

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO CITOGENÔMICA EM INDIVÍDUOS COM CARDIOPATIAS  
CONGÊNITAS CONOTRUNCALIS**

**Káren Regina Silva de Souza**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Mariluce Riegel

Porto Alegre  
Março de 2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e teve como fontes financiadoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/476783/2013-5) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/Edital PQG 001/2013).

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Mariluce Riegel, sem sua paciência, profissionalismo e companheirismo este trabalho não teria sido possível. Agradeço por sua orientação e compreensão durante todas as etapas deste estudo.

Agradeço a meus pais, José Nilton e Hilda Regina, por seu apoio em todas as etapas da minha vida e por sempre acreditarem em mim e me proporcionarem a possibilidade de escolher o caminho que eu gostaria de trilhar.

Agradeço a meu marido André, por sua paciência e amor infinito.

Agradeço a minhas irmãs Carla e Helena por serem companheiras de todas as horas.

Agradeço a equipe dos Laboratórios de Citogenética do Serviço de Genética Médica e de Citogenética Molecular por fazerem parte da minha rotina tornando todos os dias de trabalho mais agradáveis.

A Dra. Janaina Huber, cardiologista do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária, pelo trabalho em colaboração.

Finalmente, agradeço a meu filho Bernardo por me tornar uma pessoa realizada e ensinar o que é amor incondicional.

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	2
<b>RESUMO</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>Capítulo 1- INTRODUÇÃO</b> .....	6
1.1 Malformações e defeitos cardíacos congênitos.....	7
1.2.Variantes estruturais e doenças genômicas.....	13
1.3 Variantes genômicas estruturais e cardiopatias congênitas .....	15
1.4 Citogenômica aplicada a pesquisa e ao diagnóstico.....	18
1.4.1 Análise citogenômica comparativa por <i>arrays</i> .....	19
1.5 Variação do número de cópias genômicas em humanos.....	21
1.6 Interpretação da variação do número de cópias identificadas por <i>arrays</i> .....	22
<b>Capítulo 2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	25
2.1. Justificativa.....	26
2.2. Objetivo Geral.....	27
2.3.Objetivos específicos.....	27
<b>Capítulo 3- <i>Cytogenomic Evaluation of Subjects with Syndromic and Non-syndromic Conotruncal Heart Defects</i></b> .....	28
<b>Capítulo 4 – RESULTADOS ADICIONAIS</b> .....	56
4.1 Caracterização citogenômica dos desequilíbrios genômicos identificados por array-CGH.....	62
<b>Capítulo 5 – DISCUSSÃO</b> .....	68
<b>Capítulo 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	90
Anexo 1 – Formulário de registro clínico relacionado às amostras de biorrepositório de pacientes com cardiopatia congênita.....	91
Anexo 2 - Termo de Compromisso para Uso de Dados e Material Biológico.....	94
Anexo 3 – Resumo das informações clínicas associadas às 60 amostras do estudo.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AC – Anomalia congênita  
ACM – Anomalias Congênicas Múltiplas  
AP – Atresia pulmonar  
array-CGH – Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos  
BACs – Cromossomos artificiais de bactéria  
CCs – Cardiopatias congênicas  
CGH – Hibridização Genômica Comparativa  
CIA – Comunicação interatrial  
CID – Classificação Internacional de doenças  
CIV – Comunicação interventricular  
CNPs – Polimorfismo do número de cópias  
CNVs – Variação do número de cópias gênicas  
del – Deleção  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DNV – Declaração de Nascido Vivo  
DSAV total – Defeito do septo atrioventricular total  
dup – Duplicação  
EP – Estenose Pulmonar  
FISH – Hibridização *in situ* por Fluorescência  
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
IAAo – Interrupção do Arco Aórtico  
kb – Quilobase  
LCR – Baixo número de cópias  
Mb – Megabase  
MFC – Malformações congênicas  
MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*  
NAHR – Recombinação homóloga não alélica  
NHEJ – Junção de extremidades não homólogas  
p – braço curto  
q – braço longo  
pb – Pares de base

RM – Retardo Mental  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PMDC – Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos  
RN – Recém-nascido  
SIM – Sistema de Informação sobre Mortalidade  
SINASC - Sistema de Informações de Nascidos Vivos  
SKY – Carótipo espectral  
SNP – Polimorfismo de base única  
SZ – Esquizofrenia  
TEA – Transtorno do Espectro Autista  
TOF – Tetralogia de Fallot  
TGV – Transposição de grandes vasos  
VOUS – Variante de significado incerto  
YACs – Cromossomos artificiais de levedura

## RESUMO

As cardiopatias congênitas (CCs) são o grupo mais comum de defeitos congênitos graves, afetando 4 a 12 em cada 1.000 nascimentos, sendo uma importante causa de defeitos congênitos associados à mortalidade infantil. Vias biológicas moleculares e celulares complexas estão envolvidas no desenvolvimento do coração, e pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes das CCs. Os defeitos conotrunciais, malformações com significativa morbidade, representam cerca de 20% de todos os casos de CCs. Apesar dos avanços no tratamento médico e cirúrgico, a etiologia das CCs ainda não é totalmente compreendida. Com mais crianças com CC sobrevivendo até a idade adulta e começando a formar famílias, torna-se ainda mais crítico a compreensão das bases genéticas das CCs. Estudos clássicos indicaram que a origem da CC é multifatorial, devido tanto à predisposição genética quanto às influências ambientais. Os desequilíbrios genômicos que levam à variação do número de cópias parecem ter uma influência muito maior sobre o desenvolvimento de vários tipos de CCs do que previsto anteriormente. Neste trabalho, utilizamos hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (array-CGH) para estudar retrospectivamente 60 indivíduos com defeitos conotrunciais e identificar desequilíbrios genômicos. As variações no número de cópias de DNA (CNVs) detectadas foram comparadas com dados de bancos de dados genômicos, e seu significado clínico foi avaliado. Detectamos em 38,3% (23/60) dos casos de CCs desequilíbrios genômicos. Em 8,3% (5/60) destes casos, os desequilíbrios foram causais; em 8,3% (5/60), CNVs de significado desconhecido foram identificadas; e, em 21,6% (13/60), foram detectadas variantes comuns. Concluimos que, a interpretação dos resultados deve ser refinada, e embora ainda não exista um consenso a respeito dos tipos de CCs que devem ser avaliados por uma análise citogenômica, a identificação da variação do número de cópias em indivíduos com cardiopatias congênitas conotrunciais pode, potencialmente, ajudar na avaliação e manejo desta condição. O uso prospectivo ou retrospectivo do array-CGH como uma ferramenta diagnóstica beneficiaria as famílias afetadas ao fornecer um diagnóstico mais preciso, influenciando o manejo global da doença em um número significativo de casos. Além disso, os resultados desse estudo ressaltam a importância crescente do uso de análises genômicas amplas para identificar CNVs em pacientes com CCs, aumentando assim a informação disponível sobre variações genômicas associadas a esta condição.

## **ABSTRACT**

Congenital heart defects (CHDs) are the commonest group of major birth defects, affecting four to twelve per 1,000 total births, being an important cause of birth defects associated infant mortality. Complex molecular and cell biological pathways are involved in heart development, and little is known about the underlying mechanisms of CHDs. The conotruncal defects, malformations with significant morbidity and mortality, represent about 20% of all CHD cases. Despite advances in medical and surgical care, the etiology of CHD is still not completely understood. With more children with CHD surviving to adulthood and starting families, it becomes even more critical to understand the genetic bases of CHD. Classic studies have found that CHD is multifactorial, due to both genetic predisposition and environmental influences. Genomic imbalances leading to copy number changes seems to have a much greater influence on the development of various types of CHD than previously predicted. We used array-comparative genomic hybridization (array-CGH) to retrospectively study 60 subjects with conotruncal defects and identify genomic imbalances. The DNA copy number variations (CNVs) detected were matched with data from genomic databases, and their clinical significance was evaluated. We found that 38.3% (23/60) of CHD cases possessed genomic imbalances. In 8.3% (5/60) of these cases, the imbalances were causal; in 8.3% (5/60), CNVs of unknown significance were identified; and in 21.6% (13/60), common variants were detected. In conclusion, although the interpretation of the results must be refined, and although there is not yet a consensus regarding which types of CHD should be evaluated by cytogenomic analysis, the identification of copy number changes in subjects with conotruncal congenital heart defects can potentially help in the evaluation and management of this condition. The use of retrospective or prospective array-CGH as a diagnostic tool would benefit families by providing a more accurate diagnosis and would affect overall disease management in a significant number of cases. Furthermore, the results of such studies emphasize the growing importance of the use of genome-wide assays to identify CNVs in subjects with CHD, thereby increasing the available information about of genomic variation associated to this condition.



**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Malformações e Defeitos Cardíacos Congênitos

Anomalias congênitas (AC) ou defeitos congênitos são alterações morfológicas e/ou funcionais detectáveis ao nascimento. As alterações morfológicas ou anatômicas exibem manifestações clínicas muito diversificadas em órgãos ou segmentos corporais, desde dismorfias leves com prevalência relativamente alta na população, até defeitos complexos e extremamente raros. Estes defeitos podem apresentar-se isolados ou associados, compondo síndromes de causa genética e/ou ambiental. As anomalias congênitas anatômicas são genericamente chamadas de “malformações congênitas (MFC) (Manual de Anomalias Congênitas, 2012). As anomalias congênitas fazem parte de uma vasta categoria de defeitos congênitos, juntamente com o retardo mental de origem pré-natal, os erros inatos do metabolismo e outros distúrbios de origem principalmente genética (ICBDMS, 2013; OMS, 2013).

De acordo com o relatório da *United Nations Children's Fund* (UNICEF) de 2013 (<http://www.childinfo.org/mortality.html>) desde 1990 a taxa de mortalidade global em crianças abaixo de 5 anos caiu 49% - de 90 mortes a cada 1000 nascidos vivos em 1990, para 46 em 2013. Todas as regiões do mundo, exceto a África sub-sahariana e a Oceânia, reduziram suas taxas de mortalidade abaixo de 5 em 50% ou mais. No Brasil, a mortalidade neonatal (entre 0 e 27 dias de vida) representa cerca de 70% da mortalidade infantil (Ministério da Saúde, 2012). No mundo, a taxa de mortalidade neonatal teve um declínio mais lento, de 37% - menos do que o declínio de 47% da taxa de mortalidade em crianças menores de cinco anos. A taxa de mortalidade infantil no Brasil, calculada em crianças menores de um ano, em 1990 era de 49% enquanto que em 2011 foi reduzida para 14% (<http://www.unicef.org>, 2013).

Esse fato tem relação com mudanças econômicas e políticas no país, se refletindo nos indicadores das condições de vida e saúde da população. Embora tenha ocorrido um decréscimo significativo de mortalidade infantil e perinatal a taxa de mortalidade infantil em decorrência de anomalias congênitas tem se mantido constante nas últimas décadas (Victora *et al.*, 2011). A taxa de mortalidade infantil por malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas, que ocupava a quinta colocação em frequência na década de 80, assumiu a segunda posição no ano 2000 (<http://www.datasus.gov.br>, 2013). As anomalias congênitas foram responsáveis por 4% das mortes em crianças abaixo de 5 anos de idade no mundo todo, já na faixa etária neonatal, as anomalias congênitas representaram 9% das causas de mortalidade (<http://www.childinfo.org/mortality.html>).

No que se refere à incidência de MFC, há controvérsias quanto aos dados estatísticos brasileiros. Os estudos não consideram grupos multiétnicos na obtenção dos resultados, dificultando a compreensão da incidência tanto nas diferentes regiões, quanto no país como um todo (Pereira *et al.*, 2008; Horovitz *et al.*, 2013). No Brasil, estudos de morbidade em crianças indicam que as enfermidades genéticas e os defeitos congênitos representam 37% das internações pediátricas em centros terciários de assistência à saúde (Horovitz *et al.*, 2005) e são responsáveis por altas taxas de cesarianas e prematuridade (Guerra *et al.*, 2008).

As MFC menores são relativamente frequentes na população geral e não acarretam problemas significativos aos portadores. A associação de duas ou mais anomalias menores ocorre em alta frequência nas síndromes malformativas. As MFC maiores são as que trazem consequência clínica e/ou estética ao portador. Cerca de 2% dos recém-nascidos apresentam este tipo de anomalia, e cerca de 1% têm malformações múltiplas. Estas malformações deixam sequelas funcionais importantes e frequentemente são de elevada morbimortalidade (Manual de Anomalias Congênitas, 2012). A identificação precoce da natureza genética de uma determinada condição pode auxiliar no tratamento, e ajudar a identificar os recursos para fornecer os melhores cuidados para a saúde desses indivíduos.

Cardiopatas congênitas (CCs) são anormalidades do desenvolvimento da estrutura do coração e dos grandes vasos que estão presentes no nascimento. A maioria delas envolve defeitos no coração, anormalidades da válvula ou drenagem anômala de veias e artérias para o coração e a partir dele (<http://toolkit.bornhealthy.org/>). Recém-nascidos portadores de CCs representam um grupo de alto risco pelas elevadas mortalidade e morbidade. Devido à gravidade de grande parte das cardiopatas no período neonatal, essa condição necessita ser diagnosticada e tratada imediatamente, evitando-se a deterioração hemodinâmica do bebê e lesões de outros órgãos, principalmente do sistema nervoso central.

Em relação à manifestação de sintomas, as malformações cardíacas podem evoluir de forma assintomática ou apresentar sintomas importantes no período neonatal (como cianose, taquidispneia, sopro e arritmias cardíacas) (Soares de Araújo *et al.*, 2014). De acordo com a gravidade, elas podem ser classificadas em cardiopatas simples – que não requerem tratamento intensivo imediato, mas necessitam de seguimento aprofundado – e complexas – as quais necessitam de diagnóstico e tratamento precoces, geralmente no período neonatal.

As CCs ocorrem em nove de cada 1.000 nascidos vivos. Em torno de 25% dos casos são cardiopatas graves que necessitam de intervenção no primeiro ano de vida (Ministério da Saúde, 2012). Estima-se que cerca de 0,4 a 0,6% dos recém-nascidos vivos apresentem uma malformação cardíaca congênita grave ou moderada (Hoffman *et al.*, 2002; Pierpont *et al.*,

2007) podendo atingir até 1% após o nascimento (Chen *et al.*, 2004). Dois estudos brasileiros avaliaram a prevalência de CCs em nascidos vivos, identificando a presença de 5,5:1.000 nascidos vivos entre os anos de 1989 e 1998 (Guiti JC, 2000) e 9,58:1.000 nascidos vivos entre os anos de 1990 e 2003 (Amorim *et al.*, 2008).

Essas malformações podem ser isoladas ou fazerem parte de alguma síndrome; podem ser resultado de alterações genéticas, como deleções e duplicações de regiões cromossômicas, ou ainda causadas por fatores ambientais como por exemplo o uso de medicações teratogênicas pela mãe ou infecções durante o período da gestação (Grech & Gatt, 1999; Jenkis *et al.*, 2007; Pierpont *et al.*, 2007). Poucos trabalhos publicados na América Latina estudaram o perfil dos pacientes com CC em larga escala (Amorim *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2010; Zen *et al.*, 2011), sendo que a maioria envolve dados coletados pelo Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas – ECLAMC (Castilla & Orioli, 2004).

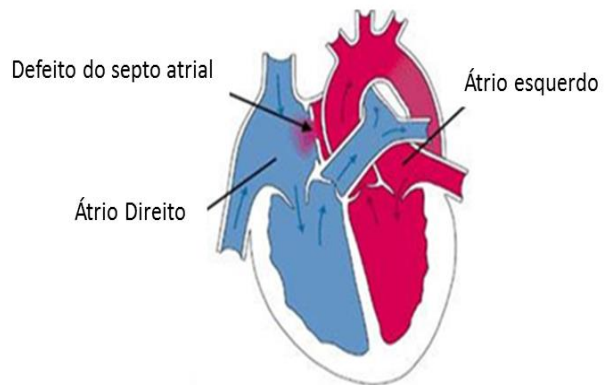
As CCs representam um grupo heterogêneo de doenças com causas e consequências variáveis. Dessa forma, têm diferentes necessidades de seguimento e intervenção, podendo ser divididas em cardiopatias simples e complexas. Dentre as CCs simples podemos citar a comunicação interatrial pequena, comunicação interventricular pequena e os defeitos leves de válvula, como a estenose valvar (Fig. 1). No entanto, os defeitos cardíacos de maior destaque são os defeitos cardíacos complexos, especialmente pela sua gravidade. Ainda dentro deste subgrupo encontram-se as cardiopatias conotruncais, defeitos que se caracterizam por alterações no processo de septação aórtico-pulmonar e compreende várias lesões como a Tetralogia de Fallot, a agenesia da valva pulmonar, dupla via de saída do ventrículo direito, transposição das grandes artérias e *truncus arteriosus* (Fig. 2), além de anomalias do arco aórtico, artérias pulmonares e valvas semilunares. As cardiopatias conotruncais correspondem a cerca de 50% das CCs relatadas em recém-nascidos (Iserin *et al.*, 1998).

Dentre as malformações congênitas mais frequentes, destacam-se as CCs, compostas por alterações estruturais e funcionais do coração presentes ao nascer, independentemente do momento do diagnóstico. As CCs são um grupo heterogêneo de lesões com consequências hemodinâmicas variadas, necessitando de diferentes seguimentos e intervenções. Estudos demonstram que a incidência das CCs pode variar de quatro a 14 por 1,000 mil nascidos vivos (Hoffman *et al.*, 2002; Pinto Junior *et al.*, 2004; Ransom *et al.*, 2007) No Brasil, descreveu-se uma prevalência que varia de cinco a 12 por 1,000 nascidos vivos (Amorim *et al.*, 1994; Guitti JC 2000; Hagemann e Zielinsky 2004). Essas variações podem ser explicadas por diversos fatores, como a ocorrência de defeitos letais que impossibilitam o

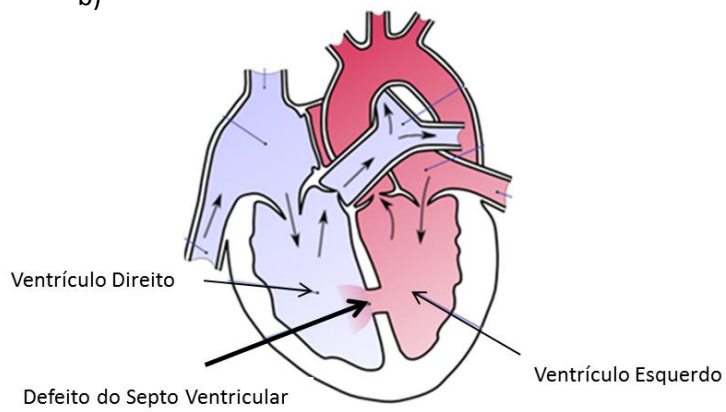
nascimento vivo do concepto e a não inclusão de defeitos cardíacos menores. Estudos demonstram que a CC pode ser responsável por cerca de 40% de todos os defeitos congênitos, sendo considerada uma das malformações mais frequentes (Acharya *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2007). No Brasil, apesar de sua grande extensão geográfica, dispõem-se de 12 centros especializados tanto no diagnóstico quanto no tratamento de pacientes com CC (Pedra *et al.*, 2009). A necessidade média de cirurgia cardiovascular em congênitos no Brasil é da ordem de 23.077 procedimentos por ano. Contudo, a rede de saúde instalada não é suficiente e, em 2002, por exemplo, houve um déficit de cirurgias que chegou a 65% (Pinto Júnior *et al.*, 2004). Assim, as CCs ainda representam um problema maior de saúde pública em escala globais, sendo a principal causa de morte entre indivíduos com malformações congênitas (Jenkins *et al.*, 2007). Defeitos cardíacos graves e moderadamente graves perfazem cerca de três a seis em cada 1.000 nascidos vivos e caracterizam-se pela necessidade de cuidados intensivos e cirúrgicos mais complexos (Hoffman *et al.*, 2002; Acharya *et al.*, 2004; Dolk *et al.*, 2011);

Na ausência de diagnóstico ou tratamento, os recém-nascidos com doença cardíaca congênita grave têm uma expectativa de vida curta, com muitas crianças afetadas morrendo na infância. Além disso, as CCs pode levar a um aumento da susceptibilidade à infecção, o que pode aumentar a mortalidade. Tem sido relatado que o diagnóstico e a cirurgia cardíaca levam a um aumento da sobrevivência de crianças com doença cardíaca congênita em ambientes onde este procedimento está disponível (<http://toolkit.bornhealthy.org/>).

a) **Comunicação Interatrial**



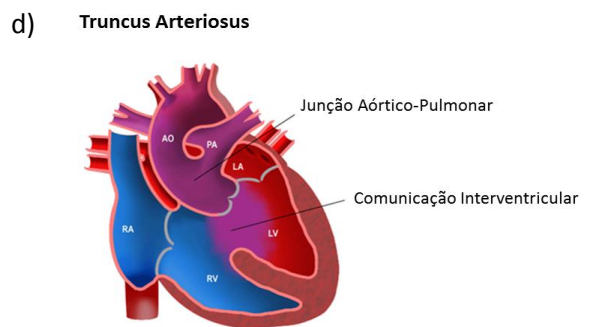
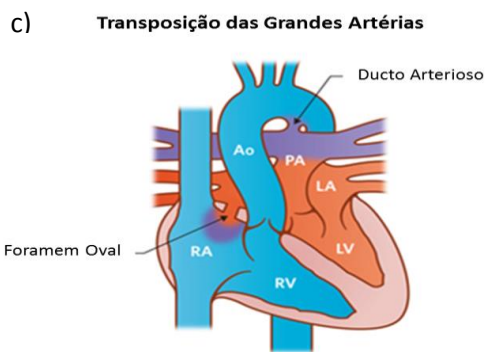
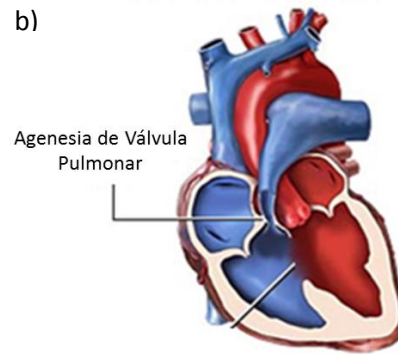
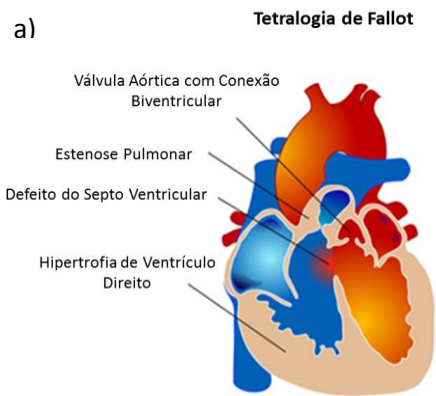
b) **Comunicação Interventricular**



c) **Estenose Valvar**



**Figura 1.** Defeitos cardíacos simples: a) comunicação interatrial; b) comunicação interventricular; c) estenose valvar. Adaptado de [http://www.rch.org.au/cardiology/heart\\_defects](http://www.rch.org.au/cardiology/heart_defects).



**Figura 1.2.** Defeitos cardíacos complexos: a) Tetralogia de Fallot; b) agenesia da valva pulmonar; c) transposição das grandes artérias; d) truncus arteriosus. Adaptado de [http://www.rch.org.au/cardiology/heart\\_defects](http://www.rch.org.au/cardiology/heart_defects).

## 1.2. Variantes estruturais e doenças genômicas

Apesar de individualmente raras, a soma das prevalências das anomalias cromossômicas e das doenças multifatoriais torna as doenças genéticas relativamente frequentes em seu conjunto (Schinzel, 2001). Tem sido referido que a etiologia dos defeitos congênitos seja, em 6% dos casos, causada por anomalias cromossômicas; em 7,5% seria monogênica; em 20% multifatorial; e 6 a 7% causada por fatores ambientais, incluindo teratógenos, infecções e doenças maternas (Caluseriu & Reardon, 2012). A etiologia de mais de 50% dos defeitos congênitos ainda é desconhecida. Por serem patologias individualmente pouco frequentes, entre outros fatores, são difíceis de investigar (Calvo *et al.*, 2012). As principais consequências clínicas desencadeadas por rearranjos genômicos estruturais surgem em função de modificação na dosagem gênica, do efeito de posição ou mudança no quadro de leitura em regiões codificadoras ou regulatórias (Stankiewicz & Lupski, 2010).

As variações do número de cópias gênicas, do inglês, *Copy Number Variation* (CNVs), são definidas como segmentos de DNA maior ou igual a 1 kb, cujo número de cópias em um dado indivíduo se mostra variável devido à perda ou ganho de material genético em comparação com o genoma de referência (Feuk *et al.*, 2006). As CNVs se enquadram como variantes estruturais (SVs). Os CNVs podem ser polimórficos, aparentemente “neutros”, em um indivíduo ou população (Sebat *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2011): em média, dois indivíduos não-relacionados podem diferir em até 12% do seu genoma devido à presença de CNVs (Redon *et al.*, 2006). Apesar de CNVs que afetam o número de cópias de certos genes possam ser variantes benignos, alterações no número de cópias de genes sensíveis a dosagem, como por exemplo *PMP22*, *PLP1*, *RAI1* ou *MECP2* e cuja expressão no sistema nervoso é finamente regulada, podem causar um fenótipo clínico grave [respectivamente, Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (duplicação de *PMP22*), Doença de Pelizaeus-Merzbacher (duplicação ou deleção de *PLP1*), Síndrome de Potocki-Lupski (duplicação de *RAI1*) ou Smith-Magenis (deleção de *RAI1*), Síndrome de duplicação do *MECP2*]. Os CNVs podem ocasionar alteração da expressão gênica e gerar variações fenotípicas diretamente pela simples falta ou excesso da região genômica em questão mas também indiretamente através de efeitos de posição (Lupski & Stankiewicz 2005). Em alguns casos podem conferir riscos a doenças complexas tais como glomerulonefrite (Aitman *et al.*, 2006) e infecção ao HIV-1 (Gonzalez *et al.*, 2005) mas também podem ser o fator causativo minoritário em doenças como Parkinson e Alzheimer (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006). Sebat e colaboradores (2007) relatam que os CNVs *de novo* são



mais frequentemente encontrados em crianças autistas do que em crianças sem histórico de autismo.

A prevalência dos CNVs como mecanismo molecular de determinadas doenças ou grupo de doenças é variável e depende de fatores distintos como indicação clínica, tipo de herança, arquitetura genômica no locus associado à doença em questão, métodos empregados no estudo, se a doença é causada por alteração estrutural em um único gene ou se é uma síndrome causada por alterações em genes contíguos. Um grupo de pacientes especialmente susceptível a apresentar CNVs são os recém-nascidos com anomalias congênitas (Lu *et al.*, 2008; Dorfman *et al.*, 2015). Até o momento, o estudo mais abrangente de triagem neonatal (realizado em 20.126 casos não selecionados) com a utilização de análise por array-CGH como teste de primeira linha revelou que 87/20.126 (0.43%) dos recém-nascidos apresentavam desequilíbrios genômicos, com uma significativa frequência de rearranjos cromossômicos (23 de deleções e 11 de duplicações) (Park *et al.*, 2013).

Outros grupos de pacientes com alta probabilidade de portar CNVs clinicamente significativos são os pacientes com deficiência mental e atraso de desenvolvimento (Hochstenbach *et al.*, 2011). Estudos recentes mostram que pacientes com autismo, esquizofrenia, e doença bipolar apresentam uma maior número de CNVs raros e maiores do que 100 kb assim como uma alta frequência de CNVs *de novo* (5-10% no caso de indivíduos com transtorno de espectro autista) comparado com indivíduos-controle sem estas doenças (Malhotra & Sebat, 2012).

A grande quantidade de informações clínicas e citogenéticas disponíveis em bancos de dados de acesso livre auxiliam a decifrar as combinações de variantes estruturais que levam a diferentes graus de patogenicidade dentre às diversas doenças genômicas. Fatores que influenciam a patogenicidade de CNVs, e uma classificação baseada em evidências para a interpretação clínica de CNVs nesses grupos, têm sido discutidos e propostos (Lee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Hehir-Kwa *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Gijsbers *et al.*, 2011; de Leeuw *et al.*, 2012; Riggs *et al.*, 2012; Liehr, 2014).

Ao interpretar e classificar CNVs, em associação com rearranjos cromossômicos estruturais (>3 Mb) é essencial distinguir CNVs com ganhos de CNVs com perdas genômicas porque as potenciais conseqüências clínicas podem diferir significativamente (Vermeesch *et al.*, 2012; Dorfman *et al.*, 2014).

### 1.3 Variantes genômicas estruturais e cardiopatias congênitas

Os defeitos cardíacos congênitos ou CCs podem se apresentar de forma isolada (80-85%), como parte de síndromes gênicas (3-5%) ou então como quadros de síndromes cromossômicas (5-10%) (Amorim *et al.*, 2008). Alterações cromossômicas numéricas podem levar a um fenótipo sindrômico, sendo que algumas destas síndromes estão bem relacionadas com a presença de CCs, tais como trissomia do 21, ou síndrome de Down (Noronha *et al.*, 2011), trissomia do 13, ou Síndrome de Patau (Caba *et al.*, 2013) e a trissomia do 18, ou síndrome de Edwards (Denardin *et al.*, 2014). Entre as causas genéticas, têm sido relatado que a frequência de anormalidades cromossômicas detectadas por meio de cariótipo em pacientes com CCs varia de 3 a 23% (em geral em torno de 9%) (Ferencz *et al.*, 1989; Pradata *et al.*, 1992; Stoll *et al.*, 1989; Harris *et al.*, 2003; Dadvand *et al.*, 2009; Hartman *et al.*, 2011), porém poucos estudos referem alterações cromossômicas relacionadas com um tipo específico de malformação cardíaca congênita (Osoegawa *et al.*, 2013).

Entre as síndromes cromossômicas estruturais com envolvimento cardíaco, a síndrome da deleção do 22q11.2 (SDdel22q11) também chamada de síndrome velocardiofacial ou síndrome de DiGeorge representa de 5 a 30% de todos os defeitos cardíacos (Ferencz *et al.*, 1989; Voigt *et al.*, 2002; Iserin *et al.*, 1998; Goldmuntz *et al.*, 1993, 1998). Com uma prevalência estimada de um para cada 2.000 a 6.000 nascimentos, essa síndrome representa, atualmente, uma das principais causas conhecidas de CC. A del22q11 apresenta uma importante relação com defeitos do tipo conotruncal. Existem diversos relatos sugerindo que 75-85% dos pacientes que sofrem da síndrome de deleção do cromossomo 22q11.2 apresentam doenças cardíacas congênitas, sendo a grande maioria defeitos congênitos conotruncais (Gong *et al.*, 2013). A frequência de síndrome de deleção 22q11 relatada em investigações relacionadas a essa condição varia de 4% a 15%. Em alguns estudos apontam índices entre 17 e 48% (Rosa *et al.*, 2009).

Estas diferenças parecem estar relacionadas, especialmente, com a faixa etária dos pacientes, sua origem/procedência, e a frequência de certos defeitos cardíacos. Outro aspecto a se considerar é que, dependendo da idade da avaliação e do local de nascimento, os indivíduos podem não estar vivos a ponto de serem avaliados. Essa situação se agrava ainda mais em lugares como o Brasil em que o diagnóstico pré-natal de CCs é ainda inadequado e não existe infraestrutura suficiente para o apropriado cuidado e tratamento destes pacientes. Em relação às variantes cromossômicas estruturais, a maior parte dos estudos não possui descrição de pacientes com anormalidades cromossômicas diferentes da microdeleção na

região 22.q11.2. Esta alteração cromossômica corresponde a uma perda de material genético de cerca de 2.5 milhões de pares de base (Mb), de tamanho que pode ser variável.

Os principais defeitos cardíacos congênitos são frequentemente causados por desequilíbrios cromossômicos, especialmente quando associados a malformações adicionais, dismorfismos, ou atraso de desenvolvimento (van Karnebeek e Hennekam, 1999). Entretanto, em apenas uma porção destes pacientes a aberração cromossômica pode ser identificada pelos métodos citogenéticos convencionais. Thienpont *et al.* (2007) avaliaram pela primeira vez o uso de array-CGH como uma ferramenta de diagnóstico em um grupo selecionado de pacientes com CC. Nesse estudo sessenta pacientes com CC de causa desconhecida mas com características sugestivas de alterações cromossômicas foram selecionados e analisados por array-CGH utilizando uma plataforma de 1 Mb de resolução. Alterações cromossômicas não previamente descritas como polimorfismos foram detectadas em 18 dos 60 pacientes (30%), sendo que 17% das alterações genômicas foram consideradas causais.

Erdogan *et al.* (2008) por meio de array-CGH relata o estudo de 105 pacientes com CC isolada, ou seja, que defeitos cardíacos como única anormalidade ao diagnóstico. Pacientes com suspeita de del22q11.2 e WBS não foram incluídos nesta coorte. O defeito cardíaco mais frequente nos 105 pacientes foi o defeito do septo ventricular (28,57%) e em segundo lugar a Tetralogia de Fallot (13,33%). Foram encontradas 18 alterações cromossômicas, não sendo variantes comuns de CNVs, incluindo uma deleção de novo, duas duplicações de novo e oito CNVs familiares (uma deleção e sete duplicações). Quatro alterações estavam sobrepostas com desequilíbrios genômicos já relatados: del(22)(q11.2), dup(22)(q11.2), del(17)(p11.2) e del(1)(q21.1). Todas as alterações foram confirmadas por FISH ou PCR quantitativo. As alterações encontradas podem ser divididas em 3 categorias: alterações de novo, alterações herdadas que não são conhecidas como CNVs frequentes e CNVs comumente encontradas. O primeiro grupo representa 3% da coorte utilizada e foi o menos complexo. O segundo grupo compreende alterações herdadas de pais saudáveis, mas são CNVs frequentes. Os autores sugerem que estas alterações podem representar fatores de risco que predisõem à doenças, embora seja difícil de interpretar a relevância destas alterações.

Em uma amostra de 150 pacientes com DDC de causa desconhecida investigadas por array-CGH com resolução de 1 Mb, Breckpot *et al.* (2010) relataram 43 variantes estruturais não listadas como polimorfismos clinicamente neutros, destes, 26 (17,3%) foram considerados causais. Estes desequilíbrios ocorreram *de novo*, com exceção de uma duplicação 22q11.2 e Xq21.1 de herança materna em dois pacientes e uma duplicação 1q21.1

de herança paterna em um paciente. Uma comparação do fenótipo clínico destes 26 pacientes com os 124 restantes do estudo revelou dismorfias com único traço com valor preditivo significativo para fins de diagnóstico utilizando array-CGH de 1 Mb. Com maior resolução, a análise em 29 pacientes resultou em 75 variantes não listadas como polimorfismos clinicamente neutros, 2 dos quais foram considerados causais, sendo estas uma deleção 17q21.31 e uma deleção *de novo* 6q25.3 envolvendo o gene *FOXC1*.

Soemedi *et al.* (2012a) avaliaram o risco de doenças associado ao total de CNVs >100 kb em uma população com CC não sindrômica e não Mendeliana (esporádica). A hipótese principal foi de que CNVs raras devem mostrar associação com risco de CC. Os dados de CNVs do genoma total identificadas utilizando Illumina 660W-Quad SNP Array em 2256 indivíduos com CCs, 283 de famílias afetadas por CCs e 1538 controles foram analisados. Os autores relataram a associação de deleções gênicas raras com risco de CCs. Deleções raras em participantes do estudo com CC tiveram maior conteúdo gênico com maiores escores de haploinsuficiência em comparação com os controles. CNVs raras *de novo* foram observadas em aproximadamente 5% dos pacientes com CC, implicando em novos genes candidatos. Algumas das CNVs encontradas nesse estudo, estavam em genes sabidamente envolvidos no desenvolvimento cardíaco (*HAND2* e *GJA5*). Deleções gênicas raras contribuíram com aproximadamente 4% com o risco atribuído à população de CCs esporádicas. CNVs previamente descritas em 1q21.1, deleções em 15q11.2 e aquelas implicando sinalização Wnt são as contribuições mais significativas para o risco de CC esporádico. Os autores também observaram que CNVs raras *de novo* identificadas na amostra deste estudo, exibiram viés de origem paterna.

Hightower *et al.* (2014) avaliaram retrospectivamente 173 pacientes com CC por array-CGH. Destes, 50 (28,9%) apresentaram alterações genômicas. Os resultados detalhados deste estudo, mostram que os pacientes com doença arterial coronariana estão em um risco substancial de ter microdeleções e microduplicações cromossômicas submicroscópicas. Além disto, os autores concluíram que a incidência de anormalidades por meio de array-CGH é maior do que a identificada com a análise por cariótipo e, que a identificação de CNVs pode auxiliar na identificação de fatores genéticos em defeitos cardíacos específicos. Em contraste, a análise por array-CGH em pacientes portadores de CC isolada não demonstra resultados significativos.

Um aspecto que provavelmente resulta em variações de frequência de variantes cromossômicas estruturais encontradas em indivíduos com CC é o método de investigação utilizado, quando disponível, para o diagnóstico e pesquisa de regiões do genoma associadas

a malformações cardíacas congênitas. Recentemente, estudos de rastreamento através da análise comparativa de genomas realizado em amostras de recém-nascidos com CC no estado da Califórnia, mostraram evidências a favor de genes candidatos e regiões cromossômicas envolvidos no desenvolvimento desta patologia (Lammer *et al.*, 2009; Kuehl *et al.*, 2010). Estudos populacionais, porém, não foram ainda desenvolvidos no Brasil de forma abrangente, e séries de casos com alterações genômicas associadas a CCs, além da microdeleção 22q11.2, têm sido raramente relatadas.

#### **1.4 Citogenômica aplicada à pesquisa e ao diagnóstico**

As pesquisas em citogenética humana se iniciaram em 1879 com o patologista alemão Arnold, examinando células de carcinoma e sarcoma. Flemming (1882) e Hansemann (1890) foram os primeiros a examinarem cromossomos humanos mitóticos. Ao final do século XIX, Waldeyer (1888) propôs o termo “cromossomo”, significando “corpo colorido”. Os primeiros cientistas a descreverem o número correto de 46 cromossomos humanos foram Tijo & Levan (1956) utilizando método de tratamento de choque hipotônico em células de fibroblastos de pulmão cultivadas. As técnicas de cultivo celular de sangue periférico e preparo de material para microscopia foram melhoradas por Moorhead *et al.* (1960) ao utilizar colchicina para reter as células na etapa de metáfase do ciclo celular, e Nowell (1960), ao descobrir a atividade mitógena da fitohemaglutinina. Técnicas para cariotipagem de cromossomos fetais foram implantadas por Steele & Breg Jr (1966) utilizando líquido amniótico, e em meados de 1970 foi desenvolvida a técnica para cultivo de vilosidades coriônicas (Hahnemann, 1974), melhorada posteriormente por Niazi *et al.* (1981) e Brambati & Simoni (1983).

Com o desenvolvimento de novas técnicas e métodos mais adequados para aumentar a resolução cromossômica, a citogenética humana evoluiu de uma ciência básica à uma estratégia valiosa para a pesquisa e diagnóstico de alterações cromossômicas constitucionais e adquiridas (Riegel 2014). A citogenética clássica tornou-se uma poderosa ferramenta na detecção de aberrações cromossômicas, incluindo ganhos e perdas de segmentos do genoma. Entretanto, a resolução das técnicas de citogenética padrão é limitada a aproximadamente 400-800 bandas por genoma haplóide, dependendo do método utilizado.

O limite de resolução alcançada com as técnicas de citogenética convencional foi superado com o advento das técnicas de citogenética molecular. As primeiras aplicações das técnicas moleculares para análise de cromossomos foram a utilização de moléculas fluorescentes marcadas direta ou indiretamente para a visualização de sequências de DNA

conhecidas as sequências de DNA alvo diretamente nos segmentos cromossômicos (Hibridização *in situ* por fluorescência – FISH). O método de FISH aumentou a resolução para identificação de rearranjos cromossômicos em níveis submicroscópicos, tornando este método aplicável para diagnóstico clínico e pesquisa (Volpi & Bridger 2008).

Uma inovação das técnicas de citogenética molecular foi o desenvolvimento do método de CGH (*comparative genome hybridization*), entre outros que se baseiam na análise da arquitetura genômica. A fusão dos termos citogenética molecular e genômica, que pode ser referida como citogenômica, expressa e se refere à triagem de alterações genômicas por métodos de citogenética molecular. O método de array-CGH traz uma abordagem eficiente para triagem total do genoma para variações no número de cópias (ganhos/duplicações e perdas/deleções) em um único experimento. O número, tamanho e distribuição dos segmentos de DNA na lâmina de vidro determinam a resolução do *array*, quanto maior o número de fragmentos, maior a resolução.

Desta forma, as técnicas de citogenética molecular têm sido cruciais na elucidação de doenças genômicas (Lupski *et al.*, 1998), que são definidas como sendo alterações do genoma menores que as possíveis de serem detectadas pela citogenética clássica (menores do que 5 Mb e maiores que 10 kb). Essas doenças estão categorizadas entre as alterações mendelianas, causadas por mutação de ponto, e as doenças cromossômicas visíveis ao microscópio (Simmons *et al.*, 2012).

#### **1.4.1 Análise citogenômica comparativa por arrays**

Os métodos clássicos utilizados para o estudo de cromossomos incluem bandamento cromossômico, com uma resolução limitada. Por este motivo, foram desenvolvidas e têm sido utilizadas técnicas que utilizam instrumentos da biologia molecular aplicadas à citogenética. A citogenômica utiliza métodos, como por exemplo array-CGH, que permitem a detecção da variação do número de cópias de DNA ao longo do genoma em uma única análise. O uso desta tecnologia tem possibilitado o diagnóstico molecular de alterações cromossômicas submicroscópicas previamente não detectadas, principalmente em indivíduos com deficiência intelectual e/ou múltiplas malformações congênitas de causa desconhecida. Esta possibilidade tem aumentado consideravelmente a detecção de rearranjos cromossômicos em desequilíbrio no genoma.

Desenvolvida em 1992, a técnica de CGH consiste na hibridização competitiva de DNA teste e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes. A técnica original

utilizava metáfases normais fixadas em lâmina e é conhecida como CGH metafásico, cromossômico ou convencional (Kallioniemi *et al.*, 1992). Mantendo o mesmo princípio de comparação entre DNA teste (amostra) e DNA normal (referência) e utilizando a tecnologia de matriz de DNA (microarrays ou arrays) (Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 1998), foi possível o desenvolvimento de uma metodologia de análise do genoma, agora baseada em microarranjos, conhecida como array-CGH. Basicamente, a técnica utiliza vários fragmentos pré-selecionados de DNA anexados, em uma superfície (lâmina de vidro ou polipropileno), gerando uma matriz de DNA. No método de array-CGH, utiliza-se como alvo de hibridização, em lugar de cromossomos metafásicos, um conjunto de sondas organizadas em alta densidade.

No processo de array-CGH o DNA genômico do sujeito que se pretende estudar (DNA teste) e o da amostra controle (DNA referência) são marcados pela incorporação de um precursor de nucleotídeo contendo um fluorocromo apropriado (por ex., Cy5 dCTPs ou Cy3 dCTPs) que fluoresce quando exposto à luz de um comprimento de onda específico. O DNA teste, junto com quantidades iguais de DNA controle (normal) marcados, são co-hibridizados a uma matriz de DNA contendo segmentos de DNA (clones) pré-selecionados correspondentes às diferentes localizações cromossômicas. Cerca de milhares ou milhões de clones de DNA mapeados e representativos do genoma são imobilizados em placa ou lâmina e são usados como a fase sólida para a hibridação.

Os fragmentos clonados de DNA que inicialmente substituíram os cromossomos metafásicos têm localização conhecida nos cromossomos e podem ser diretamente relacionados às sequências do genoma humano. A distância entre cada alvo imobilizado pode variar desde alguns milímetros até poucos micrômetros, dependendo da plataforma de arrays utilizada. A molécula imobilizada em uma lâmina ou placa é indicada como uma sonda, enquanto o alvo é a molécula em solução exposta a matriz de DNA. Após a co-hibridização, a fluorescência emitida por cada clone é capturada por “varredura” de fluorescência, utilizando-se um escaner a laser. Uma imagem fluorescente é gerada e a intensidade de fluorescência emitida pelo DNA teste e pelo DNA de referência é comparada. Os sinais de fluorescência são medidos quantitativamente por meio de uma análise digital de imagem utilizando-se um programa de conversão de dados da intensidade de hibridização para um perfil linear.

As regiões com intensidade fluorescentes equivalentes aparecem como uma mistura dos DNAs teste e de referência, que resulta em amarelo, tendo um índice normalizado correspondente a 1.0. As regiões com perda de sequências de DNA (deleção) apresentam um

índice significativamente menor que 1.0; as regiões com ganhos de seqüência de DNA (amplificação) apresentam índice significativamente maior que 1.0.

Estudos de alterações de número de cópia por meio de triagem genômica utilizando o método de array-CGH vêm sendo amplamente aplicados em uma enorme variedade de grupos de pacientes com condições clínicas diversas incluindo anomalias congênitas, deficiência mental, esquizofrenia, epilepsia e autismo, entre outras. Estes estudos mostram que deleções e duplicações patogênicas estão presentes em 6.7-17.7% dos indivíduos testados, número significativamente maior que o da população controle (Hochstenbach *et al.*, 2011). A análise citogenômica tem levado à descoberta de novas síndromes que foram clinicamente delineadas somente após a determinação da alteração cromossômica. Os fenótipos de várias dessas síndromes são mais raros e possuem menos características clínicas específicas, como atraso no desenvolvimento e diferenças comportamentais (Roos *et al.*, 2009; Deak *et al.*, 2011; Hancarova *et al.*, 2013; Palumbo *et al.*, 2012; Vergult *et al.*, 2012; Zeeman *et al.*, 2012; Thevenon *et al.*, 2013).

### **1.5 Variação do número de cópias genômicas em humanos**

Aproximadamente 12% do genoma de qualquer indivíduo é composto por CNVs (Redon *et al.*, 2006). Variações no DNA que perturbam a condição diplóide, como deleção ou duplicação de material genômico, podem ter como consequência uma condição clínica anormal. Além das alterações cromossômicas detectáveis pela análise cromossômica convencional, a aplicação de array-CGH tem permitido um melhor entendimento das causas de uma série de doenças genômicas (Vissers & Stankiewicz, 2012) através da possibilidade de uma melhor detecção e caracterização dos mecanismos de formação da variação e de alterações genômicas em humanos. Como consequência, tem ocorrido uma melhoria na capacidade de desenvolvimento de pesquisa e diagnóstico em citogenética pré-natal e pós-natal. Esse fato tem contribuído para um melhor entendimento em relação à patologia das doenças causadas por alterações no genoma. Os distúrbios genômicos em decorrência de alterações cromossômicas mais comuns e melhor delineados são divididos em duas categorias principais: aqueles decorrentes da perda de material cromossômico/DNA (deleção) e aqueles decorrentes do ganho de material cromossômico/DNA (duplicação).

Resultados de estudos por meio de array-CGH têm demonstrado que genomas de indivíduos não aparentados diferem grandemente em relação ao número de cópias de seqüências de DNA, designadas “copy number variants” (CNVs) (Redon *et al.*, 2006). A



dimensão dessa variabilidade se tornou evidente quando trabalhos demonstraram, pelo uso de diferentes plataformas de array-CGH, que genomas de indivíduos saudáveis apresentavam centenas de regiões genômicas que variavam significativamente quanto ao número de cópias independentes (Iafrate *et al.*, 2004; Tuzun *et al.*, 2005). A variação no genoma humano está presente em muitas formas, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo, polimorfismos de pequenas inserções-deleções, número variável de seqüências repetitivas e alterações estruturais genômicas, que são duplicações e deleções. O número e tamanho das CNVs detectadas em um indivíduo dependem do tamanho e da densidade das sondas da matriz de DNA empregada. Estima-se que existam milhares dessas alterações no genoma, algumas comuns, que podem ser detectadas na população em geral.

As CNVs podem ocorrer em parte das seqüências de um gene ou em um gene inteiro. Podem também estar presentes em um segmento contendo vários genes ou em elementos regulatórios (Lee *et al.*, 2007; Lee & Scherer, 2010). Considerando esses fatores, tem sido sugerido que várias CNVs podem contribuir para o desenvolvimento de uma determinada condição clínica através da influência na alteração de funções fisiológicas. A detecção e o mapeamento de alterações do número de cópias de certas regiões do genoma oferecem uma importante contribuição para a associação entre os defeitos moleculares encontrados e a condição clínica estudada.

O mapeamento genético é freqüentemente realizado por meio de duas estratégias principais: correlações entre alterações cromossômicas associadas a fenótipos anormais e estudos de ligação em grandes famílias apresentando vários indivíduos afetados. Na primeira abordagem, a presença de alterações cromossômicas associadas a fenótipos anormais sugere que quebras de segmentos de DNA possam estar interferindo na expressão de um ou mais genes, o que explicaria a condição observada.

## **1.6 Interpretação da variação do número de cópias genômicas identificadas por arrays**

O uso do array-CGH revelou grande proporção do genoma contendo regiões de variabilidade de número de cópias, e a distinção entre ganhos e perdas patogênicos e benignos tem sido um desafio. CNVs recorrentes podem ocorrer em pacientes e indivíduos saudáveis, e frequentemente mais de uma CNV é identificada no mesmo indivíduo. A grande quantidade de dados clínicos e citogenéticos disponíveis em bancos de dados públicos pode ajudar a decifrar quais combinações de variantes podem levar a diferentes graus de patogenicidade. Fatores que influenciam a patogenicidade das CNVs e uma classificação

baseada em evidências para a interpretação clínica de CNVs tem sido discutidos e propostos (Lee *et al.*, 2007; Hehir-Kwa *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Gijbbers *et al.*, 2011; de Leeuw *et al.*, 2012; Riggs *et al.*, 2012; Liehr, 2014). Recursos online e bancos de dados públicos tem sido desenvolvidos e são utilizados pelas comunidades científicas e biomédicas, as quais tem sido encorajadas a submeter seus achados nos bancos de dados para fornecer dados sobre resultados de testes (Vulto-van Silfhout *et al.*, 2013).

Embora uma classificação baseada em evidências para a interpretação clínica de CNVs tenha sido amplamente discutida pela comunidade científica, não existe ainda um critério universal para classificação de CNVs, sendo que a maioria dos pesquisadores classifica as CNVs em diferentes categorias: CNV benigna ou variação genômica normal presente na população (CNV benigna ou não causal); CNV de relevância clínica incerta ou variantes de significado incerto (VOUS); e CNV com potencial relevância clínica ou variantes patogênicas.

Sabe-se que aproximadamente 12% do genoma de qualquer indivíduo é composto por CNVs (Redon *et al.*, 2006). Indivíduos normais e saudáveis também são portadores de CNVs. Em princípio, uma CNV é classificada como benigna ou variante comum quando pertence ao mesmo tipo descrito (ganho ou perda), sendo relatada no banco de dados pelo menos 50% como as descritas em uma região não sobreposta de menos de 100 Kb (Gijbbers *et al.*, 2011).

CNVs que tenham sobreposição com uma região genômica crítica de uma síndrome de microdeleção, com uma microduplicação conhecida ou com uma região que contenha um gene previamente associado a uma doença são consideradas patogênicas. A pesquisa para a verificação da sobreposição da CNV encontrada com as novas síndromes descritas (Nevado *et al.*, 2014) é essencial para reconhecimento da patogênese da mesma.

Algumas CNVs recorrentes ainda têm significado incerto, sendo por vezes associadas a uma patologia, por vezes a outra e, muitas vezes, são herdadas de genitores normais e encontradas em indivíduos controle (Girirajan *et al.*, 2010; Girirajan *et al.*, 2011; Girirajan *et al.*, 2012; Maillard *et al.*, 2015).

Além de dados internos do próprio laboratório, existem bancos de dados públicos disponíveis na *internet* associados com anormalidades cromossômicas e variantes populacionais que podem ser consultados para uma análise comparativa de genomas (Center for the Development and Evaluation of Complex Interventions for Public Health Improvement (DECIPHER); The Chromosome Anomaly Collection: Chromosomal Variation in Man Online Database; Cytogenetic Data Analysis System (CyDAS); Database of genomic structural variation (bdVar); Ensembl; European Cytogeneticists Association Register of

Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); The International Collaboration for Clinical Genomics; Small supernumerary marker chromosomes).

O grande desafio que surge a cada investigação citogenômica nos últimos anos, principalmente com o aumento da resolução das plataformas de *array*, têm sido realizar uma correta interpretação dos resultados obtidos por meio da análise de CNVs detectadas no grupo de pacientes em estudo.

**CAPÍTULO 2**  
**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

---

## 2.1 JUSTIFICATIVA

Os defeitos cardíacos têm sido relatados como as malformações congênitas mais comuns, afetando 0,4 a 0,8% dos nascidos vivos (Guitti 2000; Hoffman *et al.*, 2002; Pierpont *et al.*, 2007). Entre as malformações cardíacas congênitas destacam-se os defeitos cardíacos complexos, não só pela sua frequência relativa, mas também pela sua gravidade. Dentro desse subgrupo encontram-se as cardiopatias conotruncais, defeitos que se caracterizam por alterações nas vias de saída do coração e que correspondem a cerca de 50% das CCs relatadas em recém-nascidos (Iserin *et al.*, 1998). Embora seja conhecida a existência de uma importante associação dessa condição com síndromes malformativas, de 25% a 30% das cardiopatias conotruncais não estão associadas a doenças genéticas conhecidas (Debrus *et al.*, 1996). Alguns estudos têm relatado anormalidades cromossômicas no genoma de 8 a 13% dos recém-nascidos com malformações cardíacas congênitas (Hoffman *et al.*, 2002; Pierpont *et al.*, 2007), mas poucos têm investigado alterações e/ou variações do genoma associadas a tipos específicos de defeitos cardíacos nesse grupo. No Brasil, a pesquisa de variações do genoma associadas à CC em recém-nascidos, síndrômicos e não síndrômicos, é, até agora, praticamente inexistente. A realização de um trabalho de pesquisa científica com essa abordagem inovadora deverá contribuir para o melhor conhecimento da etiologia das CCs, um problema que necessita ser melhor estudado em nosso país. Além disso, o resultado desta pesquisa tem um potencial de aproveitamento pelo setor de inovação, uma vez que o desenvolvimento de plataformas de *microarrays* com regiões específicas do genoma contendo sequências de genes candidatos associados às CCs é um conhecimento que pode ser rapidamente traduzido em produtos, com aplicações para a melhoria das condições de saúde. A equipe de pesquisadores desse projeto acredita que a proposta de identificação de regiões loci ou genes candidatos associados às CCs por meio de uma análise citogenômica, além de contemplar uma investigação científica que busca melhor compreender um problema de saúde da comunidade brasileira, tem um componente de atualização tecnológica cujos resultados podem gerar produtos inovadores e, dessa forma, se tornar atraentes também para o setor privado. Dessa maneira, acreditamos que este projeto contempla a pesquisa básica que se propõe a responder a inquietudes intelectuais e a pesquisa aplicada que procura atender à necessidades sociais e econômicas do país.

## **OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal desse trabalho foi investigar o perfil cromossômico de portadores de cardiopatia congênita conotruncal por meio de uma análise citogenômica utilizando o método de hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (array-CGH), em amostras armazenadas em repositórios de material biológico.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1) Identificar sequências de DNA com variação no número de cópias de segmentos de DNA associados à cardiopatias congênitas conotruncais e delinear as regiões cromossômicas que apresentarem número de cópias alterado na amostra selecionada;

2) Estimar a relevância de ganhos e perdas de sequências de DNA para a etiologia das cardiopatias congênitas conotruncais;

3) Adaptar o método de análise comparativa de genomas por microarranjos para a investigação de amostras biológicas armazenadas em biorepositório;

4) Estabelecer um processo organizado para a investigação sistemática de amostras biológicas disponíveis em repositórios de material de portadores de cardiopatias congênitas de um serviço de referência em Cardiologia do estado do Rio Grande do Sul.

### **CAPÍTULO 3**

*Cytogenomic Evaluation of Subjects with Syndromic and Non-syndromic Conotruncal Heart Defects*

---

*Artigo in press, Biomed Research International, 2015  
Special issue "Translating Genomics into Clinical Practice"*

## **Cytogenomic Evaluation of Subjects with Syndromic and Non-syndromic Conotruncal Heart Defects**

Karen Regina de Souza<sup>1</sup>, Rafaella Mergener<sup>1</sup>, Janaina Huber<sup>3</sup>, Lucia Campos Pellanda<sup>3</sup>, Mariluce Riegel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Institute of Cardiology, University Foundation of Cardiology, Av. Princesa Isabel, 297, 90620-000, Porto Alegre, RS, Brazil

### **Author e-mail addresses:**

karen\_regininha@yahoo.com.br

rmergener@hcpa.ufrgs.br

janainahuber@gmail.com

luciapell.pesquisa@cardiologia.org.br

mriegel@hcpa.edu.br

### **Corresponding author and author for pre-publication contact:**

Mariluce Riegel

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: + 55 51 3359 8011; Fax: + 55 51 3359 8010; E-mail: mriegel@hcpa.edu.br



## **Abstract**

Despite considerable advances in the detection of genomic abnormalities in congenital heart disease (CHD), the etiology of CHD remains largely unknown. CHD is the most common birth defect and is a major cause of infant morbidity and mortality, and conotruncal defects constitute 20% of all CHD cases. We used array comparative genomic hybridization (array-CGH) to retrospectively study 60 subjects with conotruncal defects and identify genomic imbalances. The DNA copy number variations (CNVs) detected were matched with data from genomic databases, and their clinical significance was evaluated. We found that 38.3% (23/60) of CHD cases possessed genomic imbalances. In 8.3% (5/60) of these cases, the imbalances were causal or potentially causal CNVs; in 8.3% (5/60), unclassified CNVs were identified; and in 21.6% (13/60), common variants were detected. Although the interpretation of the results must be refined, and there is not yet a consensus regarding the types of CHD cases in which array-CGH should be used as a first-line test, the identification of these CNVs can assist in the evaluation and management of CHD. The results of such studies emphasize the growing importance of the use of genome-wide assays in subjects with CHD to increase the number of genomic data sets associated with this condition.

**Keywords:** Conotruncal heart defects, selective screening, genomic imbalances, array-CGH.

## Introduction

Congenital heart defects are defined as structural abnormalities of the heart or intrathoracic vessels and represent one of the most common congenital anomalies at birth. Congenital heart disease (CHD) affects approximately 81.4 of every 10,000 live births (LBs) [1] and is responsible for a significant proportion of cases of infant morbidity and mortality [2-4]. Conotruncal heart malformations comprise approximately 20% of all CHD cases [5, 6]. The most common conotruncal heart defects are cardiac outflow tract defects, such as tetralogy of Fallot (TOF), transposition of the great arteries (TGA), double outlet right ventricle, truncus arteriosus communis, and aortic arch anomalies. TOF [OMIM #187500] is the most common cyanotic CHD phenotype and occurs in 1 in 2,500 LBs [7]. In the past, 80% of children born with TOF died before their tenth birthday; however, as medicine has advanced and early detection has permitted cardiac surgery, many of these newborns survive and contribute to an increased population of adults with CHD [8].

Environmental and genetic factors, including recognized chromosomal and Mendelian syndromes, have been cited as causes of CHD [9-16]. However, non-syndromic, non-Mendelian factors contribute to the largest proportion of CHD cases [17]. In the past decade, several genomic studies on isolated and syndromic CHD cases have shown that mutations in candidate genes and chromosomal regions can predispose patients to the development of several types of CHD [18;<http://homes.esat.kuleuven.be/>]. The most frequent appears to be the 1q21.1 duplication, which varies somewhat in size and coverage. This CNV occurs in at least 1 % of reported CHD cases. The largest study concluded that the 1q21.1 duplication was associated specifically with TOF and that the GJA5 gene was involved in all CHD cases [19]. Three types of CNVs can be distinguished among those found in CHD: (1) CNVs associated with well described microdeletion syndromes that include CHD (e.g., 22q11.2 deletion syndrome and William's syndromes) or partial aneuploidy due to chromosomal rearrangements; (2) CNVs that include genes known or likely to be involved in heart development (e.g., GATA4(8p23.1-p22) and NODAL(10q22.1); and (3) CNVs associated with a wide variety of other phenotypes such as autism or schizophrenia, which often show reduced penetrance or inheritance from an unaffected parent [18;<http://homes.esat.kuleuven.be/>].

DNA microarray-based technology permits the detection of submicroscopic copy number variants (CNVs) in the genome and has been widely used in clinical practice. Array comparative genomic hybridization (array-CGH) was initially used to distinguish candidate

genes involved in the pathogenesis of cancer and to identify chromosomal imbalances by detecting CNVs in tumors [20,21]. In clinical diagnostics, both oligonucleotide array-CGH and single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping have been shown to be powerful genomic methods for evaluating idiopathic mental retardation (MR) [also referred to as developmental delay (DD), intellectual disability (ID) or learning difficulty] and its associated congenital abnormalities (MCA), autistic spectrum disorders (ASDs), schizophrenia and other neuropsychiatric disorders [22]. Furthermore, comparative genomic analysis using array-CGH has been increasingly used to detect genomic imbalances involving loci and genes with known roles in cardiac development, and this approach may also identify candidate genes related to CHD [23-26]. Indeed, array-CGH can detect pathogenic genomic imbalances, and this application may be especially valuable for subjects with CHD of unknown etiology.

Therefore, the aim of this retrospective study was to use whole-genome microarray-based CGH analysis to identify genomic imbalances that are likely to be associated with conotruncal heart defects. Between January 2013 and May 2014, we selected and analyzed 60 stored DNA samples from patients with conotruncal heart defects of unknown cause. In addition, based on evaluations by a cardiology reference center in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, this study evaluated the usefulness of array-CGH as a diagnostic tool for patients with CHD.

## **Materials and Methods**

### ***Sample selection***

This retrospective study was performed using DNA extracted from blood samples of patients whose identifying information had been removed, and the samples were obtained from the biorepository of the Institute of Cardiology, University Foundation of Cardiology, Brazil. The Institute of Cardiology is a regional referral center in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Venipuncture was used to collect 5 ml of blood from each patient. The Lahiri and Nurnberg method was used for DNA extraction. In cases for which the collection of a new blood sample was necessary, DNA extraction was performed with a Pure Link Genomic DNA kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The subjects were between 22 days and 33 years of age at the time of blood collection, and they presented congenital cardiac anomalies of unknown cause. At the time of the comparative genomic analysis, the patients' clinical and laboratory data from their first referrals were collected from the hospital's records. The data

did not include follow-up investigations or disease outcomes. Cases without sufficient clinical data were excluded, as were cases in which the mothers had suspected infectious or parasitic diseases or a history of illicit drug or alcohol use during pregnancy. Individuals with double outlet right ventricle or atrioventricular septal defects that accompanied TOF or TGA were excluded. We also excluded DNA samples from subjects with a known genetic disorder, major congenital anomalies and/or chromosomal imbalances that had been detected in previous studies [27]. To avoid contamination of the donor DNA, the study also excluded subjects who had received blood transfusions in the 4 months prior to blood collection [28]. Based on these criteria, a total of 68 samples were selected, but eight of the samples were excluded because the quality of the extracted DNA was insufficient for array-CGH analysis. Therefore, the study was carried out with 60 samples. All of the patients or their guardians provided informed consent before their inclusion in the study. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee and was conducted in accordance with current institutional ethics rules regarding the use of biological materials from biorepositories [29].

### ***Whole-genome array-CGH***

We performed comparative genomic analysis with oligonucleotide array-based CGH using an 8x60K whole-genome platform (design 021924, Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America), with an average distance of 40 kb between probes. Genomic DNA was isolated from the peripheral blood of 60 subjects (available at the biorepository) and subsequently analyzed. For each experiment, a gender-mismatched normal reference (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used. The experiments were performed according to the manufacturer's protocol. Images of the arrays were taken using a microarray scanner (G2600D) and processed using the Feature Extraction software (v 9.5.1), both from Agilent. As to the measurement of data quality, various quality control (QC) parameters have been devised, and included in software packages both commercial and in the public domain. These QC parameters calculate microarray data noise, appreciation of which is critical to matters like false discovery rate. For those CGH arrays manufactured by *Agilent Technologies*, as used in our study, the major QC parameter is known as the derivative log ration, or DLR. In our study DRL values of <0.15 were indicative of acceptable data. The raw data were analyzed using the Agilent Cytogenomics v2.7.8.0 software and the ADM-2 statistical algorithm (second generation algorithm that can assist in controlling noise source),

with a threshold of 6.0 and a 4-probe minimum aberration call. Subsequent normalization of the data was performed using the software to verify changes in DNA copy number. The P-values for each probe were calculated, providing additional objective statistical criteria to determine if each probe's deviation from zero was statistically significant [30]. All experiments included two array hybridizations per sample, and the results were recorded and compared. To exclude false positive results, we confirmed the detected deletions and duplications using dye-swap experiments. Laboratory personnel were blinded to prior testing results. Array CGH detected all known regions of genomic imbalance in 10 validation samples with 100% concordance and an excellent signal-to-noise ratio ( $<0.1$ ). Only genomic imbalances that were detected in both dye-swap experiments were reported.

### ***Data analysis***

Whole-genome array-CGH data analysis was performed in a blinded fashion. Specifically, the samples were obtained, the identifying information was removed, and the investigators who performed the array-CGH analyses were not aware of the prior clinical and/or laboratory information related to each sample. The DNA CNVs that were detected were compared with the CNVs that had been reported in at least 3 publicly available online resources and in databases of chromosomal abnormalities and variants. Our own in-house database was also consulted, but was not be regarded as conclusive, *per se*. We classified the CNVs (gains/duplications and losses/deletions) into the following categories: common or benign CNVs (normal genomic variants); CNVs of uncertain clinical relevance or unclassified (variants of uncertain significance -VOUS); and pathogenic CNVs of clinical relevance (causal or potentially causal variants). Pathogenic refers to CNV reported in the medical literature, or publicly available databases, as being associated with known disease and likely to be clinically significant; VOUS refers to CNV that has not reported in the medical literature or listed in publicly available databases as being associated with known disease and benign refers to CNV recorded and/or curated in publicly, or in-house, genomic databases as polymorphic variants without known effect among control individuals. In this study, the causal or pathogenic CNVs included those in known pathogenic regions, deletions and duplications of  $>3$  Mb or that were visible by G-banded karyotyping and had not been reported in the normal population, and microdeletions or microduplications of  $<3$  Mb that had previously been reported as causal. Common deletions or duplications included variants that were well documented in the normal population or were previously reported as

polymorphisms. Deletions or duplications were classified as being VOUS or unclassified when insufficient evidence was available to conclude if the CNV was either a causal or a common variant. As a reference, we used public data from compiled, collaborative databases including the Clinical Genomic Resource (ClinGen) (<http://clinicalgenome.org/>); the Congenital Heart Defects (CHD) Wiki (<http://homes.esat.kuleuven.be/>); the Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (Decipher) (<http://decipher.sanger.ac.uk/>); the European Cytogeneticists Association's Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA) (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>); the Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>); the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); and the University California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

## Results and Discussion

Data on the 60 subjects included in this study, who all had conotruncal heart defects of unknown cause and whose DNA was analyzed via whole-genome array-CGH, are presented in Table 1. We determined that 36 of the 60 subjects were born with TOF, 22 were born with TGA, and 2 were born with truncus arteriosus. Of the 60 subjects, 35 (58.3%) were male and 25 (41.7%) were female. The ages of the subjects ranged from 22 days to 33 years at the time of blood collection (mean 8.2 years; standard deviation 4.0 years), and 51 (85%) of them were infants. We identified 23/60 (38.3%) cases with DNA CNVs. Overall, microdeletions were verified in 14/60 (23.3%) cases, and microduplications were verified in 9/60 (15%) cases. A total of 10/60 (16.6%) subjects were identified as having significant genomic imbalances; we identified clinically significant chromosomal imbalances or causal CNVs in 5/10 (50%) of these cases. Phenotypically, 8/10 (80%) subjects were identified as having TOF, and 2/10 (20%) individuals had TGA. The details of the array-CGH results from the cases with relevant genomic imbalances (causal and/or variant of uncertain significance) are summarized in Table 2.

Using array-CGH, we identified seven microdeletions (1p36.33-p36.32;1q21.1-q21.2;7p22.3-p22.1;7q11.22 ;22q11.2 and 2 cases with 7q31.1) and three microduplications (1p35.1-p34; 6q25.2 and 16p11.2). Of these ten potentially meaningful CNVs, the deletions were classified as causal or potentially causal in 4 cases (268, 108, 376 and 58) and as VOUS in 3 cases (126, 360 and 49). The duplications were classified as causal in 1 case (269) and as

VOUS in 2 cases (56 and 137). Variants that are not recurrently found in normal individuals were considered causal when they contained dosage-sensitive genes whose loss-of-function mutations are known to cause syndromic or non-syndromic conotruncal heart defects or genes that cause recessive forms of CHD. Examples of graphical overviews of the array-CGH data are shown in Figures 1 and 2.

Among the 8 subjects with TOF who also had detectable genomic imbalances, 2 cases (268 and 58) exhibited clinically significant microdeletions that coincided with the well-described 1p36 deletion syndrome [OMIM:607872] and with 22q11.2 deletion syndrome [OMIM #188400/#192430, 2007], respectively. In these two cases with CNVs associated with well-defined genetic disorders, the genomic imbalances could have been previously diagnosed by e.g. fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis (using locus-specific probes for the critical chromosome region) or multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis using markers within the critical segments, if the clinical findings at the time of referral were indicative of a particular microdeletion syndrome that could inform exactly which region(s) and/or chromosome(s) to investigate. However, both samples were from subjects in whom neither FISH or MLPA analysis were previously performed. Because there are several genomic imbalances that are associated with types of syndromic CHD whose causal genes have not yet been identified, it is necessary to first look for known chromosomal syndromes that have previously been described. The phenotypic characteristics of well-defined microdeletion/microduplication syndromes associated with conotruncal heart defects can often be clinically detected before the causal microdeletions are identified [31]. However, the clinical evaluation of individuals with such syndromes continues to challenge clinicians and requires a high degree of experience and expertise. Although some diagnostic steps are highly standardized (for example, database searches, clinical utility gene cards, and standard clinical scores), others are not suitable for standardization. Moreover, the diagnosis of microdeletion/microduplication syndromes using only clinical assessment may be difficult because of the great variability in the symptoms, especially relative to the size of the genomic imbalance and the expertise of the clinician [32]. In contrast to single gene disorders, contiguous gene deletions (which are often associated with CHD), and especially those resulting in developmental delays, intellectual disabilities or congenital developmental abnormalities, are caused by submicroscopic chromosomal rearrangements that encompass several genes; generally, at least two of these genes are dosage-sensitive but functionally unrelated [33]. There are also syndromes that do not become distinct until a certain age, at which time a particular behavior or clinical

manifestation presents. Because of the growing number of recognized genetic syndromes and chromosome abnormalities, and because of the overlapping clinical characteristics of these syndromes, it is becoming increasingly difficult to use only a clinical examination to determine exactly which syndrome affects an individual with syndromic CHD. In syndromes with CHD as part of the clinical spectrum, conotruncal heart defects are often the first symptoms to appear [34].

An additional 3 subjects with TOF showed imbalances involving a 1.15-Mb deletion in the chromosome 1q21.1-q21.2 region (case 128), a 4.56-Mb deletion in the 7p22.3-p22.1 region that could be associated with a chromosomal syndrome (case 376), and a 0.52-Mb duplication in the chromosome 16p11.2 region (case 269). Soemedi et al. [34] examined the 1q21.1 locus in 948 patients with TOF, 1,488 patients with other forms of CHD and 6,760 ethnically matched controls using SNP genotyping arrays (Illumina 660W and Affymetrix 6.0) and multiplex ligation-dependent probe amplification. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 have been associated with variable phenotypes that exhibit incomplete penetrance, including CHD. The authors found that duplication of 1q21.1 was more common in TOF cases than in controls, whereas deletion was not. By contrast, deletion of 1q21.1 was more common in cases of non-TOF CHD than in controls, whereas duplication was not. These findings show that duplications and deletions at chromosome 1q21.1 exhibit a degree of phenotypic specificity in CHD, and they implicate the *GJA5* gene, which is within the approximately 1-Mb critical region, as the gene responsible for the CHD phenotypes that result from copy number imbalances at this locus. Surprisingly, our findings revealed a novel association between a deletion at the 1q21.1 region, including the *GJA5* gene, and TOF in one case (108). Additional phenotypic details and molecular assessments within the critical region of this subject may better define the relationship between the deletion in 1q21 and TOF in this single case.

The 16p11.2 CNV (breakpoint 4–5, BP4-BP5, 29.6-30.2Mb- Hg19) was identified in case 269, and its phenotypes are characterized by both reciprocal and overlapping deficits that include energy imbalance, language impairment, autism spectrum disorder (ASD) and schizophrenia (SZ). The 16p11.2 deletion includes the region known as the “16p11.2 autism susceptibility locus” (<http://omim.org/entry/611913>). This deletion includes here approximately 33 genes, from *LOC388242* to *MAPK3*. Three of the 33 genes are recorded in OMIM as disease causing, namely: *KIF22*, *PRRT2* and *ALDOA*. But, the included gene *KCTD13* may also be relevant, as likely candidate for Autism Spectrum Disorder (ASD) phenotype. Malformations or major medical problems can be present in 16p11.2 deletions,



however, no specific recurrent mal-formation sequence or multisystemic involvement is observed [35]. Both 16p11.2 deletion and duplication are associated with ASD, whereas only the duplication is enriched in schizophrenic cohorts. Furthermore, multiple congenital anomalies (MCAs) can be caused by recombination between homologous segmental duplications, leading to microdeletions including 16p11.2.

Ghebranious et al. [36] described a novel de novo microdeletion at 16p11.2 in male monozygotic twins who presented with aortic valve abnormalities, seizure disorder, and mild mental retardation. Using array-based comparative genomic hybridization, these authors mapped the microdeletion to the short arm of chromosome 16 at 16p11.2 and refined it using hemizyosity mapping to a region of approximately 0.59 Mb that overlaps with 24 genes. Based on the phenotypes in which the twins presented, and based on what is known about the genes within the 16p11.2 microdeletion, the authors identified genes that are likely to be involved in the normal development of the aortic valve, as well as the development of seizure disorders and mental retardation. They postulated that the most probable mechanism for this genetic anomaly is through intrachromosomal recombination between the two 16 homologous, 147 kb segmental duplications. Moreover, they speculate that the HIRA interacting protein 3 (*HIRIP3*) is a candidate gene for aortic stenosis and the seizure related six homolog (mouse)-like 2 isoform (*SEZ6L2*) gene and/ or the quinolinate phosphoribosyl transferase (*QPRT*) gene for the seizure disorder. Puvabanditsin et al. [37] used array-CGH to map a deletion of chromosome 16p11.2 that is associated with endocardial fibroelastosis (EFE) in a female infant who died at 3.5 hours of age, and their analysis revealed an 8-oligonucleotide deletion of 0.55 Mb within 16p11.2. The authors reported the first case of congenital primary endocardial fibroelastosis, a rare and poorly understood disease of the endomyocardium, associated with a previously described microdeletion at 16p11.2. To the best of our knowledge, no duplication of 16p11.2 (29.6-30.2Mb- Hg19) has yet been associated with isolated TOF. The case identified in our study (269) is an infant, and it is expected that clinical follow-up will yield additional phenotypic details that will better define the relationship between phenotype and the genotype at the 16p11.2 critical region.

The other 3 cases of TOF (56, 137 and 360) showed CNVs at 1p35.1-p34.3, 6q25.2 and 7q31.1, respectively. In the 2 subjects with TGA (49 and 126), we found an interstitial deletion at 7q31.1 and an interstitial deletion at 7q11.21, respectively. These CNVs were classified as variants of unknown significance because they did not affect genes or regions known to be involved in CHD. The clinical relevance of these 5 CNVs among the 10 cases with potentially meaningful genomic imbalances remains uncertain at present, as there is

insufficient evidence to determine if the CNVs are related to CHD. Indeed, it can be challenging to determine whether a CNV without a record of clinical importance causes birth defects. We should also consider the possibility that the CNV may have been inherited from a healthy parent; in this case, the CNV could be a pathogenic variant with incomplete penetrance or a benign familial variation. The highly variable nature of the genome means that care must be taken in assigning pathogenicity to CNVs detected via array-CGH. Parental studies on the CNVs classified as VOUS in this study may enable clinical interpretation and provide valuable information for genetic counseling and the management of disease outcomes. The recurrence risk for many CHDs ranges from 2-6%, although this risk increases significantly when the parents are balanced carriers of genomic imbalances [38].

Indeed, it is important to report data on genomic imbalances whose clinical significance is unclear because some of the data may represent recurrent CNVs that could be associated with CHD. Reports of subjects with similar genomic imbalances, as well as clinical findings, may also lead to the identification of newly recognized genomic disorders or candidate genes associated with congenital heart defects [19,23,38,40-43]. However, as the number of recognized CHDs associated with genetic syndromes and chromosomal abnormalities grows, and as the clinical characteristics of those syndromes overlap, it will be more difficult to infer precisely which genomic imbalances are associated with heart defects.

This study reports the detection of benign CNVs in genomic regions that consistently harbor common variants. Overall, polymorphic copy number changes were detected in 13 of 60 subjects (21.6%). Of those polymorphisms, we identified seven deletions involving the 5q11.2, 8p11.2 and 10q26.3 chromosome regions and six duplications involving the 7p21.2, 14q32.33, 15q11.2, Xp11.23 and Xq27.2 chromosome regions. Therefore, these variants are unlikely to contribute to the cardiac phenotypes of these individuals.

The detection of common and rare CNVs has generated questions concerning the phenotypic effects of CNVs in CHD and its recurrence risk [44-46]. CNVs represent an important source of genetic variation and have been described as major contributors to phenotypic diversity and disease [47-51]. Recurrent CNVs can occur in both patients and healthy individuals, and frequently, more than one unique CNV is identified in a patient. In the presence of other CNVs or SNPs, a given change in copy number with a high pathogenic penetrance might reduce or aggravate the clinical phenotype. For example, Girirajan et al. [52] demonstrated that, as a single event, the 16p11.2 microdeletion predisposes individuals to neuropsychiatric phenotypes, and in association with other large deletions or duplications, it aggravates neurodevelopmental phenotypes.

Currently, the molecular detection of large numbers of CNVs in individuals with CHD as well as healthy individuals is prone to diagnostic pitfalls due to difficulties in interpretation [53]. Most chromosomal abnormalities have clinical effects; however, with the increasing resolution of genomic analysis, the number of instances of benign genomic imbalances has also increased. On a chromosomal or molecular genetic level, CNVs can be expected in every individual [54]. Thus, the identification of variants of unknown clinical significance is expected to increase significantly, particularly as many individuals now have their entire genomes sequenced [55, 56]. Indeed, segmental chromosome regions that might be present in the genome in variable numbers without phenotypic consequences are constantly being identified [57]. Although common strategies have been proposed to help interpret the findings of genomic imbalances associated with CHD [53], there are no universal criteria thus far. Thus, it is essential to have the most accurate and up-to-date information on the clinical significance of known genomic imbalances and CNVs, pathogenic mutations, polymorphisms and non-genetic factors that may lead to congenital heart defects. However, caution must be taken in interpreting array-CGH results as they relate to CHD. The individuals with conotruncal heart defects who were included in our study were referred to a regional cardiology referral center. Unless a geneticist saw them as outpatients, further consultations at genetics clinics and extended analysis of family members may be necessary to provide accurate clinical examinations, genetic counseling and calculation of the recurrence risk.

Ours and other studies have shown that an array-CGH approach can be successfully used to detect genomic imbalances in individuals with syndromic and non-syndromic conotruncal heart defects [19, 23, 25, 38-41, 43, 58]. Overall, array-based genomic investigations have been shown to detect genomic imbalances in between 4 and 27% of syndromic and non-syndromic CHD cases referred for analysis [23, 38-43, 58]. Our study identified causal or unclassified CNVs in 16.6% (10/60) of cases, which is similar to the range reported in previous studies. Differences in this range between studies may reflect differences in the resolution of the array platforms used, the number of cases included, the criteria used for patient selection and the interpretation of the relevance of the identified CNVs. Although genome-wide screening for deletions and duplications using array-CGH is a powerful research tool, the frequency of detectable causal CNVs related to conotruncal heart defects depends on the quality of the phenotyping, the local practice and the availability of funding. For example, in this study, we should consider the subjects' limited access to

appropriate clinical genetic diagnosis and care, which is the case in most regions in low- and middle-income countries [59].

Most CNVs are deletions or duplications that arise *de novo* as either unique or recurrent events [24]. One limitation of this study was the inability to distinguish *de novo* and inherited genomic imbalances due to the unavailability of parental DNA. *De novo* CNVs in clinically significant regions of the genome are more likely to be CHD-causative. However, inherited CNVs in known pathogenic regions should not be excluded as causes of congenital heart defects because of the possibility of variable expression and incomplete penetrance within families. Causal CNVs may be inherited from an apparently normal parent and contribute to the abnormal phenotype of the child. These types of CNVs are thought of as susceptibility loci because they increase the chance of a child developing congenital anomalies but may not be sufficient to cause a phenotype themselves. To determine if the CNV findings reported here represent CNVs that arose *de novo* or were inherited, family studies should be recommended for individuals with CHD for whom clinically significant findings were reported.

To date, one critical goal of genetic analysis has been to distinguish benign genomic imbalances from similar-looking causal imbalances associated with CHD. To facilitate the interpretation and analysis of information obtained using cytogenomic approaches, public databases have been developed and are constantly being updated. Nevertheless, many genomic imbalances are novel or extremely rare, making their interpretation problematic and uncertain. Thus, further cytogenomic screening of large CHD patient cohorts with common phenotypic features will contribute to the ongoing development of genotypic-phenotypic correlations, identifying CNVs in dosage-sensitivity genes and defining their locations in the human genome. The technology used to study genomic imbalances has also rapidly expanded [60], and the number of copy number changes and genomic rearrangements in the human genome are likely unlimited. Therefore, comprehensively collecting, organizing and maintaining raw genotypic and phenotypic data on CHD [18] through various approaches represents a major challenge. To improve the scientific knowledge and medical care related to CHD, national, regional and international guidelines on data interpretation and clinical management should be implemented to improve expertise and experience in laboratory and clinical praxis.

Of the 60 analyzed subjects, there were 28 (46.6%) whose diagnosis of conotruncal heart defects was associated with other clinical problems, including developmental delays, dysmorphisms, and congenital malformations. Therefore, the other 32 subjects could be

described as having isolated conotruncal heart defects, and of those, 5 (15.6%) presented abnormalities that were detected by array-CGH (cases 49, 58, 108, 137 and 269) (Table 2). We believe that the subjects' limited access to appropriate genetic diagnosis and care in our region could have had an influence on this frequency. Thus, we should not exclude the alternate possibility of inaccurate phenotyping in the cases of isolated conotruncal heart defects, as it is possible that other clinical problems, especially those related to minor congenital anomalies, were not identified. Furthermore, one weakness of our retrospective study is the limited clinical information available. We retrieved the clinical information for each subject from the hospital records of their initial referral. Most of the data were recorded at the time of the first cardiological evaluation and were therefore preliminary. Although the clinical presentation of causal abnormalities such as 1q21.1 deletion and 16p11.2 duplication, which were detected in our study, can be extremely variable, we should not exclude the possibility that a subsequent detailed physical examination might detect the presence of subtle phenotypic changes that were not evident at the first examination. CNV detection combined with precision phenotyping may lead to an increased molecular understanding of etiological pathways in these cases.

As in Erdogan et al. [23] and Hightower et al. [43], considering the wide range of observable CHDs, the number of conotruncal heart defects analyzed in our study was relatively small. Moreover, we should consider the selection bias of these studies, as individuals who may have been diagnosed by other means, such as fluorescence in situ hybridization or multiplex ligation-dependent probe amplification [27], were not included. Therefore, individuals with deletions in the 22q11.2 locus, which is recognized as being a frequent genetic cause of CHD, were removed from these studies. Nevertheless, we consider the cohort from our study to be representative of individuals with conotruncal heart defects. Our study also demonstrated the feasibility and usefulness of array-CGH analysis to identify copy number changes from subjects with congenital conotruncal heart defects of unknown cause. It was shown that 16.6% (10/60) of subjects possessed causal or unclassified genomic imbalances. Cytogenomic analysis allows professionals to detect genomic imbalances that are consistent with a clinical disorder, and in some cases, this analysis can be performed at an earlier age when only a few clinical findings are clear. Some of the cases presented in our study represent the "diagnostic odyssey" faced by families, with a conclusive diagnosis being reached only after a genomic evaluation is performed. The management of CHD can be greatly affected by an early diagnosis, and it may also permit improvement in genetic counseling for adults affected by CHD who are contemplating reproductive choices.

## **Conclusions**

In conclusion, although the interpretation of the results must be refined, and although there is not yet a consensus regarding which types of CHD would benefit from using cytogenomic analysis as a first-line test, the identification of copy number changes in subjects with conotruncal congenital heart defects can potentially assist in the evaluation and management of this condition. The use of retrospective or prospective array-CGH as a diagnostic tool would benefit families by providing a more accurate diagnosis and would affect overall disease management in a significant number of cases. Furthermore, the results of such studies emphasize the growing importance of the use of genome-wide assays to identify CNVs in subjects with CHD, thereby increasing the number of genomic data sets associated with this condition.

## **Conflicts of Interest**

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, grant 476783/2013-5) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil, grant 01/2013) for financial support.

## References

1. M. D. Reller, M. J. Strickland, T. Riehle-Colarusso et al., "Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta 1998-2005," *Journal of Pediatrics*, vol. 153, no. 6, pp. 807-813, 2008.
2. L. F. Amorim, C. A. Pires, A. M. Lana et al., "Presentation of congenital heart disease diagnosed at birth: analysis of 29,770 newborn infants," *Jornal de Pediatria*, vol. 84, no. 1, pp. 83-90, 2008.
3. J. J. Lee and D. Kang, "Feasibility of electron beam tomography in diagnosis of congenital heart disease: comparison with echocardiography," *European Journal of Radiology*, vol. 38, no. 3, pp. 185-190, 2001.
4. A. Miller, T. Riehle-Colarusso, C. J. Alverson, J. L. Frías, and A. Correa, "Congenital heart defects and major structural noncardiac anomalies, Atlanta, Georgia, 1968 to 2005," *Journal of Pediatrics*, vol. 159, no. 1, pp. 70-78, 2011.
5. C. Ferencz, J. D. Rubin, R. J. McCarter et al., "Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington Infant Study," *American Journal of Epidemiology*, vol. 121, no. 1, pp. 31-36, 1985.
6. C. D. O'Malley, G. M. Shaw, C. R. Wasserman, and E. J. Lammer, "Epidemiologic characteristics of conotruncal heart defects in California, 1987-1988," *Teratology*, vol. 53, no. 6, pp. 374-377, 1996.
7. J. I. Hoffman and S. Kaplan, "The incidence of congenital heart disease," *Journal of American College of Cardiology*, vol. 19, no. 39, pp. 1890-1900, 2002.
8. British Heart Foundation Statistics Database, Available at (<https://www.bhf.org.uk/research/heart-statistics/>).

9. A.K. Ryan, J.A. Goodship, D.I. Wilson et al., "Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study," *Journal of Medical Genetics*, vol. 34, no. 10, pp. 798-804, 1997.
10. S.B. Freeman, L. F. Taft, K. J. Dooley et al., "Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 80, no. 3, pp. 213-217, 1998.
11. A.Wessel, R. Pankau, D. Kececioglu et al., "Three decades of follow-up of aortic and pulmonary vascular lesions in the Williams-Beuren syndrome," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 52, no. 3, pp. 297-301, 1994.
12. J. A. Harris, C. Francannet, P. Pradat, and E. Robert, "The epidemiology of cardiovascular defects, part 2: a study based on data from three large registries of congenital malformations," *Pediatric Cardiology*, vol. 24, no. 3, pp. 222-235, 2003.
13. P. Pradat, C. Francannet, J. A. Harris, and E. Robert, "The epidemiology of cardiovascular defects, part I: a study based on data from three large registries of congenital malformations," *Pediatric Cardiology*, vol. 24, no. 3, pp. 195-221, 2003.
14. K. J. Jenkins, A. Correa, J. A. Feinstein 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: endorsed by the American Academy of Pediatrics," *Circulation*, vol. 115, no. 23, 2995-3014, 2007.
15. E. J. Lammer, J. S. Chak, D. M. Iovannisci et al., "Chromosomal abnormalities among children born with conotruncal cardiac defects," *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, vol. 85, no. 1, pp. 30-35, 2009.
16. S. E. Harris, C. Cronk, L. D. Cassidy et al., "Exploring the environmental and genetic etiologies of congenital heart defects: the Wisconsin Pediatric Cardiac Registry," *Journal of Registry Management*, vol. 38, no. 1, pp. 24-29, 2011.



17. D. C. Bittel, S. Yu, H. Newkirk et al., "Refining the 22q11.2 deletion breakpoints in DiGeorge syndrome by aCGH," *Cytogenetics and Genome Research*, vol. 124, no. 2, pp. 113-120, 2009.
18. R. Barriot, J. Breckpot, B. Thienpont et al., "Collaboratively charting the gene-to-phenotype network of human congenital heart defects," *Genome Medicine*, vol. 2, no. 3, pp. 16, 2010.
19. R. Soemedi, A. Topf, I. J. Wilson et al., "Phenotype-specific effect of chromosome 1q21.1 rearrangements and GJA5 duplications in 2436 congenital heart disease patients and 6760 controls," *Human Molecular Genetics*, vol. 21, no. 7, pp. 1513-1520, 2012.
20. W. W. Cai, J. H. Mao, C. W. Chow et al., "Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays," *Nature Biotechnology*, vol. 20, no. 4, pp. 393-396, 2002.
21. D. G. Albertson and D. Pinkel, "Genomic microarrays in human genetic disease and cancer," *Human Molecular Genetics*, vol. 12, Suppl. 2, pp. R145–R152, 2003.
22. R. Hochstenbach, J. E. Buizer-Voskamp, J. A. Vorstman, and R. A. Ophoff, "Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research," *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 135, nos. 3–4, pp. 174-202, 2011.
23. F. Erdogan, L. A. Larsen, L. Zhang et al., "High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease," *Journal of Medical Genetics*, vol. 45, no. 11, pp. 704-709, 2008.
24. J. Breckpot, B. Thienpont, H. Peeters et al., "Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects," *Journal of Pediatrics*, vol. 156, no. 5, pp. 810-817, 2010.

25. K. Osoegawa, D. M. Iovannisci, B. Lin et al., "Identification of novel candidate gene loci and increased sex chromosome aneuploidy among infants with conotruncal heart defects," *American Journal of Medical Genetics. Part A*, vol. 164A, no. 2, pp. 397-406, 2014.
26. K. Osoegawa, K. Schultz, K. Yun et al., "Haploinsufficiency of insulin gene enhancer protein 1 (ISL1) is associated with d-transposition of the great arteries," *Molecular Genetics & Genome Medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 341-351, 2014.
27. J. Huber, V. C. Peres, A. L. de Castro et al., "Molecular screening for 22Q11.2 deletion syndrome in patients with congenital heart disease," *Pediatric Cardiology*, vol. 35, no. 8, pp. 1356-1362, 2014.
28. S. F. Vervoordeldonk, K. Doumaid, E. B. Remmerswaal et al., "Long-term detection of microchimaerism in peripheral blood after pretransplantation blood transfusion," *British Journal of Haematology*, vol. 102, no. 4, pp.1004–1009, 1998.
29. M. S. Fernandes, P. Ashton-Prolla, U. Matte, L. Meurer, A. Osvaldt, A. C. Bittelbrunn, et al, "The Hospital de Clinicas de Porto Alegre normative for the storage and use of human biological materials and their associated information in research: an interdisciplinary approach" *Revista HCPA*, vol. 30, pp. 169-179, 2010.
30. J. R. Vermeesch, C. Melotte, G. Froyen et al., "Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 53, no. 3, pp. 413-422, 2005.
31. M. Schinzel, A. Riegel, and Baumer, "Microdeletion syndromes," in *Nature Encyclopedia of the Human Genome*. Macmillan Publishers, London, 2003, pp. 950-954.
32. L. E. Dorfman, J. C. Leite, R. Giugliani, and M. Riegel, "Microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances," *Jornal de Pediatria*, vol. 91, no. 1, pp. 59-67, 2015.

33. L. E. Vissers and P. Stankiewicz, "Microdeletion and microduplication syndromes," *Methods in Molecular Biology*, vol. 838, pp. 29-75, 2012.
34. P. Agergaard, C. Olesen, J. R. Østergaard, M. Christiansen, and K. M. Sørensen, "The prevalence of chromosome 22q11.2 deletions in 2,478 children with cardiovascular malformations. A population-based study," *American Journal of Medical Genetics. Part A*, vol. 158A, no. 3, pp. 498–508, 2012.
35. A. M. Maillard, A. Ruef, F. Pizzagalli et al., "The 16p11.2 locus modulates brain structures common to autism, schizophrenia and obesity," *Molecular Psychiatry*, vol. 20, no. 1, pp. 140-147, 2015.
36. N. Ghebranious, P. F. Giampietro, F. P. Wesbrook, and S. H. Rezkalla, "A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation," *American Journal of Medical Genetics. Part A*, vol.143A, no. 13, pp. 1462-1471, 2007.
37. S. Puvabanditsin, M. S. Nagar, M. Joshi et al., "Microdeletion of 16p11.2 associated with endocardial fibroelastosis," *American Journal of Medical Genetics. Part A*, vol. 152A, no. 9, pp. 2383-2386, 2010.
38. A. A. Richards, L. J. Santos, H. A. Nichols et al., "Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease," *Pediatric Research*, vol. 64, no. 4, pp. 358-363, 2008.
39. S. C. Greenway, A. C. Pereira, J. C. Lin et al., "De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot," *Nature Genetics*, vol. 41, no. 8, pp. 931-935, 2009.
40. B. Thienpont, L. Mertens, T. de Ravel et al., "Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients," *European Heart Journal*, vol. 28, no. 22, pp. 2778-2784, 2007.

41. B. Thienpont, L. Zhang, A. V. Postma, et al., “Haploinsufficiency of TAB2 causes congenital heart defects in humans,” *American Journal of Human Genetics*, vol. 86, no. 6, pp. 839-849, 2010.
42. R. Soemedi, I. J. Wilson, J. Bentham, R. Darlay, A. Töpf, D. Zelenika, C. Cosgrove, K. Setchfield, C. Thornborough, J. Granados-Riveron, G. M. Blue, J. Breckpot, S. Hellens, S. Zwolinski, E. Glen, C. Mamasoula, T. J. Rahman, D. Hall, A. Rauch, K. Devriendt, M. Gewillig, J. O' Sullivan, D. S. Winlaw, F. Bu'Lock, J. D. Brook, S. Bhattacharya, M. Lathrop, M. Santibanez-Koref, H. J. Cordell, J. A. Goodship, B. D. Keavney “Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease” *American Journal of Human Genetics*, vol. 7;91(3), pp. 489-501, Sep 2012b.
43. H. B. Hightower, N. H. Robin, F. M. Mikhail, and N. Ambalavanan, “Array comparative genomic hybridisation testing in CHD,” *Cardiology in the Young*, vol. 8, pp. 1-18, 2014.
44. S. Girirajan, L. A. Rosenfeld, B. P. Coe et al., “Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants,” *New England Journal of Medicine*, vol. 367, no. 14, pp. 1321-1331, 2012.
45. J. R. Priest, S. Girirajan, T. H. Vu et al., “Rare copy number variants in isolated sporadic and syndromic atrioventricular septal defects,” *American Journal of Medical Genetics. Part A*, vol. 158A, no. 6, pp. 1279-1284, 2012.
46. P. M. Boone, I. M. Campbell, B. C. Baggett et al., “Deletions of recessive disease genes: CNV contribution to carrier states and disease-causing alleles,” *Genome Research*, vol. 23, no. 9, pp. 1383-1384, 2013.
47. S. Girirajan and E. E. Eichler, “Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders,” *Human Molecular Genetics*, vol. 19, no. R2, pp. R176–R187, 2010.

48. M. F. Arlt, A. C. Ozdemir, S. R. Birkeland et al., "Comparison of constitutional and replication stress-induced genome structural variation by SNP array and mate-pair sequencing," *Genetics*, vol. 187, no. 3, pp. 675-683, 2011.
49. G. M. Cooper, B. P. Coe, S. Girirajan S et al., "A copy number variation morbidity map of developmental delay," *Nature Genetics*, vol. 43, no. 9, pp. 838-846, 2011.
50. S. Girirajan, C. D. Campbell, and E. E. Eichler, "Human copy number variation and complex genetic disease," *Annual Review of Genetics*, vol. 45, pp. 203-226, 2011.
51. S. Girirajan, "Genomic disorders: complexity at multiple levels," *Genome Medicine*, vol. 5, nos. 5, pp. 43, 2013.
52. S. Girirajan and E.E. Eichler, "Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders," *Human Molecular Genetics*, vol. 19, no. R2, pp. R176-R187, 2010.
53. J. Breckpot, B. Thienpont, Y. Arens et al., "Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects," *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 135, no. 3-4, pp. 251-259, 2011.
54. G. R. Abecasis, A. Auton, L. D. Brooks, M. A. DePristo, R. M. Durbin, R. E. Handsaker, H. M. Kang, G. T. Marth, G. A. McVean, "1000 Genomes Project Consortium, An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes" *Nature*, vol. 491, pp. 56-65, 2012.
55. S. Bale, M. Devisscher, W. Van Criekinge et al., "MutaDATABASE: A centralized and standardized DNA variation database," *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 2, pp. 117-1188, 2011.
56. E. Palmer, H. Speirs, P. J. Taylor et al., "Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability," *American Journal of Medical Genetics Part A*, vol. 164, nos. 2, pp. 377-385, 2014.

57. T. Liehr, "Benign & pathological chromosomal imbalances. Microscopic and submicroscopic copy number variations (CNVs) in genetics and counseling," Elsevier, London, 2014, 232 pp.
58. X. Gong, X. Wu, X. Ma et al., "Microdeletion and microduplication analysis of Chinese conotruncal defects patients with targeted array comparative genomic hybridization" PLOS ONE, vol. 2, nos. 10, pp. e76314. 2013.
59. World Health Organization, "Report 2014," Available from: <http://www.who.int/>.
60. M. Riegel, "Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides," Genetics & Molecular Biology, vol. 37, Suppl. 1, pp. 194-209, 2014.

Table 1. Study subjects grouped according to the type of congenital heart defect and the male/female distribution (M:F).

Congenital heart defect	n (%)	M:F
Tetralogy of Fallot	36 (60)	21:15
Transposition of great arteries	22 (36.7)	14:8
<i>Truncus Arteriosus</i>	2 (3.3)	0:2
Total	60 (100)	35:25

Table 2. Details of the 10 relevant genomic imbalances detected in biorepository samples from 60 subjects with conotruncal heart defects using array-CGH.

Case	Gender/ age*	Del/ Dup	Chromosome Region	Genomic coordinates (hg 19)	Size (Mb)	Type of CNV	heart defect	Associated Clinical features
268	M/5 y	del	1p36.33-p36.32	852863-3800088	2.94	causal	TOF	prominent forehead, epicanthic folds, flat, broad and short nose, and downturned corners of the mouth
56	M/11 y	dup	1p35.1-p34.3	34174663-35055122	0.88	VOUS	TOF	CNS abnormalities
108	M/18 y	del	1q21.1-q21.2	146641601-147786706	1.15	causal	TOF	none
137	M/32 y	dup	6q25.2	153543129-154567984	1.0	VOUS	TOF	none
376	F/13 y	del	7p22.3-p22.1	707018-5270759	4.56	causal	TOF	hypertelorism,, epicanthic folds, micrognathia developmental delay
126	F/5 y	del	7q11.21	64691936-65070919	0.37	VOUS	TGA	minor dysmorphic facial features
360	M/2 y	del	7q31.1	110980176-111202026	0.22	VOUS	TOF	bilateral inguinal hernias
49	M/14 y	del	7q31.1	111201968-111304031	0.10	VOUS	TGA	none
269	F/2 y	dup	16p11.2	29673954-30197341	0.52	causal	TOF	none
58	M/3 y	del	22q11.21	18919942-21440514	2.5	causal	TOF	none

\*age at the time of blood collection; array-CGH, microarray-based comparative genomic hybridization; del, deletion; dup, duplication; CNS=central nervous system; CNV=copy number variant; M, male; F, female; VOUS, variant of uncertain significance;TGA= Transposition of the Great Arteries; TOF= Tetralogy of Fallot.



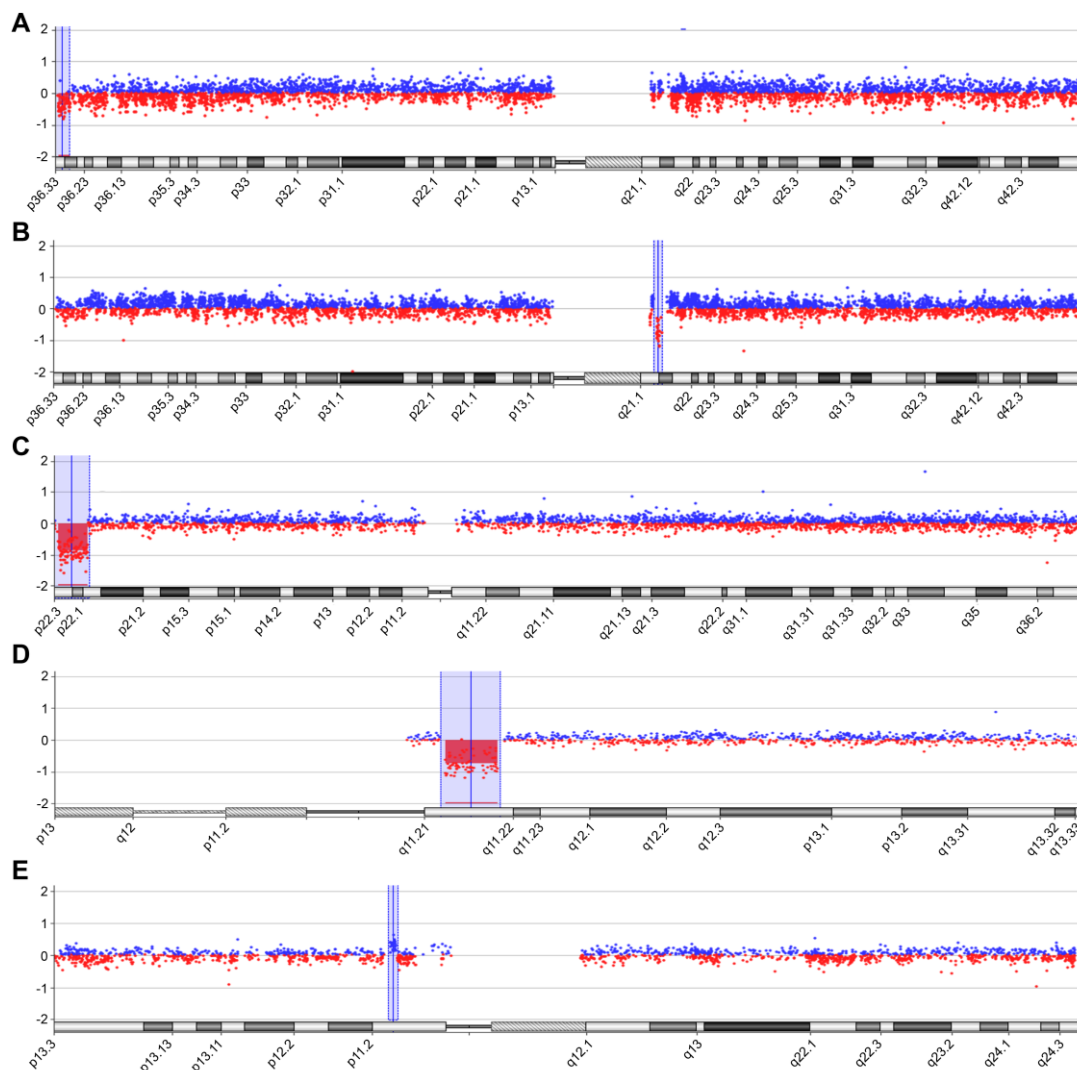


Figure 1. The array-CGH ratio profiles of the chromosomes from 5 subjects with pathogenic genomic imbalances using genomic DNA from the patients as a test (red) and DNA from normal subjects as a reference (blue). The test/reference ratio data for each chromosome are shown. Each dot represents a single probe (oligo) spotted on the array. The log ratio of the chromosome probes is plotted as a function of chromosomal position. A copy number loss shifts the ratio to the left (approximately  $-1x$ ); a copy number gain shifts the ratio to the right (approximately  $+1x$ ). The ideogram of each chromosome (left margin) shows the location of each probe. The probe log<sub>2</sub> ratios were plotted according to genomic coordinates (based on the UCSC Genome Browser, February 2009, NCBI Build 37 reference sequence). A: An approximately 2.94-Mb terminal deletion at chromosome 1p36.33-p36.32 (blue box) in case 268. B: An approximately 1.15-Mb interstitial deletion at chromosome 1q21.1-q21.2 (blue box) in case 108. C: An approximately 4.56-Mb terminal deletion at chromosome 7p22.3p22.1 (blue box) in case 376. D: An approximately 2.5-Mb interstitial deletion at chromosome 22q11.21 (blue box) in case 58. E: An approximately 0.52-Mb interstitial duplication at chromosome 16p11.2 (blue box) in case 269.

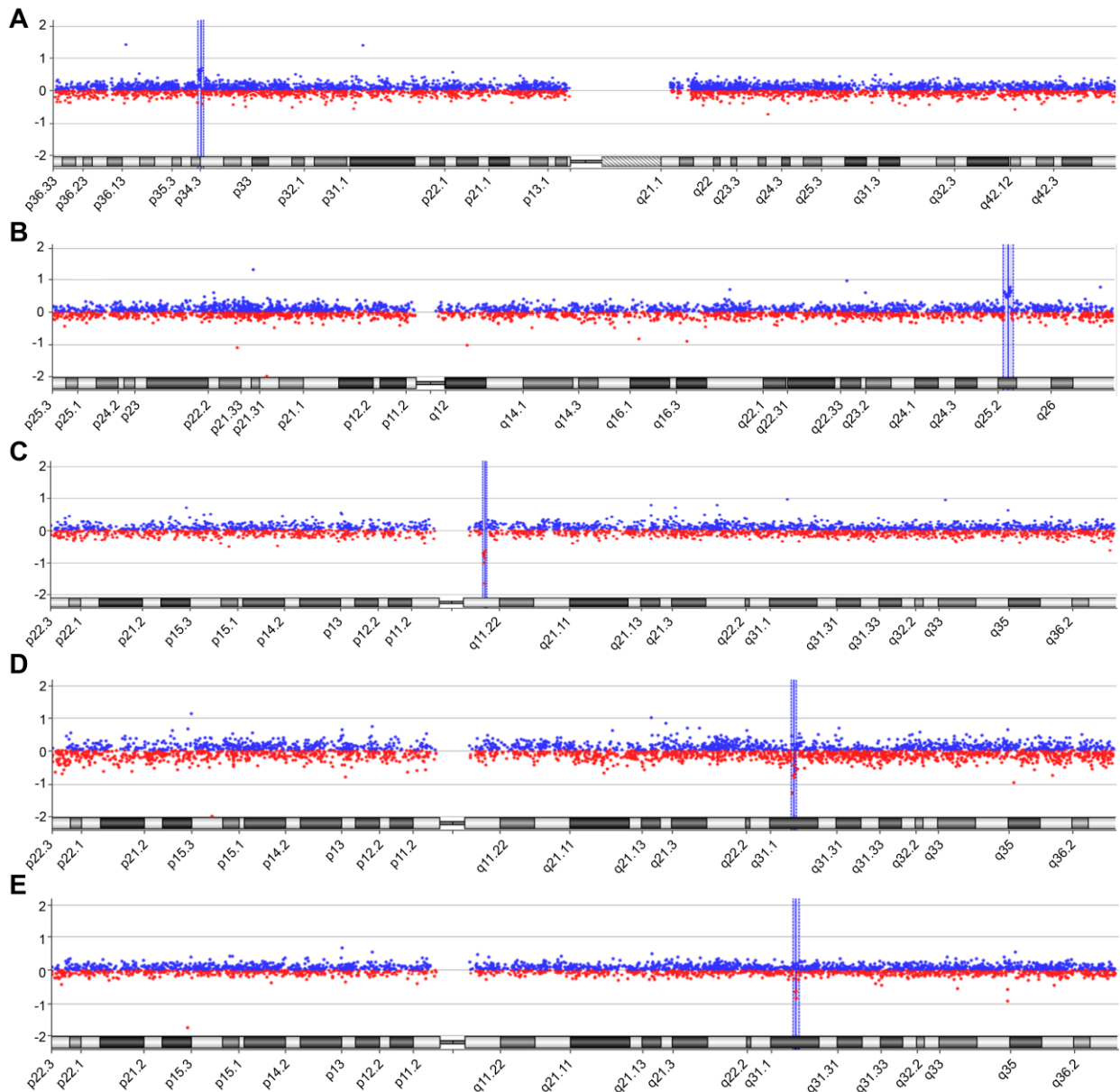


Figure 2. The array-CGH profiles of a series of variants of uncertain significance in several cases. A: An approximately 0.88-Mb duplication at chromosome 1p35.1-p34.3 (blue box) in case 56. B: An approximately 1.0-Mb duplication at chromosome 6q25.2 (blue box) in case 137. C: An approximately 0.37-Mb deletion at chromosome 7q11.21 (blue box) in case 126. D: An approximately 0.22-Mb deletion at chromosome 7q31.1 (blue box) in case 360. E: An approximately 0.10-Mb deletion at chromosome 7q31.1 (blue box) in case 49.

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS ADICIONAIS**

Caracterização citogenômica dos desequilíbrios genômicos identificados por array-CGH

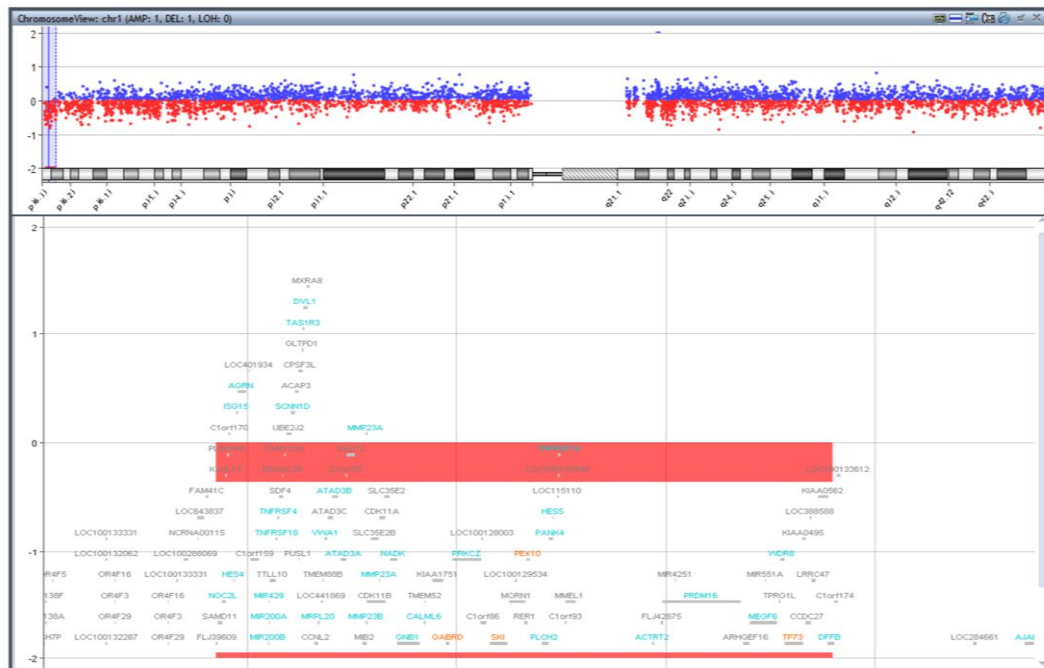
---

O desenvolvimento e a expansão da biologia molecular e das técnicas citogenéticas têm permitido a descrição de diversos tipos de variantes genômicas que contribuem para o

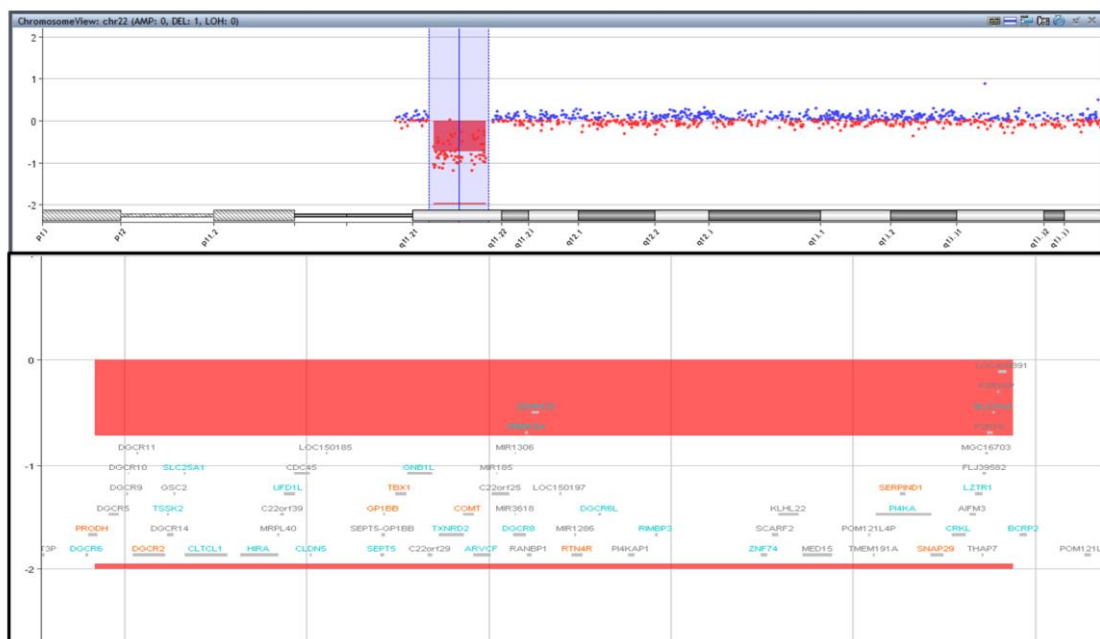
entendimento das doenças genômicas e das variações genotípicas normais na população. As variantes estruturais (SVs) dos genomas individuais resultam de rearranjos cromossômicos que afetam ao menos 50bp e incluem deleções e duplicações, inversões e translocações cromossômicas (Le Scouarnec & Gribble, 2012). A determinação precisa dos pontos de quebra e os limites das regiões envolvidas é fundamental para uma correlação genótipo-fenótipo precisa, e fornece informações sobre os mecanismos moleculares associados à origem dos rearranjos cromossômicos que levam a variantes genômicas estruturais.

A escolha das regiões incluídas na pesquisa de alterações cromossômicas ou genômicas define sua classificação em dois tipos: o array-CGH representativo do genoma inteiro e o direcionado para regiões específicas, geralmente envolvidas em rearranjos cromossômicos já descritos. Além da identificação das alterações cromossômicas detectáveis pela análise cromossômica convencional, a aplicação de array-CGH tem permitido a detecção da variação do número de cópias genômicas e a caracterização de rearranjos cromossômicos estruturais. A detecção e o mapeamento de alterações do número de cópias de certas regiões do genoma oferecem uma importante contribuição para a associação entre os defeitos moleculares encontrados e o fenótipo estudado. Assim, o método de array-CGH tem sido largamente empregado no rastreamento ao longo do genoma de alterações genômicas que podem representar a evidência inicial para a identificação de um ou mais genes associados às CCs.

A seguir, apresentamos a caracterização citogenômica das 10 regiões cromossômicas com desequilíbrios genômicos relevantes detectados por este estudo.



A



B

Figura 4.1. Representação dos segmentos cromossômicos alterados em 2 amostras de indivíduos com TOF e desequilíbrios genômicos classificados como patogênicos e associados a síndromes de genes contíguos. Imagem de array-CGH utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossomômico indica a posição cromossômica do segmento alterado. A barra horizontal (vermelha/~-1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) Acima, perfil de hibridização do cromossomo 1. Abaixo, representação gráfica dos genes da região alterada (em vermelho). array-CGH da amostra 268 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço curto do cromossomo 1p36.33-p36.32, de ~2.94 Mb de tamanho (chr1:852863-3800088) e, (B) Acima, perfil de hibridização do cromossomo 22. Abaixo, representação gráfica dos genes da região alterada (em vermelho). array-CGH da amostra 58 mostra uma deleção terminal de material genômico do braço longo do cromossomo 22q11.21, de ~2.5 Mb de tamanho (chr22: 18919942-21440514).



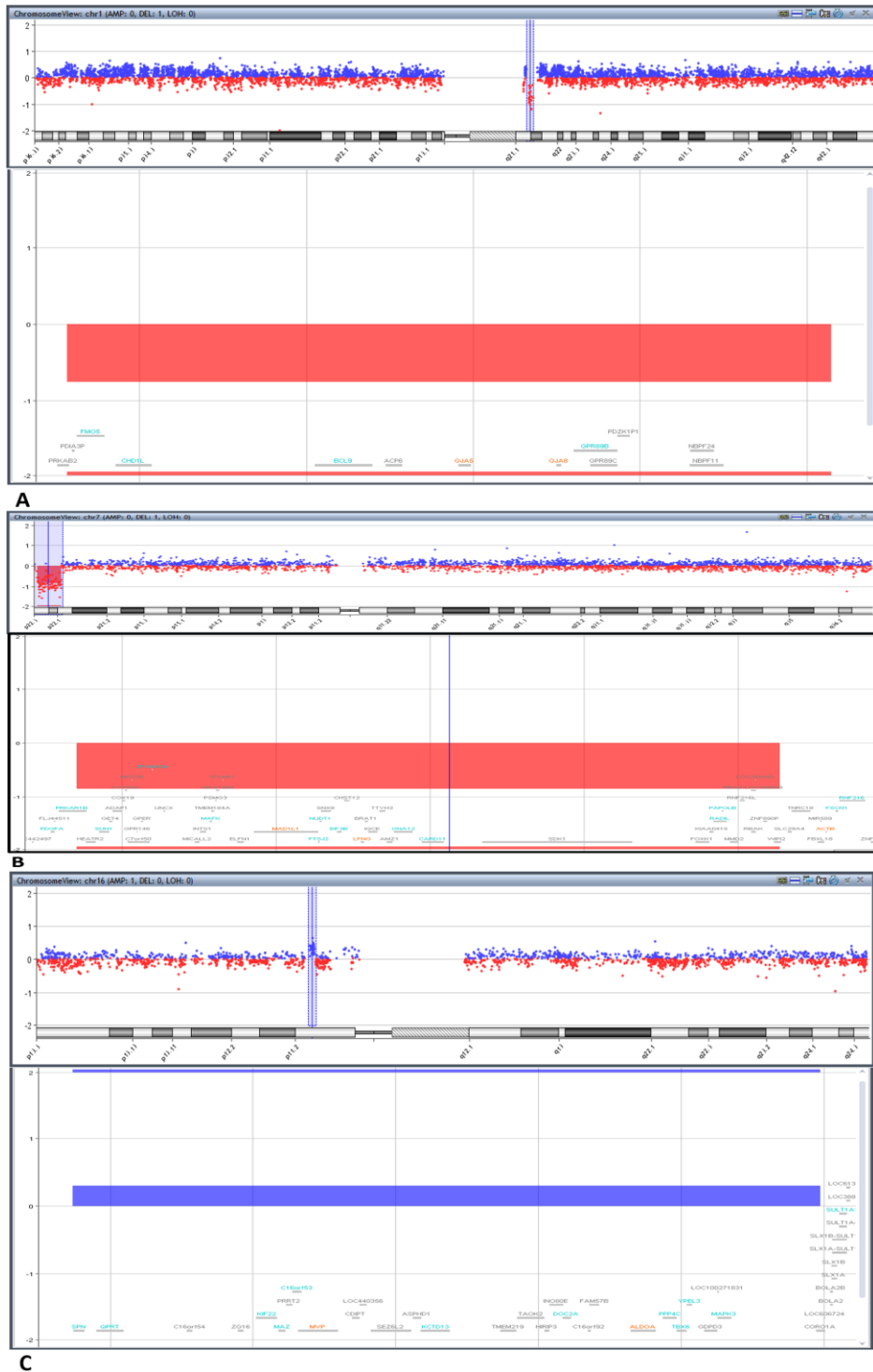
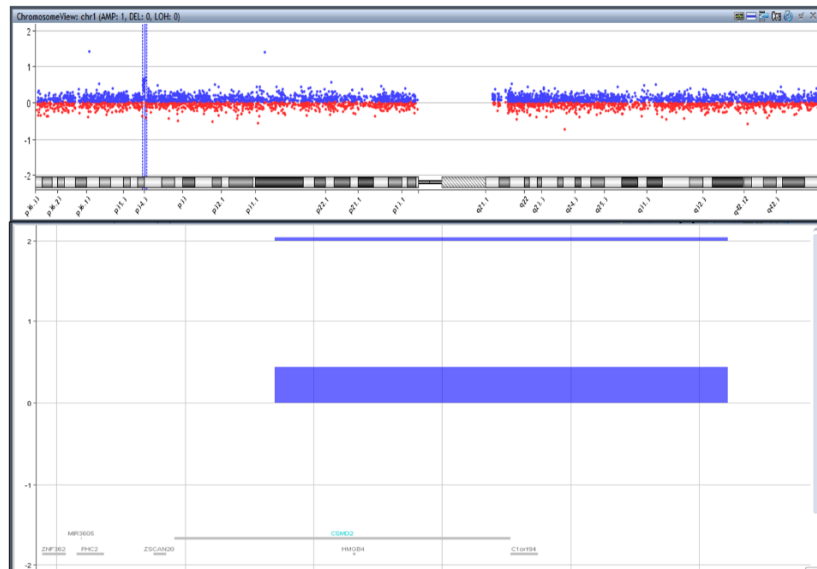
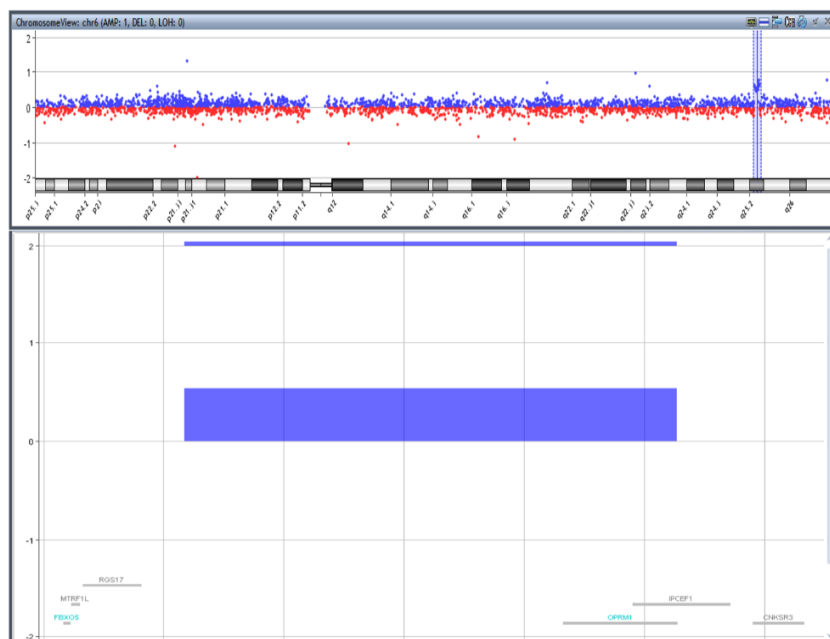


Figura 4.2. Representação de segmentos cromossômicos alterados detectados por array-CGH (8x60K, design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em 3 indivíduos com desequilíbrios genômicos classificados como patogênicos. Perfil cromossômico em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indica o segmento cromossômico alterado. A barra horizontal (em vermelho/ $\sim 1x$  ou azul/ $\sim +1x$ ) indica a posição genômica em desequilíbrio e os genes presentes. (A) array-CGH da amostra 108 mostra uma deleção intersticial do braço longo do cromossomo 1q21.1-q21.2, de  $\sim 1.15$  Mb de tamanho (chr1:146641601-147786706); (B) array-CGH da amostra 376 mostra uma deleção terminal do braço curto do cromossomo 7p22.3-p22.1, de  $\sim 4.56$  Mb de tamanho (chr7: 707018-5270759) e, (C) array-CGH da amostra 269 mostra uma duplicação intersticial do braço curto do cromossomo 16p11.2, de  $\sim 0.52$  Mb de tamanho (chr16: 29673954-30197341).



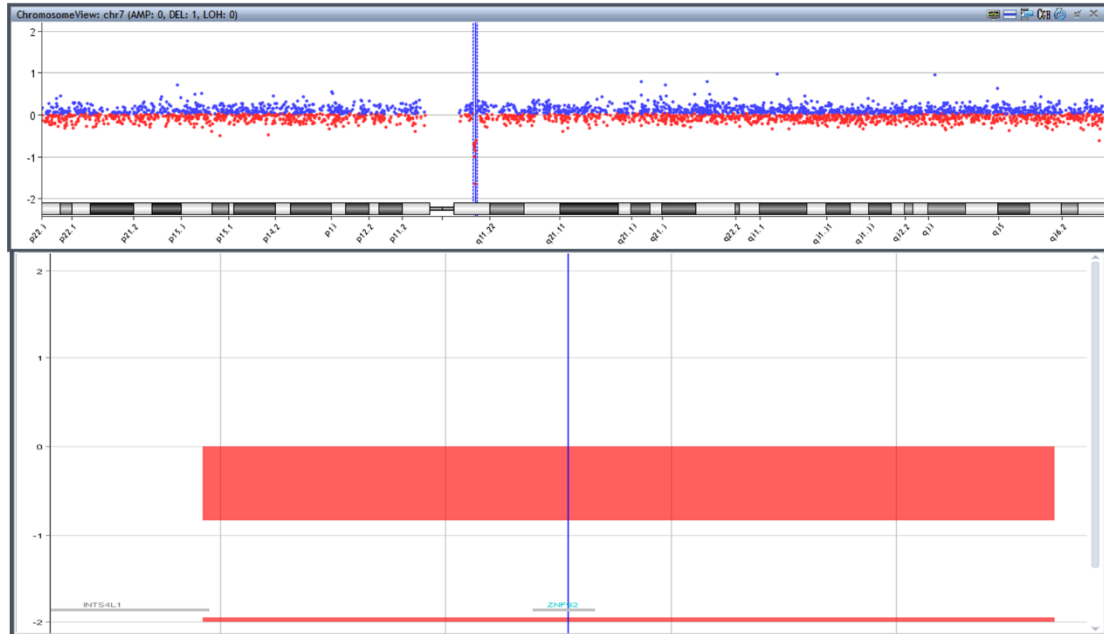
A



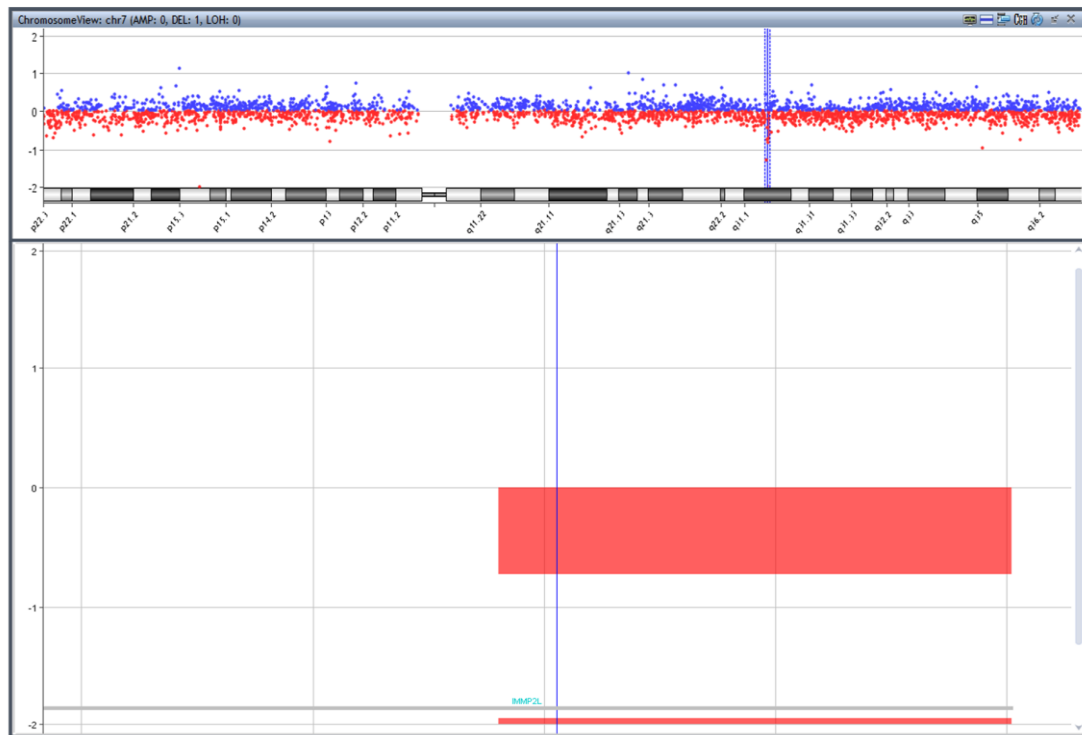
B

Figura 4.3. Representação dos segmentos cromossômicos em 2 indivíduos com TOF e desequilíbrios genômicos classificados como de significado incerto ou inconclusivo. Imagem de array-CGH utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossomômico mostra a posição genômica do segmento alterado detectado. A barra horizontal (em azul/ $\sim +1x$ ) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) array-CGH da amostra 56 mostra uma duplicação intersticial de material genômico do braço curto do cromossomo 1p35.1-p34.3, de  $\sim 0.88$  Mb de tamanho (chr1: 34174663-35055122) e, (B) array-CGH da amostra 137 mostra uma duplicação intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 6q25.2, de  $\sim 1.0$  Mb de tamanho (chr16:153543129-154567984).





A



B

Figura 4.4. Representação dos segmentos cromossômicos em 2 indivíduos com TGA e desequilíbrios genômicos classificados como de significado incerto ou inconclusivo. Imagem de array-CGH utilizando a plataforma 8x60 K (design 2521924, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) em amostras de DNA teste (pontos em azul) e controles (pontos em vermelho). Cada ponto representa uma sonda (oligonucleotídeo) localizada ao longo do cromossomo. A barra vertical em azul indicada no perfil cromossômico mostra a posição genômica do segmento alterado detectado. A barra horizontal (em vermelho/~-1x) na representação gráfica indica o segmento genômico alterado e genes relacionados com a plataforma utilizada. (A) array-CGH da amostra 126 mostra uma duplicação intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 7q11.21, de ~ 0.37 Mb de tamanho (chr7: 64691936-65070919) e, (B) array-CGH da amostra 49 mostra uma deleção intersticial de material genômico do braço longo do cromossomo 7q31.1, de ~ 0.22 Mb de tamanho (chr7:110980176-111202026).

Tabela 4.1. Caracterização citogenômica dos desequilíbrios genômicos significativos detectados por array-CGH em 10 amostras incluídas no estudo.

# Amostra: localização cromossômica: posição genômica Genes OMIM *	Doença e/ou função associada
<b>#IC-268: del1p36.33-p36.32: 852863- 3800088</b>	
<i>NOC2L</i> (Nucleolar Complex-Associated Protein 2, <i>S. cerevisiae</i> , Homolog of)	Age como inibidor de atividade de histone acetiltransferase. Previne acetilação de todas as histonas do núcleo. Envolvido na regulação de apoptose dependente de p53/Tp53.
<i>PERM1</i> (PPARGC1-and ESRR-Induced Regulator, Muscle, 1)	Regula a expressão seletiva dos genes alvo PPARGC1A/B e ESRRB/B/G com papéis no metabolismo de glicose e lipídios, transferência de energia, contratibilidade, biogênese de mitocôndrias musculares e capacidade oxidativa.
<i>HES4</i> (Hairy/enhancer of Split, <i>Drosophila</i> , Homolog of, 4)	Repressor transcricional.
<i>ISG15</i> (ISG15 Ubiquitin-Like Modifier)	Atua na resposta immune inata a infecções virais.
<i>AGRN</i> (Agrin)	Atua na formação e manutenção das junções neuromusculares e direciona eventos chave na diferenciação pós-sináptica. Envolvido na diferenciação de células endoteliais e modulação da sinalização de fatores de crescimento.
<i>MIR200B</i> (Micro RNA 200B)	Associado com fenótipo epithelial.
<i>MIR200A</i> (Micro RNA 200A)	Associado com fenótipo epithelial.
<i>MIR429</i> (Micro RNA 429)	Regula expressão de <i>Zeb1</i> (Zinc Finger e Box-Binding Homeobox 1) e <i>Zeb2</i> ((Zinc Finger e Box-Binding Homeobox 2) e controla transição de epitelial a mesenquimal.
<i>TNFRSF18</i> (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 18)	Atua nas interações entre linfócitos T ativados e células endoteliais e na regulação de morte celular mediada pelo receptor de células T.
<i>TNFRSF4</i> (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 4)	Receptor de TNFSF4/OX40L/GP34. Doenças associadas com TNFRSF4 incluem imunodeficiência.
<i>SDF4</i> (Stromal Cell-Derived Factor 4)	Regulação de atividades cálcio dependentes no lumen do retículo endoplasmático.
<i>B3GALT6</i> (UDP-Gal:Beta-Gal beta-1,3-Galactosyltransferase Polypeptide 6)	Doenças associadas com B3GALT6 incluem síndrome progeróide, displasia espondilometáfisia com frouxidão ligamentar tipo 1, com ou sem fraturas.
<i>SCNN1D</i> (Sodium Channel, Voltage-Gated, Type I, Delta Polypeptide)	Controla a reabsorção de sódio em rins, colon, pulmões e glândulas sudoríparas. Também atua na percepção de gostos.
<i>CPSF3L</i> (Cleavage and Polyadenylation-Specific Factor 3-Like)	-
<i>CPTP</i> (Ceramide-1-Phosphate Transfer Protein)	-
<i>TAS1R3</i> (Taste Receptor Type 1, Member 3)	Receptor de gosto putativo.
<i>DVLI</i> (Dishevelled 1)	Participa das vias de transdução de sinal mediadas por genes Wnt.
<i>AURKAIP1</i> (Aurora Kinase A-interacting Protein 1)	Pode agir como regulador negativo de aurora-A quinase.
<i>CCNL2</i> (Ciclin 2)	Regulador transcricional que participa na regulação de processos de splicing de pre-mRNA. Também modula a expressão de fatores apoptóticos críticos, levando à apoptose celular.
<i>MRPL20</i> (Mitochondrial Ribosomal Protein L20)	-
<i>VWAI</i> (von Willebrand Factor A Domain-Containing Protein 1)	Promove a montagem da matriz.
<i>ATAD3B</i> (ATPase Family, AAA Domain-Containing, Member 3B)	Pode atuar na rede de organização mitocondrial típica de células-tronco.
<i>ATAD3A</i> (ATPase Family, AAA Domain-Containing, Member 3A)	Essencial na rede de organização, metabolismo mitocondrial e crescimento celular a nível celular e de organismos.
<i>MIB2</i> (Mindbonb, <i>Drosophila</i> , Homolog of, 2)	Media ubiquitinação de receptors Delta.
<i>MMP23B</i> (Matrix metalloproteinase 23B)	-

---

Continuação tabela 4.1

<i>CDK11B (Cyclin-dependent kinase 11B)</i>	Atua na progressão do ciclo celular, citocinese e apoptose.
<i>MMP23A (Matrix metalloproteinase 23A)</i>	-
<i>CDK11A (Cyclin-dependent kinase 11A)</i>	Atua na progressão do ciclo celular, citocinese e apoptose.
<i>NADK (NAD Kinase)</i>	Cataliza síntese de NADP (nicotinamina-adenina-dinucleotídeo- fosfato) a partir de NAD (nicotina-adenina-dinucleotídeo) e ATP (adenosina tri-fosfato).
<i>GNB1 (Guanine Nucleotide-Binding Protein, Beta Polypeptide-1)</i>	Atua como modulador ou transdutor em vários sistemas de sinalização transmembrana.
<i>CALML6 (Calmodulin-Like 6)</i>	-
<i>GABRD (Gamma-aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Delta)</i>	Media inibição neuronal. Relação gene-fenótipo inclui susceptibilidade a epilepsia generalizada com convulsões febris tipo 5, susceptibilidade a epilepsia mioclônica juvenil e epilepsia idiopática.
<i>PRKCZ (Protein Kinase C, Zeta Form)</i>	Atua na ativação de NF-kappa-B, sinalização mitogênica, proliferação celular, polaridade celular, respostas inflamatórias e manutenção de potencial de longo termo.
<i>C1orf86 (Chromosome 1 open reading frame 86)</i>	Componente do complexo da Anemia de Fanconi (FA)
<i>SKI (Avian Sarcoma Viral (v-ski) Oncogene Homolog)</i>	Atua na diferenciação terminal de células musculares. Associação genótipo-fenótipo inclui síndrome de Shprintzen-Goldberg.
<i>PEX10 (Peroxisome Biogenesis Factor 10)</i>	Atua na biogênese de peroxissomos. Relação genótipo-fenótipo inclui distúrbio da biogênese de peroxissomos 6A e 6B.
<i>PLCH2 (Phospholipase C, eta 2)</i>	Alta atividade de fosfolipase C que é altamente sensível a concentração de íon cálcio.
<i>PANK4 (Pantothenate Kinase 4)</i>	-
<i>HES5</i>	Repressor transcricional de genes que requerem proteínas bHLH para sua transcrição. Tem papel importante como regulador negativo de neurogênese.
<i>TNFRSF14 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 14)</i>	Atua na ativação de linfócitos. Tem papel importante na patogenicidade de HSV ( <i>Herpes Simplex Virus</i> ).
<i>ACTRT2 (Actin-related Protein T2)</i>	-
<i>PRDM16 (PR Domain-Containing Protein 16)</i>	Funciona como regulador transcricional. Correlação genótipo-fenótipo inclui cardiomiopatia dilatada e não compactação de ventrículo esquerdo.
<i>MEGF6 (Multiple Epidermal Growth Factor-Like Domains 6)</i>	-
<i>MIR551A (Micro RNA 551A)</i>	-
<i>FAM79A (Family with Sequence Similarity 79, Member A)</i>	Efator de proteínas CAZ ( <i>cytometry of active zones</i> ) em sítios específicos de sinapses em vertebrados.
<i>WDR8 (WD Repeat-Containing Protein 8)</i>	-
<i>TP73 (p53-Related Protein p73)</i>	Participa na resposta apoptótica ao dano de DNA. Pode codificar proteína supressora de tumor. Associação genótipo-fenótipo inclui neuroblastoma.
<i>SMIM1 (Small Integral Membrane Protein 1)</i>	Regulador de formação de eritrócitos.
<i>DDFB (DNA Fragmentation Factor, 40kD, Beta Subunit)</i>	Induz fragmentação de DNA e condensação de cromatina durante apoptose.

---

---

Continuação tabela 4.1

**#IC-56: dup1p35.1-p34.3 : 34174663- 35055122**

<i>CSMD2 (Cub and Sushi multiple domains 2)</i>	-
<i>HMGB4 (High Mobility group Protein B4)</i>	Atua no processo de ligação do DNA.
<i>C1orf94 (chromosome 1 open read frame 94)</i>	Atua no processo de ligação à proteínas.

---

**#IC-108: del1q21.1q21.2: 146641601- 147786706**

<i>PRKAB2 (Protein Kinase, AMP-Activated, Noncatalytic, Beta-2)</i>	Reage a altas taxas de AMP/ATP (adenosina-monofosfato/adenosina- trifosfato) para regular negativamente vias biosintéticas.
<i>FMO5 (Flavin-Containing Monooxygenase 5)</i>	Atividade catalítica.
<i>CHD1L (Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 1-Like)</i>	Atua na remodelagem de cromatina pós danos ao DNA.
<i>BCL9 (B-cell CLL/Lymphoma-9)</i>	Atua na transdução de sinal pela via WNT. Promove atividade transcricional da beta catenina.
<i>ACP6 (Acid Phosphatase 6, Lisophosphatide)</i>	-
<i>GJA5 (Gap Junction Protein, Alpha-5, 40Kd)</i>	Doenças associadas com GJA5 incluem fibrilação atrial familiar relacionadas a GJA5 e paralisção atrial digênica.
<i>GJA8 (Gap Junction Membrane Channel Protein Alpha-8)</i>	Doenças associadas com GJA8 incluem síndrome de catarata da microcórnea e múltiplos tipos de catarata.
<i>GPR89B (G Protein-Coupled Receptor 89B)</i>	-
<i>NBPF8 (Neuroblastoma Breakpoint Family, Member 8)</i>	-
<i>NBPF11 (Neuroblastoma Breakpoint Family, Member 11)</i>	-
<i>GPR89B (G protein-coupled receptor 89B)</i>	Atividade em canal de íons voltage-ativados.
<i>GPR89C (G protein-coupled receptor 89C)</i>	Atividade em canal de íons voltage-ativados.
<i>PDZK1P1 (PDZ domain containing 1 pseudogene 1)</i>	-

---

**#IC-137: dup6q25.2 : 153543129- 154567984**

<i>OPRM1 (Opioid Receptor Mu-1)</i>	Receptor de opioides endógenos como endorfina e beta endorfina.
<i>IPCEF1 (Interaction protein for cytohesin exchange factors 1)</i>	Atividade de peroxidase e transportador de oxigênio.

---

**#IC-376: del7p22.3p22.1: 707018- 5270759**

<i>PRKAR1B (Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta)</i>	Subunidade reguladora da proteína quinase cAMP dependente envolvida em sinalização cAMP nas células.
<i>HEATR2 (HEAT repeat-containing protein 2)</i>	Correlação genótipo-fenótipo inclui discinesia ciliar primária. É essencial para pré-montagem ou estabilização de braços de dineína axonemal.
<i>SUN1 (SAD1 and UNC84 Domain-containing Protein 1)</i>	Necessário para migração nuclear intercinética e essencial para nucleocinese e acoplamento núcleo-centrossomo durante migração neuronal radial no córtex cerebral e durante migração glial. Ancora movimentos cromossômicos na prófase da meiose e está envolvido na expressão seletiva de genes de RNA codificante e não codificante necessários à gametogênese. Necessário para junção do telômero ao envelope nuclear e gametogênese. Auxilia a definir a distribuição de complexos de poros nucleares.
<i>GET4 (Golgi to ER traffic protein 4, S. cerevisiae, homolog of)</i>	Envolvido na entrega pós traducional de proteínas de membrana ancoradas pela cauda à membrana do retículo endoplasmático.
<i>ADAP1 (Centaurin, alpha-1)</i>	Proteína ativadora de GTPase para a família de fator de ribosilação de ADP.
<i>COX19 (Cytochrome c oxidase assembly protein Cox19)</i>	-
<i>CYP2W1 (Cytochrome P450, family 2, subfamily W, polypeptide 1)</i>	Atua na metabolização de ácido aracdônico.

---

Continuação tabela 4.1

<i>MIR339 (Micro RNA 339)</i>	-
<i>GPER1 (G protein-coupled estrogen receptor 1)</i>	Mobilização de cálcio intracelular no núcleo.
<i>ZFAND2A (Zinc finger AN1 domain-containing protein 2A)</i>	-
<i>INTS1 (Integrator complex subunit 1)</i>	Componente do complex integrador, um complex envolvido na transcrição de pequenos RNAs nucleares (snRNA) U1 e U2 e no processamento 3'-box-dependente.
<i>MAFK (V-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K)</i>	Atua como repressor transcricional quando dimeriza-se entre si.
<i>ELFN1 (Extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1)</i>	Inibe atividade fosfatase de PP1 (protein phosphatase 1).
<i>MAD1L1 (Mitotic arrest-deficient 1, yeast, homolog-like 1)</i>	Correlação genótipo fenótipo inclui linfoma somático e câncer de próstata somático. Componente da montagem dos locais de checkpoint que previne o início da anáfase até que os cromossomos estejam devidamente alinhados na placa metafásica.
<i>FTSJ2 (FTSJ, E. coli, homolog of, 2)</i>	-
<i>NUDT1 (Nudix-type motif 1)</i>	Antimutagênico. Atua como enzima sanitizante para piscinas de nucleotídeos oxidados, suprimindo disfunção celular e morte induzida por estresse oxidativo.
<i>SNX8 (Sorting Nexin 8)</i>	Atua no transporte intracelular de proteínas de endossomos primários à rede trans-Golgi.
<i>EIF3B (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B)</i>	-
<i>CHST12 (Carbohydrate sulfotransferase 12)</i>	Cataliza a transferência de sulfato para a posição 4 do resíduo N-acetilgalactosamina da condroitina e desulfatiza dermatan sulfato.
<i>LFNG (Lunatic Fringe)</i>	Correlação genótipo-fenótipo inclui disostose espongiolocal autossômica recessiva. Mediador de segmentação e padronização de somitos.
<i>BRAT1 (BRCA1-associated ATM activator 1)</i>	Correlação genótipo-fenótipo inclui rigidez neonatal letal e síndrome da convulsão multifocal. Necessária para ativação de <i>ATM (Ataxia Teleangiectasia Mutated Gene)</i> pós radiação ionizante. Pode atuar regulando desfosforilação de <i>ATM</i> .
<i>TTYH3 (Tweety, Drosophila, Homolog of, 3)</i>	Provável conductor de canal ativado de íon cálcio. Pode atuar na transdução de sinais de íon cálcio.
<i>AMZI (Archaelysin family metallopeptidase 1)</i>	Metaloprotease de zinco. Exibe atividade de aminopeptidase contra neurogranina <i>in vitro</i> . Não hidroliza angiotensina 2.
<i>GNA12 (Guanine nucleotide-binding protein, alpha-12)</i>	Atua como modulador outransdutor de vários sistemas de sinalização transmembrana. Pode atuar no controle da migração celular através da cascata de sinalização TOR ( <i>target of rapamycin</i> ).
<i>CARD11 (Caspase recruitment domain-containing protein 11)</i>	Correlação genótipo-fenótipo inclui imunodeficiência e linfocitose com células B policlonais persistentes. Envolvido na sinalização coestimulatória essencial para ativação de células T mediada por receptores de células T (TCR).
<i>SDK1 (Sidekick, Drosophila, Homolog of, 1)</i>	Proteína de adesão celular que guia terminais axonais à sinapses específicas em neurônios em desenvolvimento.
<i>AP5Z1 (Adaptor-related protein complex 5, zeta-1 subunit)</i>	Correlação genótipo-fenótipo inclui paraplegia espástica autossômica recessiva. Pode estar envolvido em transporte endossomal.
<i>RADIL (RAP GTPase interactor)</i>	Efector <i>downstream</i> de RAP ( <i>RAS related protein</i> ) necessária para adesão celular e migração de precursores de crista neural durante o desenvolvimento.
<i>PAPOLB (Poly(A) polymerase, beta)</i>	-
<i>MMD2 (Monocyte-to-macrophage differentiation-associated protein 2)</i>	-
<i>RBAK (RB-associated KRAB repressor)</i>	Atua na repressão da transcrição dependente de E2F.

Continuação tabela 4.1

<i>WIP12 (WD40 Repeat Protein Interacting with Phosphoinositides 2)</i>	-
<b>#IC-126: del7q11.21: 64691936- 65070919</b>	
<i>ZNF92 (Zinc finger protein-92)</i>	Atua na regulação transcricional.
<i>INSTR4L1 (Integrator complex subunit 4 pseudogene 1)</i>	-
<b>#IC-360: del7q31.1: 110980176- 110980176</b>	
<i>IMMP2L (Inner Mitochondrial Membrane Peptidase, Subunit 2, S. cerevisiae, Homolog of)</i>	Cataliza a remoção de peptídeos transitórios necessários para a marcação de proteínas da matriz mitocondrial, através da membrana interna, para o espaço inter-membranal.
<b>#IC-49: del7q31.1: 111201968- 111304031</b>	
<i>IMMP2L (Inner Mitochondrial Membrane Peptidase, Subunit 2, S. cerevisiae, Homolog of)</i>	Cataliza a remoção de peptídeos transitórios necessários para a marcação de proteínas da matriz mitocondrial, através da membrana interna, para o espaço inter-membranal.
<b>#IC-58: del22q11.21: 18919942- 21440514</b>	
<i>PRODH (Prolin Dehydrogenase 1)</i>	Hiperprolinemia tipo I. Susceptibilidade a esquizofrenia tipo 4.
<i>DGCR2 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 2)</i>	O gene DGCR2 codifica uma proteína putativa de receptor de adesão, a qual pode ter um papel na migração de células da crista neural, um processo que pode estar alterado na Síndrome de DiGeorge.
<i>DGCR14 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 14)</i>	Doenças associadas com DGCR14 incluem Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial.
<i>TSSK2 (Testis-specific Serine/Threonine Kinase 2)</i>	TSSK2 interage com TSKS. Recombinante solúvel TSSK2 fosforila TSKS e demonstra autofosforilação.
<i>GSC2 (Goosecoid Homeobox 2)</i>	O gene <i>GSC2 (Goosecoid Like)</i> contém um homeodomínio. O gene reside na região crítica para VCFS/DGS no cromossomo 22q11. Pode ter papel regulatório na sua própria transcrição.
<i>S</i>	
<i>LC25A1 (Solute Carrier Family 25- Mitochondrial Carrier, Citrate Transporter, Member 1)</i>	Regulação de integridade cromossômica.
<i>CLTCL1 (Clathrin, Heavy Polypeptide-like 1)</i>	Tráfego intracelular do transportador de glicose GLUT4 ( <i>Glucose transporter type 4</i> ) de compartimentos de armazenagem à membrana plasmática. Implicação na diabetes tipo 2.
<i>HIRA (Histone Cell Cycle Regulation Defective, S. Cerevisiae, Homolog of, A)</i>	Interação com fator de transcrição PAX3 (Paired Box Protein 3). É funcional em alguns aspectos do metabolismo da cromatina e de histonas.
<i>MRPL40 (Mitochondrial Ribosomal Protein L40)</i>	-
<i>UFD1L (Ubiquitin Fusion Degradation 1-Like)</i>	-
<i>CDC45L (Cell Division Cycle 45, S. Cerevisiae, Homolog-Like)</i>	Componente essencial da forquilha de replicação envolvida no desenrolamento do DNA durante a replicação.
<i>CLDN5 (Claudin 5)</i>	Aumenta permeabilidade celular.
<i>SEPT5 (Septin 5)</i>	Proteína relacionada com controle de divisão celular.
<i>GP1BB (Glycoprotein Ib, Platelet, Beta Polypeptide)</i>	Receptor do fator de Von Willebrand. Relação gene-fenótipo inclui Síndrome de Bernard-Soulier, tipo B, e distúrbio de plaquetas gigantes.
<i>TBX1 (T-BOX1)</i>	Provável regulador transcricional envolvido em processos de desenvolvimento. É necessário para o desenvolvimento normal das artérias do arco faríngeo. Correlação genótipo-fenótipo inclui face síndrômica de anomalias conotruncais, Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial e Tetralogia de Fallot.

---

Continuação tabela 4.1

<i>GNB1L</i> ( <i>Guanine Nucleotide-Binding Protein, Beta-1-Like</i> )	-
<i>TXNRD2</i> ( <i>Thioredoxin reductase 2</i> )	É uma tioredoxina reductase que pode reduzir proteínas diretamente, como a insulina.
<i>COMT</i> ( <i>Catechol-O-Methyltransferase</i> )	Atua na degradação metabólica de catecolaminas. Relação gene-fenótipo inclui susceptibilidade a síndrome do pânico e esquizofrenia.
<i>ARVCF</i> ( <i>Armadillo Repeat Gene Deleted in VCFS</i> )	Envolvido nas interações proteína-proteína nas junções aderentes.
<i>MIR185</i> ( <i>Micro RNA 185</i> )	Supressor de tradução ou induz degradação de mRNA.
<i>DGCR8</i> ( <i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i> )	Atua no silenciamento de auto-renovação de células-tronco embrionárias.
<i>TRMT2A</i> ( <i>tRNA methyltransferase 2, S. Cerevisiae, Homolog of A</i> )	Atua no metabolismo e/ou modificações de ácidos nucleicos.
<i>RANBP1</i> ( <i>RAN-Binding Protein 1</i> )	Relacionado com vias de sinalização intracelular as quais podem controlar o processo do ciclo celular regulando o transporte de proteínas e ácidos nucleicos através da membrana nuclear.
<i>ZDHHC8</i> ( <i>Zinc Finger DHHC Domain-Containing Protein 8</i> )	Palmitoiltransferase envolvida na transmissão glutamatérgica. Media palmitoilação de ABCA1 (ATP-binding Cassete Transporter).
<i>RTN4R</i> ( <i>Reticulon 4 Receptor</i> )	Media inibição de crescimento axonal. Pode ter um papel na regulação de regeneração axonal e plasticidade no sistema nervoso central adulto. Relação gene-fenótipo inclui susceptibilidade à esquizofrenia.
<i>DGCR6L</i> ( <i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 6-Like</i> )	Pode ter um papel na migração de células da crista neural para a terceira e quarta bolsas faríngeas.
<i>RIMBP3</i> ( <i>RIMS-Binding Protein 3</i> )	-
<i>ZNF74</i> ( <i>Zinc Finger Protein 74</i> )	Pode ter um papel no metabolismo do RNA.
<i>SCARF2</i> ( <i>Scavenger Receptor Class F, Member 2</i> )	Provável proteína de adesão que media interações homofílicas e heterofílicas. Relação gene-fenótipo inclui Síndrome de Van den Ende-Gupta.
<i>MED15</i> ( <i>Mediator Complex Subunit 15</i> )	Atua na transcrição regulada de quase todos os genes dependents de RNA polymerase II. Necessário para regulação do gene colesterol dependente.
<i>PI4KA</i> ( <i>Phosphatidylinositol 4-Kinase, Catalytic, Alpha</i> )	Atua no fosfatidilinositol no primeiro passo da produção do segundo mensageiro inositol-1,4,5,-trifosfato.
<i>HCF2</i> ( <i>Heparin Cofactor II</i> )	Correlação genótipo-fenótipo inclui trombofilia devido á deficiência de cofator II de heparina.
<i>SNAP29</i> ( <i>Synaptosomal-Associated Protein, 29Kd</i> )	Atua na autofagia através do controle direto da fusão de membranas de autofagossomos e lisossomos. Provavelmente envolvido em múltiplos passos de transporte de membrana. Correlação genótipo-fenótipo disgenesia cerebral, neuropatias, ictiose e síndrome do queratoderma palmoplantar.
<i>CRKL</i> ( <i>V-CRK Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like</i> )	CRKL é uma tirosina quinase e um oncogene. Deleção de CRKL resulta em diversos traços fenotípicos da Síndrome de DiGeorge. Pode mediar a transdução de sinais intracelulares.
<i>LZTR1</i> ( <i>Leucine-Zipper-Like Regulator-1</i> )	Provável regulador transcricional que tem papel crucial na embriogenese.
<i>THAP7</i> ( <i>THAP Domain Containing Protein 7</i> )	Associação à cromatina, proteína de supressão de transcrição por ligação à histonas.
<i>P2RX6</i> ( <i>Purinergic Receptor P2X-Like 1</i> )	Receptor de ATP que age como canal iônico de ligação.
<i>SLC7A4</i> ( <i>Solute Carrier Family 7, Member 4</i> )	Atua no transporte de aminoácidos catiônicos (arginina, lisina e ornitina).

---





**CAPÍTULO 5**  
**DISCUSSÃO**

---

Tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuem para a ocorrência de defeitos cardíacos congênitos, tornando complicada a elucidação dos mecanismos patogênicos. Esforços consideráveis têm sido feitos na busca de gene candidatos para cardiopatias síndrômicas e não síndrômicas por meio de array-CGH, mostrando ser este um método efetivo para isolar *loci* candidatos (Breckpot *et al.*, 2011).

O objetivo deste estudo foi de identificar, retrospectivamente, variação do número de cópias gênicas (CNVs) por meio da Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (array-CGH), em amostras de DNA de indivíduos com CCs conotruncais de etiologia desconhecida, armazenadas em biorrepositório. Além disso, este estudo visou a avaliar a contribuição do array-CGH como uma ferramenta diagnóstica de primeira linha em indivíduos com CCs, avaliados por um programa de monitoramento de um serviço público de referência em cardiologia no estado do Rio Grande do Sul.

O uso de tecnologia baseada em *microarrays* tem permitido detectar desequilíbrios patogênicos em aproximadamente 14-18% dos casos com atraso no desenvolvimento, déficit intelectual e/ou anomalias congênitas múltiplas, incluindo as CCs, referidos para análise (Hochstenbach *et al.*, 2011). Apesar de existir uma clara associação entre variação do número de cópias gênicas (CNVs) e anomalias congênitas, apenas poucos estudos de coorte em larga escala foram realizados com a utilização de array-CGH em amostras de indivíduos com CCs (Soemedi *et al.*, 2012; Osoegawa *et al.*, 2014a).

Até o momento, o estudo mais abrangente de rastreamento seletivo neonatal (realizado em uma população de base de 974.579 casos) com a utilização de análise por array-CGH em 389 recém-nascidos com CCs conotruncais (TOF ou TGA), mostrou uma taxa de 1,7% de recém nascidos do sexo masculino com defeito conotruncal e aneuploidia do cromossomo sexual (Osoegawa *et al.*, 2014a). O que representa uma taxa 7 vezes maior que a esperada (Morris *et al.*, 2008). Além disto os autores identificaram microdeleções e microduplicações consideradas clinicamente significativas em 2% (8/389) dos recém-nascidos.

Cerca de 15 a 20% dos pacientes com CCs apresentam etiologia conhecida, destacando-se as alterações cromossômicas identificadas por meio do cariótipo. Estas são comuns em indivíduos portadores de CCs síndrômicas, com frequência de 3 a 23% (Harris *et al.*, 2003; Lammer *et al.*, 2009; Van der Bom *et al.*, 2011; Blue *et al.*, 2012). Em nosso estudo, foram excluídas amostras com diagnóstico conhecido de doença genética ou alteração cromossômica detectada anteriormente por exame de cariótipo, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ou Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH)

(Huber *et al.*, 2010; Riegel *et al.*, 2015) bem como por alterações genômicas causais detectadas anteriormente (Emy Dorfman *et al.*, 2014). Uma maior taxa de alterações genômicas detectadas com o uso de array-CGH (Thienpont *et al.*, 2007; Erdogan *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2008; Greenway *et al.*, 2008; Thienpont *et al.*, 2010; Soemedi *et al.*, 2012; Osoegawa *et al.*, 2014a; Gong *et al.*, 2013; Hightower *et al.*, 2014) quando comparada com exames de citogenética clássica confirma a maior sensibilidade desse método também em nosso estudo. Entretanto, apesar de todos os avanços ocorridos nas últimas décadas na área da citogenética, o exame de cariótipo continua sendo uma ferramenta fundamental para se avaliarem pacientes com CC em conjunto com um exame físico dismorfológico minucioso.

Em nosso estudo, em 38.3% (23/60) das amostras foram identificados desequilíbrios genômicos. Em 16.6% (10/60) as CNVs foram classificadas como causais ou CNVs de significado clínico incerto (*VOUS*). CNVs patogênicas relacionadas com o fenótipo clínico foram identificadas em 8.3% (5/60) das amostras. Estudos similares relataram uma frequência de 6.8-42% de CNVs causais em indivíduos com CCs síndrômicas (Krepischi-Santos *et al.*, 2006; Thienpont *et al.*, 2007a; Richards *et al.*, 2008; Breckpot *et al.*, 2010; Hightower *et al.*, 2014) e 4.3-5.3% de CNVs causais em indivíduos com CCs não síndrômicas (Erdogan *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2008; Greenway *et al.*, 2009; Breckpot *et al.*, 2011). Este estudo incluiu indivíduos com cardiopatias conotrunciais síndrômicas e não-síndrômicas. Diferenças de taxas entre diversos estudos podem estar relacionadas ao tamanho da coorte, aos critérios de seleção de pacientes, à plataforma de *microarrays* utilizada e à interpretação da relevância clínica das CNVs.

Entre os casos com CNVs causais identificadas neste estudo, em três casos (58; 108 e 376) as anormalidades encontradas não foram previamente associadas com síndromes reconhecidas. Em dois outros casos (58 e 268) as alterações genômicas já haviam sido associadas à síndromes de microdeleção bem definidas (síndrome de deleção 1p36 (OMIM#607872) e síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2, OMIM#18840/#192430)), respectivamente.

A deleção 1p36.33/p36.32 foi identificada em um caso (268) do nosso estudo que apresentava TOF e dismorfias faciais. Estima-se que a síndrome de del1p36 ocorra em 1/5000 recém-nascidos (Heilstedt *et al.*, 2003), sendo associada com um amplo espectro de anomalias congênitas e diferentes níveis de gravidade (Battaglia & Shaffer 2008). Rearranjos cromossômicos constitucionais envolvendo a região 1p36 são as alterações cromossômicas com significado clínico mais frequentes em causas de MCA/MR (*Multiple Congenital Anomalies/Mental Retardation*) (Ballif *et al.*, 2007; Shaffer *et al.*, 2007). O fenótipo facial, o

padrão de desenvolvimento neuropsicomotor e o atraso mental são características marcantes nesta síndrome (Bataglia 2005; Gajecka *et al.*, 2007; Battaglia *et al.*, 2008). Os achados cardiovasculares incluem cardiomiopatia dilatada na infância em 23% dos casos. Entretanto, grande parte dos casos não foram identificados clinicamente, mas detectados em pesquisas sobre a integridade subtelomérica em indivíduos com MCA/RM (Riegel *et al.*, 1999; Slavotinek *et al.*, 1999; Riegel *et al.*, 2001; Koolen *et al.*, 2004; Moog *et al.*, 2005). Além disso, têm sido frequente a descrição de fenótipos atípicos ou menos graves ou apresentando sobreposição clínica com outras síndromes genéticas, o que dificulta uma indicação clínica específica para a identificação da deleção, situação que observamos quando da identificação da del1p36 neste trabalho.

A microdeleção 22q11.2 identificada na amostra 58 está associada a síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2). Estudos populacionais com pacientes com CC têm estimado prevalências da del22q11.2 que oscilam de 1 em cada 4 mil a 6 mil nascidos vivos (Goodship *et al.*, 1998; Botto *et al.*, 2003). Contudo, sua prevalência ao nascimento é certamente maior, pois alguns bebês acabam morrendo ainda nos primeiros dias de vida devido a anormalidades cardíacas graves e/ou a sequências de malformações secundárias incompatíveis com a vida (Shprintzen *et al.*, 2005). Detectamos em nosso estudo apenas um caso de TOF não síndrômico de del22q11.2. Casos de del22q11.2 identificado anteriormente por outros métodos como FISH ou MLPA (Huber *et al.*, 2014; Riegel *et al.*, 2015), não foram incluídos em nosso estudo. Embora fosse possível na prática identificar a del22q11.2 por métodos de menor resolução, não apresentou-se anterior a este estudo a oportunidade de realização de teste genético por FISH ou MLPA. Pacientes com a SD22q11 são considerados indivíduos em risco, uma vez que podem necessitar, ao longo de suas vidas, de um grande número de intervenções médicas e hospitalizações. Assim, o reconhecimento da síndrome por meio desse estudo, não apenas permitiu identificar a alteração causal, mas também influenciará no aconselhamento genético aos familiares.

Considerando o tamanho e a região dos desequilíbrios genômicos encontrados nos casos de del1p36 e del22q11.2, a alteração poderia ter sido previamente diagnosticados pela análise por meio de FISH isoladamente (usando sondas *loci*-específicas para a região cromossômica crítica), caso os achados clínicos fossem indicativos de uma síndrome de microdeleção particular. Entretanto, teriam sido necessárias informações clínicas sugestivas de uma determinada síndrome para inferir exatamente qual região e/ou cromossomo deveria ser investigado por FISH. Neste estudo, ambas as amostras eram de indivíduos nos quais o fenótipo não foi indicativo para uma análise por FISH. Além disto, rearranjos cromossômicos

envolvendo as regiões 1p36 e 22q11.2, podem levar a síndromes de microdeleção com rearranjos não recorrentes de tamanho variáveis. Portanto, mesmo que uma microdeleção seja detectada por FISH ou MLPA, a reavaliação através de array-CGH leva a uma melhor caracterização dos segmentos cromossômicos quanto ao tamanho e quanto à determinação da posição genômica da alteração. Isto permite uma melhor definição dos pontos de quebra cromossômicos e/ou a determinação de genes candidatos associados às síndromes levando conseqüentemente a uma melhor correlação genótipo-fenótipo.

Em um dos três casos com CNVs patogênicas não associadas com síndromes descritas (caso 376), uma deleção de 4.56 Mb no braço curto do cromossomo 7, nas bandas p22.3-p22.1, foi identificada. Na época, havia a expectativa de que o cariótipo do paciente e de seus pais seria realizado para melhor definir o tipo e a origem (se *de novo* ou familiar) do rearranjo cromossômico terminal envolvendo o cromossomos 7p22.3-p22.1. Embora esta alteração esteja no limite de resolução de um exame de cariótipo para detecção de alterações cromossômicas, neste caso teria ficado evidente já a partir da análise do cariótipo que uma deleção cromossômica de 4.56 Mb deva envolver muitos genes, e portanto, com alta probabilidade de produzir uma alteração genômica causal. Esta análise teria permitido previamente a observação de que uma alteração cromossômica relacionada com o fenótipo clínico e CC associada, reforçando a importância da realização do cariótipo. Entretanto, a análise por array-CGH por ter alta resolução, permitiu informações genômicas adicionais em relação a determinação dos pontos de quebra na região 7p22.3-p22.1 que serão analisadas detalhadamente em um estudo prospectivo.

Em outras duas 2 amostras com TOF não sindrômico (casos 108 e 269) e CNVs patogênicas, foram detectadas uma deleção de 1.15 Mb clinicamente relevante no cromossomo 1q21.1-q21.2 e uma duplicação de 0.52 Mb no cromossomo 16p11.2. Rearranjos recorrentes no cromossomo 1q21.1 têm sido associados a fenótipos variados de penetrância incompleta, incluindo doença cardíaca congênita. A deleção do cromossomo 1q21.1 foi primeiramente sugerida como uma das causas das CCs por Christiansen *et al.* (2004). Soemedi *et al.* (2012) genotiparam a região 1q21.1 em 948 pacientes com TOF, 1.488 pacientes com outras formas de CC e 6.760 controles pareados. A duplicação 1q21.1 foi mais frequente em casos de TOF em relação aos controles, o que não ocorre com as deleções envolvendo a mesma região. A deleção 1q21.1 foi mais frequente em casos de não-TOF do que nos controles. Em contraste, nossos resultados indicaram a associação entre a região de deleção 1q21.1 incluindo o gene *GJA5* em um caso (108) com TOF. Espera-se que um exame clínico adicional do paciente, estudos parentais e avaliação molecular dentro da região crítica

sejam realizados para permitir uma melhor interpretação dos resultados neste único caso. A duplicação e deleção no cromossomo 1q21.1 exibem um grau de especificidade fenotípica, e foi demonstrado que o gene *GJA5* - expresso em miócitos atriais, responsável por mediar a ativação elétrica coordenada dos átrios -, é o gene responsável pelos defeitos cardíacos em indivíduos com alterações genômicas na região 1q21.1 (Soemedi *et al.*, 2012a).

Alterações genômicas envolvendo a região 16p11.2 (pontos de quebra 4 e 5;BP4-BP5, 29673954-30197341) como a identificada neste estudo (caso 269) deste estudo, tem sido associadas a distúrbio de linguagem, transtorno do espectro do autismo (TEA) e esquizofrenia (SZ) (Maillard *et al.*, 2015). Têm sido relatado que tanto a deleção do cromossomo 16p11.2 como a duplicação 16p11.2 estão associadas com TEA, ao passo que apenas duplicações desta região foram identificadas em cortes de indivíduos com esquizofrenia (SZ). Muitas anomalias congênitas múltiplas são causadas por recombinação entre duplicações de segmentos homólogos que conduzem a deleções, incluindo a região 16p11.2. Alterações desta região foram raramente descritas especificamente associadas a CC (Puvabanditsin *et al.* 2010). Ghebranious *et al.* (2007) descreveu uma microdeleção *de novo* em 16p11.2 em gêmeos monozigóticos do sexo masculino que apresentaram anormalidade da válvula aórtica, convulsões e retardo mental leve. Por meio de array-CGH, os autores mapearam uma microdeleção de ~0.59 Mb no braço curto do cromossomo 16p11.2, evidenciando uma região que se sobrepõe com 24 genes. Com base nos fenótipos descritos nos gêmeos e comparação de genes funcionais dentro da microdeleção 16p11.2, os autores propuseram vários genes que são fortes candidatos para o desenvolvimento normal da válvula aórtica, assim como sua influência no desenvolvimento de convulsões e retardo mental. A microduplicação 16p11.2 como a identificada em nosso estudo (caso 269) associada a TOF não síndrômico, ainda não foi relatada. Entretanto, deve-se considerar que outros achados clínicos associados a alterações em 16p11.2, serão evidenciados somente mais tarde durante a infância. Espera-se que um seguimento clínico posterior deste paciente permita uma melhor correlação genótipo-fenótipo em relação a região crítica 16p11.2 .

Em 8.3% (5/60) das amostras, desequilíbrios genômicos classificados como VOUS (casos 56;137; 126; 360 e 49) foram identificados. A natureza altamente variável do genoma indica que cuidados devem ser tomados ao avaliar a patogenicidade potencial de CNVs detectadas por array-CGH. Considerando o grupo de amostras com CNVs potencialmente causais identificadas neste estudo, a relevância clínica de 50% (5/10) das CNVs permanece indefinida até o momento, uma vez que as evidências são insuficientes para se concluir se as CNVs são patogênicas ou benignas. Mesmo para as CNVs nos quais não há um registro

robusto sobre a sua relevância clínica, a interpretação sobre o quanto estão causalmente relacionados com a CC pode ser desafiadora. Devemos ainda considerar que a CNV possa ser potencialmente herdada de um progenitor sadio, podendo ser nesse caso uma variante patogênica com penetrância incompleta, ou uma variante familiar benigna.

Nas CNVs classificadas neste estudo como *VOUS*, espera-se que estudos parentais sejam realizados para permitir uma melhor interpretação dos resultados e para fornecer informações precisas para o aconselhamento genético antes de uma nova gestação ou ainda para os indivíduos em idade reprodutiva. Ressaltamos que é importante registrar dados sobre desequilíbrios genômicos com significado clínico duvidoso, pois alguns deles podem indicar CNVs recorrentes associados a novas síndromes ou rearranjos cromossômicos. Relatos de indivíduos com rearranjos cromossômicos e CCs similares podem levar à identificação de novas síndromes genéticas ou de genes candidatos associados à anomalia congênita isolada.

Em 21.6% (13/60) das amostras, variantes genômicas normais (CNVs benignas) envolvendo os cromossomos 7p21.1, 7p14.3, 8p11.2, 10q26.3, 14p32.33, 15q11.1-q11.2 e Xq27.2 foram identificadas. É reconhecido que todos os humanos diferem nos seus cromossomos ao nível submicroscópico e que as CNVs ocorrem com alta frequência, como polimorfismos de número de cópias presentes em > 5% da população (Iafate *et al.*, 2004; Redon *et al.*, 2006). Esses polimorfismos de número de cópias são, mais frequentemente, relativamente pequenos, podem ser herdados de um progenitor fenotipicamente normal, estão preferencialmente presentes em regiões com poucos genes e usualmente contém mais sequências repetitivas de DNA. Estima-se que cerca de 12% da eucromatina possa variar sem que ocorra um efeito fenotípico. Uma porção adicional de cerca de 20% do genoma consiste de heterocromatina extremamente variável, concentrada ao redor de regiões centroméricas e teloméricas que contém poucos genes (Liehr *et al.*, 2014). A presença de CNVs foi registrada neste estudo mesmo quando presente em regiões que, consistentemente, abrigam variantes benignas, uma vez que o conhecimento mais consistente sobre isso pode vir a reduzir a necessidade de realizar estudos dos progenitores nos quais CNVs comprovadamente benignas foram identificadas.

Uma limitação deste estudo foi a impossibilidade de distinguir desequilíbrios *de novo* dos desequilíbrios herdados devido à indisponibilidade de DNA dos progenitores que pudesse ser analisado. CNVs *de novo* em regiões clinicamente significantes são mais prováveis de serem causadoras de patologia. No entanto, CNVs patogênicas herdadas não podem ser excluídas como causa das CCs em função da sua expressividade variável e penetrância incompleta (Riggs *et al.*, 2012; Soemedi *et al.*, 2012b). Como citamos anteriormente, CNVs

podem ser herdadas de um progenitor aparentemente normal e contribuir para um fenótipo anormal na prole. Esses tipos de CNVs podem representar *loci* de susceptibilidade, uma vez que eles aumentam a chance da prole desenvolver CCs, mas podem não ser suficientes para causar alterações fenotípicas por elas mesmas.

Estudos em progenitores devem ser recomendados para indivíduos nos quais achados clinicamente significantes foram relatados, para determinar se as CNVs representam eventos *de novo* ou familiares. Ainda que várias estratégias tenham sido propostas para ajudar a interpretar o significado dos desequilíbrios genômicos associados à CCs, não existem ainda critérios que sejam universalmente aceitos. É essencial ter a informação mais precisa e atualizada possível sobre o significado clínico dos desequilíbrios detectados, assim como sobre CNVs em diferentes regiões do genoma, sobre mutações patogênicas ou polimorfismos em outros genes e sobre fatores não genéticos que podem ser necessários para que uma anomalia congênita se expresse.

Cuidados devem ser tomados no processo de interpretação clínica de um resultado de array-CGH. O exame físico dismorfológico minucioso, realizado por um pediatra experiente ou por um geneticista, é muito importante para uma correta correlação genótipo-fenótipo em relação às CCs. Consultas adicionais são imprescindíveis a avaliação clínica do paciente, especialmente pelo médico geneticista, de maneira que se possa prover um aconselhamento genético adequado às famílias.

Uma característica usual dos estudos retrospectivos utilizando bancos de material biológico é muitas vezes a escassa informação clínica relacionada as amostras. Neste estudo, a informação clínica obtida, foi a que estava disponível nos registros hospitalares no período da referência inicial da investigação cardiológica dos indivíduos. A maioria deles foi registrada no momento das solicitações iniciais de exames e avaliação clínica, dessa forma, eram relativamente pouco detalhadas. Mesmo assim, consideramos que esta coorte é representativa de indivíduos com CCs conotrunciais de causa desconhecida.

Entre as vantagens da análise citogenômica com o método de array-CGH, estão a de não ser necessária a obtenção de cromossomos metafásicos e a maior sensibilidade, uma vez que é capaz de detectar em amostras de DNA, qualquer rearranjo cromossômico em desequilíbrio, além de loci ou genes candidatos associados à CCs. O presente estudo demonstrou a exequibilidade e a utilidade do array-CGH na identificação de deleções e duplicações em amostras de DNA estocadas em biorrepositório. Foi demonstrado que uma proporção dos indivíduos com CCs conotrunciais de causa desconhecida apresenta desequilíbrios cromossômicos relacionados com os seus fenótipos.



A maior desvantagem da utilização de array-CGH é a de não detectar rearranjos cromossômicos equilibrados, como as translocações balanceadas. Considerando que os indivíduos com CCs avaliados por este estudo não realizaram exame de cariótipo, não podemos excluir em nosso estudo, indivíduos portadores de alterações cromossômicas equilibradas não identificadas. Além disso, no Brasil, o alto custo e a escassez de centros especializados e de profissionais habilitados em citogenômica, são motivos que dificultam sua utilização em programas de triagem seletiva.

Ao interpretar a classificação das CNVs relacionadas com anomalias específicas com uma larga variabilidade fenotípica como no caso das cardiopatias incluídas neste estudo, é essencial diferenciar ganhos de perdas mesmo dentro de uma mesma região genômica, pois as potenciais consequências clínicas podem diferir significativamente. Ainda, é importante comparar ganhos com ganhos (duplicações) e perdas com perdas (deleções) (Vermeesch *et al.*, 2007; Conrad *et al.*, 2010; Vermeesch *et al.*, 2012). Deve-se considerar que similares pontos de quebra cromossômicos dentro de uma mesma região genômica podem ativar mecanismos moleculares de ativação gênica diferentes.

O número de desequilíbrios genômicos e potenciais rearranjos cromossômicos no genoma humano associados ao desenvolvimento das CCs é provavelmente ilimitado. Na última década, a importância do desenvolvimento tecnológico aplicado pela citogenética para detecção e entendimento dos mecanismos moleculares de rearranjos cromossômicos que levam à defeitos congênitos tem sido demonstrada (Riegel, 2014). Apesar do desenvolvimento de técnicas de nova geração para identificação de variantes cromossômicas e CNVs relacionados às CCs, a aplicação prática destes métodos de investigação é praticamente inexistente em nosso meio. A implementação e atualização de diretrizes nacionais sobre interpretação de resultados de pesquisa em citogenômica junto com o manejo clínico para melhorar a perícia e experiência nos costumes clínicos e laboratoriais é necessária para melhorar o conhecimento científico e a assistência médica relacionada aos pacientes com CCs.

Além da detecção de alterações genômicas significantes (patogênicas ou VOUS) em 16.6% de indivíduos com CCs de etiologia desconhecida, este estudo permitiu a detecção de rearranjos cromossômicos consistentes com síndromes genéticas em uma idade precoce, quando os achados clínicos podem ser ainda pouco definidos. Mesmo em síndromes bem definidas clinicamente, rearranjos cromossômicos recorrentes e não recorrentes com alta variabilidade em seu tamanho ocorrem, levando a um amplo espectro fenotípico nos indivíduos com CC conotruncal, por vezes fora dos limites de detecção clínica.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a técnica da análise citogenômica por array-CGH foi aplicada com sucesso para investigar pacientes de um centro público de referência em cardiologia, estando em condições de ser sistematicamente utilizada para o rastreamento genômico seletivo de indivíduos com CCs de causa desconhecida, permitindo a identificação e caracterização de rearranjos cromossômicos relacionados às CCs bem como a identificação de genes candidatos.

Estudos retrospectivos ou prospectivos utilizando array-CGH em casos de cardiopatias congênitas cuja causa não foi esclarecida podem beneficiar as famílias afetadas por permitir, em uma proporção significativa dos casos, uma elucidação diagnóstica mais precisa. Assim, o diagnóstico precoce desses casos é fundamental para a adequada avaliação e manejo clínico. Acredita-se que os dados obtidos através deste trabalho contribuíram para uma melhor caracterização genotípica dos indivíduos portadores de CCs contrunciais. Nossos achados reforçam que o uso de array-CGH como uma ferramenta diagnóstica de primeira linha pode proporcionar um diagnóstico acurado e impactar favoravelmente o manejo global dos casos desde o período neonatal até a idade adulta.

**CAPÍTULO 6**  
**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

Acredita-se que, à partir das informações geradas neste projeto, um banco de dados poderá ser iniciado para servir como uma biblioteca de referência para consulta e para futuros estudos. Deste modo, será possível a execução de análises e estudos posteriores das mesmas amostras sem que seja necessária uma nova pesquisa sobre dados relativos ao número, à localização de repositório de material biológico e a caracterização dos diferentes tipos de CCs. Em consequência, a consistência será aumentada, evitará um aumento de custos e o tempo de execução será reduzido para os novos projetos que envolvam esse grupo de amostras.

Desenvolvemos um projeto de investigação no qual os recursos investidos, além de subsidiar a pesquisa proposta, levaram ao desenvolvimento técnico-científico da pesquisa em saúde. A proposta deste projeto comprometeu-se em gerar e divulgar conhecimento e incrementar a formação de recursos humanos na área de pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico em citogenômica. Além disto, desde a sua formação este projeto se apresentou como um programa permanente de formação de pessoal através da capacitação de apoio técnico, tanto do ponto de vista de formação científica quanto de treinamento em uma área com raros especialistas no Brasil.

Uma pesquisa científica direcionada a comunidade e que se propõe a estabelecer a renovação de tecnologia aplicada a saúde, deve ocorrer de forma sistemática, necessitando investimento regular para desenvolvimento e atualização tecnológica. Um desafio maior a ser enfrentado após a conclusão deste trabalho, tem sido a continuidade do custeio das suas operações, garantindo o seguimento a longo prazo desta iniciativa de pesquisa emergente envolvendo uma abordagem inovadora no estudo das CCs no Brasil.

A renovação tecnológica utilizada para a avaliação de indivíduos com CC avaliados por um serviço de referência em cardiologia foi um dos resultados mais impactantes deste projeto. Embora a atividade fundamental de um serviço de saúde seja a prestação de assistência médica, não haverá assistência com excelência e pioneirismo se esta não estiver na fronteira do conhecimento.

A possibilidade de identificação de *loci* e/ou genes candidatos nas amostras incluídas neste projeto, permitiu um registro atualizado do genótipo de portadores de CC contruncal, o que contribui para uma melhor compreensão da etiologia das malformações cardíacas na amostra estudada e permitiu a obtenção de mapas genéticos de alta densidade. Além disso, este trabalho corrobora estudos anteriores referentes a importância da investigação citogenômica para a identificação de fatores genéticos determinantes no desenvolvimento das CCs.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, *et al.* (2006) Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 16: 851-5.
- Amorim LF, Pires CA, Lana AM, Campos AS, Aguiar RA, Tiburcio JD, Siqueira AL, Mota CC, Aguiar MJ (2008) Presentation of congenital heart disease diagnosed at birth: analysis of 29,770 newborn infants. *J Pediatr (Rio J)* 84:83-90.
- Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Beijani BA, Shaffer LG (2007) The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array-CGH. *Am J Med Genet A* 143A:1850-1857.
- Battaglia A (2005) Del 1p36 syndrome: a newly emerging clinical entity. *Brain Dev* 27:358-361.
- Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL, *et al.* (2008) Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* 121:404-410.
- Battaglia A, Shaffer LG. 1p36 deletion syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, *Gene Reviews* University of Washington, Seattle, 1993-2008. [citado em 09 Ago 2010] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book= gene&part=del1p36>.
- Bittel DC, Butler MG, Kibiriyeva N, Marshall JA, Chen J, Lofland GK, O'Brien JE Jr (2011) Gene expression in cardiac tissues from infants with idiopathic conotruncal defects. *BMC Med Genomics* 4:1-10.
- Blue GM, Kirk EP, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS (2012) Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust* 197:155-159.
- Botto LD, Correa A (2003) Decreasing the burden of congenital heart disease: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. *Prog Pediatr Cardiol* 18:111-21.
- Brambati B, Simoni G (1983) Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet* 1:586.
- Brasil. Ministério da Saúde. Normas e Manuais Técnicos (2012) Atenção á Saúde do Recém-nascido. Volume 3 [citado em 20 Jan 2015] Disponível em: [http://www.redeblh.fiocruz.br/media/arn\\_v3.pdf](http://www.redeblh.fiocruz.br/media/arn_v3.pdf).
- Brasil. Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS [citado em 20 Jan 2015] Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
- Breckpot J, Thienpont B, Peeters H, de Ravel T, Singer A, Rayvan M, Allegaert K, Vanhole C, Eyskens B, Vermeesch JR, *et al.* (2010) Array Comparative Genomic Hybridization as a diagnostic Tool for Syndromic Heart Defects. *J Pediatr* 156:810-817.
- Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC, Vermeesch JR, Moreau Y, Gewillig M, Devriendt K (2011) Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res* 135:251-259.
- Burn J, Brennan P, Little J, Holloway S, Coffey R, Somerville J, Dennis NR, Allan L, Arnold R, Deanfield JE, *et al.* (1998) Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet* 351:311-316.
- Caba L, Rusu C, Butnariu L, Panzaru M, Braha E, Volosciuc M, Popescu R, Gramescu M, Bujoran C, Martiniuc V, *et al.* (2013) Phenotypic variability in Patau syndrome. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 117:321-327.
- Caluseriu O, Reardon W (2012) Malformation Syndromes. *Textbook of Neonatology, Fifth Edition*. London, UK 791-817.
- Castilla EE, Orioli IM (2004) ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Community Genet* 7:76-94.

Centre for the Development and Evaluation of Complex Interventions for Public Health Improvement (DECIPHER) [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://decipher.sanger.ac.uk>.

Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Leveque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, *et al.* (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169.

Chen CW, Li CY, Wang JK (2004) Growth and development of children with congenital heart disease. *J Adv Nurs* 47:260-269.

Christiansen J, Dyck JD, Elyas BG, Lilley M, Bamforth JS, Hicks M, Sprysak KA, Tomaszewski R, Haase SM, Vicen-Wyhony LM, *et al.* (2004) Chromosome 1q21.1 Contiguous Gene Deletion Is Associated With Congenital Heart Disease. *Circ Res* 94:1429-1435.

Chromosomal Variation in Man Online Database [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://www.wiley.com/legacy/products/subject/life/borgaonkar/access.html>.

Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, *et al.* (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464:704-712.

Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, *et al.* (2011) A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 43:838-846.

Cytogenetic Data Analysis System (CyDAS) [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://www.cydias.org/>.

Dadvand P, Rankin J, Shirley MD, Rushton S, Pless-Mulloli T (2009) Descriptive epidemiology of congenital heart disease in Northern England. *Pediatr Perinat Epidemiol* 23:58-65.

Database of genomic structural variation (bdVar) [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>.

de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth HV, Kuhn RM, Ledbetter DH, Martin CL, van Ravenswaaij-Arts CM, *et al.* (2012) Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat* [Epub ahead of print].

Deak KL, Horn SR, Rehder CW (2011) The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: variable expressivity and genomic complexity. *Clin Lab Med* 31:543-64.

Debrus S, Berger G, de Meeus A, Sauer U, Guillaumont S, Voisin M, Bozio A, Demczuk S, Aurias A, Bouvagnet P (1996) Familial non-syndromic conotruncal defects are not associated with a 22q11 microdeletion. *Human Genet* 97:138-144.

Denardin D, Savaris FE, Cunha AC, Betat RD, Telles JA, Targa LV, Weiss A, Zen PR, Rosa RF (2014) Retrospective cohort of trisomy 18 (Edwards syndrome) in southern Brazil. *Sao Paulo Med J* 7:0.

Dorfman LE, Leite JC, Giugliani R, Riegel M (2015) Microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. *Jornal de Pediatria* 91:59-67.

Dolk H, Loane M, Garne E; European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group (2011) Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation* 123:841-849.

ECLAMC (2007) Manual Operacional. Rio de Janeiro, 92pp.

Ensembl [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: [www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/).

Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tumer Z, Tommerup N, Chen W, Jacobsen JR, Schubert M, Jurkatis J, Tzschach A, *et al.* (2008) High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet* 45:704-709.

European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA) [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: [www.ecaruca.net](http://www.ecaruca.net).

Ferencz C, Neill CA, Boughman JA, Rubin JD, Brenner JI, Perry LW (1989) Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: an epidemiologic study. *J Pediatrics* 114:79–86.

Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Brenner JI, Neill CA, Perry LW, Hepner SI, Downing JW (1985) Congenital heart disease: Prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington Infant Study. *Am J Epidemiol* 121:31–36.

Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:346–356.

Ghebranious N, Giampietro PF, Wesbrook FP, Rezkalla SH (2007) A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 143A:1462-1471.

Gijsbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA (2011) Interpretation of array comparative genome hybridization data: A major challenge. *Cytogenet Genome Res* 135:222-227.

Girirajan S, Eichler EE (2010) Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Hum Mol Genet* 19(R2):R176-R87.

Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE (2011) Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet* 45:203-226.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, Filipink RA, McConnell JS, Angle B, Meschino WS, *et al.* (2012) Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 367:1321-1331.

Girirajan S (2013) Genomic disorders: complexity at multiple levels. *Genome Med* 5:43.

Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, McDonald-McGinn D, Chien P, Feuer J, Zackai EH, *et al.* (1998) Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *JACC* 32:492–498.

Goldmuntz E, Driscoll D, Budarf ML, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Biegel JA, Emanuel BS (1993) Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patients with congenital conotruncal cardiac defects. *J Med Genet* 30:807–812.

Gong X, Wu X, Ma X, Wu D, Zhang T, He L, Qin S, Li X (2013) Microdeletion and Microduplication Analysis of Chinese Conotruncal Defects Patients with Targeted Array Comparative Genomic Hybridization. *8:e76314*.

Gonzalez EI, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307:1434-1440.

Goodship J, Cross I, Liling J, Wren C (1998) A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. *Arch Dis Child*. 79:348-351.

Grech V, Gatt M (1999) Syndromes and malformations associated with congenital heart disease in a population-based study. *Int J Cardiol* 68:151-156.

Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, DePalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, Ergul E, Conta JH, Korn JM, McCarroll SA, *et al.* (2009) De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet* 41:931–935.

Guerra F, Llerena JJ, Gama S, Cunha C, Theme Filha M (2008) Birth defects in Rio de Janeiro, Brazil: an evaluation through birth certificates (2000-2004). *Cad Saude Publica* 24:140-149.



- Guiti JC (2000) Epidemiological characteristics of congenital heart diseases in Londrina, Parana south Brazil. *Arq Bras Cardiol* 74:395-404.
- Hahnemann N (1974) Early prenatal diagnosis: A study of biopsy techniques and cell culturing from extraembryonic membranes. *Clin Genet* 6:294-306.
- Hancarova M, Vejvalkova S, Trkova M, Drabova J, Dleskova A, Vlckova M, Sedlacek Z (2013) Identification of a patient with intellectual disability and de novo 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15. *Gene* 516:158-161.
- Harris JA, Francannet C, Pradat P, Robert E (2003) The Epidemiology of Cardiovascular Defects, Part 2: A Study Based on Data from Three Large Registries of Congenital Malformations. *Pediatr Cardiol* 24:222-235.
- Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, Shin M, Correa A (2011) The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol* 32:1147-1157.
- Hehir-Kwa JY, Wieskamp N, Webber C, Pfundt R, Brunner HG, Gilissen C, de Vries BB, Ponting CP, Veltman JA (2010) Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. *PLoS Comput Biol* 6:e1000752.
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG (2003) Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet* 64:310-316.
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003) Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1200-1212.
- Hightower HB, Robin NH, Mikhail FM, Ambalavanan N (2014) Array comparative genomic hybridisation testing in CHD. *Cardiology in the Young* 8:1-18.
- Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA (2011) Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: Lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res* 135:174-202.
- Hoffman JI, Kaplan S (2002) The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 39:1890-1900.
- Horovitz D, Llerena Jr. J, Mattos R (2005) Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad Saude Publica* 21:1055-1064.
- Horovitz DD, de Faria Ferraz VE, Dain S, Marques-de-Faria AP (2013) Genetic services and testing in Brazil. *J Community Genet* 4:355-375.
- Huber J, Peres VC, dos Santos TJ, Beltrão LF, Baumont AC, Cañedo AD, Schaan BD, Pellandal LC (2010) Cardiopatias Congênitas em um Serviço de Referência: Evolução Clínica e Doenças Associadas. *Arq Bras Cardiol* 94:333-338.
- Huber J, Peres VC, de Castro AL, dos Santos TJ, da Fontoura Beltrão L, de Baumont AC, Cossio SL, Dalberto TP, Riegel M, Cañedo AD, *et al.* (2014) Molecular screening for 22Q11.2 deletion syndrome in patients with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 35:1356-1362.
- Iafraite AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951.
- Iserin L, de Lonlay P, Viot G, Sidi D, Kachaner J, Munnich A, Lyonnet S, Vekemans M, Bonnet D (1998) Prevalence of the microdeletion 22q11 in newborn infants with congenital conotruncal cardiac anomalies. *Eur J Pediatr* 157:881-884.

- Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, Elixson M, Warnes CA, Webb CL (2007) Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: Current knowledge: A scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young. Endorsed.
- Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, Elixson M, Warnes CA, Webb CL (2007) Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge. *Cir* 115:2995–3014.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, *et al.* (2004) Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 41:892-899.
- Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehes FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, *et al.* (2006) Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res* 115:254–261.
- Kuehl K, Loffredo C, Lammer EJ, Iovannisci DM, Shaw GM (2010) Association of congenital cardiovascular malformations with 33 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:101-110.
- Lammer EJ, Chak JS, Iovannisci DM, Schultz K, Osoegawa K, Yang W, Carmichael SL, Shaw GM (2009) Chromosomal abnormalities among children born with conotruncal cardiac defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85:30-35.
- Le Scouarnec S, Gribble SM (2012) Characterising chromosome rearrangements: Recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity (Edinb)* 108:75-85.
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR (2007) Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 39:48-54.
- Lee C, Scherer SW (2010) The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med* 12:e8.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131:1235-1247.
- Liehr T (2014) *Benign & Pathological Chromosomal Imbalances. Microscopic and Submicroscopic Copy Number Variations (CNVs) in Genetics and Counseling.* Elsevier, London, 232 pp.
- Lu X, Phung MT, Shaw C, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino C, Stankiewicz P, Kang SL (2008) Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatr* 122:1310–1318.
- Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14:417-22.
- Maillard M, Ruef A, Pizzagalli F, Migliavacca E, Hippolyte L, Adaszewski S, Dukart J, Ferrari C, Conus P, Männik K, *et al.* (2015) The 16p11.2 locus modulates brain structures common to autism, schizophrenia and obesity. *Mol Psychiatr* 20:140-147.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biasecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, *et al.* (2010) Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749-764.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. *Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher.* Editora MS, Brasília, pp 163-182. [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude>.

- Moog U, Arens YH, van Lent-Albrechts JC, Huijts PE, Smeets EE, Schrande-Stumpel CT, Engelen JJ (2005) Subtelomeric chromosome aberrations: still a lot to learn. *Clin Genet* 68:397-407.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, BattipsDM, Hungerford DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes 206 Human molecular cytogenetics cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-616.
- Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P (2008) Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet* 16:163–170.
- Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, Martínez-Glez V, Mori MA, Santos F, García-Miñaur S, *et al.* (2014) New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol* 37:210-219.
- Niazi M, Coleman DV, Loeffler FE (1981) Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi. *Br J Obstet Gynaecol* 88:1081-1085.
- Noronha FL, Brito Junior HL, Guedes SS, Silva Junior TJ (2011) Prevalência de cardiopatia congênita em crianças com síndrome de Down de Juiz de Fora e região. *HU Revista* 37:147-153.
- Nowell PC (1960) Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 20:462- 466.
- Osoegawa K, Iovannisci DM, Lin B, Parodi C, Schultz K, Shaw GM, Lammer EJ (2013) Identification of novel candidate gene loci and increased sex chromosome aneuploidy among infants with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet Part A* 9999:1–10.
- Osoegawa K, Iovannisci DM, Lin B, Parodi C, Schultz K, Shaw GM, Lammer EJ (2014a) Identification of novel candidate gene loci and increased sex chromosome aneuploidy among infants with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet Part A* 164A:397-406.
- Palumbo O, Palumbo P, Palladino T, Stallone R, Miroballo M, Piemontese MR, Zelante L, Carella M (2012) An emerging phenotype of interstitial 15q25.2 microdeletions: clinical report and review. *Am J Med Genet A* 158A:3182-3189.
- Pedra CA, Haddad J, Pedra SF, Peirone A, Pilla CB, Marin-Neto JA (2009) Paediatric and congenital heart disease in South America: an overview. *Heart* 95:1385–1392.
- Pereira RJS, Abreu LC, Valenti VE, Albuquerque WDM, Pereira SC, Araújo R, Ferreira Neto ML, Santos SM (2008) Frequência de malformações congênicas das extremidades em recém-nascidos. *Rev Bras Crescimento Desenv Hum* 18:155-162.
- Pierpont ME, Basson CT, Benson Jr DW, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Giglia TM, Goldmuntz E, Srivastava D, American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee Council on Cardiovascular Disease in the Young, *et al.* (2007) 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. *Circ* 115:301530-301538.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo W-L, Chen C, Zhai Y, *et al.* (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genet* 20:207–211.
- Pinto Junior VC, Daher CV, Sallum FS, Jatene MB, Croti UA (2004) The situation of congenital heart surgeries in Brazil. *Braz J Cardiovasc Surg* 19:3-6.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Pradat P (1992) Epidemiology of major congenital heart defects in Sweden, 1981- 1986. *J Epidemiol Community Health* 46:211-215.

- Pradat P, Francannet C, Harris JA, Robert E (2003) The epidemiology of cardiovascular defects, part I: a study based on data from three large registries of congenital malformations. *Pediatr Cardiol* 24:195-221.
- Puvabanditsin S, Nagar MS, Joshi M, Lambert G, Garrow E, Brandsma E (2010) Microdeletion of 16p11.2 associated with endocardial fibroelastosis. *Am J Med Genet Part A* 152A:2383-2386.
- Ransom J, Srivastava D (2007) The genetics of cardiac birth defects. *Semin Cell Dev Biol* 18:132-139.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, *et al.* (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 23.444:444-454.
- Reino Unido, Toolkit for Health Needs Assessment in Congenital Disorders (2015) [citado em 20 Jan 2015] Disponível em: <http://toolkit.bornhealthy.org/>.
- Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, Zinn AR, Garg V (2008) Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res* 64:358-363.
- Riegel M, Castellan C, Balmer D, Brecevic L, Schinzel A (1999) Terminal deletion, del(1)(p36.3), detected through screening for terminal deletions in patients with unclassified malformations syndromes. *Am J Med Genet* 82:249-253.
- Riegel M, Baumer, A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A (2001) Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109:286-294.
- Riegel M (2014) Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genet and Mol Biol* 37:194-209.
- Riegel M, Barcellos N, Mergener R, de Souza KRS, Leite JCL, Kessler R, Moreira LMA, Giugliani R (2015) Molecular cytogenetic evaluation of chromosomal microdeletions: the experience of a public hospital in southern Brazil. *Clin Biomed Res* 34:357-365.
- Riggs ER, Church DM, Hanson K, Horner VL, Kaminsky EB, Kuhn RM, Wain KE, Williams ES, Aradhya S, Kearney HM, *et al.* (2012) Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clin Genet* 81:403-412.
- Roos L, Jonch AE, Kjaergaard S, Taudorf K, Simonsen H, Hamborg-Petersen B, Brondum-Nielsen K, Kirchhoff M (2009) A new microduplication syndrome encompassing the region of the Miller-Dieker (17p13 deletion) syndrome. *J Med Genet* 46:703-710.
- Rosa RF, Pilla CB, Pereira VL, Flores JA, Golendziner E, Koshiyama DB, Hertz MY, Ricachinevsky CP, Roman T, Varela-Garcia M, *et al.* (2008) 22q11.2 deletion syndrome in patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit in Brazil. *Am J Med Genet* 146A:1655-1661.
- Rosa RFM, Zen PRG, Roman T, Graziado C, Paskulin GA (2009) Síndrome de deleção 22q11.2: compreendendo o CATCH22. *Rev Paul Pediatr* 27:211-220.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, *et al.* (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38:24-26.
- Schinzel A (2001) *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*. 2nd edition. Walter de Gruyter Press, Berlin, 966 pp.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, *et al.* (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-528.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316:445-449.

Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. São Paulo (cidade). Declaração de Nascido Vivo - Manual de Anomalias Congênitas. 2nd edition. Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, 97 pp.

Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC (2007) The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Genet C Semin Med Genet* 145C:335-345.

Shprintzen RJ, Higgins AM, Antshel K, Fremont W, Roizen N, Kates W (2005) Velocardio-facial syndrome. *Curr Opin Pediatr* 17:725-730.

Simmons AD1, Carvalho CM, Lupski JR (2012) What have studies of genomic disorders taught us about our genome? *Methods Mol Biol* 838:1-27.

Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK (1999) Monosomy 1p36. *J Med Genet* 36:657-663.

Small supernumerary marker chromosomes [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://ssmctl.com/sSMC.html>.

Soares de Araújo JS, Régis, CT, Gomes RGS, Silva CS, Abath CMB, Mourato FA, Mattos SS (2014) Congenital Heart Disease in Northeast Brazil: 10 Consecutive Years of Records in Paraíba State, Brazil. *Rev Bras Cardiol* 27:509-515.

Soemedi R, Topf A, Wilson IJ, Darlay R, Rahman T, Glen E, Hall D, Huang N, Bentham J, Bhattacharya S, *et al.* (2012a) Phenotype-specific effect of chromosome 1q21.1 rearrangements and GJA5 duplications in 2436 congenital heart disease patients and 6760 controls. *Hum Mol Genet* 21:1513-1520.

Soemedi R, Wilson IJ, Bentham J, Darlay R, Topf A, Zelenika D, Cosgrove C, Setchfield K, Thornborough C, Granados-Riveron J, *et al.* (2012b) Contribution of Global Rare Copy-Number Variants to the Risk of Sporadic Congenital Heart Disease. *T Am J of Hum Genet* 91:489-501.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Gen Chrom Cancer* 20:399-407.

Stankiewicz P, Lupski JR (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* 61:437-455.

Steele MW, Breg Jr WR (1966) Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet* 1:383-385.

Stoll C, Alembik Y, Roth MP, Dott B, De Geeter B (1989) Risk factors in congenital heart disease. *Eur J Epidemiol* 5:382-391.

The Chromosome Anomaly Collection [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://www.ngrl.org.uk/wessex/collection/>.

The International Collaboration for Clinical Genomics [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://www.icc.org>.

The United Nations Children's Fund (UNICEF) Levels & Trends in Child Mortality- Report 2013 [citado em 28 Jan 2015] Disponível em: <http://www.childinfo.org/mortality.html>.

Thevenon J, Callier P, Andrieux J, Delobel B, David A, Sukno S, Minot D, Mosca Anne L, Marle N, Sanlaville D, *et al.* (2013) 12p13.33 microdeletion including ELKS/ERC1, a new locus associated with childhood apraxia of speech. *Eur J Hum Genet* 21:82-88.

Thienpont B, Mertens L, Buyse G, Vermeesch JR, Devriendt K (2007) Left-ventricular non-compaction in a patient with monosomy 1p36. *Eur J Med Genet* 50:233-236.

- Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, Fryns JP, Gewillig M, Vermeesch JR, Devriendt K (2007) Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* 28:2778–2784.
- Thienpont B, Zhang L, Postma AV, Breckpot J, Tranchevent LC, Van Loo P, Mollgard K, Tommerup N, Bache I, Tuimer Z, *et al.* (2010) Haploinsufficiency of TAB2 causes congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet* 86:839–849.
- Tijjo JH, Levan A (1956) The chromosome number of man. *Hered* 42:1-6.
- Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D, *et al.* (2005) Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 37:727-732.
- Van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, Meijboom FJ, Bouma BJ, Mulder BJ (2011) The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol* 8:50–60.
- Van Karnebeek CD, Hennekam RC (1999) Associations between chromosomal anomalies and congenital heart defects: a database search. *Am J Med Genet* 84:158-166.
- Vergult S, Dauber A, Delle Chiaie B, Van Oudenhove E, Simon M, Rihani A, Loeys B, Hirschhorn J, Pfothenhauer J, Phillips JA 3rd, *et al.* (2012) 17q24.2 microdeletions: a new syndromal entity with intellectual disability, truncal obesity, mood swings and hallucinations. *Eur J Hum Genet* 20:534-539.
- Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ (2012) Genome-wide arrays: Quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat* 33:906-915.
- Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, VanRavenswaaij C, *et al.* (2007) Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet* 15:1105-1114.
- Victora CG, Aquino EM, do Carmo Leal M, Monteiro CA, Barros FC, Szwarcwald CL (2011) Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. *Lancet* 377:1863-1876.
- Vissers LE, Stankiewicz P (2012) Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol Biol* 838:29-75.
- Voigt R, Maier-Weidmann M, Lange PE, Haaf T (2002) Chromosome 10p13-14 and 22q11 deletion screening in 100 patients with isolated and syndromic conotruncal heart defects. *J Med Genet* 39:e16.
- Volpi EV, Bridger JM (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotech* 45:385-386.
- Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, van Bon BW, Schuurs-Hoeijmakers JH, Meader S, Hellebrekers CJ, Thoonen IJ, de Brouwer AP, Brunner HG, Webber C, *et al.* (2013) Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation. *Hum Mutat* 34:1679-1687.
- Waldeyer W (1888) Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat* 32:1-112.
- Zeesman S, Kjaergaard S, Hove HD, Kirchhoff M, Stevens JM, Nowaczyk MJ (2012) Microdeletion in distal 17p13.1: a recognizable phenotype with microcephaly, distinctive facial features, and intellectual disability. *Am J Med Genet A* 158A:1832-1836.
- Zen TD, Rosa RF, Zen PR, Trevisan P, da Silva AP, Ricachinevsky CP, Paskulin GA (2011) Gestational and family risk factors for carriers of congenital heart defects in southern Brazil. *Pediatr Int* 53:551-557.

**ANEXOS**





▪ # Medicamentos em uso:

- |  |  |  |
|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> 1-hidroclorotiazida | <input type="checkbox"/> 5-calcitriol          | <input type="checkbox"/> 9-espironolactona |
| <input type="checkbox"/> 2-furosemida        | <input type="checkbox"/> 6-anticonvuls (qual?) | <input type="checkbox"/> 10-amiodarona     |
| <input type="checkbox"/> 3-corticóide        | <input type="checkbox"/> 7-digoxina            | <input type="checkbox"/> 11-AAS            |
| <input type="checkbox"/> 4-cálcio            | <input type="checkbox"/> 8-captopril           | <input type="checkbox"/> 12-outros:        |

▪ # Condições ao nascimento:

- premature:  sim  não  
-anormalidade no pré-natal: diabete pressão alta etilismo  
infecções qual? medicamentos qual?  
contato c/ substância, etc (qual?) outros:

▪ # Diagnóstico firmado de imunodeficiência  (qual?) quando: / /

▪ # Infecções de repetição (mais que as outras pessoas?):

- resp alta (gripe, otite, sinusite, garganta)   
-infecção intestinal   
-meningite   
-pneumonia  (quantas?)  
-urinária  (quantas?)  
-sepe  (quantas? bact, fungo, idade início)

▪ # DNPM:

- 1-adequado  2-pouco atraso  3-muito atraso (desenvolvimento neuropsicomotor)  
DESCREVER O ATRASO

▪ Dificuldade de aprendizado na escola?

▪ # Hipocalcemia:  1-sim  2-não  3-nunca dosou (início: / / )

▪ # História familiar:

- cardiopatia congênita: (qual e quem?)  
 microdeleção 22q11.2 (quem?)  
 hipocalcemia (quem?)  
 infecções de repetição ou probl defesas organismo (qual e quem?)  
 anormalidades faciais (quais e quem?)

( ) síndromes (qual e quem?)

▪ #Exame Físico:

- peso: Kg (perc P/I: ) (perc P/A: )
- altura: cm (perc A/I: )
- perím. cef.: cm (perc PC/I: )
- fenda palpebral curta, estreita e oblíqua ( )
- hipertelorismo ( )
- filtro nasal curto ( )
- extremidade do nariz bulbosa ( )
- anormalidades no palato ( ) qual:
- boca pequena ( )
- micrognatia ( )
- implantação baixa das orelhas ( )
- orelhas pequenas e arredondadas ( )
- voz anasalada ( )
- dedos finos ( )
- outros:

REVISÃO DO PRONTUÁRIO:

▪ #Exames Laboratoriais : (revisão do prontuário)

Data							
Ca total							
Ca iônico							
PTH							
Fósforo							
Magnésio							
Albumina							

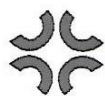
▪ #Exames de Imagem:

▪ #Outros Exames:

- Já tem diagn. microdel. 22q11.2? ( ) 1-sim ( ) 2-não  
(como?) (quando? / / )
- Cardiopatia: (revisão do prontuário)  
-diagnóstico sequencial/cirurg. realizadas (data) /lesões residuais/arco Ao:

( ) 1-à D ( ) 2-à

Anexo 2 - Termo de Compromisso para utilização de material biológico



**Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

**Termo de Compromisso para Utilização de  
Material Biológico e Informações Associadas**

Título do Projeto

**ANÁLISE COMPARATIVA DE GENOMAS: AVALIAÇÃO CITOMOLECULAR  
EM INDIVÍDUOS COM CARDIOPATIA CONGÊNITA CONOTRUNCAL**

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 15 de abril de 2013.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Karen Regina da Silva de Souza	
MariLuze Riegel	

Anexo 3 - Resumo das informações clínicas associadas às 60 amostras incluídas no estudo.

Caso	Sexo	Idade*	Cardiopatía Congénita	Fenótipo associado
32	M	5	TGA	Anormalidade de SNC, crises convulsivas, Hipertelorismo, palato elevado, estrabismo
49	M	14	TGA	NR
55	F	19	TGA	Anormalidade de SNC, crises convulsivas
56	M	11	TOF	ADNPM, crises convulsivas, anormalidade de SNC
58	M	3	TOF	NR
62	M	13	TOF	NR
74	M	15	TGA	NR
75	M	1	TOF	NR
78	M	1	TOF	NR
84	F	24	TOF	NR
91	M	33	TOF	Anormalidade músculo esquelética
93	F	24	TGA	NR
101	M	2	TOF	Anormalidade músculo esquelética, criptorquidia
107	M	1	TGA	Hipertelorismo, nariz pequeno
108	M	18	TOF	NR
116	F	18	TOF	Anormalidade de SNC, crises convulsivas
125	F	3	TGA	ADNPM, olhos pequenos, estrabismo
126	F	5	TGA	Dismorfias faciais
132	F	14	TOF	Anormalidade músculo esquelética ( <i>pectus excavatum</i> )
137	M	32	TOF	NR
140	F	10	TOF	NR
141	M	7	TOF	NR
144	M	11	TGA	NR
145	M	10	TOF	NR
148	M	7	TGA	NR
149	F	3	TOF	Hipertelorismo, epicanto
152	M	17	TOF	Dismorfias faciais
189	M	15	TOF	NR
195	F	14	TOF	Fenda palpebral oblíqua
201	F	11	TOF	NR
206	F	RN	TOF	Anormalidade músculo esquelética, dismorfias faciais
210	M	8	TOF	NR
222	F	7	TOF	Anormalidade músculo esquelética e de SNC, crises convulsivas, dismorfias faciais
235	M	15	TOF	NR
265	M	20	TGA	Anormalidade de SNC, fenda labio-palatina bilateral, crises convulsivas, fenda palpebral oblíqua
268	M	5	TOF	ADNPM, hipertelorismo, baixa implantação de orelhas
269	F	2	TOF	NR
280	F	5	TGA	Anormalidade de SNC, crises convulsivas
291	F	16	TGA	Anormalidade de SNC, crises convulsivas
298	F	10	<i>Truncus arteriosus</i>	NR
300	M	11	TOF	Dismorfias faciais
303	F	23	TOF	NR
317	M	3	TGA	Orelhas de abano
325	F	15	TOF	NR
338	M	33	TOF	Anormalidade músculo esquelética
346	F	22	TGA	NR
347	M	18	TGA	Anormalidade de SNC, baixa implantação das orelhas
356	M	6	TGA	NR
358	F	2	TOF	NR
360	M	2	TOF	Hérnia inguinal bilateral
365	M	16	TOF	NR
376	F	13	TOF	Hipertelorismo, micrognatia
378	F	15	TGA	NR
382	M	2	TGA	NR
398	M	11	TGA	Anormalidade de SNC, crises convulsivas
410	F	6	<i>Truncus arteriosus</i>	Estrabismo, cistos de ovário
443	M	12	TGA	NR
461	M	15	TOF	NR
468	M	9	TGA	Hipertelorismo
484	F	17	TOF	Anormalidade de SNC, crises convulsivas

\*= idade na coleta da amostra para extração de DNA em anos; ADNPM: atraso de desenvolvimento psicomotor; F=feminino; M=masculino; NR= não relatada; RN= Recém Nascido; SNC=sistema nervoso central; TOF= Tetralogia de Fallot; TGA =Transposição das Grandes Artérias.