FISH) and/or multiplex ligation probe amplification (MLPA) were tested by chromosomal microarray analysis (CMA).

Results: Clinically significant copy number variations (CNVs ≥ 300 kb) were identified in 10% (8/78) of cases. In addition, potentially relevant CNVs were detected in two cases (993 kb duplication in 15q21.1 and 706 kb duplication in 2p22.3). Genes inside the CNV regions found in this study, such as IRX4, BMPR1A, SORBS2, ID2, ROCK2, E2F6, GATA4, SOX7, SEMAD6D, FBN1, and LTPB1 are known to participate in cardiac development and could be candidate genes for CHD.

Conclusion: These data showed that patients presenting CHD with extra cardiac anomalies and exclusion of 22q11.2 DS should be investigated by CMA. The present study emphasizes the possible role of CNVs in CHD.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.11.007>

[☆] Como citar este artigo: Molck MC, Simioni M, Vieira TP, Sgardoli IC, Monteiro FP, Souza J, et al. Genomic imbalances in syndromic congenital heart disease. J Pediatr (Rio J). 2017;93:497–507.

^{☆☆} Estudo realizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Departamento de Genética Médica, Campinas, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: vlopes@fcm.unicamp.br (V.L. Gil-da-Silva-Lopes).

PALAVRAS-CHAVE

Variações do número de cópias de DNA; Cardiopatias congênitas; Síndrome de deleção 22q11; Hibridização genômica comparativa; Aberrações cromossômicas

Desequilíbrios genômicos na cardiopatia congênita síndrômica**Resumo**

Objetivo: Identificar desequilíbrios genômicos patogênicos em pacientes que apresentam cardiopatias congênitas (CC) e anomalias extracardíacas e exclusão da síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2).

Métodos: Foram avaliados por *microarray* cromossômico (CMA) 78 pacientes negativos para a deleção 22q11.2, previamente testados por hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) e/ou amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA).

Resultados: Foram identificadas variações do número de cópias de DNA (CNVs) clinicamente significativas (≥ 300 kb) em 10% (8/78) dos casos, além de CNVs potencialmente relevantes em dois casos (duplicação de 993 kb em 15q21.1 e duplicação de 706 kb em 2p22.3). Genes envolvidos como IRX4, BMPR1A, SORBS2, ID2, ROCK2, E2F6, GATA4, SOX7, SEMAD6D, FBN1 e LTPB1 são conhecidos por atuar no desenvolvimento cardíaco e podem ser genes candidatos a CC.

Conclusão: Esses dados mostram que pacientes que apresentam CC, com anomalias extracardíacas e exclusão da SD22q11.2, devem ser investigados por CMA. Ainda, este estudo enfatiza a possível função das CNVs nas CC.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A cardiopatia congênita (CC) é uma malformação comum que afeta aproximadamente seis de 1.000 nascidos vivos. Ela ocorre isoladamente ou em anomalias congênitas múltiplas, dentre as quais a síndrome de deleção 22q11.2 é a mais comum.¹ A CC é a manifestação mais crítica e principal fator de morbimortalidade na síndrome de deleção 22q11.2 (22q11.2DS), afeta entre 74% e 80% dos pacientes. Dentre diversas CCs relatadas, os defeitos conotruncais e/ou do arco aórtico são os mais prevalentes.² A causa da heterogeneidade fenotípica cardíaca não é conhecida, porém não há provas de correlação com sexo, raça, tamanho da deleção 22q11.2 ou origem parental da deleção.³

Recomenda-se que todos os recém-nascidos ou crianças que apresentem CC e dismorfismo ou outras anomalias congênitas sejam examinadas para deleção 22q11.2.⁴ Além disso, desequilíbrios genômicos de outras regiões cromossômicas, inclusive 10p12-p15, 4q21-q35, 8p21-p23, 17p13 e 18q21, podem ser encontrados em pacientes com suspeita clínica de 22q11.2DS e sem deleção 22q11.2.⁵

Atualmente, a aplicação da análise cromossômica por *microarray* (CMA) no diagnóstico clínico possibilita a identificação de desequilíbrios genômicos submicroscópicos indetectáveis, traz novas informações sobre a gênese dos defeitos congênitos. Investigamos um grupo de indivíduos que apresentam CC com anomalias extracardíacas e exclusão da 22q11.2DS para identificar desequilíbrios genômicos patogênicos.

Pacientes e métodos**Pacientes**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Campinas aprovou este estudo (números 487/2009 e 433/2010). Todos os participantes ou seus responsáveis assinaram o

consentimento informado por escrito. A avaliação incluiu um protocolo padronizado como parte de um estudo multicêntrico do Projeto Crânio-Face Brasil e todos os indivíduos foram consultados por um geneticista.

Inicialmente, 108 pacientes que apresentam CC com anomalias extracardíacas e suspeita clínica de 22q11.2 foram examinados por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e/ou amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA). Apenas 78 pacientes (43 homens e 35 mulheres) sem 22q11.2 foram incluídos no presente estudo.

Dentre as CCs nessa coorte, foi observada tetralogia de Fallot (ToF) em 40%, defeito do septo ventricular (DSV) em 22% e defeito do septo atrial (DAS) em 8% dos casos. Em 9% dos casos foram observados dois desses três defeitos. O restante dos 21% dos casos apresentou outros defeitos cardíacos como *truncus arteriosus* (TA), válvula aórtica bicúspide (VAB) e persistência do canal arterial (PCA), dentre outros.

As principais características clínicas encontradas nesses pacientes, além de CC, foram: dismorfismos faciais – 96% (75/78), alterações neurocognitivas e comportamentais – 65% (51/78), alterações esqueléticas – 58% (45/78), alterações palatinas – 43% (34/78), alterações imunológicas – 41% (32/78), atraso no crescimento e/ou alterações na alimentação – 32% (25/78), anomalias gastrointestinais – 23% (18/78), perda de audição – 10% (8/78), anomalias no trato urinário – 10% (8/78), alterações visuais – 9% (7/78) e alterações neurológicas – 5% (4/78).

Métodos

As análises cromossômicas por *microarray* foram feitas em todos os 78 pacientes. Os pais dos pacientes não foram testados. Para cada amostra, 250 ng de DNA genômico foram marcados e hibridados no chip CytoScan HD (Affymetrix®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os parâmetros de controle de qualidade foram avaliados com o pacote de *software* de sistema de genotipagem

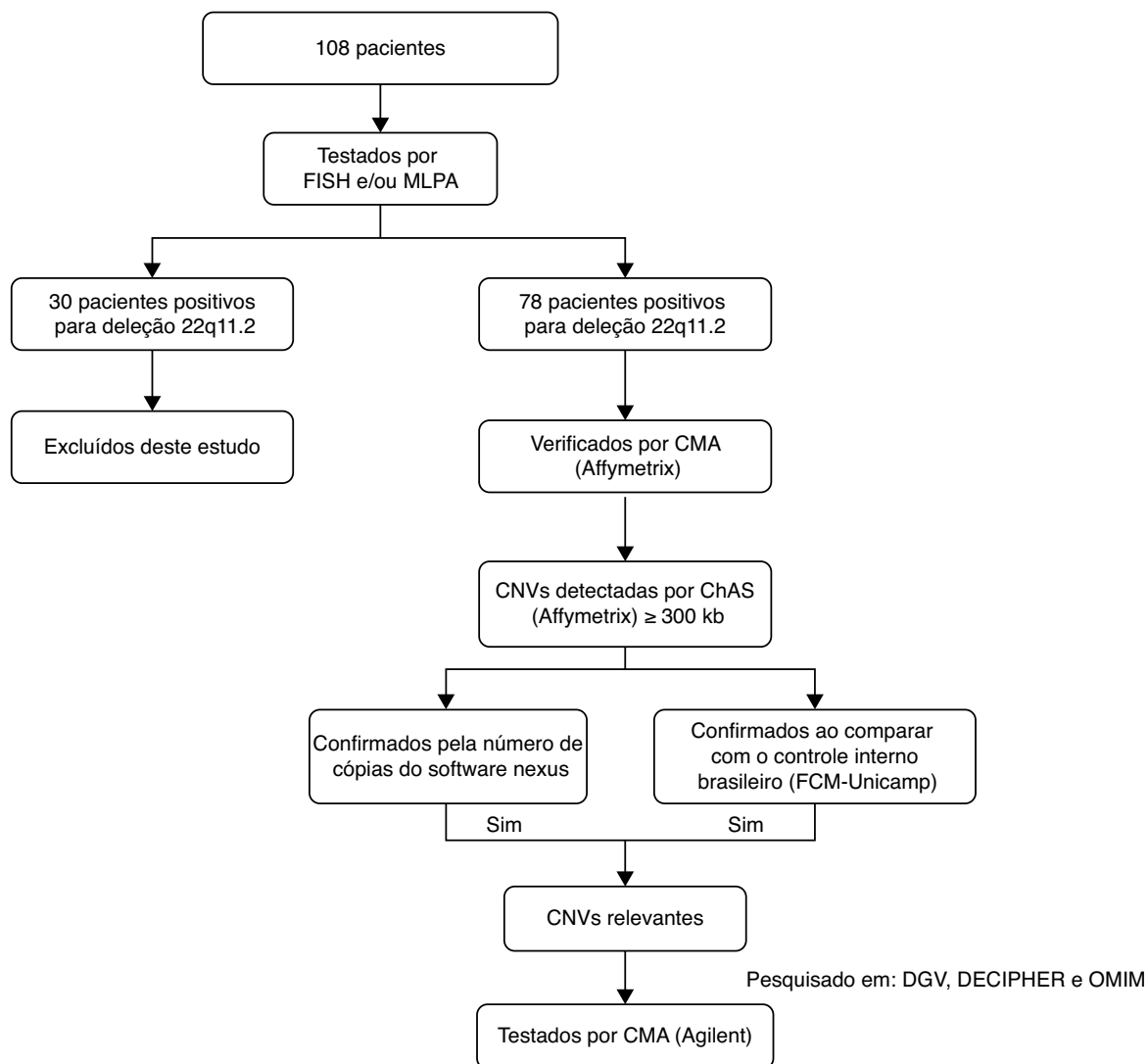


Figura 1 Fluxograma com a população de pacientes e técnicas aplicadas. FISH, fluorescence in situ hybridization; MLPA, multiplex ligation probe amplification; CMA, chromosomal microarray; CNVs, copy number variations; ChAS, chromosome analysis suite; DGV, database of genomic variants; DECIPHER, database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensemble resources; OMIM, Online Mendelian Inheritance In Man.

Affymetrix[®]. Os dados de *array* foram analisados com o *software* de análise cromossômica (ChAS Affymetrix[®]). Foram aplicados filtros de 25 marcadores genéticos para deleção e 50 para duplicações, conforme recomendado pelo fabricante, e também foi aplicado um comprimento mínimo do segmento de 300 kb para duplicações e deleções (definido como amplas variações no número de cópias (CNVs)). Essas CNVs foram confirmadas com o *software* Nexus Copy Number (BioDiscovery[®], EUA). As CNVs foram ainda comparadas com um conjunto de dados de CNVs para controle interno, inclusive 105 controles da população geral brasileira designada com o Cytoscan HD (Affymetrix[®]). Apenas os desequilíbrios genômicos encontrados em todas as abordagens foram selecionados para investigação mais detalhada, com as seguintes bases de dados: *Database of Genomic Variants* (DGV),⁶ *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans* (DECIPHER)⁷ e *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM).⁸ As CNVs consideradas relevantes foram

transferidas para confirmação por outra plataforma de *microarray*. Essa confirmação foi feita para 18 pacientes, com o *microarray* de genoma humano G3 SurePrint 8 × 60K da Agilent (Agilent Technologies[®], EUA). O DNA extraído dos pacientes e os controles de referência (Promega[®], EUA) foram medidos para concentração e pureza com o espectrofotômetro Qubit[®] (Life Technologies[®], EUA). A quantidade de 500 ng de DNA do paciente e um DNA de referência com correspondência sexual foi processada para rotulagem e hibridização de acordo com o protocolo do fabricante (hibridização genômica comparativa (CGH) – *array* de oligonucleotídeos da Agilent para análise do DNA genômico – protocolo de rotulagem enzimática v7.3). Os slides foram digitalizados em um scanner dual-laser G4900DA (Agilent Technologies[®], EUA) e as imagens foram extraídas e analisadas com o *software* de extração de recursos Agilent (v.11.5.1.1). Os dados de *array* foram analisados com o *software* de citogenética (v.3.0.1.1). Um fluxograma com a

população de pacientes estudada encontra-se resumido na [figura 1](#).

Resultados

Foram detectadas 67 CNVs \geq 300 kb, 33 deleções e 34 duplicações. As CNVs com menos de 100% de sobreposição de casos na DECIPHER e as CNVs com mais de quatro ocorrências na DGV (sobreposição de mais de 50%) não foram consideradas potencialmente relevantes.

Dentre as 67 CNVs \geq 300 kb, 25 abrangem genes, 11 deleções e 14 duplicações; 18 CNVs foram confirmadas por outra plataforma de *microarray* e duas foram anteriormente detectadas pelas técnicas de FISH e/ou MLPA ([tabela 1](#)). As síndromes de anomalias congênitas múltiplas já foram relatadas na literatura e envolvem oito dessas CNVs: síndrome de deleção 16p11.2 OMIM 611913 (caso 8), síndrome de deleção 17q12 OMIM 614527 (caso 26), síndrome de deleção 5p OMIM 123450 (caso 29), síndrome de duplicação 3q (caso 40), síndrome de deleção 10q22-q23 OMIM 612242 (caso 71), síndrome de deleção 4q (caso 72), síndrome de deleção 8p23.1 (caso 77) e síndrome de deleção 22q13.33 OMIM 606232 (caso 78). Esses pacientes apresentaram características clínicas que sobrepueram 22q11.2DS ([tabela 2](#)).

Portanto, as CNVs patogênicas foram detectadas em oito dos 78 pacientes (10%), com tamanhos de 611 Kb a 17,4 Mb. Os genes que reconhecidamente participam do desenvolvimento cardíaco e que são candidatos a CC são relatados na [tabela 3](#). Além disso, foram identificadas duas CNVs potencialmente relevantes que abrangem genes cardíacos (duplicação de 993 kb em 15q21.1 e duplicação de 706 kb em 2p22.3).

Discussão

Elucidar a contribuição genética de doenças complexas é difícil devido ao grande número, à baixa frequência e ao efeito variável do local de predisposição. As CNVs genômicas foram estabelecidas como uma importante fonte de variação genética humana inerente a várias síndromes de anomalias congênitas múltiplas, inclusive a 22q11.2DS. Para determinar se a CNV contribui ou não para um fenótipo depende de diversos fatores, inclusive do modo de herança, do conteúdo genético, do número de cópias (perda ou ganho), da plataforma de *array* usada e se ela foi encontrada em grupos de controle da população geral.⁹ Em geral, CNVs mais amplas têm um maior potencial de patogenia, pois é mais possível o envolvimento de um gene sensível à dosagem e/ou que um maior número de genes esteja incluído no desequilíbrio, o que resulta em um fenótipo anormal.¹⁰

A classificação de uma variação no número de cópias CNV não relatada anteriormente, e que não inclui um gene de doença anteriormente conhecida, pode variar entre diferentes populações.¹⁰ Portanto, nossa análise das CNVs foi feita com foco no diagnóstico e de acordo com três abordagens analíticas, pois ainda não há uma base de dados de controle populacional brasileira disponível. Consideramos um tamanho mínimo de 300 kb (definido como CNVs amplas), o número recomendado de marcadores genéticos e apenas CNVs identificadas por todas as três abordagens selecionadas para pesquisa e confirmação.

CNVs patogênicas foram detectadas em oito dos 78 pacientes (10%) e os genes envolvidos, como *IRX4*, *BMPR1A*, *SORBS2*, *ID2*, *ROCK2*, *E2F6*, *GATA4* e *SOX7*, são conhecidos por atuar no desenvolvimento cardíaco e seriam candidatos a CC.¹¹⁻¹⁸

O caso 8 mostrou uma deleção de 611 kb com sobreposição à região crítica da síndrome de deleção 16p11.2. Os pacientes com essa síndrome normalmente apresentam atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, características de transtornos do espectro autista, convulsões (epilepsia) e obesidade,¹⁹ não apresentados por nossos pacientes. Menos frequentemente, foram observados CC, dismorfismos faciais menores e atraso na fala,¹⁹ em concordância com nosso paciente. Nosso paciente apresentou ToF e arco aórtico interrompido. Essa região excluída não aloca genes candidatos a CC, até o momento.

O caso 26 mostrou uma deleção de 1,8 kb com sobreposição à região crítica da síndrome de deleção 17q12. As deleções dessa região, inclusive o gene *HNF1 β* , foram encontradas em pacientes com diabetes tipo MODY 5 (*MODY5*) e em pacientes com doença renal cística, dilatações renais, atrofia pancreática e anormalidades hepáticas,²⁰ não apresentadas por nosso paciente. Recentemente, deficiência intelectual, atraso na fala e dismorfismos faciais foram associados a deleção,²¹ compatível com nosso paciente, porém CC não foi mencionada. Nosso paciente apresentou VAB. Não houve relato de genes candidatos a CC até o momento.

O caso 29 apresentou deleção de 17,4 Mb em 5p15.1-p15.33, abrangeu a síndrome de deleção 5p (síndrome de Cri Du Chat). Os neonatos com essa condição normalmente apresentam grido agudo que soa como o de um gato, microcefalia, baixo peso ao nascer e hipotonia,²² não relatados pelos pais dos pacientes (avaliado por um ano). Os indivíduos afetados também apresentam deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento, características faciais distintivas, inclusive hipertelorismo, orelhas baixas, mandíbula pequena e CC,²² observados em nosso paciente. A baixa resolução do cariótipo anterior [46,XY] prejudicou o diagnóstico desse paciente, que foi aprimorado com hibridação genômica em *arrays* (aGH). Nosso paciente apresenta PCA. A região excluída aloca um gene com fator de transcrição cardíaco, o *IRX4*, nas quais as mutações estavam relacionadas a CC.¹¹

O caso 40 apresentou duplicação de 2 Mb em 3q26.2, não abrangeu a região crítica da síndrome de duplicação 3q (definida como 3q26.31-q27.3). Recentemente, casos com duplicações parciais 3q que envolvem a região de nossa CNV foram relatados e associados a essa síndrome.²³ O fenótipo normalmente envolve CC, anomalias cerebrais, microcefalia e dismorfismos faciais atípicos compatíveis com nosso paciente. Nosso paciente apresentou ToF, DAS, atresia pulmonar e persistência da veia cava superior esquerda. Não houve relato de genes candidatos a CC nessa região duplicada até o momento.

O caso 71 mostrou uma deleção de 7,8 Mb em 10q22.3-q23.2 e essa região foi recentemente associada a uma nova síndrome caracterizada por comprometimento comportamental e do desenvolvimento neurológico, inclusive atraso cognitivo, autismo, hiperatividade e doença psiquiátrica.²⁴ Nosso paciente apresentou apenas atraso no desenvolvimento. Além disso, dismorfismos faciais leves e CC foram observados de forma menos frequente na síndrome de

Tabela 1 Tipo de CC e CNVs \geq 300 kb observado na coorte

ID	Tipo de CC	CNV	Local	Número de cópias	Início (bp)	Final (bp)	Tamanho (kb)	Genes RefSeq	DGV	DECIPHER	Validado por aCGH
2	DAS	del	12p12.1-p12.2	1	20.994.908	21.415.634	421	<i>SLCO1B3, SLCO1B7, SLCO1B1</i>	+	+	Sim
3	DAS	dup	15q22.2	3	62.209.640	62.543.660	334	<i>VPS13 C, C2CD4A, C2CD4B</i>	-	+	NR
8	ToF, AAI	del	16p11.2	1	29.567.295	30.177.916	611	<i>SLC7A5P1, SPN, QPRT, ZG16, KIF22, MAZ, PRRT2, MVP, CDIPT, SEZ6L2, ASPHD1, KCTD13, TMEM219, TAOK2, HIRIP3, INO80E, DOC2A, FAM57B, ALDOA, PPP4 C, TBX6, YPEL3, GDDP3, MAPK3</i>	+	+	Sim
13	TA	dup	8p11.1-p11.21	3	42.935.729	43.776.564	841	<i>FNTA, SGK196, HGSNAT, POTEA</i>	+	+	Sim
14	DSV, DAS, AP	del	10q25.1	1	110.420.129	111.116.531	696	<i>RNU6-53, MAPKAPK5P1-001</i>	-	+	Sim
19	DSV	dup	Yp11.2	2	9.664.007	9.997.425	333	<i>TTY23, TTY23B</i>	-	+	NR
20	DAS, PDA, AP	dup	2q13	3	110.504.318	111.365.996	862	<i>RGPD5, RGPD6, LIMS3, LIMS3L, LIMS3-LOC440895, LOC440895, LOC100288570, LOC440894, MIR4267, MALL, MIR4436B2, MIR4436B1, NPHP1, LINCO0116, LOC100507334, LOC151009</i>	-	+	Sim
21	DAS	dup	7q21.13	3	88.819.024	89.678.695	860	<i>ZNF804B</i>	+	+	Sim
24	DAS, TA, AP	del	16p11.1-p11.2	1	34.197.616	35.158.405	961	<i>UBE2MP1, LOC283914, LOC146481, LOC100130700, RN5S411, FLJ26245</i>	-	-	Sim
26	VAB	del	17q12	1	34.477.385	36.283.612	1.806	<i>TBC1D3B, CCL3L3, CCL3L1, CCL4L2, CCL4L1, TBC1D3 C, TBC1D3H, TBC1D3G, ZNHIT3, MYO19, PIGW, GGNBP2, DHRS11, MRM1, LHX1, AATF, MIR2909, ACACA, C17orf78, TADA2A, DUSP14, SYNRG, DDX52, HNF1B, LOC284100</i>	-	+	Sim
29	PCA	del	5p15.1-p15.33	1	113.576	17.511.896	17.398	<i>PLEKHG4B, LRRC14B, CCDC127, SDHA, PDCD6, AHRR, C5orf55, EXOC3, PP7080, SLC9A3, MIR4456, CEP72, TPPP, ZDHHC11, BRD9, TRIP13, LOC100506688, NKD2, SLC12A7, MIR4635, SLC6A19, SLC6A18, TERT, MIR4457, CLPTM1L, SLC6A3, LPCAT1, SDHAP3, LOC728613, MIR4277, MRPL36, NDUFS6, IRX4, IRX2, C5orf38, LOC285577, IRX1, LOC340094, ADAMTS16, KIAA0947, FLJ33360, MED10, UBE2QL1, LOC255167, NSUN2, SRD5A1, PAPD7, MIR4278, MIR4454, LOC442132, ADCY2, C5orf49, FASTKD3, MTRR, LOC729506, LOC100505738, MIR4458, SEMA5A, MIR4636, LOC100505806, SNORD123, TAS2R1, LOC285692, FAM173B, CCT5, CMBL, MARCH6, ROPN1L, ANKRD33B, DAP, CTNND2, TAG, DNAH5, TRIO, FAM105A, FAM105B, ANKH, LOC100130744, MIR4637, FBXL7, MARCH11, ZNF622, FAM134B, MYO10, LOC285696, BASP1, LOC401177</i>	-	+	NR

Tabela 1 (Continuação)

ID	Tipo de CC	CNV	Local	Número de cópias	Início (bp)	Final (bp)	Tamanho (kb)	Genes RefSeq	DGV	DECIPHER	Validado por aCGH
30	DAS	dup	5q33.2	3	154.330.014	154.664.212	334	<i>MRPL22, KIF4B</i>	-	-	NR
35	ToF, AP, PLSVC	dup	15q21.1	3	48.023.616	49.017.024	993	<i>SEMA6D, SLC24A5, MYEF2, CTXN2, SLC12A1, DUT, FBN1</i>	-	+	Sim
40	ToF, AP, DAS, PVCSE	dup	3q26.2	3	168.485.398	170.468.489	1.983	<i>EGFEM1P, MECOM, TERC, ACTRT3, MYNN, LRRC34, LRRIQ4, LRRC31, SAMD7, LOC100128164, SEC62, GPR160, PHC3, PRKCI, SKIL, CLDN11, SLC7A14</i>	-	+	Sim
52	ToF, AP, DAS	dup	2p22.3	3	32.628.617	33.334.307	706	<i>BIRC6, MIR558, TTC27, MIR4765, LINC00486, LOC100271832, LTBP1</i>	+	+	Sim
58	ToF, AP	dup	6q14.3	3	87.387.316	87.921.049	534	<i>HTR1E, CGA, ZNF292</i>	-	+	Sim
59	ToF, AP, MVP	dup	16q23.1	3	77.923.068	78.596.237	673	<i>VAT1L, CLEC3A, WWOX</i>	-	+	Sim
63	ToF, AP	dup	3p26.3	3	1.750.535	2.205.306	455	<i>CNTN4, CNTN4-AS2</i>	+	+	Sim
67	ToF	dup	3p26.3	3	1.775.844	2.158.248	382	<i>CNTN4, CNTN4-AS2</i>	+	+	Não
71	ToF	del	10q22.3-q23.2	1	81.446.577	89.253.430	7.807	<i>LOC650623, LOC642361, LOC100288974, MBL1P, SFTPD, LOC219347, C10orf57, PLAC9, ANXA11, LOC439990, MAT1A, DYDC1, DYDC2, FAM213A, TSPAN14, SH2D4B, NRG3, GHITM, C10orf99, CDHR1, LRIT2, LRIT1, RGR, LOC170425, FAM190B, GRID1-AS1, GRID1, MIR346, WAPAL, OPN4, LDB3, BMPR1A, MMRN2, SNCG, C10orf116, AGAP11, FAM25A, GLUD1, FAM35A, FAM22A, LOC728190, LOC439994, FAM22D, LOC728218</i>	-	+	Sim
72	DAS, AP, ASD, TGA	dup	2p24.3-p25.3	3	12.770	14.851.012	14.838	<i>FAM110C, SH3YL1, ACP1, FAM150B, TMEM18, LOC339822, SNTG2, TPO, PXDN, MYT1L, LOC730811, TSSC1, TRAPPC12, ADI1, RNASEH1, LOC100506054, RPS7, COLEC11, ALLC, LOC100505964, LOC727982, SOX11, LOC150622, LOC400940, LINC00487, CMPK2, RSAD2, LOC386597, RNF144A, LOC100506274, LOC339788, LINC00299, ID2, KIDINS220, MBOAT2, ASAP2, ITGB1BP1, CPSF3, IAH1, ADAM17, YWHAQ, TAF1B, GRHL1, KLF11, CYS1, RRM2, C2orf48, MIR4261, HPCAL1, ODC1, SNORA80B, NOL10, ATP6V1C2, PDIA6, KCNF1, FLJ33534, C2orf50, PQLC3, ROCK2, LINC00570, E2F6, GREB1, MIR4429, NTSR2, LPIN1, MIR4262, TRIB2, MIR3125, LOC100506474, FAM84A</i>	-	+	Sim

Tabela 1 (Continuação)

ID	Tipo de CC	CNV	Local	Número de cópias	Início (bp)	Final (bp)	Tamanho (kb)	Genes RefSeq	DGV	DECIPHER	Validado por aCGH
77	DSV, AP, DAS, PVCSE	del	4q35.1-q35.2	1	186.464.011	190.957.473	4.493	<i>SORBS2, TLR3, FAM149A, FLJ38576, CYP4V2, KLKB1, F11, LOC285441, MTNR1A, FAT1, LOC339975, ZFP42, TRIML2, TRIML1, LOC401164, HSP90AA4P, FRG1, LOC100288255, FRG2</i>	-	+	Sim
		del	16p12.2	1	21.576.802	21.951.415	375	<i>METTL9, IGSF6, OTOA, RRN3P1</i>	+	+	Sim
		del	8p23.1	1	8.093.065	11.935.465	3.842	<i>FLJ10661, SGK223, CLDN23, MFHAS1, ERI1, MIR4660, PPP1R3B, LOC157273, TNKS, MIR597, LINC00599, MIR124-1, MSRA, PRSS55, RP1L1, C8orf74, SOX7, PINX1, MIR1322, XKR6, MIR598, MTMR9, SLC35G5, TDH, C8orf12, FAM167A, BLK, LINC00208, GATA4, NEIL2, FDFT1, CTSB, DEFB136, DEFB135, DEFB134, LOC100133267, DEFB130</i>	-	+	VA
78	VAB, EA, SV	del	22q13.33	1	50.100.435	51.197.838	1.097	<i>BRD1, LOC90834, ZBED4, ALG12, CRELD2, PIM3, IL17REL, MLC1, MOV10L1, PANX2, TRABD, SELO, TUBGCP6, HDAC10, MAPK12, MAPK11, PLXNB2, FAM116B, PPP6R2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2, NCAPH2, SCO2, TYMP, ODF3B, KLHDC7B, SYCE3, CPT1B, CHKB-CPT1B, CHKB, LOC100144603, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, ACR, RPL23AP82</i>	-	+	VA

-, ausência; +, presença; AAI, arco aórtico interrompido; aCGH, hibridização genômica comparativa em *array* (com o microarray de Genoma Humano G3 SurePrint 8 × 60 K da Agilent); AP, atresia pulmonar; bp, pares de base; CC, cardiopatia congênita; CNV, variação no número de cópias; DAS, defeito do septo atrial; DECIPHER, *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*⁷; del, exclusão; DGV, Database of Genomic Variants;⁶ DSV, defeito do septo ventricular; dup, duplicação; EA, ectasia da aorta; ID, identificação do paciente; kb, kilobase; NR, não realizado; PCA, persistência do canal arterial; PVCSE, persistência da veia cava superior esquerda; PVM, prolapso da válvula mitral; SV, seio de valsalva; TA, *truncus arteriosus*; TGA, transposição das grandes artérias; ToF, tetralogia de Fallot; VA, validado anteriormente (detectado pelas técnicas de FISH e/ou MLPA); VAB, válvula aórtica bicúspide.

Tabela 2 Características clínicas dos pacientes que apresentam CNVs relacionadas a síndromes com anomalias congênicas múltiplas que com sobreposição da 22q11.2DS

	Caso 08	Caso 26	Caso 29	Caso 40	Caso 71	Caso 72	Caso 77	Caso 78	22q11.2DS ^a
Desequilíbrio genômico	del 16p11.2	del 17q12	del 5p15.1-p15.33	dup 3q26.2	del 10q22.3-q23.2	del 4q35.1-q35.2	del 8p23.1	del 22q13.33	del 22q11.2
Tamanho da aberração	611 Kb	1,8 Mb	17,4 Mb	2,0 Mb	7,8 Mb	4,5 Mb	3,8 Mb	1,1 Mb	1,5-3,0 Mb
Sexo	masculino	masculino	masculino	feminino	masculino	feminino	feminino	masculino	Distribuída igualmente
Idade na avaliação	7 y	11 y	1 y	2 y	3 y	39 y	5 y	10 y	56% ≤5 a
Atraso no crescimento	+	-	+	-	-	-	-	-	NR
Cardiopatía congênita	+	+	+	+	+	+	+	+	74%
Anomalias palatais	+	+	+	+	-	-	+	-	69%
Dismorfismos faciais	+	+	+	+	+	+	+	+	Comum
Anomalias imunológicas	+	-	-	-	+	-	+	+	Comum
Atraso no desenvolvimento	-	+	+	-	+	+	+	+	70-90%
Problemas na alimentação	-	-	-	-	-	-	-	+	30%
Perda auditiva	+	+	-	-	-	-	-	-	39%
Anomalias oculares	-	-	-	-	-	-	-	-	≥69%
Anomalias neurológicas	-	-	-	-	-	-	-	-	NR
Anomalias no trato urinário	-	-	+	-	-	-	-	-	37%
Anomalias gastrointestinais	+	-	+	-	-	-	+	-	NR
Anomalias esqueléticas	-	-	-	+	+	+	+	+	NR

-, ausência; +, presença; 22q11.2DS, síndrome de deleção 22q11.2; a, anos; del, deleção; dip, duplicação; Kb, kilobase; Mb, megabase; NR, não relatado,

^a McDonald-McGinn et al.².

Tabela 3 Genes candidatos a CC envolvidos nas CNVs clinicamente significativas detectadas

IRX4	606199	Ligação específica ao DNA	Estabelecimento de orientação de órgãos; <i>desenvolvimento do coração</i> ; regulação da transcrição; modelo do DNA
<i>BMPR1A</i>	601299	Receptor de BMP, fator de transcrição RNA-polimerase II, homodimerização de proteínas e atividade de proteína serina/treonina quinase; ATP, SMAD, glicoproteína, ligação de íons metálicos e proteínas	<i>Via de sinalização BMP; desenvolvimento do sistema de condução do coração; ventrículo direito cardíaco, aorta dorsal e morfogênese da válvula mitral; formação do coração</i>
<i>SORBS2</i>	616349	Atividade do adaptador citoesquelético, íon metálico, RNA poli (A) e ligação da proteína; componente estrutural do citoesqueleto; componente estrutural do músculo	Organização dos filamentos de actina; processo biológico; adesão celular; <i>crescimento celular envolvido no desenvolvimento celular do músculo cardíaco</i> ; migração celular
<i>ID2</i>	600386	ATP, proteína Rho GTPase, íon metálico, RNA poli(A) e ligação da proteína; atividade de dimerização proteica	<i>morfogênese do septo membranoso</i> ; desenvolvimento metanérico; desenvolvimento do organismos multicelulares; diferenciação celular das células <i>natural killer</i>
<i>ROCK2</i>	604002	Proteína serina dependente de Rho, proteína serina/treonina quinase e atividade molecular estrutural	duplicação dos centrossomas; organização do citoesqueleto de actina cortical; via de sinalização do receptor de efrina; <i>regulação negativa da angiogênese</i>
<i>E2F6</i>	602944	DNA, proteína e atividade do fator de transcrição, ligação específica ao DNA, atividade do correpressor de transcrição	Regulação negativa da transcrição do fator promotor de RNA-polimerase II; regulação da transcrição envolvida na transição G1/S do ciclo celular mitótico; transcrição, modelo do DNA
<i>GATA4</i>	600576	DNA, proteína NFAT, fator de transcrição do RNA-polimerase II, fato de transcrição de ativação, cromatina, co-SMAD, potenciador da ligação específica ao DNA e ligação específica ao DNA; atividade de coativação da transcrição; ligação de íons de zinco	formação da estrutura anatômica envolvida na morfogênese; <i>septo atrial, morfogênese do ventrículo cardíaco</i> ; desenvolvimento celular; <i>crescimento celular envolvido no desenvolvimento celular do músculo cardíaco</i> ; <i>especificação do padrão anterior/posterior do tubo embrionário do coração</i> ; desenvolvimento do <i>coxim endocárdico</i> ; <i>looping cardíaco</i>
<i>SOX7</i>	612202	Proteína, atividade do fator de transcrição, ligação específica ao DNA e ligação ao DNA à região reguladora da transcrição	formação da endoderme; regulação negativa de proliferação celular; regulação negativa da transcrição, modelo do DNA; regulação positiva da atividade da cisteína endopeptidase envolvida no processo apoptótico; regulação da via de sinalização canônica Wnt; transcrição, modelo do DNA

OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*.⁸

deleção 10q22-q23,²⁵ ambos apresentados por nosso paciente. Nosso paciente apresentou ToF. Essa região excluída abrange o gene *BMPR1A*, sugere um gene candidato a CC devido a seu papel no desenvolvimento embrionário e na formação do coração.¹²

O caso 72 apresentou deleção de 4,5 Mb em 4q35.1-q35.2. As deleções em 4q são raras e associadas a deficiência intelectual, dismorfismos craniofaciais, orelhas baixas, fissura palatina, CC e anomalias do quinto dedo.²⁶ Nosso paciente apresentou a maior parte dessas características, exceto orelhas baixas e fissura palatina. Além disso, esse paciente mostrou uma duplicação de 14,8 Mb em 2p24.3-p25.3 e duplicação de 375 bK em 16p12.2, ambas CNVs sem

um fenótipo específico descrito até o momento. Nosso paciente apresentou DSV, DAS, atresia pulmonar e transposição das grandes artérias. A região excluída 4q35.1-q35.2 aloca o gene *SORBS2*, que é altamente expresso em discos intercalares de tecidos normais do coração.¹³ A região duplicada de +2p24.3-p25s abrange os genes *ID2*, *ROCK2* e *E2F6*, que atuam no desenvolvimento do coração e são genes candidatos a CC.¹⁴⁻¹⁶

O caso 77 mostrou uma deleção de 3,8 kb que abrangeu a região crítica da síndrome de deleção 8p23.1; a CC é a marca registrada dessa síndrome, principalmente defeitos do septo atrioventricular, defeito do septo atrial e estenose pulmonar,⁵ compatível com os achados de nosso paciente.

Além disso, foi observado que microcefalia, dismorfismos faciais, atraso no desenvolvimento e problemas comportamentais estão associados a essa síndrome.⁵ Nosso paciente apresentou DSV, DAS, atresia pulmonar e persistência da veia cava superior esquerda. Essa região excluída abrange os genes *GATA4* e *SOX7*, ambos fatores de transcrição que atuam na embriogênese cardíaca. Eles foram sugeridos como os genes candidatos a CC, com base em modelos animais, mutações relatadas por pacientes e estudos sobre CNVs.^{17,18}

O caso 78 apresentou uma deleção de 1,1 Mb que abrangeu a região crítica da síndrome de deleção 22q13.33 (síndrome de Phelan-McDermid), caracterizada por atraso no desenvolvimento, retardo ou ausência de fala e características autistas.²⁷ Nosso paciente apresenta atraso no desenvolvimento e na fala. Além disso, e de forma menos frequente, foram observados dismorfismos faciais, infecções recorrentes, CC e dificuldade na alimentação,²⁸ compatível com nosso paciente. Nosso paciente apresentou VAB, ectasia da aorta e seio de valsalva. Essa região excluída não aloca genes candidatos a CC até o momento.

Os estudos sobre CNVs em pacientes com fenótipos semelhantes de doenças bem conhecidas podem contribuir para um melhor conhecimento dos fenótipos e para a identificação dos genes e das vias envolvidas em CCs específicas e outras alterações.²⁹ As CNVs detectadas neste estudo anteriormente descritas em síndromes clinicamente reconhecíveis podem ajudar no manejo clínico e proporcionar aconselhamento genético adequado para esses pacientes e suas famílias. Esses achados também reforçam a importância da CMA para o diagnóstico. Além disso, duas CNVs detectadas aqui possivelmente estão relacionadas a CC.

O caso 35 apresentou duplicação em 15q21.1 (993 kb), inclusive sete genes, dois dos quais podem ser realçados. O gene *SEMA6D* atua na morfogênese do coração;³⁰ e o gene *FBN1* atua no desenvolvimento do coração e as mutações nesse gene são associadas a CC.³¹ Essa CNV é descrita em quatro indivíduos na DECIPHER (286150, 250179, 260222, 278520), que apresentam somente essa variação; contudo, nenhum deles apresentou CC. Essa CNV não foi detectada na DGV. Nosso paciente apresentou ToF, atresia pulmonar e persistência da veia cava superior esquerda.

O caso 52 apresentou duplicação em 2p22.3 (706 kb), inclusive sete genes como *LTPB1*, que é o maior regulador do gene *TGFB1* e atua no desenvolvimento da válvula do coração.³² Essa CNV foi encontrada em dois indivíduos na DECIPHER (249550, 249780), que apresentaram apenas essa variação; contudo, sem CC. Essa CNV foi descrita em quatro estudos na DGV (Variação.8367, Variação.53694, Variação.5203, Variação.5202). Nosso paciente apresentou ToF, atresia pulmonar e DAS.

CNVs clinicamente significativas foram identificadas em 10% dos casos. Isso reforça que a CMA é uma tecnologia confiável para pacientes que apresentam CC com anomalias extracardíacas e exclusão de 22q11.2DS. Há uma sobreposição entre as manifestações clínicas de várias síndromes listadas aqui, apesar de abranger características distintas. O mesmo aplica-se ao fenótipo de nossos indivíduos. Isso reforça os mecanismos complexos envolvidos na embriogênese humana, que implica a correta interação entre os genes. Como vários mecanismos de interação entre os genes não foram completamente elucidados, nosso estudo enfatiza a possível atuação das CNVs na CC.

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) (2008/10596-0, 2008/50421-4, 2009/08756-1 e 2011/23794-7) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (149600/2010-0 e 471422/2011-8). VLGSL conta com o apoio de CNPq 304455/2012-1.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Aos pacientes e seus pais pela cooperação e aos colegas Priscilla Bernardi, Ana Carolina Xavier, Gabriela Ferraz e Chong Ae Kim, que enviaram amostras. A Ana Paula dos Santos e Benilton de Sá Carvalho, pelo apoio na técnica e na análise. Ao Laboratório de Microarray do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e ao Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp. E aos professores Íscia Lopes-Cendes e Fabio Rossi Torres pela colaboração com amostras em nosso grupo de controle.

Referências

1. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res*. 2013;112:707–20.
2. McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, et al. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns*. 1999;10:11–24.
3. Mlynarski EE, Sheridan MB, Xie M, Guo T, Racedo SE, McDonald-McGinn DM, et al. Copy-number variation of the glucose transporter gene *SLC2A3* and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Hum Genet*. 2015;96:753–64.
4. Ziolkowska L, Kawalec W, Turska-Kmiec A, Krajewska-Walasek M, Brzezinska-Rajszyz G, Daszkowska J, et al. Chromosome 22q11.2 microdeletion in children with conotruncal heart defects: frequency, associated cardiovascular anomalies, and outcome following cardiac surgery. *Eur J Pediatr*. 2008;167:1135–40.
5. Molck MC, Monteiro FP, Simioni M, Gil-da-Silva-Lopes VL. 8p23.1 Interstitial deletion in a patient with congenital cardiopathy, neurobehavioral disorders, and minor signs suggesting 22q11.2 deletion syndrome. *J Dev Behav Pediatr*. 2015;36:544–8.
6. Database of Genomic Variants (DGV). [cited Jun 2016]. Available from: <http://projects.tcag.ca/variation>. in press.
7. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (Decipher). [cited Jun 2016]. Available from: <http://decipher.sanger.ac.uk>
8. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). [cited Jun 2016]. Available from: <https://omim.org/>
9. Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics*. 2009;93:22–6.
10. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, et al. An evidence-based approach to establish the functional

- and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med.* 2011;13:777–84.
11. Cheng Z, Wang J, Su D, Pan H, Huang G, Li X, et al. Two novel mutations of the *IRX4* gene in patients with congenital heart disease. *Hum Genet.* 2011;130:657–62.
 12. Breckpot J, Tranchevent LC, Thienpont B, Bauters M, Troost E, Gewillig M, et al. *BMPR1A* is a candidate gene for congenital heart defects associated with the recurrent 10q22q23 deletion syndrome. *Eur J Med Genet.* 2012;55:12–6.
 13. Kakimoto Y, Ito S, Abiru H, Kotani H, Ozeki M, Tamaki K, et al. Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 is released from infarcted heart in the very early phase: proteomic analysis of cardiac tissues from patients. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000565.
 14. Jongbloed MR, Vicente-Steijn R, Douglas YL, Wisse LJ, Mori K, Yokota Y, et al. Expression of *Id2* in the second heart field and cardiac defects in *Id2* knock-out mice. *Dev Dyn.* 2011;240:2561–77.
 15. Aksoy M, Uygun H, Baspinar O, Demiryurek S, Oztuzcu S, Cengiz B, et al. Is there any association between childhood cardiac septal defects and *ROCK2* gene polymorphism? *Genet Mol Res.* 2014;13:1949–54.
 16. Movassagh M, Bicknell KA, Brooks G. Characterisation and regulation of *E2F-6* and *E2F-6b* in the rat heart: a potential target for myocardial regeneration? *J Pharm Pharmacol.* 2006;58:73–82.
 17. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Oka T, Sargent MA, York A, et al. Cardiomyocyte *GATA4* functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest.* 2007;117:3198–210.
 18. Takash W, Cañizares J, Bonneaud N, Poulat F, Mattéi MG, Jay P, et al. *SOX7* transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:4274–83.
 19. Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, Franssen van de Putte DE, Anderlid BM, et al. Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet.* 2009;52:77–87.
 20. Nagamani SC, Erez A, Shen J, Li C, Roeder E, Cox S, et al. Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12. *Eur J Hum Genet.* 2010;18:278–84.
 21. Palumbo P, Antona V, Palumbo O, Piccione M, Nardello R, Fontana A, et al. Variable phenotype in 17q12 microdeletions: clinical and molecular characterization of a new case. *Gene.* 2014;538:373–8.
 22. Mainardi PC, Pastore G, Castronovo C, Godi M, Guala A, Tamiazzo S, et al. The natural history of cri du chat syndrome. A report from the Italian Register. *Eur J Med Genet.* 2006;49:363–83.
 23. Rodríguez L, Bhatt SS, García-Castro M, Plasencia A, Fernández-Toral J, Abarca E, et al. A unique case of a discontinuous duplication 3q26.1-3q28 resulting from a segregation error of a maternal complex chromosomal rearrangement involving an insertion and an inversion. *Gene.* 2014;535:165–9.
 24. Balciuniene J, Feng N, Iyadurai K, Hirsch B, Charnas L, Bill BR, et al. Recurrent 10q22-q23 deletions: a genomic disorder on 10q associated with cognitive and behavioral abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2007;80:938–47.
 25. Alliman S, Coppinger J, Marcadier J, Thiese H, Brock P, Shafer S, et al. Clinical and molecular characterization of individuals with recurrent genomic disorder at 10q22.3q23.2. *Clin Genet.* 2010;78:162–8.
 26. Strehle EM, Gruszfeld D, Schenk D, Mehta SG, Simonic I, Huang T. The spectrum of 4q- syndrome illustrated by a case series. *Gene.* 2012;506:387–91.
 27. Dhar SU, del Gaudio D, German JR, Peters SU, Ou Z, Bader PI, et al. 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:573–81.
 28. Sarasua SM, Boccutto L, Sharp JL, Dwivedi A, Chen CF, Rollins JD, et al. Clinical and genomic evaluation of 201 patients with Phelan-McDermid syndrome. *Hum Genet.* 2014;133:847–59.
 29. Busse T, Graham JM Jr, Feldman G, Perin J, Catherwood A, Knowlton R, et al. High-resolution genomic arrays identify CNVs that phenocopy the chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mutat.* 2011;32:91–7.
 30. Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, et al. Dual roles of *Sema6D* in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, *Plexin-A1*, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 2004;18:435–47.
 31. Pepe G, Nistri S, Giusti B, Sticchi E, Attanasio M, Porciani C, et al. Identification of *fibrillin 1* gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Med Genet.* 2014;15:23.
 32. Todorovic V, Finnegan E, Freyer L, Zilberberg L, Ota M, Rifkin DB. Long form of latent TGF- β binding protein 1 (*Ltbp1L*) regulates cardiac valve development. *Dev Dyn.* 2011;240:176–87.