



Universidade de Brasília

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA CAROLINA VAQUEIRO FIGUEIREDO

DOENÇAS CARDÍACAS CONGÊNITAS (DCCS): INVESTIGAÇÃO DE
ETIOLOGIA GENÉTICA.

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Doutora em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Professora Dra. Aline Pic-Taylor

BRASÍLIA
2022

ANA CAROLINA VAQUEIRO FIGUEIREDO

Doenças cardíacas congênitas (DCCs): investigação de etiologia genética.

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 25 de maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Aline Pic-Taylor (Presidente)

Departamento de Genética e Morfologia-IB/UnB

Dr. Jorge Yussef Afiune

Instituto de Cardiologia do Distrito Federal-ICDF

Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo (Suplente em exercício)

Faculdade de Medicina-UnB

Dr. Gustavo Barcelos Barra

Laboratório Sabin

Dr. Társis Antônio Paiva Vieira

Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP

Dedico esse trabalho ao meu pai, Nilton Figueiredo de Souza, meu primeiro “professor” de ciências. Ele me fez querer aprender sobre as plantas que ele apontava, os peixes que a gente pescava. A vontade de estar com ele me aproximou da natureza, que meio sem querer, ele acabou me ensinando a amar.
Te amo pai!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que se faz presente na minha vida em todos os seus formatos, em todas as suas manifestações, em cada pessoa, em cada ser vivo.

Aos pacientes e familiares que concordaram em participar do estudo. Que esse trabalho seja uma mão amiga na jornada de cada um de vocês.

À minha orientadora Professora Dra. Aline Pic-Taylor, que me acolheu e acreditou em meu potencial desde 2016. Por equilibrar cobrança, correção e autonomia para me fazer entender o lugar de pesquisadora que faz. Que mostrou pelo exemplo a importância de sempre aprender. Que ensina a mágica de ser pesquisadora, estudante, mulher, esposa, mãe de três e como dar o seu melhor em tantos aspectos ao mesmo tempo, tudo junto de modo absolutamente maluco e igualmente genial. Não suficiente, sobreveio uma lição maior, pra nós todas, *my dear*. Tenha a certeza de que seus filhos, os três de sangue daí e essa de academia daqui, também aprendem a honrar e ser abrigo para nossos pais como você é. Obrigada por toda essa jornada!

À Professora Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço. Sempre generosa comigo no ensinar, nesse doutorado ainda mais, ao sustentar a orientação desse projeto quando necessário. Quem me abriu as portas para todas as técnicas moleculares e segue me ajudando a estudar esse mundo de variáveis intrigantes. Que me ensina a dividir, a ensinar mais gente, a aprender e construir com todo mundo que puder somar. Muito obrigada!

À Professora Dra. Silviene Fabiana de Oliveira, que alimentou minha paixão por genética ainda na graduação, e contribui com o fomento e estrutura laboratorial do projeto desde o início. À Professora Dra. Patrícia N. Moretti, pelas ideias durante a qualificação, pelo aprendizado com a técnica de FISH, pela oportunidade de trabalhar junto com os orientandos de graduação.

À Dra. Iris Ferrari (*in memoriam*) e à Dra. Mara Córdoba, que me mostraram os primeiros passos na citogenética clássica, seus truques e a importância desse saber para entender as novidades técnicas. É uma honra para mim que os resultados de cariotípico dessa tese trazem a marca de vocês. Obrigada!

A todo corpo médico que ao longo dos anos atendeu no Ambulatório de Genética do HUB e que ajudaram a construir um tesouro: o arquivo de prontuários do laboratório. A letra de cada uma de vocês escreve junto essa tese e tantas outros trabalhos. Dra. Mara Córdoba, Dra. Rosenelle Araújo, Dra. Beatriz Versiani, agradeço ainda pelo trabalho de devolver a pacientes e familiares nossos achados em forma de aconselhamento e demais encaminhamentos médicos. Reforço o agradecimento a Dra. Beatriz Versiani que teve especial cuidado com o projeto de cardiopatias, me sinalizando pacientes e contribuindo na análise dos exames.

Aos técnicos dos laboratórios: Aluízio, Nilsa e Renata, lendas das bancadas e da orquestração do Laboratório da FS e no IB, Raphael Bonadio, meu instrutor e companheiro de bancada nos arrays.

À colega Dra. Érica Caldas, que me salvou tantas vezes com o sequenciador e Ma. Ana Caroline Gonçalves, parceira de MLPA. À doutoranda Aline Saliba minha companheira de projeto de cardiopatias. Às Doutorandas Vanessa Sodré, Gabriella Corassa, Bárbara Merfort, e à já Dra. Shélida Braz. Obrigada pelas parcerias e momentos de terapia coletiva de pós-graduandas. Fui muito feliz crescendo academicamente ao lado de vocês.

Ao Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital da Criança de Brasília–LPT-HCB, em especial ao Dr. Ricardo Camargo pela disponibilidade e pelas trocas nas realizações do MLPA.

À minha família de origem, de base, minhas raízes, a bateria que me recarrega a cada encontro: Meus pais Beatriz Figueiredo e Nilton Figueiredo, sempre sendo régua, sustento e exemplo; à minha irmã Flávia, cunhado Márcio, ao meu irmão Leonardo e cunhada Taíssa, vocês que ensinam no dia a dia o que é ser lar, a receber o outro, a lutar pelos nossos, a construir; aos sobrinhos Maria Luísa, Arthur e Beatriz, que mantém minha imaginação afiada com muitas perguntas. Que vocês saibam que a gente pode ser o que quiser quando crescer, como nas nossas brincadeiras. Amo todos vocês, obrigada por tanto.

À minha família de casa, essenciais para que esse trabalho exista: Liliam Huzioka, que é amor, compromisso, incentivo, respiro, cuidado, aconchego, arte, liberdade, carnaval. Tudo junto e misturado, em uma sinfonia de deuses e coisas

mínimas, sempre banhada pelas águas da criatividade. À Caju, minha filha felina, que é coautora dessa tese por estar sempre ao meu lado durante a escrita, as vezes em cima do teclado também. Amo vocês! HÁ!

À família Huzioka: Ademar, Mariko e Daniel, pelo acolhimento amoroso, pelos ensinamentos, pelas risadas e mesas fartas que trouxeram sempre leveza e força para o *gambatte* necessário.

Aos colegas da Unidade de Correição da Secretaria de Saúde do DF, que para além do trabalho formal trouxeram em tantos momentos compreensão e incentivo aos estudos. Cumprimento a todos através das chefas queridas Fabiana Braga, Raissa Monteiro e Liane Menezes.

Às amizades que ajudaram a manter a sanidade e alegria: Às que curam: Ingrid Martins, amiga-irmã ninja das agulhas e Eloisa Guimarães, fisioterapeuta. Às Quânticas Carolina Queiroz, Rafaela Toledo, Juliana Bolzan, Fernanda Nogales, Mariana Catunda. Aos de infância e filosofia: Nana Yung, Laís Santillo, Leonardo Resende, Braytner Rocha, Lincoln Coelho, Naldo L'Costa. Malu Rodrigues, Bruno Bruce, Paulo Sérgio Cassis, Mário Marco Corrêa, Sérgio Ricart, Rafael Castelo, Elisa Colares, e meu amigo Davi. À família Citronela: Naiane Comar, Rafael Cordeiro, Rodiney Kuroki, Igor dos Santos, Águeda Macias, Isabella Bueno, Lui Martins, Ian B. Martins “e” Vasconcelos. Aos vizinhos Nathan Pinheiro, Charlotte Bilo, João Flávio Silva e Camila Souza. Às que Lili dividiu comigo: Aline Yamamoto e Nina Yamamoto, Ana Laura Lobato e Patrícia Rangel.

À banca examinadora, pela disposição e pelas contribuições para esse trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. À FAP-DF pelo financiamento desse trabalho e incentivo à pesquisa no DF.

Eu gostaria de agradecer também a mim. Registro para lembrar dessa capacidade de persistir em meio ao caos. Agradeço à Ana menina, com seus experimentos de brincadeira e imaginação. Hoje, sei que as perguntas podem mudar, mas sempre existirão aos milhares, felizmente! Que as dúvidas existam e que eu continue a olhar para elas como uma criança curiosa.

“Ser verdadeiramente radical é tornar a esperança possível e não o desespero convincente.”

Raymond Williams (1980)

RESUMO

As doenças cardíacas congênitas (DCCs) são definidas como alterações estruturais no coração e nos grandes vasos presentes ao nascimento. Acometem em todo o mundo de 1 a 5% de todos os nascidos vivos, sendo, portanto, o defeito congênito mais comum. Com o objetivo de investigar a etiologia genética foram selecionados 120 pacientes com DCCs e fenótipos extracardíacos, e suas amostras foram submetidas a exames de Cariótipo, MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), análise cromossômica por *microarray* (CMA) (do inglês *Chromosomal Microarray Analysis*) e/ou sequenciamento de exoma, conforme orientação clínica. Com aplicação do fluxograma proposto foram realizados 115 exames de Cariótipo, 43 exames de MLPA, 42 CMAs e nove sequenciamentos de exoma, que permitiram a identificação de alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas em 71,7% dos pacientes (86 de 120), superando a expectativa de diagnóstico apresentada na literatura e reforçando a capacidade diagnóstica disponível e aplicável no Brasil. Os achados genômicos desse grupo de pacientes reforçam a importância da fenotipagem adequada para classificação de variantes genômicas, e do entendimento das vias metabólicas envolvidas na cardiogênese. Contribui-se ainda para ponderação sobre regras vigentes de classificação de CNVs e variantes genômicas em doenças complexas, apresentando alterações com potencial para o estabelecimento ou ampliação de associações genótipo-fenótipo em pacientes com DCCs.

Palavras-chave: cardiopatia congênita; doenças cardíacas congênitas; Cariótipo; MLPA; CMA; CNVs; Exoma; variantes patogênicas.

ABSTRACT

Congenital heart diseases (CHD) are structural alterations in the heart and/or great vessels present at birth. Affecting between 1 and 5% of all live births worldwide, they constitute the most common congenital defect. To investigate the genetic etiology of CHD, 120 patients with CHD and extracardiac phenotypes were selected and their samples submitted to karyotyping, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), Chromosomal Microarrays (CMA) and exome sequencing techniques, after clinical guidance. 115 karyotype tests, 43 MLPA tests, 42 CMAs, and nine exome Sequencing were performed. The screening resulted in the identification of pathogenic or potentially pathogenic alterations in 74.1% of the patients (89 of 120). This result exceed the diagnostic expectation presented in the literature and reinforce the diagnostic capacity applicable in Brazil. The genomic findings for this patient group highlight the importance of adequate phenotyping to allow the classification of genomic variants and reinforce the importance of screening the metabolic pathways involved in cardiogenesis. Furthermore, these findings contribute to discussions regarding the classification standards for copy number variations (CNVs) and genomic variants in complex diseases, presenting variants with the potential to establish or expand genotype-phenotype associations in patients with CHD.

Keywords: Congenital heart disease; Karyotype; MLPA; CMA; CNVs; Exome Sequencing; Pathogenic variants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de DCCs, terminologias e graduação de gravidade.....	21
Figura 2. Adaptações da circulação fetal para neonatal. Imagem adaptada de Open Stax, 2021.....	26
Figura 3. .Dinâmica da cardiogênese, referência temporal em camundongos.	29
Figura 4. Diferentes modos de ativação da via Wnt.	33
Figura 5. Via Notch de sinalização. Adaptado de Luxán <i>et al.</i> , 2016 e Lai, 2004.....	38
Figura 6. Trabeculação do miocárdio ventricular.	39
Figura 7. Componentes da via de sinalização genérica da superfamília TGF-β.	41
Figura 8. Representação da transição epitélio-mesenquimal na formação do canal atrioventricular. Adaptado de Yamagishi <i>et al.</i> , 2009.....	43
Figura 9. Desenvolvimento do coxim endocárdico em embrião de galinha.	44
Figura 10. Via Bmp.....	46
Figura 11. Via Nodal de sinalização. Adaptado de Barnes and Black, 2016.	47
Figura 12.Via de sinalização Shh em seu estado ativado.	49
Figura 13. Via RAS/MAPK.	51
Figura 14. Via VEGF e os principais fatores de transcrição por ela ativados.Traduzido de De Lartigue, 2016.....	52
Figura 15. VEGF e o direcionamento da migração celular. Traduzido de Lambrechts and Carmeliet, 2004.....	53
Figura 16. Diferenciação celular e os marcadores moleculares das linhagens celulares na cardiogênese. À esquerda indicação temporal do modelo de camundongos. Traduzido de Brade <i>et al.</i> , 2013.....	56
Figura 17. Subdomínios do SHF.	59
Figura 18. Migração e posicionamento das células da crista neural (NCCs) nos arcos aórticos. Siglas: aao: Aorta ascendente; bca: artéria braquiocefálica; da: aorta dorsal; lcca: artéria carótida comum esquerda; lsa: artéria subclávia esquerda; P: tronco pulmonar. Adaptado de Brade <i>et al.</i> , 2013.	62
Figura 19. Distribuição das causas genéticas identificadas em pacientes com DCCs.CNV: Variação de número de cópias; SNV: variação de um único nucleotídeo. Adaptado de Zaidi e Brueckner, 2017... ..	68
Figura 20. Heterogeneidade fenotípica e de <i>locus</i> nas DCCs.....	69
Figura 21. Os principais distúrbios genômicos (síndromes associadas à CNVs) relacionados à DCC.(Saliba <i>et al.</i> , 2019).	73
Figura 22. Diferentes tamanhos de deleções na região 22q11.2 e denominações.....	74
Figura 23. Fluxograma de triagem diagnóstica.....	82
Figura 24. Etapas da reação de MLPA. Adaptado de MRC-Holland.	85
Figura 26. Protocolo de preparo de amostras da Affymetrix® CytoScan® 750k Array. Traduzido dos protocolos Affymetrix® CytoScan® 750k Array.	89
Figura 27. O sequenciamento de nova geração. Traduzido de Illumina, Inc, 2020.....	96
Figura 28. Resultados identificados por meio do fluxograma proposto.	104

Figura 29. DCCs identificadas nos pacientes diagnosticados por cariótipo.	109
Figura 30. Deleção da região típica de 3Mb na região 22q11.2 na amostra do paciente P077.....	112
Figura 31. Deleção em 22q11.2 de ~1,5Mb identificada no paciente P078.	113
Figura 32. DCCs identificadas nos pacientes diagnosticados por CMA.	115
Figura 33. arr[hg19] 15q11.2q13.3(22,770,421-32,439,281)x4 identificada no paciente P079.....	125
Figura 35. Deleção de 10,16 Mb na região arr[hg19] 11p14.3p13(24,315,244-34,478,570)x1 identificada no paciente P078.	126
Figura 36. Deleção em homozigose de 1,68 Mb na região Xp22.31 arr[hg19] (6,455,151-8,135,568)x0 identificada no paciente P081*.	128
Figura 37. Duplicação de 172 kb na região 3p25.2 arr[hg19] (12,626,587-12,820,795) identificada no paciente P081*.	128
Figura 38. Duplicação 14q31.3q32.33 de 17.95 Mb identificada no probando P082 e em seu irmão.	131
Figura 39. Deleção terminal no cromossomo 10 dos irmãos, arr[hg19] 10q26.2q26.3(129,480,529- 135,426,386)x1 de 5,94Mb.	132
Figura 41. Deleção na região 2q37.3 arr[hg19] 2q37.3(240,526,165-242,782,258)x1 de 2,25 Mb identificada no paciente P083. Extraída de publicação de publicação de nosso grupo (Moretti <i>et al.</i> , 2020).	134
Figura 42. Deleção na região arr[hg19] 1q43q44(238,561,769-249,224,684)x1 de 10,7 Mb identificada no paciente P084.	135
Figura 43. Deleção de 5,90Mb identificada no paciente P085, arr[hg19] 3p26.3p26.1(61,891- 5,965,980)x1.....	137
Figura 44. Duplicação de 40,90Mb na região arr[hg19] 7q31.31q36.3(118,213,867-159,119,707)x3.	137
Figura 45. Deleção de 12 Kb na região arr[hg19] 22q11.21(19,754,878-19,766,917)x1, identificada no paciente P086.....	139
Figura 48. Duplicação de 421 Kb no paciente P087* herdada da genitora.	141
Figura 49. Deleção de 76Kb na região arr[hg19] 2p16.3(50,539,818-50,615,382)x1.....	143
Figura 50. Duplicação de 200Kb encontrada no paciente P089 na região arr[hg19] 3p25.2(12,639,852-12,839,971)x3.....	144
Figura 34. Duplicação de 98 Kb na região arr[hg19] Xp11.22(53,579,302-53,676,961)x3 no paciente P090.	145
Figura 54. Deleção de 240 Kb na região arr[hg19] 16q23.1(77,411,910-77,651,587)x1.	147
Figura 55. Deleção do gene NPHP1 identificada no paciente P093*.	148
Figura 40. Deleção identificada de 652Kb na região arr[hg19] 22q11.22q11.23(22,997,928- 23,649,562)x1 de 652 Kb.	151
Figura 56. Regiões de homozigose maiores que 5Mb identificadas na paciente P095, apresentadas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11 e 22. As duas maiores regiões de AOH no braço longo do cromossomo 2 com 47,02Mb e 25,77Mb;	153
Figura 57. Alterações identificadas no cromossomo 2 da paciente P095.	153

Figura 58. Deleção de 254 Kb em arr[hg19] Xq13.3(74,193,804-74,447,411)x1 com deleção completa do gene ABCB7.....	154
Figura 59. Deleção de 151.5kb identificada no paciente P097* envolvendo o gene <i>MIPEP</i>	156
Figura 46. AOH de 11,2 Mb na região 10q25.1q26.11: arr [hg19] (108,864,732-120,122,033) hmz identificada no paciente P098*.....	158
Figura 47. Grandes regiões de AOH no paciente P099.....	160
Figura 51. AOH pericentromérica de no cromossomo 11 identificada no paciente P100*.....	161
Figura 52. Região de homozigose identificada na paciente, arr[hg19] 7p15.3p14.1(25,363,632-37,576,674) hmz de 12,2 Mb.	162
Figura 53. AOH identificada no cromossomo 22 do paciente P102*	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das cardiopatias congênitas baseada em aspectos embriológicos e do desenvolvimento, com a finalidade de facilitar a compreensão de estrutura e de risco. Adaptado de Botto <i>et al</i> , 2007.....	24
Tabela 2. Incidência por milhão de nascidos vivos.....	28
Tabela 3. Genes de fatores de transcrição associados com DCCs na literatura.....	63
Tabela 4. Ocorrências sindrômicas de DI/ADNPM e cardiopatias congênitas.....	70
Tabela 5. Critérios gerais de investigação da patogenicidade das CNVs.....	92
Tabela 6. Critério de classificação de variantes do <i>American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)</i>	97
Tabela 7. Resultados gerais dos pacientes diagnosticados por meio de cariotípico.....	106
Tabela 8. Casos com diagnóstico por MLPA.....	110
Tabela 9. Fenótipos cardiológicos identificados nos pacientes com alterações identificadas por MLPA.....	113
Tabela 10. Alterações patogênicas e possivelmente patogênicas identificadas por CMA.....	116
Tabela 11. Alterações de significado incerto (VOUS) identificadas por CMA.....	118
Tabela 12. Casos com AOH identificadas por CMA.....	120
Tabela 13. Casos com alterações benignas identificadas por CMA.....	121
Tabela 14. Resultados dos casos selecionados para sequenciamento de exoma.....	123
Tabela 15. Investigações sugeridas para perspectivas futuras.....	168

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO OBJETO DE ESTUDO	17
1.2. DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE DCCS NA PERSPECTIVA DO BRASIL.....	18
1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS DCCS.....	21
1.4. CARDIOGÊNESE E AS DCCS.....	29
1.4.1. Via Wnt.....	32
1.4.1.1. A via wnt canônica: manutenção da indiferenciação celular.....	32
1.4.1.2. As vias Wnt não-canônicas:	34
1.4.1.2.1. Via de polaridade planar (PCP).....	34
1.4.1.2.2. Via Wnt/Ca ²⁺	35
1.4.1.3. Modulação entre as diferentes vias Wnt.....	35
1.4.2. Via Notch.....	36
1.4.3. Superfamília TGF-β	40
1.4.3.1. Via Bmp	45
1.4.4. Via Nodal.....	46
1.4.5. Vias Hedgehog	48
1.4.6. Via RAS/MAPK.....	50
1.4.7. Via Vegf.....	51
1.5. As principais linhagens celulares envolvidas na cardiogênese, marcadores moleculares e vias de sinalização.	54
1.5.1. Linhagem de células do pró-epicárdio (PE)	60
1.5.2. Linhagem de células progenitoras da crista neural	61
1.6. Moléculas chave da interação das vias metabólicas: principais fatores de transcrição da cardiogênese.	62
1.7. Novos horizontes de interesse da cardiogênese molecular: matriz extracelular, cílios, epigenética e modificadores de cromatina.	65
1.8. ETIOLOGIA GENÉTICA DAS DCCS.....	68
1.8.1. Aneuploidias e desequilíbrios cromossômicos.....	69
1.8.2. Variação de número de cópias	72
1.8.3. Alterações gênicas	78
2. OBJETIVOS.....	79
2.1. OBJETIVO GERAL.....	79
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	79
3. MÉTODOS.....	80

3.1.	CASUÍSTICA	80
3.1.1.	Critérios de inclusão	80
3.1.2.	Critérios de exclusão:	80
3.2.	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO	81
3.2.1.	Cariótipo	82
3.2.2.	Extração de DNA das amostras para as técnicas moleculares	83
3.2.3.	<i>Multiplex ligation probe amplification</i> -MLPA.....	83
3.2.4.	ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA).....	88
3.2.5.	Classificação das alterações de número de cópias	91
3.2.6.	Sequenciamento de Exoma.....	93
3.2.7.	Classificação das alterações identificadas por Exoma.....	97
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	101
4.1.	RESULTADOS ALTERADOS NA INVESTIGAÇÃO POR CARIÓTIPO CONVENCIONAL	106
4.2.	RESULTADOS ALTERADOS NA INVESTIGAÇÃO POR MLPA	109
4.3.	RESULTADOS DA ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA) ..	114
4.3.1.	ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS POR CMA.....	116
4.3.2.	ALTERAÇÕES DE SIGNIFICADO INCERTO (VOUS) IDENTIFICADAS POR CMA	117
4.3.1.	ALTERAÇÕES DE ZIGOSIDADE IDENTIFICADAS POR CMA.....	119
4.3.2.	ALTERAÇÕES BENIGNAS IDENTIFICADAS POR CMA	121
4.4.	RESULTADOS DA ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE EXOMA.....	122
5.	DETALHAMENTO CLÍNICO DOS CASOS	124
5.1.	CASOS COM ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS POR CMA.....	124
5.2.	CASOS COM ALTERAÇÕES DE SIGNIFICADO INCERTO (VOUS) IDENTIFICADAS POR CMA	141
5.3.	CASOS COM ALTERAÇÕES DE ZIGOSIDADE IDENTIFICADAS POR CMA ...	158
5.4.	CASOS COM ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS POR EXOMA.....	164
6.	REFLEXÕES SOBRE OS RESULTADOS ALCANÇADOS E PERSPECTIVAS FUTURAS	166
7.	CONCLUSÃO	170
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
9.	APÊNDICES	184
9.1.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	184
9.2.	Artigos publicados	185

10. ANEXOS.....	186
10.1. Anexo 1- Sondas presentes no Kit de MLPA P250.....	186
10.2. Anexo 2- Sondas presentes no Kit de MLPA P245.....	187

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO OBJETO DE ESTUDO

As doenças cardíacas congênitas (DCCs) são definidas como alterações estruturais no coração e nos grandes vasos presentes ao nascimento (1). Exclui-se desse grupo, portanto as cardiomiopatias, as vasculopatias e as arritmias cardíacas (2). Estima-se que as DCCs acometam em todo o mundo de 1 a 5% de todos os nascidos vivos, sendo, portanto, o defeito congênito mais comum (3). A alta incidência desse defeito congênito é creditada à complexidade do desenvolvimento cardíaco durante o processo embrionário. A cardiogênese é um processo que envolve diversas etapas morfogênicas e ocorre sob efeito de diferentes vias de regulação do desenvolvimento que, isoladas ou em combinação, atuam na especificação e diferenciação das linhagens celulares, e finalmente na estruturação do coração e dos grandes vasos (4).

Diante de tantas etapas e mecanismos regulatórios, alterações em diferentes momentos do padrão de desenvolvimento cardíaco levam a uma diversidade de fenótipos anatômicos e fisiológicos. As DCCs são a maior fonte de morbidade e mortalidade pediátrica em todo o mundo, e a compreensão de sua etiologia é fundamental para auxiliar no prognóstico e permitir o planejamento do cuidado cardíaco especializado de que esses pacientes necessitam (Costain *et al.*, 2016).

As DCCs têm sido descritas ainda como causa direta de aborto espontâneo e perda gestacional tardia. Em um estudo baseado em autópsias e ultrassom pré-natal de gestações que resultaram em perda gestacional ou feto natimorto, o grupo de Jorgensen e colaboradores (2014) identificou que 8,5% dos casos (179 de 2083) apresentavam DCCs, sendo identificada prevalência de DCCs dez vezes maior em casos de aborto espontâneo e perda gestacional tardia quando comparada com a incidência entre os nascidos vivos (~0,8%) (5).

Nesse estudo, identificou-se ainda que 84% (151 de 179) dos fetos apresentavam DCCs como provável causa do óbito, sendo que desses óbitos por DCCs 83% (125 de 151) apresentavam anomalias extracardíacas e 17% (26 de 151), DCCs isoladas. Entre casos de DCCs com múltiplas anomalias foram identificadas

síndromes cromossômicas em 44% dos fetos, reforçando a importância da etiologia genética das DCCs.

1.2. DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE DCCS NA PERSPECTIVA DO BRASIL

As cardiopatias congênitas figuram nas estatísticas brasileiras como terceira maior causa de óbito neonatal e na primeira infância, representando cerca de 8% da mortalidade infantil. A maioria dos portadores é atendida pelo Sistema Único de Saúde -SUS- e estima-se que em torno de 30% dos recém-nascidos recebem alta hospitalar sem o diagnóstico, podendo evoluir para óbito precoce, antes de receber tratamento adequado (6,7). O diagnóstico precoce e manejo adequado das cardiopatias congênitas gera, portanto, impacto direto na redução da mortalidade infantil, auxiliando no atendimento a um dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) declarados pelas Nações Unidas (8). Para além do impacto na mortalidade, o diagnóstico precoce e manejo adequado das cardiopatias congênitas apresentam, em longo prazo, como possibilidade de melhora dos índices de morbidade, redução do tempo de internação, prevenção às futuras complicações cardiovasculares, além de trazer melhorias para o desenvolvimento neuropsicomotor dos pacientes (7).

A implementação de rotinas de diagnóstico genético bem definidas, como a proposta nesse estudo, representa a união da eficiência com a eficácia. Além de ampliar a taxa de diagnósticos, o uso de fluxogramas e protocolos específicos para o diagnóstico das DCCs produzem uma redução significativa no custo financeiro envolvido. Um estudo do *Medical College of Wisconsin*, por Geddes e colaboradores (2017), identificou aumento de 10% na taxa de diagnóstico genético e redução do custo financeiro final para o paciente de 13,2% a partir da aplicação de protocolos específicos para pacientes com DCC. A redução do custo financeiro se justifica pela redução do uso de múltiplos testes que era de 66% antes da aplicação de protocolos direcionados à DCCs, sendo reduzida para 24%, durante seu uso. Essa redução do uso de exames redundantes traz além de benefícios econômicos, melhorias na qualidade de vida de pacientes e familiares. (Geddes *et al.*, 2017).

Os principais benefícios do diagnóstico genético no manejo clínico de pacientes com cardiopatia congênita são:

- Confirmação diagnóstica: permite a compreensão das causas e mecanismos patogênicos, além de evitar equívocos possíveis no uso de diagnóstico diferencial;
- Compreensão do prognóstico: facilita manejo pós-operatório e resultados a longo prazo dos tratamentos aplicados;
- Identificação de malformações extracardíacas: auxilia na identificação de síndromes. Além disso, a associação frequente entre certos tipos de DCCs e malformações aponta caminhos na investigação de outras malformações, como por exemplo na ocorrência recorrente de defeitos de formação de coxins endocárdicos e malformações craniofaciais;
- Manejo de outras complicações cardíacas: o entendimento das causas genéticas envolvendo as DCC permite identificar a predisposição às arritmias, insuficiência cardíaca, defeitos cardíacos de condução e sobreposição entre DCCs e cardiomiopatias;
- Identificação de familiares afetados: permite a identificação de variações fenotípicas familiares subnotificadas, levando até ao diagnóstico de familiares sob os quais não havia suspeita, de acordo com cada país;
- Risco de recorrência: entendimento da causa genética, padrão de herança, penetrância e expressividade permitem estimativas de recorrência mais acuradas de acordo com o tipo de DCC;
- Diagnóstico pré-natal e pré-implantacional: bem estabelecido para grandes alterações cromossômicas, em especial alterações numéricas, porém enfrenta dificuldades de aplicação devido a variabilidade fenotípica das alterações, além da correlação direta com as políticas de interrupção de gravidez, de acordo com cada país;
- Potencial terapêutico: grande desafio da área, apresenta caminhos promissores como as pesquisas de ativação farmacológica de vias metabólicas associadas às DCCs (9). Como exemplo, em estudos experimentais com modelos *knock-out* do gene *WNT2* que resultaram em defeito atrioventricular, o fenótipo identificado pode ser revertido *in vivo* através da ativação farmacológica da via de sinalização Wnt (10). Estudos na área de terapias

potenciais usualmente recrutam pacientes com variantes de sequência definidas e/ou casos familiares previamente estabelecidos.

No ano de 2014 instituiu-se no Brasil a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, diante das diretrizes apresentadas pela Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014. Tal política tem como objetivo a redução da morbimortalidade e a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com doenças raras e prioriza a implantação de ações de promoção, prevenção, detecção precoce, tratamento oportuno, redução de incapacidade e cuidados paliativos. As ações contemplam em seu primeiro eixo de atuação as doenças raras de origem genética e, especificamente, as anomalias congênitas. Prevê ainda regras para o credenciamento de unidades de saúde como Serviço de Referência em Doenças Raras, de modo que esses serviços, ao atender os requisitos descritos e receberem o credenciamento, possam implementar a linha de diagnóstico e cuidado em doenças raras, recebendo para tanto, financiamento mensal específico. A Portaria Nº 199 elenca inclusive relação de exames de diagnóstico genético previstos para solicitação e custeio no Serviços de Referência, incluindo os exames utilizados nesse estudo. Entretanto, a implementação prática dos serviços de referência depende da atuação direta dos órgãos de saúde municipais, distritais e estaduais. E essa implementação enfrenta dificuldades burocráticas, desconhecimento e falta de vontade política dos governantes para sua completa efetivação e funcionamento.

1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS DCCS

As DCCs se apresentam clinicamente em um amplo espectro de fenótipos. A heterogeneidade se amplia ainda mais se observada para além da anatomia, levando em conta origem e desenvolvimento embriológico, variações de apresentação clínica e epidemiologia. Por isso, definir uma metodologia de classificação para as DCCs é desafiador. Usualmente, a classificação das DCCs é realizada com base nos diferentes fenótipos identificados e em sua gravidade (Figura 1). Estima-se que um terço dos pacientes apresentem DCCs graves, que demandam intervenção cirúrgica antes do primeiro ano de vida (Zaidi and Brueckner, 2017).

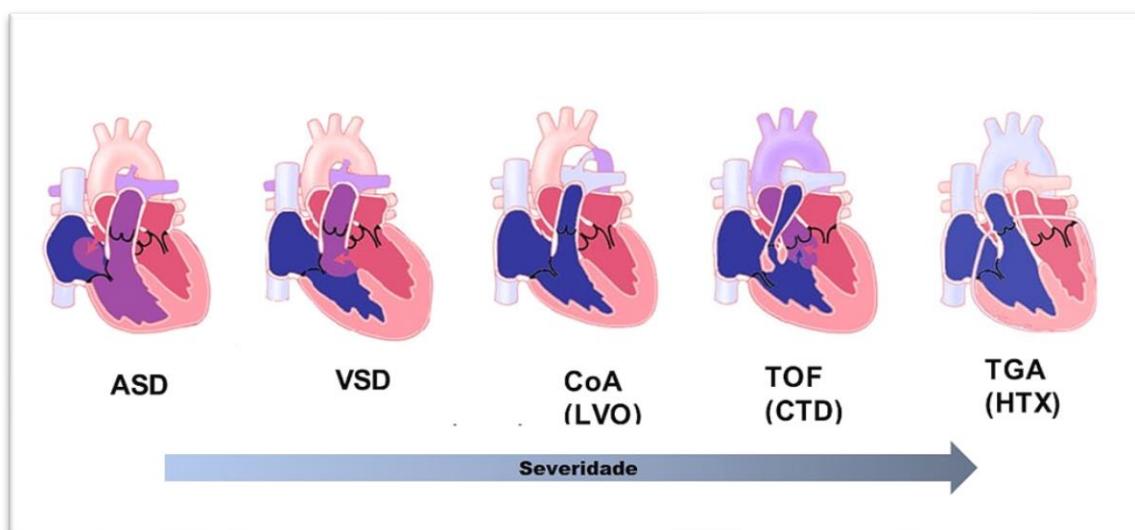


Figura 1. Exemplos de DCCs, terminologias e graduação de gravidade.

Siglas: ASD: Defeito de septação atrial; VSD: Defeito de septação ventricular; CoA: Coactação de aorta; LVO: Obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo; TOF: Tetralogia de Fallot; CTD: Defeito conotruncal; TGA: Transposição completa de grandes vasos; HTX: Heterotaxia. Adaptado de Zaidi e Brueckner, 2017.

Para o estudo de um objeto tão diverso, se faz necessária uma classificação estruturada que permita a comparação entre os diversos casos. Para alcançar esse objetivo, diversos sistemas de classificação já foram propostos. A estrutura apresentada na Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas

Relacionados com a Saúde (CID-10, em inglês *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* -ICD-10) definido pela Organização Mundial da Saúde- OMS (em inglês, *World Health Organization-WHO*) com a finalidade de permitir a comparação de dados epidemiológicos (como morbidade e mortalidade) entre países é pouco específica e não abarca a diversidade de alterações clinicamente identificadas (11).

O *International Paediatric and Congenital Cardiac Code* (IPCCC), criado para facilitar as correções cirúrgicas de cardiopatias e seus desdobramentos, traz uma proposta ampla e detalhada de classificação que reúne três classificações anteriores, com enfoque na complexidade das DCCs. Entretanto, o sistema proposto é tão complexo quanto seu objeto, composto uma lista longa com sete categorias, detalhadas em listas complementares que contém, literalmente, milhares de alterações listadas de modo que cada DCC acaba representada por um código numérico de seis dígitos. Para dar ideia da complexidade, a lista completa disponível em <http://ipccc.net/>, em formato .xlsx, tem 36 colunas e 9438 linhas de diferentes classificações (12). Outros estudos buscaram simplificar e unificar as classificações. Houyel e colaboradores (2011), apresentaram em uma classificação anatômica e demográfica, com 10 grandes grupos e apenas 23 subseções.

Entre classes pouco específicas e extremamente acuradas, muitas propostas terminam apresentando uma diversidade de grupos de classificação, que acabam incluindo estatisticamente poucos casos. Além disso, todos tem em comum a abordagem anatômica e focada em critérios de tratamento das DCCs, deixando claro que não abordam os mecanismos de desenvolvimento embriológico envolvidos nas lesões classificadas (13)

Do ponto de vista do tratamento cardiológico, a classificação apresentada pelo IPCCC representa um avanço contínuo de padronização das nomenclaturas das DCCs, tendo inclusive recentemente se aproximado da *International Classification of Diseases* (ICD-11) da Organização Mundial de Saúde, em um esforço de padronização. No novo ICD-11, no Brasil, CID-11, foram incorporados 318 termos para diagnóstico de DCCs, que somados à nomenclatura das versões anteriores compõe agora 367 termos (14).

Em outra direção, a classificação proposta por Botto e colaboradores (2007) agrupa as diversas DCCs em grupos mais abrangentes, formados principalmente por suas características anatômicas, epidemiológicas e de desenvolvimento embriológico, inferida a partir de extensa revisão de literatura científica. A proposta de Botto e seus colaboradores visa classificar para permitir uma estimativa de fatores de risco associados às lesões, um enfoque mais alinhado com estudos etiológicos (15).

Botto e colaboradores (2007) separam as DCCs em três grandes grupos de complexidade, conforme detalhado na Tabela 01.

No grupo dos defeitos simples, agrupa-se fenótipos em que é possível reconhecer um defeito principal, seja um defeito simples (por exemplo, atresia pulmonar) ou um fenótipo bem caracterizado (por exemplo, Tetralogia de Fallot). Os defeitos simples se dividem em sete subgrupos.

No grupo das associações, descreve-se combinações comuns de defeitos simples, ou seja, combinações bem definidas entre dois ou mais fenótipos bem caracterizados.

No grupo dos defeitos complexos, descreve-se fenótipos que não podem ser agrupados como defeitos simples nem como associações.

Tabela 1. Classificação das cardiopatias congênitas baseada em aspectos embriológicos e do desenvolvimento, com a finalidade de facilitar a compreensão de estrutura e de risco. Adaptado de Botto *et al*, 2007.

Grupos de DCCs	
Defeitos Simples	Exemplos de fenótipos
<i>Conotruncais (CTD)</i>	Tetralogia de Fallot (TOF) Atresia pulmonar (PA) Transposição de grandes artérias (TGA) Dupla via de saída do ventrículo direito (DORV)
<i>Anomalia retorno venoso pulmonar (APVR)</i>	Anomalia retorno venoso pulmonar com estenose pulmonar (APVR- EP) Anomalia retorno venoso pulmonar parcial (APVRP)
<i>Obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo (LVOTO)</i>	Coactação de Aorta (CoA) Estenose de aorta (AS) com/sem defeito de septação atrial Síndrome do coração esquerdo hipoplásico com/sem defeito de septação atrial (HLHS)
<i>Obstrução da via de saída do ventrículo direito (RVOTO)</i>	Estenose de valva ou ramos pulmonares (EP) Atresia de tricúspide (TA) Anomalia de Ebstein Atresia Pulmonar
Defeitos de septação	Defeito de septação atrial (ASD) Defeito de septação ventricular (VSD) Defeito de septação atrioventricular completo (AVSD) Defeito de septação atrioventricular transitório (defeito de coxins endocárdicos)
<i>Heterotaxia</i>	Defeito de lateralidade parcial (<i>Situs inversus partialis</i>) com malformação cardiovascular complexa Defeito de lateralidade (<i>Situs inversus totalis</i>) com malformação cardiovascular complexa
Associações	Exemplos de fenótipos
<i>Conotruncal +AVSD</i>	Transposição de grandes vasos com defeito de septação atrioventricular (TGA+AVSD)
<i>APVR+AVSD</i>	Anomalia retorno venoso pulmonar com defeito de septação atrioventricular
<i>ASD + CoA</i>	Defeito de septação atrial com Coarctação de Aorta
Defeitos complexos	Exemplos de fenótipos
<i>SV SV, DIRV TGA + RVOTO</i>	Ventrículo único Ventrículo único e entrada dupla no ventrículo direito Transposição de grandes artérias com estenose ou coarctação aórtica

A classificação unificada apresentada pelo IPCCCC/ ICD-11 uniformiza as terminologias cardiológicas, especialmente do ponto de vista clínico, cirúrgico e administrativo (para referência em atestados e relatórios médicos, por exemplo). Entretanto, do ponto de vista genético permanece um grande questionamento a respeito de variantes morfológicas do coração que frequentemente são excluídas das classificações (Botto *et al.*, 2007 e Jacobs *et al.*, 2021).

São variantes que muitas vezes ocorrem de maneira transitória ou de resolução espontânea tais como PCA (persistência do canal arterioso, também referido como ducto arterioso patente ou persistência do ducto arterioso) e FOP (forame oval patente). Essas variantes morfológicas não patológicas estão presentes na circulação fetal, que se adapta para garantir as funções de excreção, nutrição e oxigenação da placenta, permitindo que o sangue oxigenado e nutritivo flua a partir da placenta para todo o feto, enquanto os pulmões e sistema digestivo ainda estão em formação (16).

Na Figura 2 estão representadas regiões da circulação fetal e as adaptações que permitem a obtenção de nutrientes e oxigênio pela placenta. No coração do feto, a abertura do Forame Oval permite a passagem preferencial de sangue oxigenado que chega da placenta e acessa o coração pelo átrio direito fluindo pelo forame oval para o átrio esquerdo. O sangue oxigenado é bombeado pelo ventrículo esquerdo e deixa o coração pela Aorta para irrigar o feto em formação. Uma proporção menor de sangue segue para o ventrículo esquerdo, sendo novamente desviado para a Aorta através do Ducto Arterioso. Esses desvios permitem que um menor fluxo de sangue passe pela artéria pulmonar com baixa pressão evitando a sobrecarga do pulmão em formação. A oxigenação do sangue no feto é realizada na placenta. O sangue oxigenado na placenta flui através da veia umbilical, chegando ao fígado onde é desviado pelo Ducto Venoso, interligado à veia cava inferior, por meio da qual acessa o coração pelo átrio direito. No lado direito da imagem ilustra-se as conversões após o parto (16).

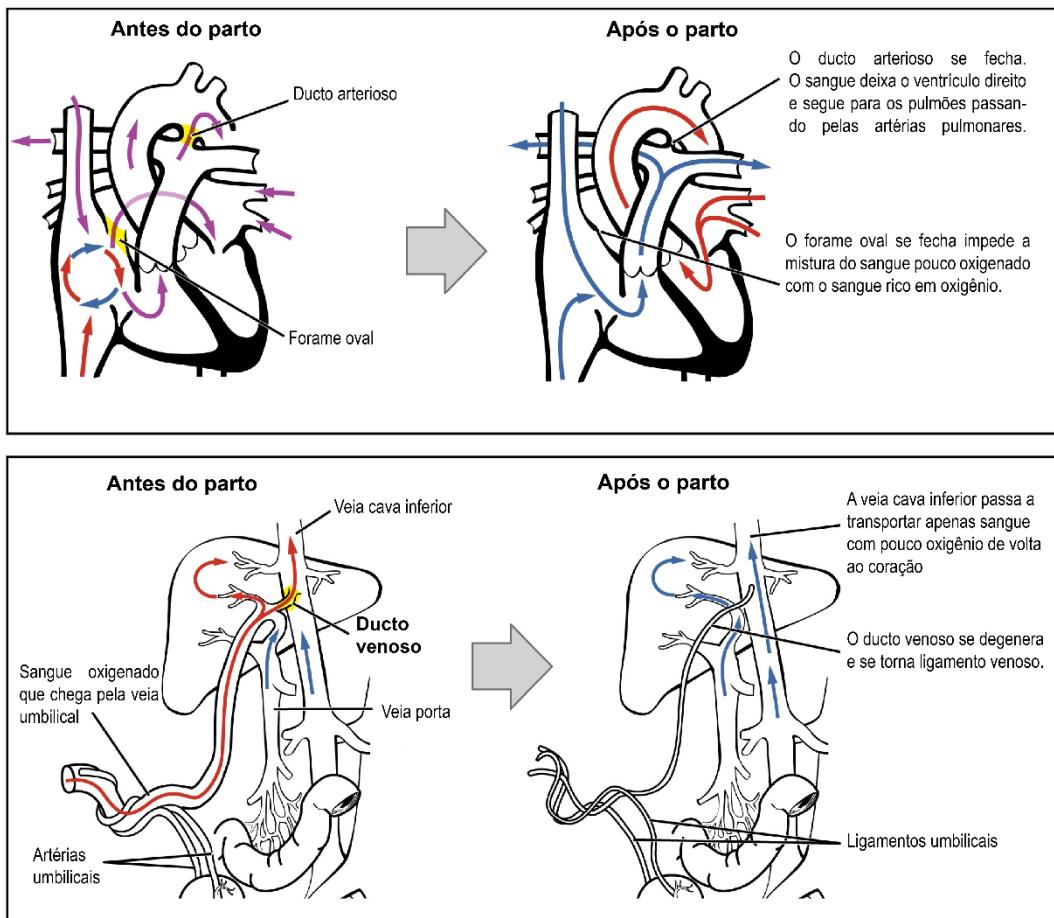


Figura 2. Adaptações da circulação fetal para neonatal. Imagem adaptada de OpenStax, 2021.

Após o nascimento, com a separação entre feto e placenta e iniciado o funcionamento dos pulmões, ocorre a transição da circulação fetal para a circulação neonatal, com a separação entre a circulação pulmonar e sistêmica. O aumento do fluxo sanguíneo pulmonar promove o fechamento do FOP. O redirecionamento do fluxo sanguíneo para os pulmões e sistema digestivo do neonato levam ao fechamento do canal arterioso e ducto venoso, respectivamente (destaques na Figura 2). Espera-se o fechamento do FOP assim que iniciada a respiração pulmonar. No caso de PCA e do ducto arterioso no fígado, estima-se que o fechamento desses desvios fetais se inicie logo após o corte do cordão umbilical, com processo de fibrose promovendo o fechamento total dos vasos ocorrendo entre 4-8 semanas após o nascimento (16).

Observa-se que as diversas classificações de DCCs apresentadas baseiam seus dados em estudos prévios, focados na intervenção clínica e nas correções cirúrgicas de DCCs a partir de dados de centros cardiológicos especializados. As variações anatômicas assintomáticas ou consideradas leves ou de baixa repercussão aparecem na literatura de forma sub-representadas, casos como BAV, PS, FOP, PCA entre outros, e muitas vezes deixam de ser encaminhados para atendimento cardiológico e genético especializado tendo em vista a baixa repercussão hemodinâmica (17).

Essas variantes morfológicas estão presentes inclusive em grande parte da população, ainda que representem baixo impacto hemodinâmico. Desse modo, embora possam apresentar baixa relevância enquanto quadro cardiológico, elas compõe o quadro fenotípico geral de diversos pacientes, sendo frequentemente reportadas do ponto de vista fenotípico. O *Human Phenotype Ontology* (HPO) reúne um vocabulário padronizado de anormalidades fenotípicas visando colaborar com a comunicação entre pesquisadores, clínicos e bioinformaticos das diferentes áreas de saúde para uniformizar as descrições clínicas abrangendo os relatos relevantes para todas essas áreas (18).

Desse modo, pode-se utilizar as classificações mais generalistas como a de Botto e colaboradores (2007), que facilitam o entendimento de profissionais não-cardiologistas; e posteriormente, avançar sobre a classificação clinicamente orientada e detalhista trazida pelo IPCCC/ ICD-11. Entretanto, do ponto de vista do entendimento genômico, é imprescindível informar toda e qualquer variação anatômica relevante, nos moldes do HPO, especialmente quando se pesquisa etiologia genética das alterações (14,15,18).

Do ponto de vista epidemiológico, a incidência estimada das diferentes formas de DCCs é bastante variada, tendo em vista que geralmente estão baseadas em estudos regionais de grandes centros cardiológicos ou em estudos com enfoques em DCCs específicas. Essas características dificultam a apresentação de dados mais abrangentes e aplicáveis para a população mundial. Em uma tentativa de estimar de forma mais abrangente a incidência das formas mais comuns de DCCs, Hoffman e Kaplann (2012), analisaram 44 estudos

publicados que continha dados sobre incidência analisando pelo menos 100 sujeitos. Os dados reunidos apresentam um desvio-padrão considerável em relação à incidência média calculada, confirmado o viés decorrente de estudos regionais, estudos com enfoques em DCCs específicas, ou do uso de diferentes classificações anatômicas (17).

Os autores destacam ainda que as subnotificação de lesões consideradas leves também impactam a capacidade de estimar a incidência de cada tipo de lesão. Apesar disso, o estudo permitiu calcular uma incidência média de diferentes lesões por milhão de nascidos vivos. Os dados apresentados na Tabela 2, permitem identificar a expressiva incidência de defeitos de septação mesmo quando comparados com os dados de todas as DCCs ou todas as lesões cianóticas (17).

Tabela 2. Incidência por milhão de nascidos vivos.

LESÃO	INCIDÊNCIA MÉDIA	NÚMERO DE ESTUDOS	DESVIO PADRÃO
BAV	13556	10	13049
Todas as DCCs	9596	43	7484
VSD	3570	43	2878
Todas as Cianóticas	1391	37	590
ASD	941	43	1043
PCA	799	40	1399
PS	729	39	731
TOF	421	41	188
CoA	409	39	246
AS	401	37	543
AVSD	348	40	165
TGA	315	41	115
HLH	266	36	216
HRH	222	32	199
DORV	157	16	103
Anomalia de Ebstein	114	5	138
PTA	107	30	71
SV	106	23	70
TAPVC	94	25	46
TA	79	11	52

Siglas, conforme termos em inglês: BAV: Valva aórtica bicúspide; ASD: defeito de septação atrial; VSD: defeito de septação ventricular; PCA: persistência do canal arterial; PS: Estenose de valva pulmonar; TOF: Tetralogia de Fallot; CoA: Coactação de aorta; AS: Estenose de Aorta; AVSD: Defeito de septação atrioventricular; TGA: Transposição completa de grandes vasos; HLH: coração esquerdo hipoplásico; HRH: coração direito hipoplásico; DORV: dupla via de saída do ventrículo esquerdo; PTA: tronco arterioso persistente; SV: ventrículo único; TAPVC: conexão anômala total de veias pulmonares; TA: atresia de tricúspide; Adaptado de Hoffman and Kaplan, 2002.

1.4. CARDIOGÊNESE E AS DCCS.

A compreensão dos mecanismos moleculares que guiam o desenvolvimento embriológico do coração é essencial para o entendimento do impacto fenotípico das alterações genéticas identificadas nos pacientes (4).

Do ponto de vista morfológico o coração é formado a partir dos campos cardíacos laterais denominados campo cardíaco primário (FHF, do inglês, *first heart field*) e o campo cardíaco secundário (SHF, do inglês, *second heart field*). Essas regiões são formadas durante a gastrulação, por células que delaminam do epiblasto e migram através da linha primitiva logo abaixo do nó de Hensen para posição cranial formando a linhagem das células cardiógenicas do mesoderma (CMCs) (Figura 3-A).

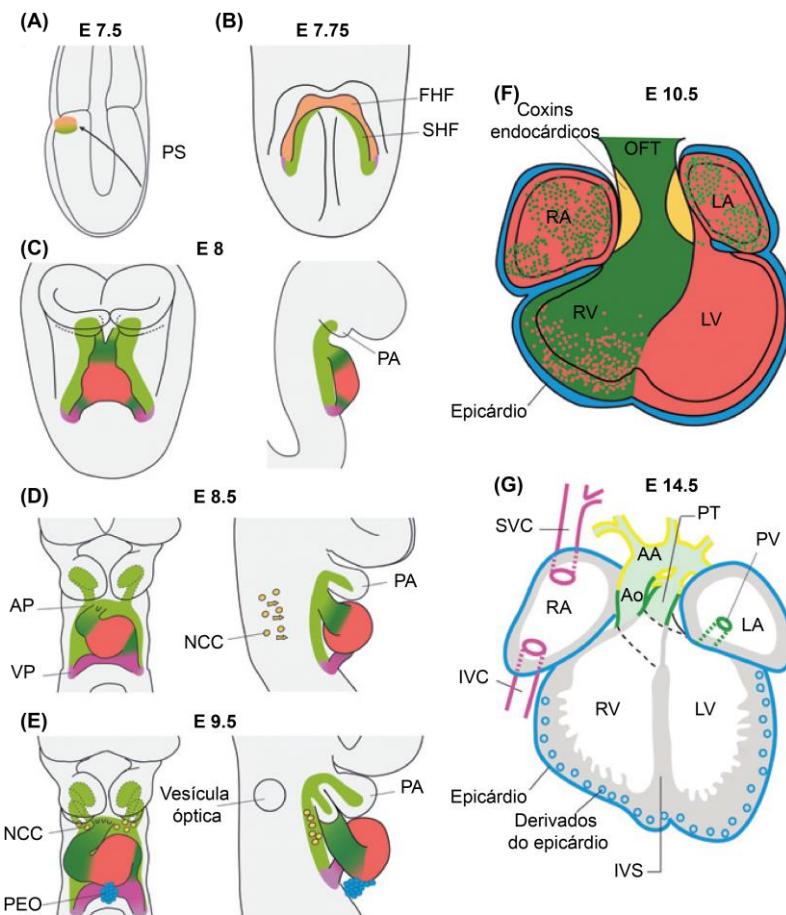


Figura 3. .Dinâmica da cardiogênese, referência temporal em camundongos.

(A) Migração celular a partir da linha primitiva. (B) Formação do crescente cardíaco, composto pelo FHF e SHF. (C-E) Visão ventral e lateral do looping cardíaco. Regiões derivadas do FHF em vermelho e do SHF em verde escuro (miocárdio) e verde claro (endotélio vascular). Em amarelo as NCCs em migração até o polo arterial. Em azul células do pró-epicárdio no polo venoso. (F) Após o looping, regiões cardíacas delimitadas, com formação das vias de saída com origem no SHF, coxins endocárdicos com contribuição das NCCs, e contribuições do FHF e SHF nas câmaras cardíacas. (G) Coração maduro após septação. Siglas, conforme termos em inglês: PS, linha primitiva; NCC, células da crista neural; AP, polo arterial; VP: polo venoso; PEO, pró-epicárdio; RV, ventrículo direito; LV, ventrículo direito; RA, átrio direito; LA, átrio esquerdo; AA, arco aórtico; Ao, artéria Aorta; OFT, vias de saída do coração; IVS: septo interventricular; SVC, veia cava superior; IVC, veia cava inferior; PT, tronco pulmonar; PV, veia pulmonar. Traduzido de Vincent and Buckingham, 2010.

Na região lateral dos campos cardíacos em forma de ferradura se inicia a formação de dois tubos endocárdicos a partir das células do FHF e do SHF contribuindo para a formação de diferentes regiões (Figura 3-B).

Ocorre então o processo de dobra embrionária para conversão do embrião de um disco plano, em um cilindro. Esse dobramento ocorre tanto no sentido crânio-caudal, quanto das laterais para o centro do embrião. A partir do dobramento do embrião os dois tubos laterais cardíacos se unem formando o tubo cardíaco primitivo (Figura 3-C). A elongação do tubo cardíaco primitivo ocorre pelo recrutamento de linhagens celulares adjacentes, localizadas na mesoderme faríngea, formando o chamado campo cardíaco secundário (SHF)(20). As células que compõe o SHF migram para ambos os polos do tubo em formação (Figura 3-C em tons de verde).

O tubo cardíaco continua sua expansão linear concomitante ao dobramento de todo o embrião, com consequente dobramento do tubo cardíaco à direita. O dobramento do tubo cardíaco promove uma gradual subdivisão entre as câmaras cardíacas primordiais, até alcançar a posição espacial definitiva com o átrio primitivo assumindo posição mais cranial em relação ao ventrículo (Figura 3- C-E) (21). As células provenientes do SHF nos polos do tubo cardíaco em dobramento contribuem para a formação final das vias de saída do coração, do ventrículo direito, boa parte da porção de entrada do átrio (Figura 3-F). (22).

Alcançado o posicionamento adequado, as câmara primitivas passam por remodelagem, proliferação e especificação celular, coordenados por

diferentes vias metabólicas e fatores de transcrição, que aliados às etapas de septação e formação de valvas resultam na formação de um coração completo com suas quatro câmaras principais delimitadas (Figura 3-G) (23,24,19–21).

A formação do órgão completo e funcional depende da especificação de diversos tipos celulares como cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas, componentes conjuntivos das valvas, células do sistema condutivo, entre outros (22). Essa diversidade de linhagens se determina a partir de três diferentes origens celulares, separadas espaço-temporamente no desenvolvimento embriológico, e interligadas por suas complexas vias de sinalização, a saber células cardiogênicas do mesoderma (CMCs, do inglês, *cardiogenic mesoderm cells*), células do pró-epicárdio (PE, do inglês, *proepicardium*) e células da crista neural (NCCs, do inglês, *neural crest cells*) (Figura 3- nas cores amarela e azul).

A diferenciação, a proliferação e o direcionamento de cada tipo celular que atua na formação cardiogênica são orquestrados por diferentes vias de sinalização, em estreita correlação com seu posicionamento espacial de influência no embrião.

A seguir serão detalhadas as vias mais diretamente envolvidas na cardiogênese e as moléculas que as compõe.

1.4.1. Via Wnt

A via metabólica Wnt é uma via metabólica evolutivamente conservada que atua na comunicação célula a célula e regula aspectos cruciais da diferenciação, migração e polaridade celular durante o desenvolvimento embriológico (25,26). Atuam nessa via 19 glicoproteínas WNTs, 10 receptores FRIZZLED (Fz) e três proteínas DVL (do inglês, *Dishevelled* (Dsh) em *Drosophila*, sendo identificada como DVL em mamíferos), o que sugere uma grande complexidade, alta capacidade de regulação de sinalização e importante função biológica (26). Devido à sua importância, as vias Wnt são rigorosamente reguladas, seja pela expressão das proteínas WNT, ou pela expressão de antagonistas que desempenham seu papel em momentos precisamente sincronizados espacial e temporalmente durante o desenvolvimento (25).

A via Wnt apresenta uma via denominada via canônica Wnt, também chamada Wnt/β-catenina dependente. Além dessa via, ramifica-se em pelo menos nove diferentes cascatas de transdução de sinal intra-cellular: via de polaridade planar, Wnt/Ca₂₊, Wnt-RAP1, Wnt-Ror2, Wnt-PKA, Wnt-GSK3MT, Wnt-aPKC, Wnt-RYK, Wnt-mTOR (27).

Pelo menos três dessas vias tem importantes implicações na cardiógenese (25):

- Via canônica Wnt, também chamada Wnt/β-catenina dependente;
- Via de polaridade planar;
- Via Wnt/Ca₂₊;

1.4.1.1. A via wnt canônica: manutenção da indiferenciação celular

A principal característica da via Wnt canônica é a acumulação e translocação da proteína de adesão β-catenina no núcleo. Sem a sinalização Wnt, a β-catenina citoplasmática é degradada por um complexo de moléculas que levam à sua fosforilação e ubiquitinação, com consequente degradação proteossomal. A ligação de diferentes proteínas WNT aos receptores FRIZZLED

(FZ) desencadeia a interrupção do complexo proteico necessário para a degradação guiada da β -catenina. A ativação ocorre com a ligação de proteínas WNT ao receptor FRIZZLED (FZ) e correceptor LRP5/6, CK1 e GSK3b são ativados e recrutam DVL, Axina e APC para a membrana celular, desativando o complexo de degradação da β -catenina pelos proteassomos. A β -catenina é acumulada no citoplasma e posteriormente passa para o núcleo onde atua como um ativador da transcrição (seta vermelha) mediada por TCF/LEF e outros cofatores. A β -catenina estável no citoplasma chega ao núcleo e se liga a diferentes co-fatores que favorecem sua retenção e sua capacidade de regulação transcrional (Figura 6-A) (25) (28).

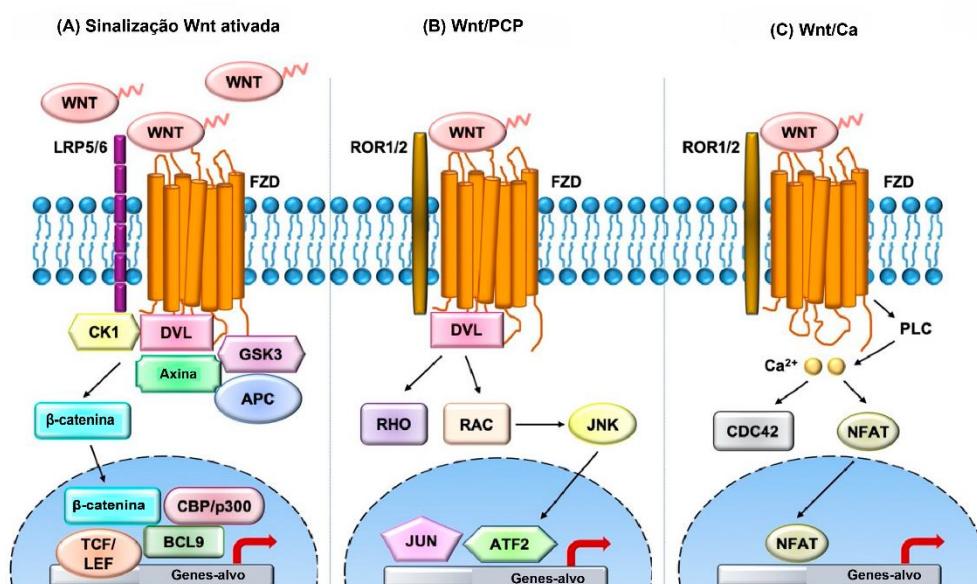


Figura 4. Diferentes modos de ativação da via Wnt.

(A) Via Wnt/ β -catenina ativada. CK1, caseína quinase 1; GSK3 β , glicogênio sintase quinase 3 β ; Axin1, proteína de inibição axina 1; APC, adenomatous polyposis coli; TCF, fator de células T (TCF) e o; LEF, fator potencializador linfóide. (B) Via de polaridade planar. DVL (do inglês, *Dishevelled* (Dsh) em *Drosophila*; quinase Rho (ROCK); quinase n-terminal Jun (JNK). (C) A Via Wnt/Ca2. Adaptado de Komiya and Habas, 2008 e Palomer *et al.*, 2019, Sharma and Pruitt, 2020.

1.4.1.2. As vias Wnt não-canônicas:

1.4.1.2.1. Via de polaridade planar (PCP)

A via de polaridade planar (PCP, do inglês *planar cell polarity*) (Figura 6-B) atua na definição da polaridade apical-basolateral das células embrionárias, tendo importância na morfologia e comportamento migratório das células mesodérmicas dorsais. Diferente da via Wnt canônica a via de polaridade planar não requer a interação de LRP5/6 e é β -catenina independente.

Com a apresentação do ligante WNT, o sinal é transduzido por FZ, levando à ativação de DVL (do inglês, *Dishevelled* (*Dsh*) em *Drosophila*, sendo identificada como DVL em mamíferos), que na ausência de LRP5/6, ativa a quinase Rho (ROCK) e a quinase n-terminal Jun (JNK). A ativação de ROCK leva à polimerização de actina, essencial para as mudanças no citoesqueleto que polarizam as células e viabilizam a motilidade durante a gastrulação. A ativação de JNK promove a transcrição mediada por JUN. A via não canônica do Wnt regula tanto a polaridade quanto a movimentação dessas células. Os ligantes WNT4, WNT5A e WNT11 são importantes sinalizadores dessa via não canônica (25).

A sinalização PCP foi bem caracterizada na embriogênese de diversos organismos como em galinhas, *Xenopus*, *Zebrafish* e camundongos, tendo sido descritas DCCs decorrentes de alterações em proteínas atuantes nessa via (29). Foram descritas DCCs relacionadas às vias de saída do coração (tronco arterioso persistente e dupla via de saída do ventrículo esquerdo), à formação dos arcos aórticos e aos defeitos de septação, sendo todos, defeitos relacionados a anomalias na migração celular durante a cardiogênese. Destaca-se os estudos de variantes de sequência em *WNT11*, que identificaram a ocorrência de associações entre diferentes DCCs em animais mutantes, e indicam que a proteína WNT11 pode atuar na interação entre as vias Wnt canônica, PCP e a via Tgf β . Entretanto, ainda não foi estabelecida correlação entre alterações na sinalização PCP e DCCs em humanos (29).

1.4.1.2.2. Via Wnt/Ca²⁺

A via Wnt/Ca²⁺ foi identificada a partir do achado de que receptores WNT e FZ podem promover a liberação de Ca²⁺ intracelular a partir do retículo endoplasmático (Figura 6-C). A Via Wnt/Ca²⁺ é ativada pelo complexo Wnt-FZD-ROR que ativa a fosfolipase C (PLC) desencadeando um sinal para o influxo intracelular. Na presença do Ca²⁺, CDC42 e NFAT são ativados e promovem respostas transcripcionais (seta vermelha) responsáveis pelo movimento e a polaridade das células dependentes do cálcio. NFAT regula o destino das células ventrais enquanto CDC42 atua na separação dos tecidos e movimentos celulares durante a gastrulação.

Em modelos animais, é bem caracterizado que a liberação de Ca²⁺ intracelular atua na definição dos padrões de formação embrionários no início da gastrulação, promovendo o estabelecimento da polaridade dorsoventral de diferentes órgãos, inclusive no coração (25,27).

WNT5A, WNT11 e RFZ-2 são capazes de induzir a liberação intracelular de Ca²⁺, sem afetar a estabilidade da β-catenina, através da ativação da via da Proteína-G. O acúmulo citoplasmático de Ca²⁺ leva à ativação de diversas proteínas, interagindo inclusive com outras vias, como a Wnt-Ror2 (25,27). A ativação de outras proteínas cálcio-dependentes como PKC e CamKII foi identificada durante a formação do coração em *Zebrafish* e *Xenopus* (25).

1.4.1.3. Modulação entre as diferentes vias Wnt

A modulação entre as vias Wnt a serem ativadas acontece em diferentes níveis. Inicialmente, na membrana celular, a definição de qual das vias será ativada é pelo ligante apresentado (com preferencialmente WNT1 ativando a via canônica, WNT5A ativando a via PCP e WNT11 ativando a Wnt/Ca²⁺) e sua

interação com o receptor, bem como o recrutamento de outros correceptores (como LRP5/6 ou ROR) (30).

A proteína DVL atua de modo mais específico nessa modulação, a depender quem são seus ativadores e qual de seus três domínios será ativado: DIX, PDZ e DEP. Por exemplo, na via canônica é essencial a ativação do domínio PDZ e posteriormente DIX, que impede a degradação da β -catenina; enquanto o domínio DEP é essencial para a ativação das vias não-canônicas (25,31).

Há ainda outros estudos a respeito da função da endocitose de WNT e seus ligantes durante a sinalização e como esse processo modula as vias canônicas e não canônicas, sendo objeto de pesquisa tanto a sinalização paracrína de WNT quanto a importância da endocitose para a regulação da transcrição de genes subsequente à sinalização (32).

A via Wnt por sua complexidade, com numerosos moduladores, antagonistas e agonistas segue como objeto de investigação no campo do desenvolvimento embriológico e implicação em processos patogênicos.

1.4.2. Via Notch

Notch é uma via de sinalização celular evolutivamente conservada que regula a especificação e diferenciação celular, além de atuar na padronização de diferentes tecidos durante o desenvolvimento embrionário e também ao longo da vida adulta (33). A via atua na padronização do endocárdio, subpopulação endotelial especializada originada das células progenitoras presentes no crescente cardíaco, e que interage com o miocárdio de forma crítica no desenvolvimento.

A família de proteínas NOTCH, principal componente da via, tem como representantes NOTCH1A, NOTCH1B, NOTCH2, NOTCH3 E NOTCH4, que fazem parte de um grupo de receptores transmembrânicos de passagem única. São formadas por um domínio extracelular (NECD, do inglês *NOTCH extracellular domain*) e um domínio intracelular (NICD, do inglês *NOTCH*

intracelular domain) que contém uma porção ativadora de transcrição (33) (Figura 7).

A sinalização Notch promove a transcrição de diferentes genes alvo relacionados à cardiogênese: *HES* e *HEY*, genes importantes no desenvolvimento das valvas; *SNAI1* importante na transição epitélio-mesenquimal (EMT) para formação dos coxins endocárdicos; *p21* e *EPHRINB2*, que atuam na trabeculação cardíaca; *NRARP*, que atua formação dos somitos (Figura 7) (33) (34).

As células sinalizadoras contêm em sua membrana proteínas ligantes dos tipos Delta (DII1, 3 ou 4) ou JAGGED (JAG1 ou JAG2) com domínios extracelulares expostos. Quando ligados ao Receptor NOTCH de uma célula receptora de sinal, são ativados dois sítios de clivagem que liberam NOTCH da membrana celular. O domínio intracelular NICD permanece da célula receptora e após ser liberado da membrana plasmática, segue para o núcleo da célula receptora. No núcleo, NICD interage com o complexo repressor CSL que mantêm inativa a transcrição (OFF na figura). NICD se junta a outros cofatores formando um complexo de ativação da transcrição de diversos genes-alvo (33,35).

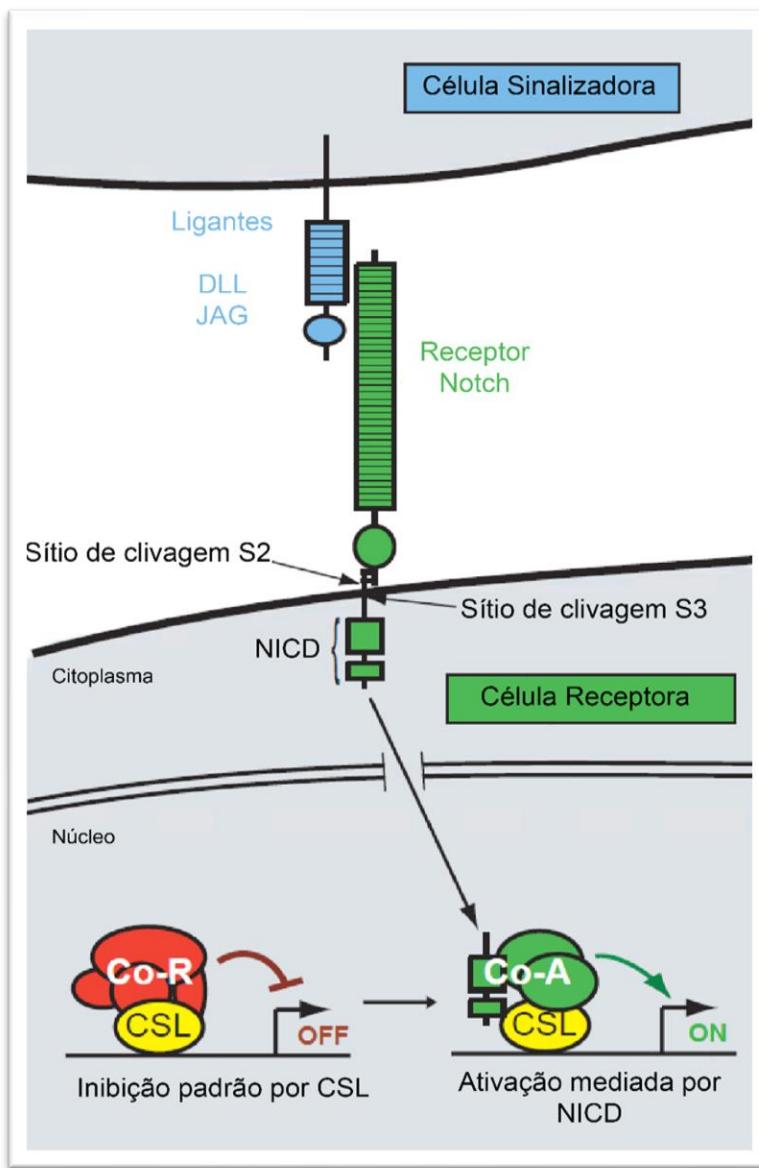


Figura 5. Via Notch de sinalização. Adaptado de Luxán *et al.*, 2016 e Lai, 2004.

A via Notch está ativa desde o início do desenvolvimento cardíaco, mas afeta mais diretamente a delimitação das câmaras cardíacas, atuando na septação e na formação das valvas por meio da expressão dos ligantes DLL4 e JAG1 expressos no endocárdio da região de formação do canal atrioventricular e da região de formação do OFT. NOTCH atua também no aumento da trabeculação e na compactação do miocárdio ventricular (Figura 8) além de induzir a diferenciação de células da crista neural em células (NCCs) musculares na formação do OFT (33) (19).

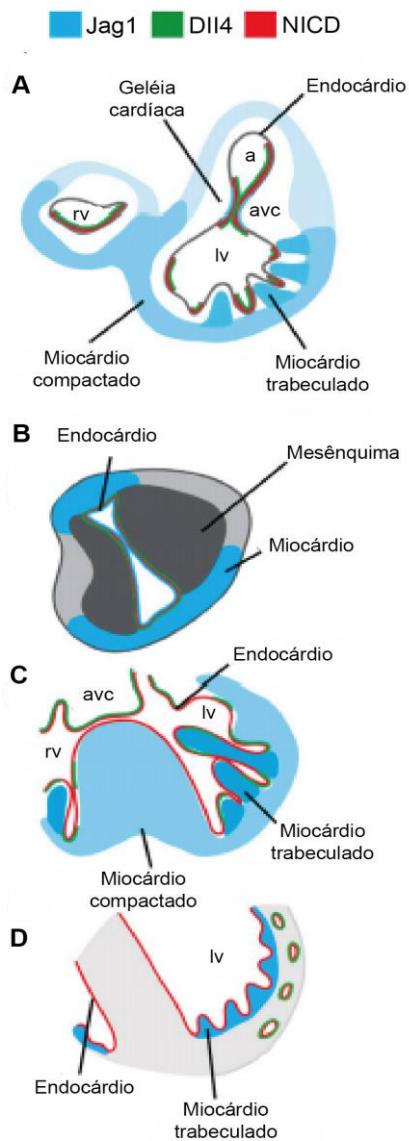


Figura 6. Trabeculação do miocárdio ventricular.

Legenda de cores mostra os locais de expressão de moléculas importantes da via Notch. A: JAG1 e DII4 expressos no AVC, no miocárdio e endocárdio. B: JAG1 fortemente expresso no endocárdio na região de formação dos coxins endocárdicos do OFT. C e D: JAG1 fortemente expresso nas regiões de trabeculação, e de forma mais branda nas regiões compactadas. No endocárdio da câmara que passa por trabeculação há expressão de NICD e DII4. DII4 também é expresso nos vasos coronários do endotélio. Adaptado de Luxán *et al.*, 2016.

Em interação com a via Wnt, a via Notch inibe a proliferação de progenitores cardíacos no SHF ao regular negativamente impedindo o acúmulo da β -catenina, e portanto, promovendo a diferenciação ao invés da proliferação celular. Outras vias de sinalização também sofrem regulação pela via Notch, como a via BMP que promove a diferenciação do miocárdio (19). Notch ainda regula positivamente SNAIL1/2 e WNT4 levando a um aumento da expressão de BMP2 que facilita a transição epitélio-mesenquimal no miocárdio do canal atrioventricular (36).

1.4.3. Superfamília TGF- β

Esse grande grupo chamado de superfamília é composto por diversos polipeptídeos secretados similares aos fatores de transcrição do tipo *transforming growth factor beta* (TGF- β). Essa família é composta de mais de 30 membros que inclui além das proteínas TGF- β 1, 2 e 3, as proteínas morfogênicas BMPs (do inglês, *bone morphogenetic proteins*), além de ativinas, inibinas, Nodal, o hormônio anti-Mulleriano (AMH, do inglês *anti-Mullerian*), diversos fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) como VEGF, FGF. O mecanismo canônico da superfamília TGF- β ocorre através da sinalização entre esses ligantes e receptores de membrana do tipo serina/treonina quinase, ao serem ativados provocam o acúmulo intracelular de proteínas SMAD (Figura 9) (37).

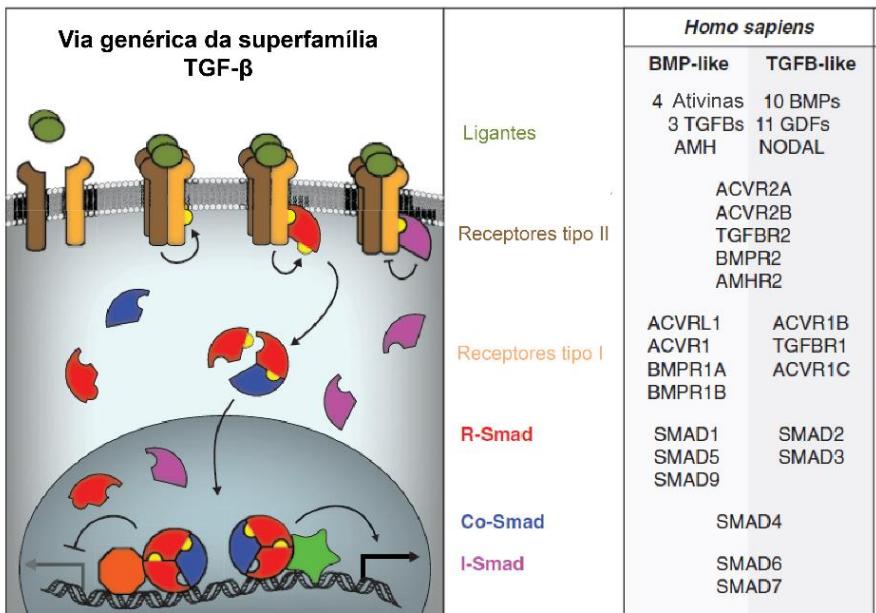


Figura 7. Componentes da via de sinalização genérica da superfamília TGF-β.

Com ativação pelos ligantes (verde) junto ao Receptor tipo II (marrom), o Receptor tipo I (amarelo) é fosforilado (bola amarela representa fosforilação), levando ao recrutamento e acúmulo de R-SMADS (vermelho) no citoplasma. Esses R-Smads são fosforilados pelo Receptor tipo I, se dissociam do complexo para recrutar Co-SMADS (azul). Os complexos SMAD formados se acumulam no núcleo e interagem com o proteínas ligadas ao DNA (laranja e verde claro) para a regulação da expressão gênica. Os I-SMADS (roxo) são potentes inibidores que bloqueiam o Receptor tipo I impedindo a ativação da via. Adaptado de Weiss e Attisano, 2013.

Esse mecanismo geral é regulado por inúmeros agonistas e antagonistas, além de correceptores diversos que ajustam a expressão gênica de acordo contexto necessário a cada tipo celular (37,38).

Por meio dessas vias metabólicas tão complexas e ajustáveis, é que esse grupo de proteínas consegue atuar em inúmeros tecidos, produzindo uma enorme variedade de funções no desenvolvimento embriológico: na proliferação e indução celular, com modificações dessa via principal por meio de complexas vias de regulação e interação com outras vias metabólicas (37,38).

A superfamília atua em diversos processos cardiológicos. Na especificação de células cardiológicas é necessária a expressão na endoderme de fatores como BMP2, VEGF-2, FGF2 e TGFβ2. Esses fatores atuam como indutores para a formação dos campos cardíacos. No estabelecimento da

assimetria cardíaca, estão envolvidos as Ativinas, BMP, Nodal, LEFTY. As proteínas TGF- β atuam diretamente na padronização de células do SHF, em regulação alinhada com a via do ácido retinóico (tratada em outro tópico). Atuam também na migração e indução das NCCs, especialmente na formação dos arcos aórticos, promovendo importante efeito anti-apoptose (38) (22).

As vias ativadas especificamente pelas proteínas TGF- β são reguladas pelos receptores transmembrânicos do tipo serina-treonina quinase TGF β RI, TGF β RII e TGF β RIII, que apresentam diferentes capacidades de interação com os diferentes fatores de transcrição. Os complexos formados entre ligante e receptor sinalizam para o interior das células através das proteínas SMAD, que apresentam diferentes funções: SMAD2 e 3 tem funções regulatórias, SMAD4 é um corregulador, SMAD6 e 7 tem atividade inibitória. As diferentes possibilidades de interação e combinação entre proteínas reforçam a plasticidade dessa via de sinalização. A sinalização por TGF- β pode ocorrer ainda por vias independentes de SMAD, podendo ocorrer pela interação com RAS/MAPK (tratada em outro tópico) ou com o Ca²⁺ intracelular, pela desfosforilação da Calcineurina e ativação do fator de transcrição NFAT, de modo similar à via Wnt/Ca²⁺ (38).

Um dos principais mecanismos de atuação das proteínas TGF β na cardiogênese é a transformação de células epiteliais em células mesenquimais (EMT, do inglês *epithelial-to-mesenchymal cell transformation*). Esse mecanismo pode ocorrer no epicárdio ou no endocárdio, é essencial para formação dos septos cardíacos (Figura 10).

Fatores pouco conhecidos (cogita-se atuação de VEGF, NFATc, ERBB, NOTCH, β -catenina, NF1) e BMP secretados pelo miocárdio. Essa indução leva à ativação por TGF β no endocárdio, resultando na expressão de outros fatores de transcrição (como SNAIL e MSX1) que levam ativação de genes específicos do mesênquima como α -SMA, SMAD-6 e ROCK, levando a transição celular.

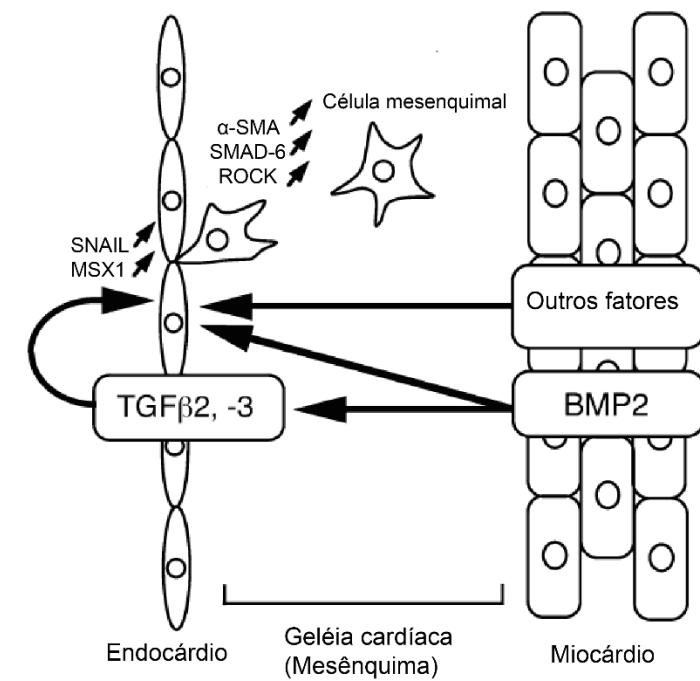


Figura 8. Representação da transição epitélio-mesenquimal na formação do canal atrioventricular. Adaptado de Yamagishi *et al.*, 2009.

O processo de formação dos coxins endocárdicos que originam os septos envolve, além da transição epitélio-mesenquimal, da qual participam TGF β 2 e TGF β 3, uma sinalização redundante de TGF β 3 que permite continua expansão do mesênquima após a transformação celular, resultando no preenchimento gradativo da geléia cardíaca, formando o tecido dos coxins e das valvas adjacentes em formação (Figura 11) (38).

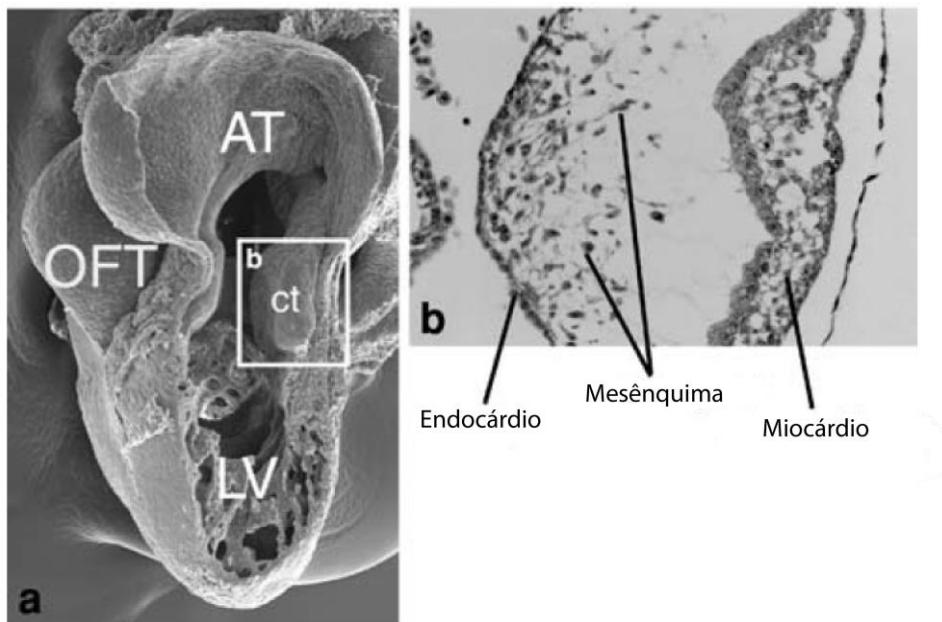


Figura 9. Desenvolvimento do coxim endocárdico em embrião de galinha.

Em (a) visualiza-se o coração em desenvolvimento após o dobramento e rotação à direita, sendo possível identificar as regiões presumidas do átrio e seio venoso (AT, tronco arterioso), das vias de saída (OFT) e do ventrículo primitivo que após a septação será o ventrículo esquerdo (LV). No quadro (b) destacado em branco temos o coxim endocárdico em formação (ct). A região é detalhada em corte histológico em (b) em que se observa a transformação das células do endocárdio invadindo o mesênquima em direção ao miocárdio. Adaptado de Yamagishi *et al.*, 2009.

A formação dos coxins endocárdicos depende ainda do processo denominado miocardialização, por meio da qual células do miocárdio invadem o mesênquima dos coxins em formação. Esse processo foi identificado na formação de todos os septos cardíacos, e apesar de não ter seu mecanismo molecular completamente conhecido, já foi confirmada a expressão de TGF β 2, que atua possivelmente por meio da modificação da composição da matriz extracelular do mesênquima em transição. O processo de miocardialização do mesênquima se inicia após a invasão do tecido por células da crista neural (NCCs), especialmente na septação da OFT. Entende-se que TGF β 2 atua como citocina, regulando a apoptose das NCCs e a gradativa substituição por células mesenquimais. Esse mesmo mecanismo em que TGF β 2 atua como regulador da apoptose é essencial para a remodelagem dos arcos aórticos (38).

1.4.3.1. Via Bmp

As proteínas morfogênicas ósseas (BMP, do inglês *bone morphogenetic proteins*) foram descobertas a partir de sua atuação na formação de ossos e cartilagens, sendo posteriormente caracterizadas inúmeras funções na embriogênese. São proteínas que fazem parte da superfamília TGF β , e sua sinalização também ocorre via receptores heterodiméricos do tipo I, BMPR1A, e do tipo II, BMPR2 (40).

As BMPs estão ativas em diferentes processos de formação das vias de saída do coração (OFT), como na transformação de células epiteliais em células mesenquimais (EMT, do inglês *epithelial-to-mesenchymal cell transformation*), na septação do OFT e na migração de células da crista neural. Alterações nas vias BMP já foram associadas com diferentes DCCs como DORV, TGA, PTA e PDA (40).

A via canônica de sinalização Bmp é ativada quando BMPs ligantes interagem com o receptor do tipo II, e posteriormente ativa o receptor do tipo I, e um correceptor SMAD (SMAD1, SMAD5, ou SMAD8) que atua na transdução do sinal (Figura 12) (40).

Além da atuação direta na transcrição, as proteínas SMAD também atuam na regulação da expressão de diferentes miRNAs, representando outro caminho de regulação transcricional (40). A regulação epigenética tem sido foco de estudos recentes, e será detalhada em seção própria.

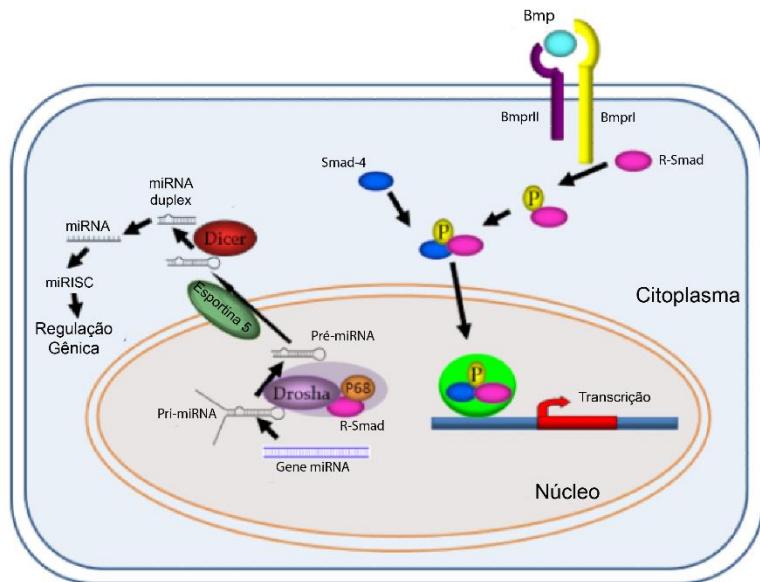


Figura 10. Via Bmp.

À esquerda está representada a via de regulação da expressão de miRNAs por Bmp, em que diferentes R-Smads (1,5 e 8) podem se ligar ao complexo Drosha responsável pelo processamento do pri-miRNA em pré-miRNA. A direita está representada a via canônica, ativada pela interação dos Bmps ligantes com os receptores BMPR2 e BMPR1A, seguido pela cascata de sinalização via Smad, que leva a transcrição de diversos genes. Adaptado de Wang et al., 2011.

1.4.4. Via Nodal

A via de sinalização Nodal está presente em todos os Vertebrados e está ativa desde o início do desenvolvimento embrionário, atuando essencialmente na padronização durante a morfogênese. Sua atuação se inicia ainda na gastrulação, durante a formação da crista neural e da especificação da mesoderme e da endoderme. Após a gastrulação, a via Nodal atua de forma crítica no estabelecimento da assimetria esquerda-direita do embrião, e regula a expressão de *Sonic Hedgehog* (SHH) (19,41).

A proteína NODAL faz parte da família de fatores de crescimento TGF- β (do inglês, *transforming growth factor beta*), tendo, portanto, um mecanismo de sinalização mediada por receptor para ativação de SMADs (Figura 13).

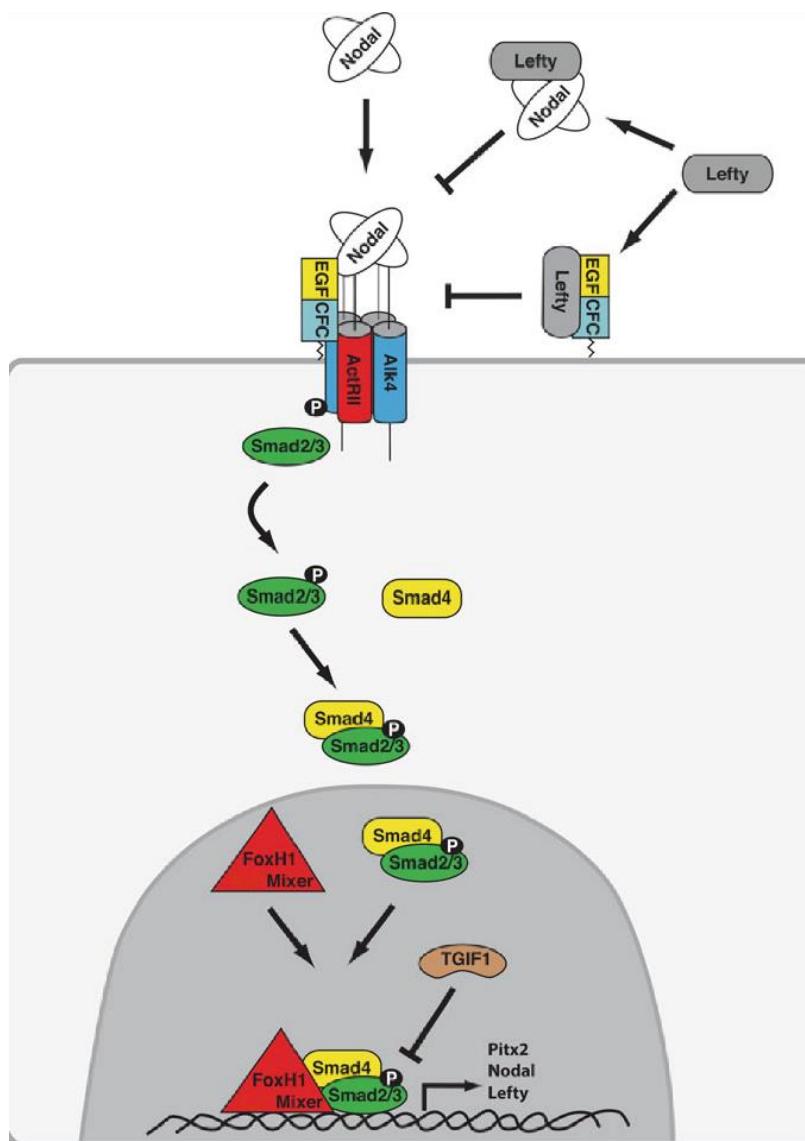


Figura 11. Via Nodal de sinalização. Adaptado de Barnes and Black, 2016.

A proteína NODAL é secretada no meio extracelular na forma de um homodímero, que é reconhecido pelo correceptor EGF-CFC (também denominadas CRIPTO e CRYPTIC), que se liga à receptores da família TGF- β dos tipos I- TGF- β R1 e do tipo II- TGF- β R2, presentes na membrana celular na forma de heterodímero (Figura 13). A associação do complexo de receptor/correceptor e NODAL leva a fosforilação e liberação de uma proteína SMAD2 ou SMAD3 presente no receptor, que livre no citoplasma, se junta à

SMAD4 formando um complexo oligomérico. O complexo SMAD formado se transloca para o núcleo onde se liga ao DNA por intermédio do fator de transcrição FOXH1 (também chamado *Mixer*). O complexo formado leva à transcrição de importantes genes da via Nodal como: *LEFTY*, que atua como inibidor de *NODAL* por interagir diretamente com o correceptor EGF-CFC; o próprio gene *NODAL*; e *PITX2*, essencial para a estruturação diferenciada do lado esquerdo e direito do coração em formação (Figura 13).

Alterações da via de sinalização Nodal estão associadas a diferentes formas de DCCs, em especial a defeitos de lateralidade, com ou sem sinais extracardíacos. Foram descritos diversos casos de alterações na cardiogênese por variantes de sequência ou alteração de dosagem em diferentes genes componentes da via Nodal, como *NODAL*, *CRYPTIC*, *CRIPERO*, *LEFTY*, *SMAD2*, *TGF- β R2*, *FOXH1*, além das alterações do gene-alvo da via *Pitx2* com implicações diretas na assimetria esquerda-direita do coração e na septação medial das câmaras cardíacas (41).

1.4.5. Vias Hedgehog

A sinalização via Hedgehog (Hh) é essencial durante o desenvolvimento de mamíferos, por promover a comunicação intercelular. Em vertebrados, a sinalização Hh ocorre principalmente pela ativação dos cílios primários, estruturas especializadas de superfície celular e formadas por microtúbulos provenientes dos centríolos (42).

Em mamíferos, existem três proteínas Hedgehog:

- Sonic-hedgehog (Shh), atua na diferenciação de células do tecido nervoso, organogênese e formação dos membros;
- Indian-hedgehog (Ihh), atua na endoderme abaixo da mesoderme lateral onde se formam os campos cardíacos, no desenvolvimento do esqueleto, principalmente na ossificação;
- Desert-hedgehog (Dhh), restrita aos tecidos gonadais como nas células de Sertoli;

A Sinalização Hh têm múltiplas funções na cardiogênese, Shh atua no estabelecimento da assimetria direita-esquerda do embrião e regula a diferenciação de cardiomiócitos, enquanto o looping durante a elongação do tubo cardíaco é regulado por Ihh (43).

A via canônica de Sonic-hedgehog (Shh) é ativada pela proteína de mesmo nome, que desativa a inibição da atividade dos cílios presentes na membrana celular (Figura 14). A Proteína SHH se liga ao receptor PTCH1 na superfície da célula. Essa ligação desativa a inibição de SMO, que se move para o cílio primário, onde promove a dissociação entre o fator de transcrição GLI e o supressor SUFU. As formas ativadas de GLI se deslocam para o núcleo ativando a transcrição dos genes-alvo da via.

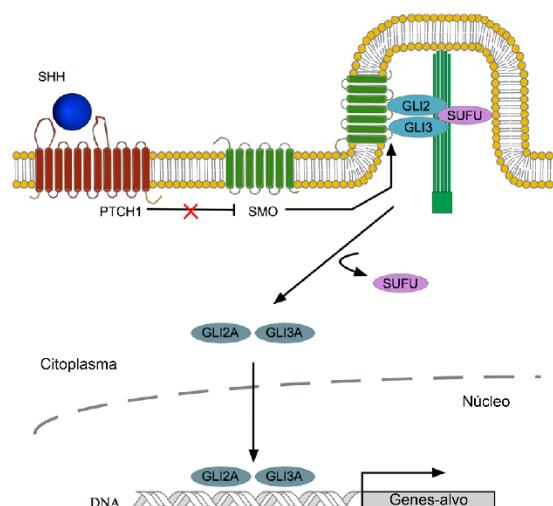


Figura 12.Via de sinalização Shh em seu estado ativado.

Adaptado de Fernandes-Silva *et al.*, 2017.

As vias Hh estão relacionadas ao correto posicionamento das células precursoras cardíacas nas laterais do embrião, formando a placa mesodérmica lateral. A interação entre Shh, que promove a diferenciação dos cardiomiócitos e de Ihh direcionam o correto dobramento do tubo cardíaco em formação (43). Portanto, as vias Hedgehog estão relacionadas à defeitos derivados de alterações na assimetria lateral do embrião como dupla via de saída do ventrículo esquerdo (DORV), coração esquerdo hipoplásico (HLH), retorno anômalo total de veias pulmonares (TAPVR) e ventrículo único (SV). A patogênese

dessas DCCs está relacionada ainda com a atuação dos cílios celulares e seu importante papel no desenvolvimento embrionário (43).

Além disso, Shh e sua sinalização ciliar no campo cardíaco secundário são essenciais para o desenvolvimento da protrusão mesocárdica dorsal (DMP), uma movimentação celular essencial para a correta fusão dos coxins endocárdios que formam os septos cardíacos. Portanto, Shh está envolvido ainda em defeitos de septação como defeito de septação atrioventricular (AVSD) e defeito de septação atrial (ASD) (45).

Shh é ainda uma sinalização essencial para a manutenção da sobrevivência das células da crista neural (NCCs) que migram para os arcos faríngeos e para as vias de saída do coração, contribuído com sua formação e posicionamento. Estudos com camundongos portadores de variantes de sequência em Shh e outros genes da via de sinalização identificaram fenótipos similares à atresia de tricúspide (TA), atresia pulmonar (PA) e Defeito de septação ventricular (VSD), Tetralogia de Fallot (TOF) (46).

1.4.6. Via RAS/MAPK

A via denominada RAS/MAPK (proteína quinase mitógeno-ativada, em inglês) regula o ciclo celular, o crescimento e a morte celular, atuando também na diferenciação. Com tantas funções essenciais durante a embriogênese, as alterações em genes parte dessa via são causa de um grupo de doenças multi-sistêmicas com fenótipos similares denominadas “RASopatias”: Síndrome de Noonan, Síndrome Cardio-facio-cutânea, Síndrome de Costello, Síndrome de Noonan com múltiplas lentiginosas e Síndrome Noonan-like com perda de cabelos anágenos (47)

A via RAS/MAPK é na verdade uma via composta de diferentes cascatas de sinalização celular que atuam sobre muitas moléculas no citoplasma e no núcleo. Devido ao estudo das RASopatias, essa complexa via foi bem caracterizada, permitindo inclusive associação entre alterações em genes

específicos e os fenótipos das diferentes doenças (Figura 15) (Tidyman e Rauen, 2009).

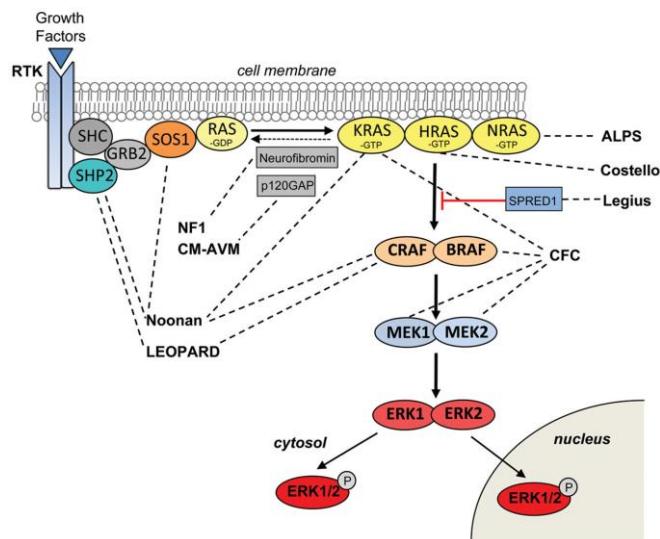


Figura 13. Via RAS/MAPK.

A ativação do receptor RTK desencadeia diferentes vias de sinalização intracelulares, como RAS (amarelo), RAF (laranja), MAPK (azul) e ERK (vermelho). As linhas pontilhadas indicam as associações dos genes indicados e cada RASopatia. Adaptado de Tidyman e Rauen, 2009.

As DCCs ocorrem em 60-90% dos pacientes com RASopatias, sendo mais frequente a ocorrência de Estenose de valva pulmonar (PS), defeito de septação atrial (ASD) e cardiomiopatia hipertrófica (49).

1.4.7. Via Vegf

Membros da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de crescimento placentário (PIGF) se ligam seletivamente aos receptores VEGF (VEGFRs), iniciando complexos eventos de sinalização celular em múltiplas vias metabólicas que culminam na formação dos vasos sanguíneos e do coração (50).

Na septação cardíaca, VEGF atua na transição epitélio-mesenquimal (EMT) das células endoteliais, mecanismo essencial para a formação dos coxins endocárdicos. O aumento da expressão de *VEGF* inibe o processo EMT. Tendo em vista que a hipóxia é um forte estímulo à expressão de *VEGF*, identifica-se essa via como mediadora dos defeitos de septação e de valvas induzidos por hipóxia. A hiperglicemias fetal por diabetes materna atua no sentido oposto, reduzindo a expressão de *VEGF*, mas levando também à alterações em valvas e septos (51).

A via Vegf atua ainda no desenvolvimento do sistema vascular e neural, especialmente no mecanismo de migração celular. As proteínas VEGF atuam no direcionamento de estruturas celulares chamadas filopódios, presentes especialmente em células em migração, e que permitem a extensão celular como nos axônios ou vasos sanguíneos através da atração ou repulsão dos receptores NRP1 e NRP2. As moléculas VEGF atraem os filopódios enquanto as sematoforinas, como SEMA3A, os repelem (Figura 14). Destaca-se nomenclatura do VEGFR-1, do inglês *Vegf-receptor-1*, também denominado FLT-1, do inglês, *fms-related tyrosine kinase* e VEGFR-2 também denominado FLK-1, do inglês *fetal-liver kinase* (50).

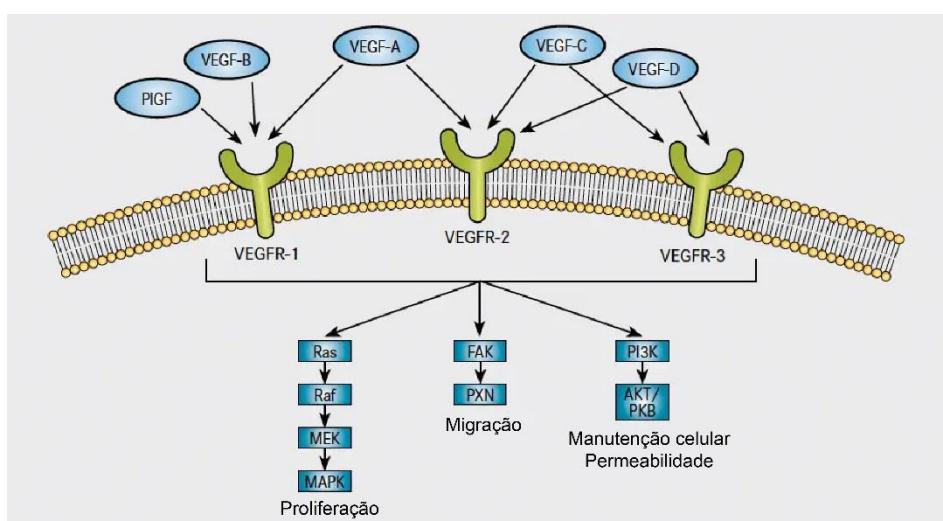


Figura 14. Via VEGF e os principais fatores de transcrição por ela ativados.
Traduzido de De Lartigue, 2016.

Outra característica interessante é a ocorrência de isoformas de VEGF contendo 121, 165, 189, ou 206 aminoácidos, formadas por *splicing* alternativo. Essas isoformas apresentam diferentes solubilidades e bioatividade nos tecidos, de modo que a dispersão dessas diferentes proteínas forma um gradiente de sinalização importante para migração e expansão celular. A formação desse gradiente é essencial para o remodelamento dos arcos aórticos (51).

A presença do receptor NRP1 nas NCCs sugere que esse mecanismo atua também na determinação dos territórios de migração das NCCs (Figura 17) (51).

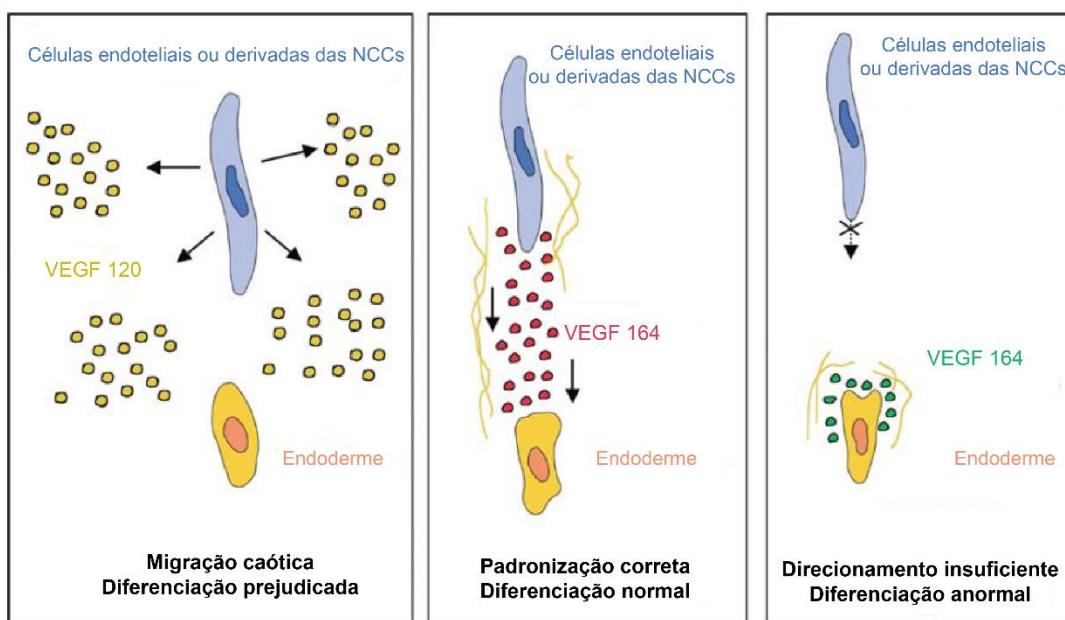


Figura 15. VEGF e o direcionamento da migração celular. Traduzido de Lambrechts and Carmeliet, 2004.

Alterações nessa via estão relacionados à DCCs que envolvem as vias de saída do coração e defeitos de septação, tendo sido identificada alta expressão de VEGF na região de formação do septo atrioventricular, e nos arcos faríngeos. Identifica-se ainda ocorrência de defeitos do sistema nervoso, anomalias vasculares menores ou maiores como a transposição de grandes vasos relacionados à via Vegf (51). Estudos com camundongos NRP-1-*knockout* identificaram fenótipos como defeito de septação ventricular (VSD), tronco

arterioso persistente; (PTA) e defeitos de septação das vias de saída do coração (52).

A via VEGF e seus gradientes de concentração ajuda entender como as vias metabólicas guiam as mudanças estruturais que ocorrem no embrião durante o desenvolvimento. Embora se utilize o recurso didático de estudo das vias metabólicas de forma individualizada, o entendimento da complexidade da embriogênese se dá com a compreensão de que as vias aqui detalhadas e diversas outras estão atuando em diferentes regiões do embrião de forma concomitante, diversas vezes interagindo e regulando umas às outras para a formação das diversas linhagens celulares que participam da formação do coração embrionário.

1.5. AS PRINCIPAIS LINHAGENS CELULARES ENVOLVIDAS NA CARDIOGÊNESE, MARCADORES MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO.

No âmbito molecular, a proteína MESP1+ é um dos primeiros marcadores da linhagem das células cardiológicas do mesoderma (CMCs) que formam o crescente cardíaco. Essa sinalização desencadeia a delaminação dessa população celular do contato com a linha primitiva do embrião pela ativação momentânea da transição epitelial/mesenquimal nas células embrionárias (19).

A indução das CMCs envolve quatro vias sinalizadoras principais: Nodal, Bmp, Wnt e Fgf. A interação desses sinalizadores guia cada etapa envolvendo essa linhagem celular (Figura 16-A):

- A diferenciação das células do mesoderme em células cardiológicas depende da inibição da via canônica Wnt/b-catenina e ativação da via não-canônica Wnt/b-catenin;

- A migração das células do mesoderme pela linha primitiva é direcionada pela expressão da proteína TBOXT, em inglês *T-box transcription factor Brachyury T* (também denominado BRY), que é um gene alvo na ativação não-canônica da via de sinalização Wnt/b-catenin; A população de células precursoras Bry⁺ formam posteriormente o campo cardíaco primário (FHF) e o campo cardíaco secundário (SHF). Essa população mesodérmica expressa ainda o receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR2 ou Flk-1). Os hemangioblastos Bry⁺/Flk-1⁺ regulados pela via canônica Wnt/b-catenina dão origem às linhagens de células endoteliais e sanguíneas;
- Posteriormente a sinalização canônica Wnt/b-catenin é inativada, e convertida na via não-canônica Wnt/b-catenin. Essa população celular que expressa Bry⁺/Flk-1⁺ recebe então sinalização mesodérmica pelo fator de transcrição T-box Eomesodermina, que promove a inibição de Bry, ativando a expressão da proteína mesodérmica posterior 1 (MESP1⁺) (Vincent and Buckingham, 2010; Brade *et al.*, 2013).

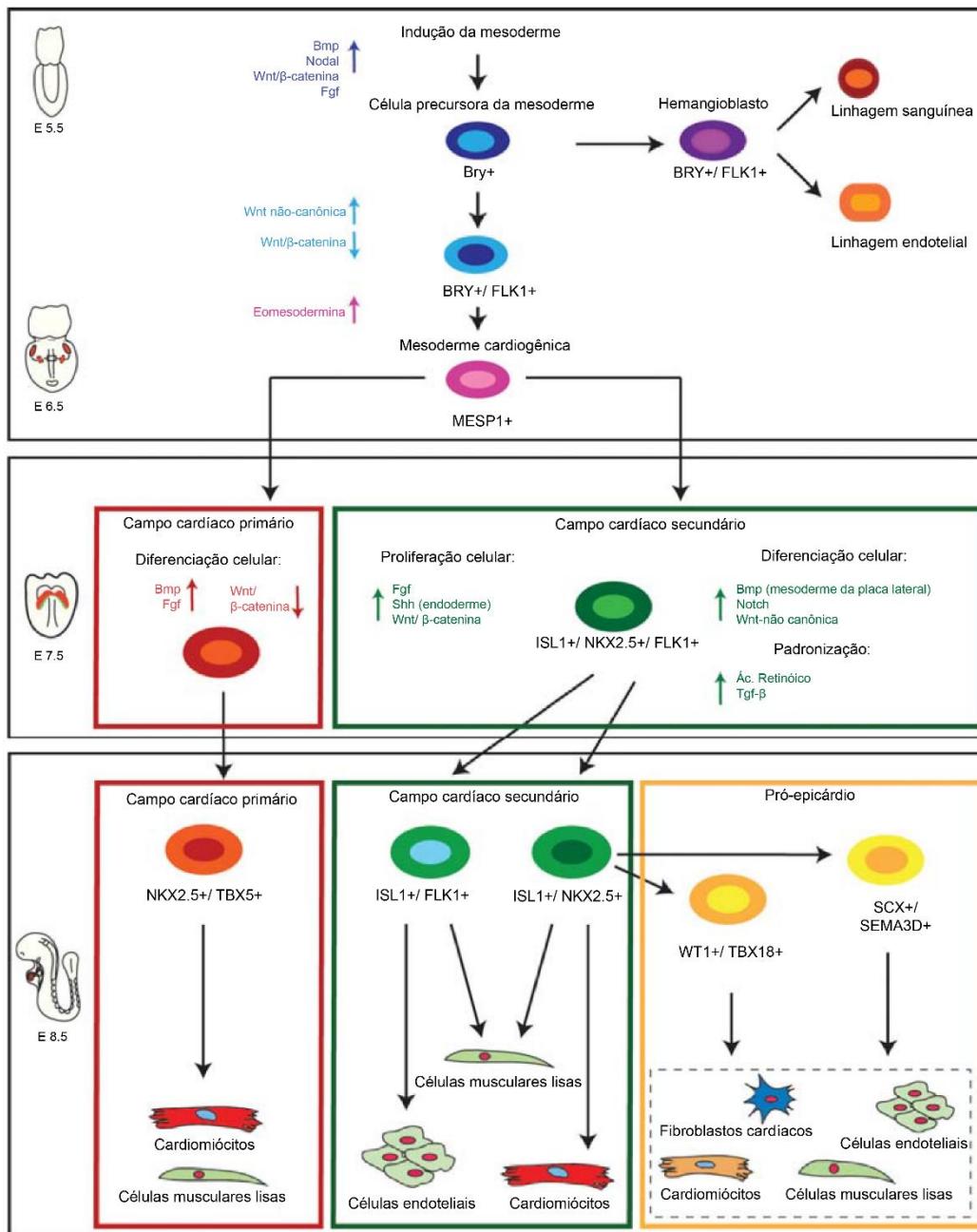


Figura 16. Diferenciação celular e os marcadores moleculares das linhagens celulares na cardiogênese. À esquerda indicação temporal do modelo de camundongos. Traduzido de Brade *et al.*, 2013.

Com essas influências moleculares as células migram pela linha primitiva e assumem uma posição anterior e lateral formando o chamado crescente cardíaco, composto em sua porção anterior pelo FHF e posterior pelo SHF. Devido ao seu posicionamento anterior no embrião o FHF está exposto às vias de sinalização BMP e FGF, e à inibidores da via canônica Wnt/b-catenin, o que

resulta no início da diferenciação em linhagem cardiógena no FHF. As células na região do SHF sob sinalização da via canônica Wnt/β-catenin permanecem indiferenciadas, e expressam, além de FLK-1 e NKX2-5, o fator de transcrição exclusivo do SHF, ISL-1 (do inglês, *LIM-homeodomain transcription factor*). Esse conjunto de fatores viabiliza a sobrevivência, a proliferação e a posterior migração das células multipotentes do SHF para tubo cardíaco primitivo (Vincent and Buckingham, 2010; Brade *et al.*, 2013) (Figura 16-B).

A diferenciação da célula multipotente em cardiomiócitos ocorre pela ativação de GATA4 e NKX2-5, na presença de fatores de transcrição como TBX5, HAND1 e HAND2 e MEF2C (22). A expressão de GATA4 e TBX5 induzem a atuação de BAF60C/SMARCD3, um componente que induz a remodelagem da cromatina. Essa remodelagem ativa a expressão de NKX2-5, iniciando assim a programação cardiomiotígena no FHF e nas células do SHF que mantém a expressão de NKX2-5 (Figura 16-B, vermelho)(19).

As células do SHF passam por uma etapa de proliferação, induzida pela via Fgf, e mantidas indiferenciadas pelos sinais recebidos da endoderme pela via *Sonic hedgehog* (Shh) e pelos sinais da via canônica Wnt/b-catenin, fortemente presente no tubo neural. Posteriormente as células do SHF iniciam sua diferenciação ao receber BMPs do mesoderme lateral, da ativação das vias Notch e da via não-canônica canônica Wnt/b-catenina (Figura 16-B caixa em verde) (Vincent and Buckingham, 2010; Brade *et al.*, 2013).

As células do SHF estão expostas ainda aos sinais de Tgf-β e da via do ácido retinóico, responsáveis pela padronização cardíaca.

No SHF observa-se duas subpopulações: parte das células do SHF deixam de expressar FLK-1, e na presença de NKX2-5 se diferenciam em cardiomiócitos e células musculares lisas. Outro conjunto de células deixam de expressar NKX2-5 e se diferenciam em células musculares lisas e células endoteliais (Vincent and Buckingham, 2010; Brade *et al.*, 2013).

Desse modo, são definidas as linhagens celulares essenciais para a formação e elongação do tubo cardíaco primário, e das duas primeiras camadas do coração: endocárdio e miocárdio. A camada externa do coração maduro, o epicárdio se forma a partir de um grupo celular que se diferencia posteriormente (aproximadamente na 8^a semana de gestação), denominado pró-epicárdio com a contribuição da subpopulação ISL1+/ NKX2-5+ do SHF(Figura 16-C) (Brade *et al.*, 2013).

Estudos avançados de rastreio de linhagem celular caracterizaram uma expressão celular em diferentes subdomínios no SHF que se relaciona às regiões cardíacas específicas do coração maduro. Em embriões de ratos de 8 dias, é possível identificar as diferentes regiões cardíacas em formação e respectivos padrões de expressão. Destaca-se a expressão de PITX2C+ somente do lado esquerdo do embrião (listras verdes na Figura 17). Entre 14 e 15 dias, se observa as regiões formadas por cada padrão de expressão, após o looping cardíaco, além de novos padrões de expressão (Figura 17-B caixas e listras roxas e marrons) (Vincent e Buckingham, 2010).

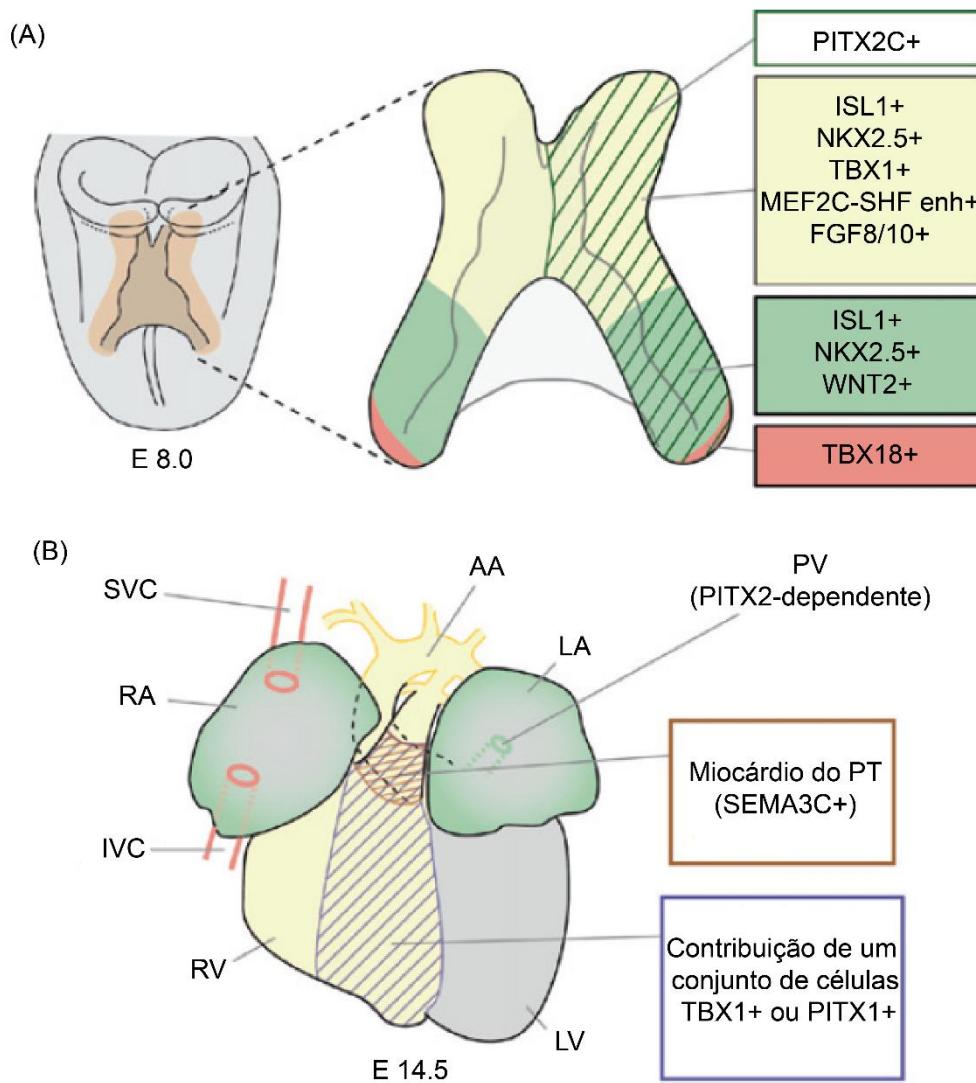


Figura 17. Subdomínios do SHF.

Siglas, do inglês: AA: arcos aórticos; LA, átrio esquerdo; RA, átrio direito; LV, ventrículo esquerdo; RV, ventrículo direito; SVC, veia cava superior; IVC, veia cava inferior; PT, tronco pulmonar; PV, veia pulmonar. Adaptado de Vincent e Buckingham, 2010.

Na porção anterior do SHF são expressos os genes *FGF8*, *FGF10*, *TBX1* e o *enhancer MEF2C*, que promovem o aumento do número de células, essencial para elongação do tubo cardíaco primário. A região mais anterior que dará origem ao tronco pulmonar, recebe influência da sinalização Shh. A expressão de *TBX1* controla a proliferação de células, e especificamente na região mais central, a co-expressão com *PITX2* ocorre na região responsável pela formação do septo interventricular. A expressão *PITX2* só ocorre do lado esquerdo do SHF (Vincent and Buckingham, 2010).

A região dos átrios é composta de células da região posterior do SHF que expressam WNT2 que leva a ativação do gene *Gata6*, em adição à ISL1⁺. Na região mais caudal do SHF, há uma região que expressa unicamente *TBX18*. *TBX18* é uma das moléculas marcadoras das células do pró-epicárdio, embora as células dessa região tenham anteriormente apresentado expressão de *NKX2-5* e *ISL-1*, como o restante do SHF. Essa expressão diferenciada leva alguns grupos a defender essa área como outro domínio celular, um terceiro campo cardíaco a ser estudado. As células *TBX18*⁺ dessa área contribuem para a formação das veias cavas inferior e superior (Vincent and Buckingham, 2010; Brade *et al.*, 2013).

1.5.1. Linhagem de células do pró-epicárdio (PE)

As células do pró-epicárdio não estão presentes no tubo cardíaco primário. Elas se originam do mesênquima celômico do septo transverso na região do polo venoso do tubo cardíaco. Esse grupo celular é induzido pela sinalização Fgf e Bmp, que induzem a posterior diferenciação em miocárdio.

É possível diferenciar duas populações celulares distintas, uma que expressa WTN1+/TBX18+ e ISL1+/ NKX2-5+. Uma segunda população expressa (SEMA3D+) e SCX+. Os dois grupamentos de células permanecem juntos em vesículas externas ao tubo cardíaco, e após o processo de dobramento do tubo se fundem ao miocárdio do coração em formação próximo à região atrioventricular. As células do pró-epicárdio se proliferam e migram até cobrirem todo o coração, aproximadamente na 11^a semana de gestação (Figura 3-F a G). Parte das células derivadas do pró-epicárdio passa por uma transição epitelial-mesenquimal mediada pelas vias Wnt, Fgf e pelas moléculas sinalizadoras WT1/SNAIL. Essa células adentram o tecido podendo se diferenciar em fibroblastos, ou contribuir para a formação de veias e artérias coronárias diferenciando-se em células endoteliais ou células musculares lisas (22).

1.5.2. Linhagem de células progenitoras da crista neural

As células da crista neural (NCC) são uma subpopulação de células da porção dorsal do tubo neural, em contato com a borda dorsal dos somitos. Essas células se delaminam do tubo neural e migram para o coração em formação através dos arcos faríngeos. Além de se diferenciarem em tipos celulares importantes, o principal papel das NCC é o de estabelecer a sinalização molecular adequada para os processos tardios da cardiogênese, como enervação, modelagem das vias de saída do coração (OFT) e septação cardíaca (Vincent and Buckingham, 2010; Brade *et al.*, 2013).

A migração das NCC é guiada por diferentes indutores ou inibidores: Além das vias de sinalização Bmp, Fgf, Wnt/β-catenina e do ácido retinóico, as moléculas da família das efrinas, conexinas, e as semaforinas/plexinas/neurofilinas da via de sinalização FGF atuam na proliferação celular e na migração das NCCs (Figura 18-A).

Nos arcos faríngeos, as NCCs atuam na remodelagem dos arcos aórticos: os seis pares de artérias simétricas são remodelados para formação da aorta ascendente e do tronco pulmonar. O gene TBX-1 também atua na migração das NNC. O gene não é expresso nas NCC, mas na endoderme faríngea e regula expressão das moléculas sinalizadoras SLIT e de FGF-8, que atuam na correta migração e manutenção celular para formação do 4º arco aórtico. Além de atuar na sinalização, as NCC presentes nos arcos aórticos se diferenciam em células musculares lisas e cobrem as células endoteliais dos vasos sanguíneos após a remodelagem (Figura 18-B) (Vincent and Buckingham, 2010; Brade *et al.*, 2013).

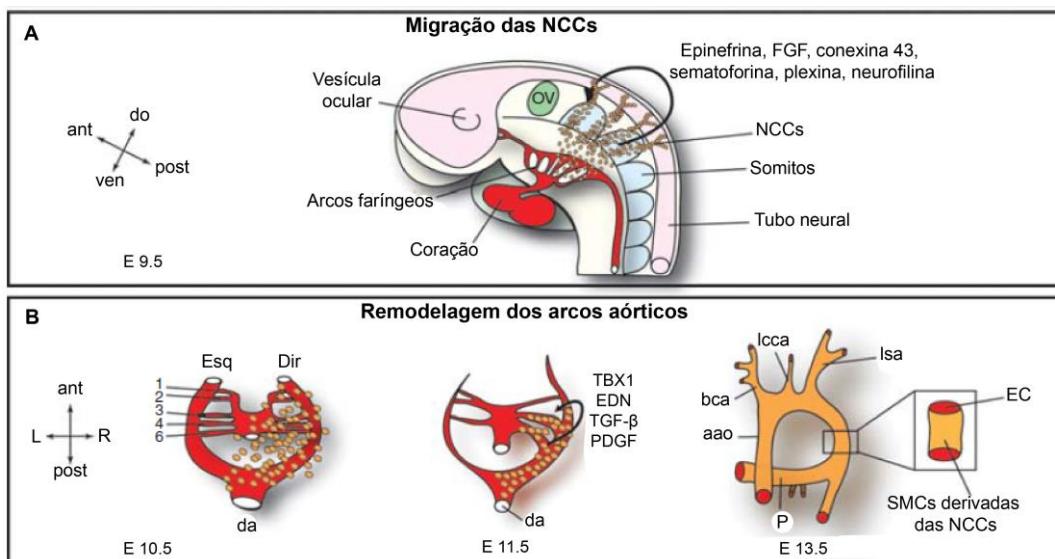


Figura 18. Migração e posicionamento das células da crista neural (NCCs) nos arcos aórticos. Siglas: aao: Aorta ascendente; bca: artéria braquiocefálica; da: aorta dorsal; lcca: artéria carótida comum esquerda; isa: artéria subclávia esquerda; P: tronco pulmonar. Adaptado de Brade et al., 2013.

As NCC também atuam no desenvolvimento do OFT, por exemplo, mantendo os níveis de FGF-8, molécula que participa da manutenção da capacidade proliferativa das células provenientes do SHF. Posteriormente as NCC atuam na septação do OFT, e se unem às células mesenquimais para formar os septos que separam os fluxos sistêmico e pulmonar no interior do coração em formação. Nesse processo, é essencial a atuação das semaforinas, além da sinalização Bmp e Wnt (22).

1.6. MOLÉCULAS CHAVE DA INTERAÇÃO DAS VIAS METABÓLICAS: PRINCIPAIS FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA CARDIOGÊNESE.

Os fatores de transcrição atuam de forma determinante na diferenciação celular. Desde os estágios mais primitivos do embrião, cada fator de transcrição é responsável por direcionar os passos seguintes da embriogênese, seja pela ativação de diferentes vias de sinalização, pela repressão da transcrição ou pela

manutenção do potencial pluripotente das células embrionárias (21). Com funções tão relevantes, as moléculas das famílias de fatores de transcrição emergem de forma previsível como foco de alterações de número de cópias (CNVs) ou variantes em estudos com coortes de pacientes com DCCs.

As várias atividades dessas moléculas contribuem para o potencial deletério das eventuais variantes, das mudanças transpcionais e da expressão de suas moléculas-alvo gerando diferentes alterações na diferenciação celular durante a cardiogênese. Desse modo, os fenótipos gerados por CNVs ou outras variantes de sequência nesses genes, são igualmente diversos como exemplificado na Tabela 3.

Tabela 3. Genes de fatores de transcrição associados com DCCs na literatura.

GENE	FENÓTIPO	OMIM
FATORES E COFATORES DE TRANSCRIÇÃO		
<i>ANKRD1</i>	TAPVR	609599
<i>CITED2</i>	ASD; VSD	602937
<i>ETS1</i>	VSD, ASD	164720
<i>FOG2/ZFPM2</i>	TOF, DORV	603693
<i>GATA4</i>	ASD, PS, VSD, TOF, AVSD, PAPVR	600576
<i>GATA6</i>	ASD, TOF, PS, AVSD, PCA, OFTD, VSD	601656
<i>HAND2</i>	TOF	602407
<i>IRX4</i>	VSD	606199
<i>MED13L</i>	TGA	608771
<i>NKX2-5/NKX2.5</i>	ASD, VSD, TOF, HLH, CoA, TGA, DORV, IAA, OFTD	600584
<i>NKX2-6</i>	PTA	611770
<i>TBX1</i>	TOF (SD22q11)	602054
<i>TBX5</i>	AVSD, ASD, VSD, (Síndrome Holt-Oram)	601620
<i>TBX20</i>	ASD, MS, VSD	606061
<i>TFAP2B</i>	PCA (Síndrome de Char)	601601
<i>ZIC3</i>	TGA, PS, DORV, TAPVR, ASD, HLH, VSD, Dextrocardia, Defeitos de lateralidade	300265

RECEPTORES, LIGANTES, SINALIZADORES, INIBIDORES

<i>ACVR1/ALK2</i>	AVSD	102576
<i>ACVR2B</i>	PS, DORV, TGA, Dextrocardia,	602730
<i>ALDH1A2</i>	TOF	603687
<i>CFC1/CRYPTIC</i>	TOF; TGA; AVSD; ASD; VSD; IAA; DORV	605194
<i>CRELD1</i>	ASD; AVSD	607170
<i>CREBBP</i>	ASD, VSD, PCA, CoA, PS, BAV (Síndrome de Rubinstein-Taybi)	600140
<i>EID2/EP300</i>	ASD, VSD, PCA, CoA, PS, BAV (Síndrome de Rubinstein-Taybi) Bilateral SVC, VSD,	609773
<i>FOXC1</i>	Síndrome de Axenfeld–Rieger, ASD	601090
<i>FOXC2</i>	HLHS, TOF, OA, PA, PCA, PAH, TAPVR, SVC, ASD, VSD	602402
<i>FOXH1</i>	TOF, TGA	603621
<i>FOXJ1</i>	VSD, SIT	602291
<i>FOXO1</i>	TOF	136533
<i>FOXP1</i>	AVSD, HLHS	605515
<i>GDF1</i>	Heterotaxia, TOF, TGA, DORV	602880
<i>GJA1</i>	ASD, HLH, TAPVR, (Displasia Oculodentodigital)	121014
<i>JAG1</i>	PAS, TOF, (Síndrome de Alagille)	601920
<i>LEFTY2</i>	TGA, AVSD, IAA, CoA, Defeitos de lateralidade, IVCD	601877
<i>NODAL</i>	TGA, PA, TOF, DORV, Dextrocardia, IVCD, TAPVR, AVSD	601265
<i>NOTCH1</i>	BAV, AS, CoA, HLH	190198
<i>NR1D2</i>	AVSD	602304
<i>NR2F2</i>	AVSD, DORV e VSD	107773
<i>PDGFRA</i>	TAPVR	173490
<i>PTPN11</i>	PVS	176876
<i>SMAD6</i>	BAV, CoA, AS	602931
<i>TAB2</i>	OFTD	605101
<i>TDGF1</i>	TOF, VSD	187395
<i>VEGF</i>	CoA, OFTD	192240

PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

<i>ACTC</i>	ASD	102540
--------------------	-----	--------

ELN	SVAS, PAS, PS, AS, (Síndrome de Williams-Beuren)	130160
FBN1	AA	134797
MYH11	PCA, AA	160745
MYH6	ASD, TA, AS, PFO, TGA	160710
MYH7	Anomalia de Ebstein, ASD, NVM	160760

Adaptado de Shabana *et al.*, 2020; Williams *et al.*, 2019; Srivastava, 2006; Stevens and Bhakta, 1995 .

1.7. NOVOS HORIZONTES DE INTERESSE DA CARDIOGÊNESE

MOLECULAR: MATRIZ EXTRACELULAR, CÍLIOS, EPIGENÉTICA E MODIFICADORES DE CROMATINA.

Diante da complexidade da dinâmica molecular envolvida na cardiogênese e da diversidade de fenótipos, alguns grupos de estudo têm se voltado para mecanismos de controle ou fatores comuns que possam influenciar em diferentes vias e mecanismos embriológicos.

A matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*) interfere na interação entre os diferentes morfógenos, fatores de transcrição e de crescimento nos diferentes tipos celulares em formação. Atuam ainda em mecanismos importantes como a transição EMT e os processos de trabeculação (55,56). Alterações em genes como *HAS2* e *ADAMTS1* estão associados a defeitos de septação e não-compactação de ventrículo esquerdo (21).

Estudos com animais modelo revelaram a importância dos cílios na cardiogênese. Os cílios são organelas que se projetam a partir da superfície das células podendo apresentar presença ou ausência de motilidade (43).

Os cílios móveis estão envolvidos na motilidade celular, e no fluxo extracelular com influência direta nos gradientes de morfógenos e moléculas sinalizadoras que chegam às células. Essas organelas móveis

atuam na padronização esquerda-direita do embrião. Alterações em genes relacionados à defeitos ciliares tem sido associados com defeitos de lateralidade (55). Em estudo prévio de nosso grupo foi identificada ocorrência de discinesia ciliar em paciente com Dextrocardia, *situs inversus partialis*, defeito de septação ventricular (VSD) e persistência do canal arterioso (PCA) (57).

Já os cílios sem motilidade, denominados cílios primários, atuam na transdução de sinal em diferentes vias metabólicas envolvidas na cardiogênese, como Wnt, Tgf- β , Bmp, Shh, Notch, Vegf. Os cílios primários modulam a polaridade planar das células, atuam na migração das células do pró-epicárdio, e no posicionamento das NCCs para promoção da transição EMT (55). Alterações que levam à disfunção ciliar incluem diversos fenótipos de defeitos de septação, alterações de valvas e de OFT (58).

Os modificadores de cromatina atuam na regulação da transcrição por todo o genoma por meio do controle do acesso do complexo de transcrição ao DNA. A compactação do DNA em suas diferentes regiões é controlada pela acetilação, metilação e ubiquitinação dos quatro tipos de histonas (H2A, H2B, H3, e H4). Em coortes de pacientes com DCCs sindrômicas foram identificadas diversas ocorrências de variantes de sequência *de novo* em genes modificadores de cromatina. Adiciona-se à esses, os casos de variantes em modificadores epigenéticos, que igualmente atuam na regulação da transcrição, que em estudos de coorte e de organismos modelo *knock-out* tem se mostrado relevantes na etiologia de DCCs (58).

Entre as etiologias estabelecidas cita-se o gene modificador de histonas *KMT2D* já associado à Síndrome de Kabuki, com ocorrência de coarcação de Aorta (CoA), defeito de septação atrial (ASD), e defeito de septação ventricular (VSD) (59). Alterações em genes do complexo repressor HDAC tem sido identificados em pacientes com DCCs. Pela capacidade de inibição de fatores de transcrição como *MEF2C*, são identificados como antagonistas de hipertrofia, mecanismo essencial na

cardiogênese (60). Genes da classe HDAC já foram identificados em casos de dupla via de saída do ventrículo direito (DORV) e Tetralogia de Fallot (TOF) (55).

1.8. ETIOLOGIA GENÉTICA DAS DCCS.

Apesar de seu impacto expressivo na saúde dos pacientes e no funcionamento dos sistemas de saúde por todo o mundo, as causas das cardiopatias congênitas ainda são pouco compreendidas, devido à complexidade genômica e variabilidade fenotípica.

Ainda assim, a epidemiologia das DCCs, a concordância em casos de gemelares e o aumento da incidência de DCCs, e os casos recorrentes em populações com elevados níveis de consanguinidade indicam que o componente genético tem uma grande importância para a etiologia das DCCs (Zaidi and Brueckner, 2017). Diversos mecanismos genéticos têm sido estudados para compreender a patofisiologia das DCCs, além de promover o diagnóstico e auxiliar no prognóstico dos pacientes, conforme demonstrado na Figura 19.

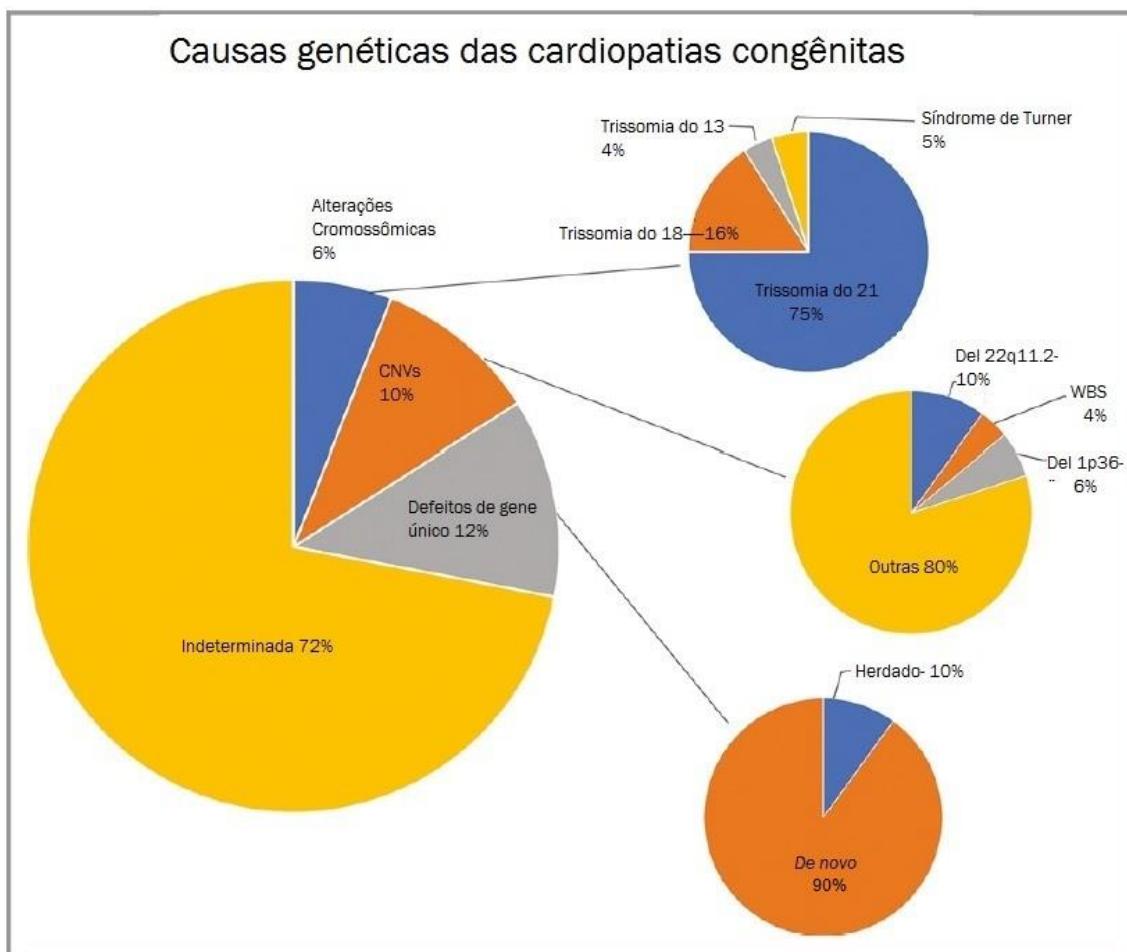


Figura 19. Distribuição das causas genéticas identificadas em pacientes com DCCs. CNV: Variação de número de cópias; SNV: variação de um único nucleotídeo. Adaptado de Zaidi e Brueckner, 2017.

A busca da correlação entre fenótipo e genótipo deve levar em conta a heterogeneidade das cardiopatias congênitas. Uma única alteração genética tem potencial para impactar um conjunto diverso de moléculas e vias que orquestram o desenvolvimento cardiovascular (61). Por conseguinte, um grupo de fenótipos anatomicamente heterogêneo pode ter uma mesma origem embriológica (Bajolle *et al.*, 2009). Inversamente, um mesmo fenótipo de cardiopatia pode ter origem em diversos mecanismos embriológicos, sob a influência de diversos *loci* gênicos (Azhar and Ware, 2016). Isso justifica a ocorrência de uma mesma cardiopatia decorrente de alterações distintas, em genes diferentes e envolvendo outros mecanismos embriológicos (Figura 20) (Bajolle *et al.*, 2009).

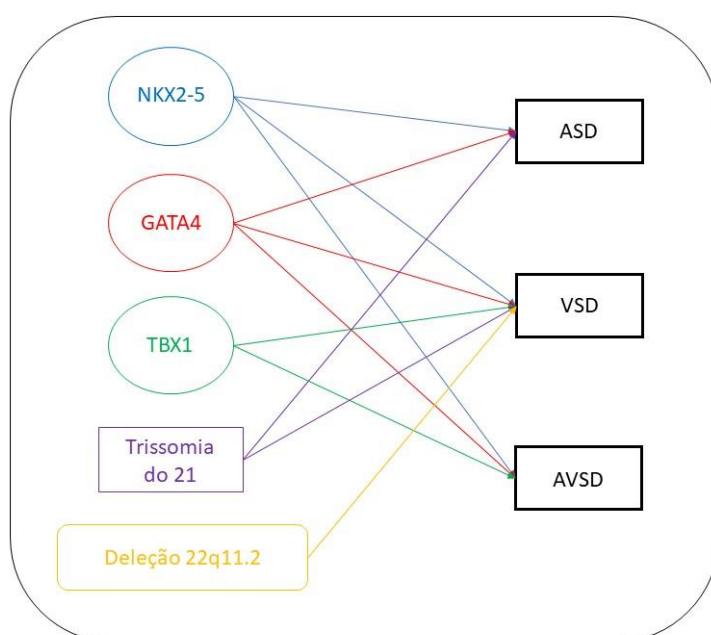


Figura 20. Heterogeneidade fenotípica e de *locus* nas DCCs.

ASD: Defeito de septação atrial; VSD: Defeito de septação ventricular; AVSD: Defeito de septação atrioventricular. Adaptado de Azhar e Ware, 2016 e Bajolle *et al.*, 2008.

1.8.1. Aneuploidias e desequilíbrios cromossômicos

A estimativa de ocorrência de DCC associada à aneuploidias varia entre 9% e 18% na literatura (Zaidi and Brueckner, 2017). Grande parte dos estudos sobre o tema permite concluir que maioria das anomalias cromossômicas resulta

de alterações *de novo*. Além disso, observa-se que a quantidade de genes com alteração de dosagem resultante das aneuploidias usualmente levam a efeitos pleiotrópicos e severos, de modo que 98% dos casos resultam em outras malformações congênitas extracardíacas. Essa característica facilita a identificação de uma diversidade de patologias no período neonatal e até pré-natal (Zaidi and Brueckner, 2017).

Apesar da grande variabilidade de DCC identificadas em pacientes portadores de aneuploidias, é possível relacionar as DCC mais frequentemente associadas à cada síndrome, na Tabela 4. O grande número de genes com dosagem alterada dificulta também a definição de genes causais das cardiopatias (Zaidi and Brueckner, 2017). Casos raros de aneuploidias segmentais, variantes de sequência e modelos animais auxiliam na identificação de genes causais e suas implicações no quadro sindrômico, como os genes *DSCAM* e *COL6A* nas cardiopatias congênitas de pacientes com Síndrome de Down (62), do gene *ELN* na Síndrome de Williams (63) e dos genes *TBX1* e *CRKL* na Síndrome da deleção 22q11.2 (64).

Tabela 4. Ocorrências sindrômicas de DI/ADNPM e cardiopatias congênitas.

Síndrome	Alteração genética	Frequência de CC	DCC frequentes	Outros fenótipos
Patau	Trissomia do 13	80-100%	ASD, VSD, PCA, HLH	Microcefalia, microftalmia, holoprosencefalia, defeitos no couro cabeludo, polidactilia, fenda labial e/ou palatina, onfalocele, anomalias genitourinárias.
Edwards	Trissomia do 18	90-100%	ASD, VSD, PCA, TOF, DORV, CoA, BAV	Polihidrâmnios, pé torto congênito, hipertonia, hérnia diafragmática, onfalocele.
Down	Trissomia do 21	40-50%	ASD, VSD, AVSD, TOF	Hipotonia, epicanto, macroglossia, perda auditiva condutiva, prega palmar única
Turner	Monossomia do X	20-50%	CoA, BAV, AS, HLH,	Baixa estatura, pescoço alado, linfoedema,

			PAPVD sem ASD	disgenesia gonadal, amenorréia primária, aumento da distância intermamilar com mamilos hipoplásicos, baixa implantação de cabelos na nuca
Deleção 22q11.2	Deleção em 22q11.2	75%	IAA tipo B, AAA, Tronco arterioso, TOF, TA, VSD	Hipoplasia de timo e paratireoide, imunodeficiência, baixa implantação de orelhas, hipocalcemia, anomalias renais
Williams-Beuren	Deleção 7q11.23	80-100%	SVAS, PS, AS, AV/MVD	Hipercalcemia infantil, face “élfica”, personalidade sociável, anomalias renais
Cri-du-chat	Deleção em 5p15.2	10-55%	VSD, PCA, ASD, TOF	Microcefalia, facies típica, hipertelorismo, epicanto, hipotonía, implantação baixa de orelhas, malformações de laringe
Cat Eye	Inversão/duplicação em 22q11	>50%	TAPVR, TOF	Coloboma de íris, atresia anal, anomalias renais, apêndices auriculares
Jacobsen	Deleção em 11q23	>50%	HLH, LVOT	Craniosinostose, estrabismo, facies típica, campodactilia bilateral, trombocitopenia autoimune
Deleção 1p36	Deleção em 1p36	43-70%	PCA, CMP	Facies típica, perda auditiva, anomalias orofaciais, microcefalia

AAA: anomalias do arco aórtico, AS: estenose da Aorta, ASD: Defeito de septação atrial, AVSD: defeito de septação atrioventricular, CoA: coactação de aorta, HLH: hipoplasia do coração esquerdo, PCA: ducto arterioso patente, PS: estenose pulmonar, PTA: persistência do canal arterial, TA: atresia de valva tricúspide, TOF: tetralogia de Fallot, VSD: defeito de septação ventricular, DORV: dupla via de saída do ventrículo direito, BAV: valva aórtica bicúspide, IAA: interrupção do arco aórtico, PAPVD sem ASD: drenagem venosa pulmonar anômala parcial sem defeito de septação atrial, TAPVR: retorno venoso pulmonar anômalo total, MVP: prolapsus de valva mitral, AV/MVD: defeitos no canal atrioventricular e

valva mitral, LVOT: obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo, CMP: cardiomiopatias. Adaptado de Fahed *et al.*, 2013; Richards *et al.*, 2008.

1.8.2. Variação de número de cópias

As variações de número de cópias (CNVs) são variações estruturais genômicas caracterizadas por uma mudança na quantidade de material genômico por perda ou ganho de DNA com 50 pares de base ou mais (67).

Os CNVs usualmente surgem a partir de rearranjos estruturais em pontos de quebra comuns decorrentes da arquitetura genômica e não são necessariamente patogênicos. Entretanto, CNVs podem levar à desregulação da funcionalidade de um ou mais elementos do genoma, com consequente alteração da expressão, levando à patologias e problemas de desenvolvimento (Costain *et al.*, 2016).

Têm se identificado um excesso de CNVs raros e *de novo* em pacientes com DCCs em comparação com populações controle, indicando que as CNVs e a variabilidade genética que carregam contribuem para a suscetibilidade às malformações cardíacas. As taxas de surgimentos de CNVs *de novo* podem explicar parcialmente como a incidência de DCCs se mantém elevada nas populações, apesar de haver uma grande pressão seletiva negativa. Além disso, diversos casos de CNVs inicialmente identificados como *de novo* são herdadas de genitores que não apresentam DCCs, devido a mecanismos de expressividade variável e penetrância reduzida (Costain *et al.*, 2016).

A importância das CNVs foi ampliada a partir do uso clínico da análise cromossômica por *microarray* (CMA) que ampliou o diagnóstico de síndromes de microdeleção e microduplicação, de CNVs patogênicas e variantes de significado incerto (VOUS). Em estudos com pacientes com DCCs pré e pós-natais corrobora-se as altas taxas de CNVs patogênicas e de VOUS em pacientes sindrômicos e não-sindrômicos (68,69). As CNVs se apresentam como potencial mecanismo etiológico para as DCCs uma vez que por seu tamanho

tem a capacidade de perturbar múltiplos genes e elementos regulatórios. Tal impacto seria compatível com perturbação necessária para alterar os mecanismos de cardiogênese nas diversas vias gênicas que o compõe, ultrapassando até a redundância genética protetiva estabelecida ao longo da evolução (Costen et al., 2016).

Os aspectos clínicos das síndromes que envolvem DCCs e o conhecimento acerca da etiologia genética dessas síndromes foi discutido mais detalhadamente em artigo de revisão publicado por nosso grupo de pesquisa (Figura 21) (Saliba et al., 2019- Apêndice 2- Artigo *Genetic and genomics in congenital heart disease: a clinical review*).

Condição	Gene(s)	Localização no cromossomo
Deleção/Duplicação de 22q11.2	TBX1	22Q11.2
22q11.2del distal	CRKL, ERK2/MAPK1	22q11.22
Deleção/Duplicação de 1q21.1	GJA5	1q21.1
1p36del 8P23.1DEL	PRDM16 GATA4	1P36.32 8p23.1
Síndrome de Wolf-Hirschhorn	WHSC1,	4p16.3
Síndrome de Williams Beuren	FGFRL1 ELN, WSTF	7q11.23
Síndrome de Kleefstra	EHMT1, NOTCH1	9q34.3
Síndrome de Noonan	PTPN11 (50%) RIT1 (alta incidência de DCC)	12q24.12 1q22
Síndrome de Adams Oliver	RBPJ NOTCH1	4p12.2 9q34.3
Síndrome de Holt-Oram	TBX5	12q24.21
Síndrome de Alagille	JAG1 NOTCH2	20p12.2 1p12

Figura 21. Os principais distúrbios genômicos (síndromes associadas à CNVs) relacionados à DCC.(70).

A microdeleção mais comum em humanos ocorre na região 22q11.2, com prevalência estimada de 1/4000 nascidos vivos, e de 1/1000 em diagnóstico intraútero (71).

A microdeleção na região 22q11.2 é a causa da Síndrome da deleção 22q11.2 (22q11.2SD) (OMIM 188400, 192430, 611867), que afeta múltiplos

órgãos e apresenta grande variação de severidade e de penetrância entre indivíduos afetados. Apesar da grande variação de sinais e sintomas, são descritos como características da síndrome DCC, deficiência intelectual, anomalias craniofaciais e de palato, deficiência imune e hipocalcemia. A DCC está presente em 75% dos indivíduos afetados, sendo mais comuns as malformações do OFT, TOF, alterações dos arcos aórticos e VSD (71).

As diferentes alterações congênitas presentes na síndrome são originadas pelo impacto da deleção 22q11.2 no remodelamento da região faríngea durante a embriogênese, alterando diretamente a diferenciação do SHF, as artérias derivadas dos arcos faríngeos, e a formação do timo e da paratireóide, derivados do terceiro e quarto par de arcos faríngeos (71).

Com relação a etiologia genética, 85-90% dos pacientes afetados apresentam a deleção típica de 3 Mb na porção proximal. Outras deleções menores foram identificadas com menor frequência, geralmente delimitadas por algum dos pares de *low-copy number repeats*, (LCR) presentes na região (Figura 22).

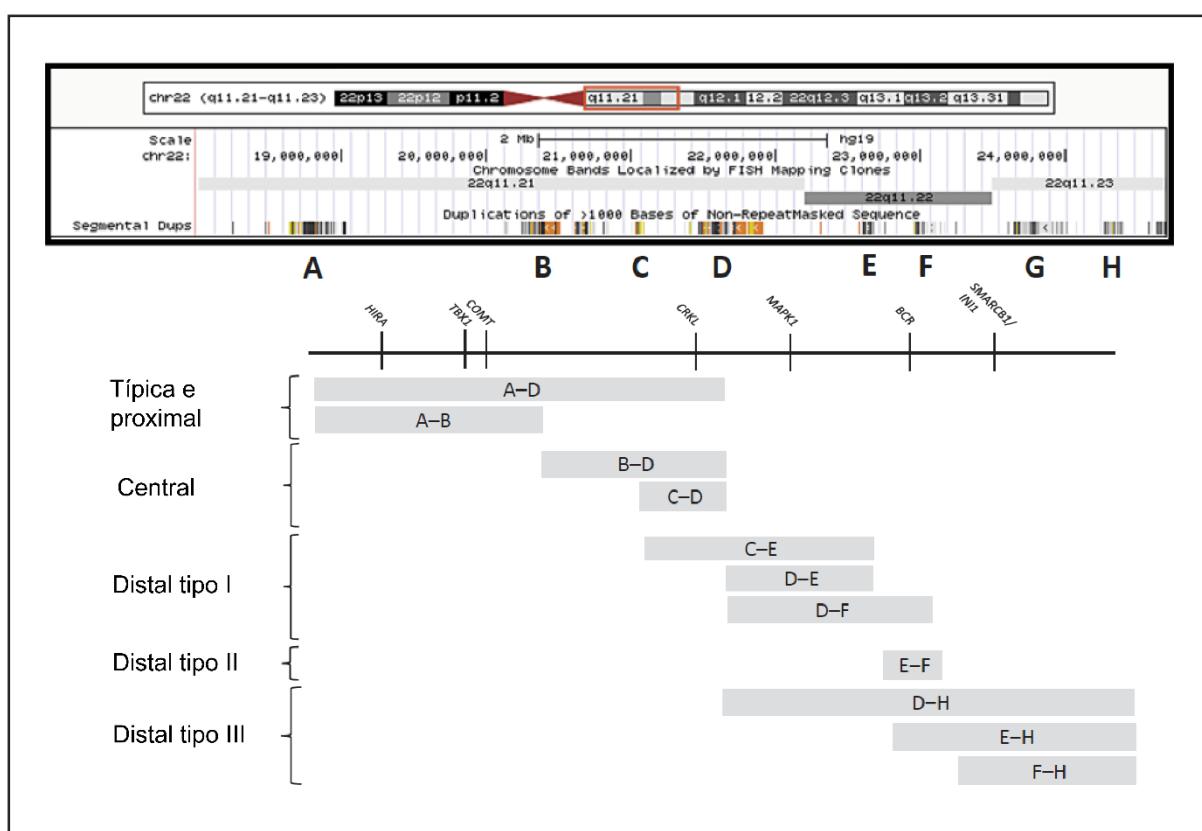


Figura 22. Diferentes tamanhos de deleções na região 22q11.2 e denominações.

Na parte superior, representação do cromossomo 22 referenciado no *UCSC Genome Browser* indicando a posição das LCR, também denominadas *segmental duplications*, ilustradas como caixas coloridas. Estão indicados, em suas respectivas posições alguns dos genes presentes na região. A deleção A-D representa a deleção típica de 3Mb, mais frequente entre os pacientes com a síndrome. As demais deleções representadas são menos frequentes. Figura adaptada de Burnside, 2015.

A região 22q11.2 apresenta diversas repetições com poucas cópias (LCR, do inglês *low-copy number repeats*) de forte homologia, que podem levar ao pareamento desigual entre cromossomos ou cromátides levando à eventos de recombinação homóloga não alélica (NAHR, do inglês *Non-Allelic Homologous Recombination*) que podem levar a duplicações ou deleções segmentares (73,71).

A deleção típica de 3Mb (LCR A-LCR D) resulta na hemizigose de 106 genes, entre os quais o gene *TBX1*, que durante a embriogênese é expresso no aparato faringeal e nas células progenitoras do SHF, sendo responsável pela regulação da expressão de mais de 2000 genes presentes em outras regiões genômicas (Figura 22) (74). Além de *TBX1*, a região típica contém ainda 7 microRNAs, 12 RNAs longos não codificantes e outros transcritos indefinidos. O estudo dos demais genes e outros elementos genômicos da região tem avançado visando explicar especialmente a enorme variabilidade fenotípica da síndrome 22q11.2SD (74). O gene *DGCR8* codifica uma proteína nuclear essencial para a biogênese dos miRNAs, importantes reguladores da expressão gênica. Em modelos animais, a haploinsuficiência de *DGCR8* já foi associada à redução da expressão neuronal de diversos miRNAs que causam disruptões sinápticas características da esquizofrenia, presente em 30% dos portadores da 22q11.2SD, ao lado de outras alterações psiquiátricas (71).

O diagnóstico preciso dos pacientes com 22q11.2SD revela cada vez mais, a importância da investigação genética para o prognóstico e para a melhoria da qualidade de vida do paciente. A intervenção precoce em pacientes com 22q11.2SD é responsável por uma redução de aproximadamente 12% dos casos de óbito (75). De modo similar, medidas simples, como a suplementação de

cálcio, evitam complicações que só seriam identificadas tarde, com potenciais consequências graves à saúde física, mental e familiar dos pacientes.

A identificação de síndromes conhecidas e bem estudadas beneficia diretamente pacientes e seus familiares, por possibilitar um planejamento clínico adequado ao longo de toda a vida. No caso da 22q11.2SD, os principais focos de atuação médica estão indicados na Figura 8, elaborada de acordo com as diretrizes de manejo da síndrome (76). A variabilidade do quadro sindrômico entre pacientes tem sido cada vez mais associada ao impacto da deleção 22q11.2 na regulação dos miRNAs e de outros fatores epigenéticos. Esses novos alvos tem sido objeto de diversos estudos que buscam alvos terapêuticos para redução da severidade da síndrome (71).

O diagnóstico genético auxilia no planejamento dos encaminhamentos médicos necessários para pacientes portadores, tendo em vista, por exemplo, a incidência de alterações comportamentais e o acometimento de doenças mentais, é possível realizar o acompanhamento precoce dos pacientes diagnosticados ainda na infância, como é o caso da amostra apresentada.

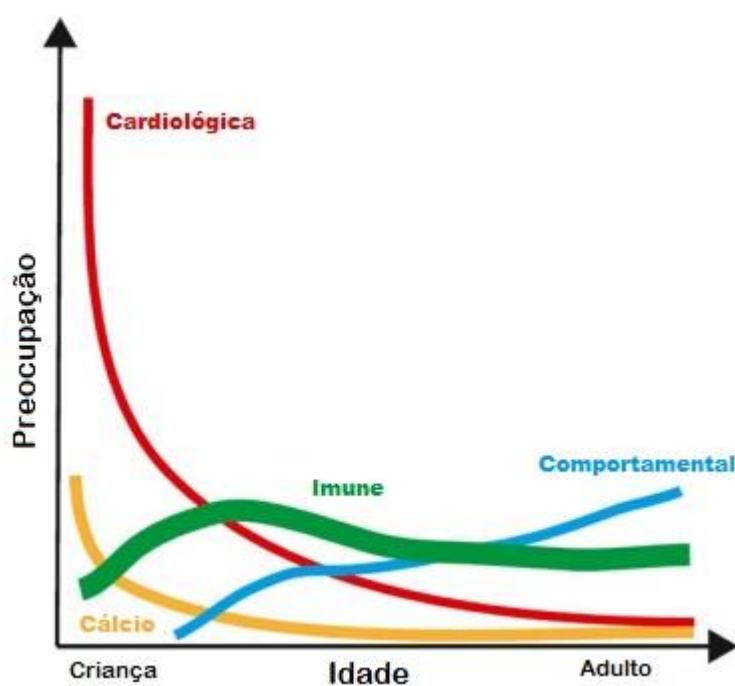


Figura 8. Diagrama representando as preocupações médicas ao longo da vida de pacientes com 22q11.2SD. Traduzido de Sullivan, 2019.

Outra síndrome de microdeleção frequentemente associada às DCCs é a Síndrome de Williams-Beuren (WBS, OMIM 194050) que afeta 1:7500 a 1:10.000 nascidos vivos. As DCCs estão presentes em 75% dos portadores, que usualmente apresentam estenose pulmonar e estenose aórtica supravalvar. A alta recorrência desse fenótipo é explicada pela deleção típica da síndrome, de 1,5-1,8 Mbp na região 7q11.23, onde estão localizados cerca de 28 genes, entre eles o gene da elastina (ELN), cuja haploinsuficiência causa deposição anormal de elastina nas paredes arteriais, ampliando a proliferação de células de músculo liso arterial e subsequente hiperplasia intimal (70).

Pacientes com Síndrome de Williams apresentam perfil clínico reconhecível em ambulatório, como face sindrômica característica, personalidade sociável e amigável, além de alterações do padrão de crescimento, anomalias esqueléticas e de tecido conjuntivo (77). A suspeita clínica é confirmada pela identificação da deleção típica no braço longo do cromossomo 7 utilizando técnicas moleculares direcionadas como MLPA ou FISH.

Além da descoberta, caracterização e diagnóstico de síndromes de microdeleção e microduplicação, outro avanço importante decorrente do uso dos *microarrays* ocorreu com o acréscimo de sondas específicas para a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único que permitiram a identificação de regiões de ausência de heterozigose, assim direcionando o sequenciamento e a identificação de genes recessivos relacionados com a cardiogênese presentes nestas regiões em homozigose (Costain *et al.*, 2016).

1.8.3. Alterações gênicas

O avanço de estudos de casos familiares de DCCs e estudos de coorte utilizando a análise de ligação, o sequenciamento direto de genes candidatos, os estudos funcionais com modelos animais e o Sequenciamento de Nova Geração-NGS (do inglês, *next-generation sequencing*) são marcos históricos que levaram à caracterização de diversas variantes de sequência causadoras de DCCs (Fahed *et al.*, 2013).

O NGS em especial se firmou como importante ferramenta para pesquisa científica, seja pelo uso do sequenciamento completo de genoma (WGS- do inglês *whole genome sequencing*) ou de exoma (WES, do inglês *whole exome sequencing*) ou pelo sequenciamento direcionado de genes associados à doenças, muito utilizado na área clínica. O desenvolvimento da genômica ampliou a capacidade de descoberta de diversos fatores genéticos envolvidos na embriogênese e na função cardíaca, tais como proteínas regulatórias, fatores de transcrição e vias de sinalização (78).

A maioria das variantes de sequência identificadas leva à mecanismos de haploinsuficiência de proteínas importantes na cardiogênese. Essa característica parece indicar a ocorrência de um limiar mínimo de expressão gênica necessária para o adequado desenvolvimento embriológico (55,65).

Outras linhas de estudos têm identificado a importância de fatores relacionados à regulação gênica do processo de cardiogênese, como fatores epigenéticos, modificadores de histonas, remodeladores de cromatina. Desse modo, torna-se cada vez mais necessário o avanço das pesquisas que combinem diferentes abordagens como transcriptoma, epigenética, estudos funcionais e com modelos animais que permitam entender a complexa regulação gênica e os mecanismos patogênicos que levam às DCCs (78).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar a etiologia genética das doenças cardíacas congênitas utilizando exames diagnósticos aplicáveis na realidade brasileira.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o grupo amostral de pacientes e caracterizar o fenótipo cardíaco dos pacientes portadores de DCCs sindrômicas que buscam diagnóstico genético ambulatorial.
- Investigar a etiologia genética do grupo amostral de pacientes com DCC utilizando as seguintes técnicas:
 - Identificação de pacientes com alterações cromossômicas utilizando metodologias de citogenética clássica;
 - Realização de triagem para deleções na região cromossômica 22q11 e outras síndromes de microdeleção por *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA);
 - Busca de alterações sub-microscópicas utilizando a técnica de CMA;
 - Busca de alterações genômicas por meio do Sequenciamento de Exoma, para pacientes com indicação após CMA;
- Relacionar os fenótipos e genótipos no grupo amostral de pacientes com DCC;
- Contribuir para ampliação do entendimento da genética das DCCs empregando tecnologias genômicas emergentes.
- Analisar a eficiência das diferentes metodologias de diagnóstico genético para um grupo heterogêneo de pacientes com DCCs em condições aplicáveis à realidade da saúde pública brasileira.

3. MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Os indivíduos que fizeram parte deste trabalho foram recrutados no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB), Distrito Federal. Foram incluídos no trabalho todos os indivíduos com diagnóstico de cardiopatia congênita sindrômica ou isolada sem resolução espontânea, de acordo com a definição usada nesse estudo, que acessaram o Ambulatório de Genética do HUB entre os anos de 2014 e 2020.

O corpo médico Ambulatório de Genética do HUB realizou a anamnese, o preenchimento de prontuário clínico e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Modelo consta no Apêndice I) pelos pacientes/responsáveis legais. Em seguida, foram coletados 4 mL de sangue periférico em tubo de coleta com anticoagulante heparina sódica e 4 mL em tubo de coleta com anticoagulante EDTA para os exames genéticos.

3.1.1. Critérios de inclusão

- a) Paciente com diagnóstico clínico fundamentado de cardiopatia congênita sem resolução espontânea;
- b) Assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pacientes/responsáveis legais;

3.1.2. Critérios de exclusão:

- a) Paciente apresenta somente alterações da morfologia cardíaca comuns na transição da circulação fetal para circulação pós-natal com posterior resolução espontânea sem necessidade de intervenção

cirúrgica (por exemplo, persistência de canal arterial resolvida espontaneamente, sem intervenção cirúrgica);

- b) Paciente apresenta somente alterações condutivas e de ritmo cardíaco;
- c) Discordância em participar do estudo ou na assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- d) Paciente em atendimento no ambulatório sem diagnóstico cardiológico conclusivo confirmado;

3.2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO

As técnicas de diagnóstico genético foram aplicadas ao grupo amostral de pacientes que se adequaram ao critério de inclusão do estudo. O principal norteador do fluxo de aplicação das técnicas foi a indicação clínica fundamentada pelas médicas geneticistas do Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB), Distrito Federal visando o alcance do diagnóstico com melhor custo-benefício, partindo das técnicas menos onerosas, como demonstrado na Figura 23.

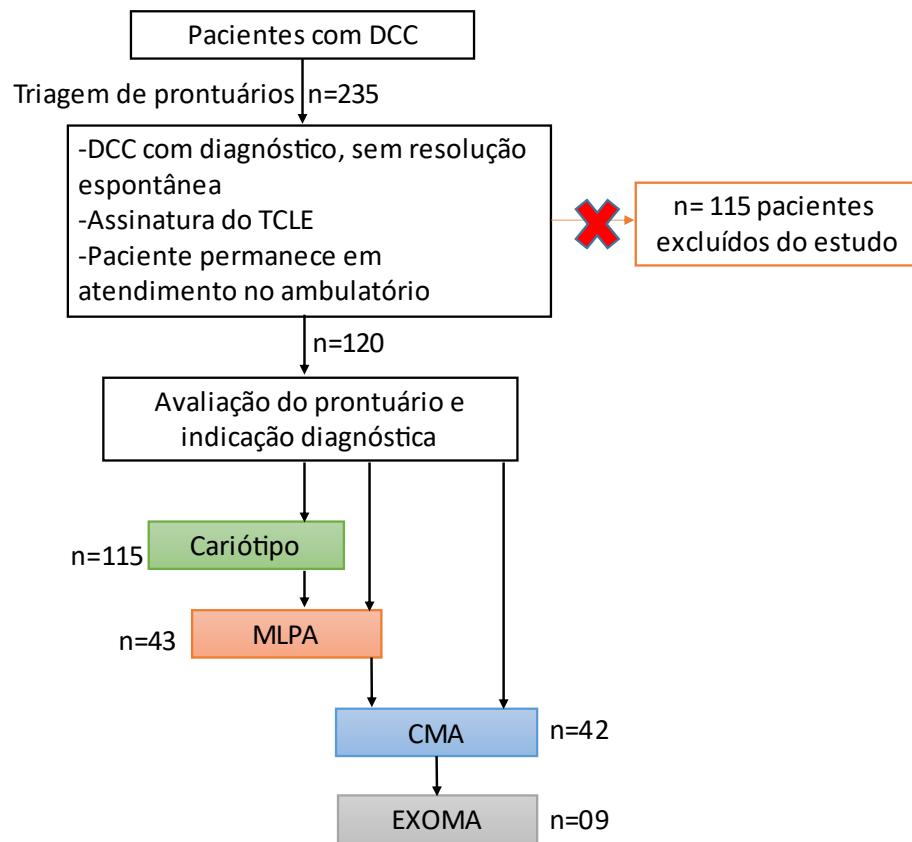


Figura 23. Fluxograma de triagem diagnóstica.

3.2.1. Cariótipo

O material para análise foi obtido pelo cultivo dos linfócitos do sangue periférico realizado seguindo a técnica citogenética clássica descrita por (79). Após o preparo das lâminas, foi realizado bandeamento cromossômico em padrão GTG.

A análise citogenética compreende um total de 20 metáfases para cada caso, sendo que o número de metáfases analisadas foi ampliado em casos com suspeita de mosaicismo ou necessidade de melhor caracterização de alterações observadas. Os cariótipos analisados seguem as regras de análise e de descrição de acordo com as regras internacionais de nomenclatura citogenética e citogenômica (*ISCN 2020 | Karger Book*).

3.2.2. Extração de DNA das amostras para as técnicas moleculares

A extração de DNA foi realizada conforme o método Puregene (www.puregene.com). Utilizando 3 mL de sangue total, foi realizada lise pela adição de 9 mL de solução de lise RBC (5mM MgCl₂ -1mM EDTA pH 8,0), inversão do tubo e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 10 minutos a 3400 G e descarte do sobrenadante, foi realizada ressuspensão do pellet e adição de 3 mL de solução de lise celular (SLC) (10mM Tris pH 7,5 – 1mM EDTA pH 8,0 – 1% SDS), obtendo-se uma suspensão homogênea.

A remoção das proteínas presentes no lisado celular, foi realizada pela adição de 1 mL da solução de precipitação de proteína (NH₄Ac 7,5 M), seguida de homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 3400 G, obtendo sobrenadante contendo DNA, separado das proteínas precipitadas descartadas no pellet.

O sobrenadante foi reservado em outro tubo em que se adicionou 3 mL de isopropanol 100% para precipitação do DNA, seguido de centrifugação por 3 minutos a 3400 G e posterior descarte de sobrenadante. Ao pellet obtido, foram adicionados e homogeneizados 3 mL de etanol 70%, seguido centrifugação por 1 minuto a 3400 G. Após o descarte do sobrenadante, o tubo permaneceu aberto em temperatura ambiente para evaporação por 20 minutos. O pellet resultante foi ressuspendido em 200 µL de água livre de DNA (DNase free), ou TE (Tris-HCL 10mM - EDTA 1mM pH 8,0), e armazenado à 2 a 8°C. As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE *Healthcare Life Sciences*, EUA).

3.2.3. Multiplex ligation probe amplification-MLPA

O método de MLPA foi empregado para identificar os pacientes que têm microdeleções ou microduplicações em regiões bem caracterizadas e relacionadas à quadros sindrômicos.

Para a aplicação da técnica, as amostras de DNA extraídas do sangue dos pacientes foram quantificadas no espectrofotômetro Nanovue® (GE), obtendo-se razão de 260/280 nM de pureza e concentração de 50 nG/µL.

Alíquotas de 5 µL cada amostra foram denaturadas em termociclador à 94° C por 5 minutos, promovendo a separação das fitas de DNA. As amostras foram tratadas com os reagentes prontos para uso que compõe cada kit de MLPA (MRC-Holland), conforme orientação do fabricante. Em cada amostra foi aplicado em cada reação 0,375 µL do kit de sondas (Probe Mix), 0,375 µL de tampão (Salsa Buffer) e 0,25 µL de água livre de DNA (DNase free), homogeneizando por pipetagem.

As sondas presentes no kit de MLPA (MRC-Holland) são compostas por dois segmentos complementares às sequências-alvo de DNA, cada segmento da sonda contém um iniciador (do inglês, *primer*), e uma das partes contém uma sequência coringa que varia de tamanho nas diferentes sondas, permitindo a separação dos diferentes fragmentos posteriormente por eletroforese capilar (Figura 24-1).

A hibridação das sondas ao DNA das amostras foi realizada em termociclador com ciclo de 95° C por 1 minuto seguido de ciclo a 60° C por 3 horas. Nessa etapa as sondas se ligam ao DNA das amostras que contém suas sequências complementares, de modo que os dois fragmentos de cada sonda se posicionam lado a lado em sua região alvo (Figura 24-2).

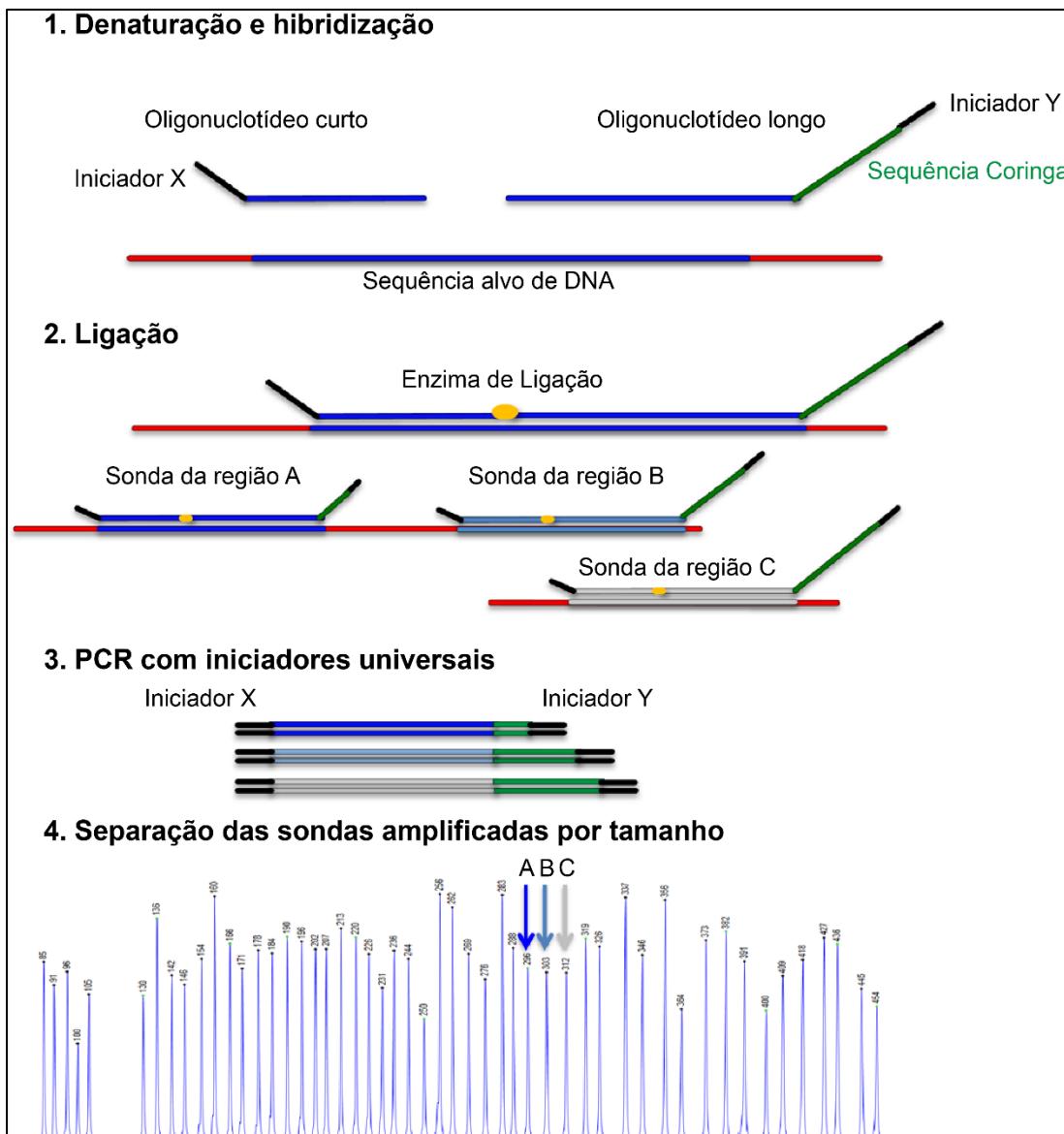


Figura 24. Etapas da reação de MLPA. Adaptado de MRC-Holland.

Após hibridação entre as sondas e o DNA da amostra, aplicou-se a cada reação 0,75 µL de tampão A (*Ligase Buffer A*) e 0,75 µL de tampão B (*Ligase Buffer B*), além de 6,25 µL de água DNase free e 0,25 µL de enzima Ligase. A reação de ligação em termociclador seguiu o programa de ciclo a 54° C por 15 minutos, 98° C por 5 minutos e 20° C por 20 minutos. Nessa etapa, os dois fragmentos de cada sonda que adequadamente se hibridaram ao DNA alvo são unidos por ação da enzima Ligase, formando uma sonda única (Figura 24-3).

As sondas de cada região têm tamanho específico e conhecido, de acordo com extensão da sequência-coringa. Essa diferenciação entre o tamanho das

sondas vai permitir a posterior identificação das sondas por região-alvo (Figura 24-4).

As sondas que adequadamente se hibridizaram ao DNA na região-alvo, serão todas ligadas por ação da enzima Ligase. As sondas que não encontraram a região alvo, casos de deleção não serão não hibridizadas, e não serão ligadas em uma sonda única. Em regiões duplicadas, muito mais sondas serão hibridizadas e ligadas pela enzima, e essa diferença de quantidade, permite a identificação das deleções e duplicações genômicas pela técnica de MLPA.

Para facilitar a quantificação, cada amostra passa por Reação em Cadeia de Polimerase- PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) para amplificação das sondas unificadas. Foi utilizado para cada amostra 0,6 µL de solução para PCR contendo oligonucleotídeos sintéticos com marcador fluorescente (FAM), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, e detergente não-iônico, 4,15 µL de água DNase free e 0,25 µL de enzima Taq polimerase, seguido de homogeneização por pipetagem. A reação de PCR é realizada com um único par de iniciadores, comum a todas as sondas (Schouten, 2002). A reação foi realizada em termociclador, com programação de 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto e um ciclo final de 72° C por 20 minutos.

O produto da reação foi diluído para quantificação na proporção de 1:10, sendo posteriormente disposto em placa de 96 poços, em que se aplica em cada poço 1 µL de cada amostra diluída, acrescidos de 9 µL de Formamida HIDI e 0,01 µL de marcador Liz-500. As amostras tratadas foram submetidas à eletroforese capilar no analisador genético ABI-3130. Os resultados foram analisados o software *Coffalyser* (MRC-Holland).

A técnica de MLPA, pela hibridação de sondas específicas e amplificação por PCR, permite a identificação do número de cópias de uma dada sequência de DNA. Após a quantificação, cada região é identificada pelo tamanho da sonda hibridizada na região alvo. A quantidade de cada uma das sondas é medida por meio de eletroforese capilar. A quantidade de sondas identificadas pode ser observada em gráfico de picos, em que cada pico representa uma sonda e a quantidade dessa sonda identificada na amostra (Figura 24-5).

Além do gráfico de quantificação, o software *Coffalyser* (MRC-Holland) realiza uma comparação entre as amostras de paciente e as amostras de controle, e produz uma representação gráfica que facilita a identificação de regiões deletadas ou duplicadas, exemplificada na Figura 25.

O principal kit de MLPA selecionado para uso nesse estudo é identificado como P250 (MRC-Holland), sendo específico para diagnóstico da Síndrome da deleção 22q11.2- SD22q11.2 (antigamente denominada DiGeorge ou Velocardiofacial) e da síndrome do Olho de Gato, citogeneticamente caracterizada por duplicação da região 22q11.2. As deleções no cromossomo 22q11 (a região deletada na SD22q11.2) são uma causa muito frequente de malformações cardíacas congênitas (81).

No Anexo 1 consta a lista de sondas presentes no kit P250, conforme a descrição do fabricante (MRC-Holland). Primeiramente são apresentadas as sondas na região CES, região específica da Síndrome do olho de gato, visando identificar sua duplicação característica. As demais sondas presentes no cromossomo 22 estão posicionadas visando identificar deleções na região 22q11.2, que geralmente ocorre por eventos de recombinação homóloga não alélica meiótica (NAHR) entre as regiões de repetição de poucas cópias (LCRs, do inglês, *low copy repeats*) presentes na região 22q11.2. As sondas entre as LCR22A e LCR22D buscam identificar a deleção mais frequente, denominada deleção típica de 3Mb. As demais sondas que flanqueiam as LCR22E até a LCR22H, buscam identificar alterações de tamanho atípico na região.

O kit p250 (MRC-Holland) apresenta ainda sondas fora do cromossomo 22, que funcionam como sondas de normalização e controle para as amostras. Além de representarem casos ainda mais raros descritos na literatura que tenham relação com a Síndrome da deleção 22q11.2 e/ou contenham anomalias cardíacas, tais como as sondas na região 4q35-qter, 8p23, 9q34.3, 10p14, 17p13, 22q13.

A técnica de MLPA pode ser aplicada com uso de diversos kits, entre eles kits que avaliam múltiplas síndromes de microdeleção ou microduplicação.

Alguns casos investigados nesse estudo foram avaliados por meio do kit P245 que é composto de 50 sondas que tem como alvo, regiões tipicamente alteradas em diversas síndromes de microdeleção ou microduplicação clinicamente reconhecíveis. Esse kit diagnostica alterações no número de cópias de regiões associadas à outras síndromes que apresentam quadro de cardiopatia congênita, como por exemplo Síndrome da deleção 1p36, *Cri du chat*, Williams, entre outras identificadas no Anexo 2. Alguns pacientes da amostra foram avaliados por meio desses kits de microdeleções/microduplicações, devido à forte suspeita clínica, como por exemplo casos de suspeita clínica de Síndrome de Williams-Beuren, permitindo rápida confirmação.

3.2.4. ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA)

Para pacientes com cariótipo normal e sem alteração identificada por MLPA, foi realizada análise de CMA com objetivo de buscar deleções e amplificações sub-microscópicas no genoma. Foi empregada a análise cromossômica por microarray utilizando a plataforma CytoScanTM 750k (Affymetrix). Essa plataforma possui cerca de 750.000 sondas que permitem uma alta resolução tanto de variações no número de cópias quanto de ausência de heterozigose. A técnica é realizada a partir de um protocolo de quatro dias de trabalho com tempo estimado de processamento detalhado na Figura 26.

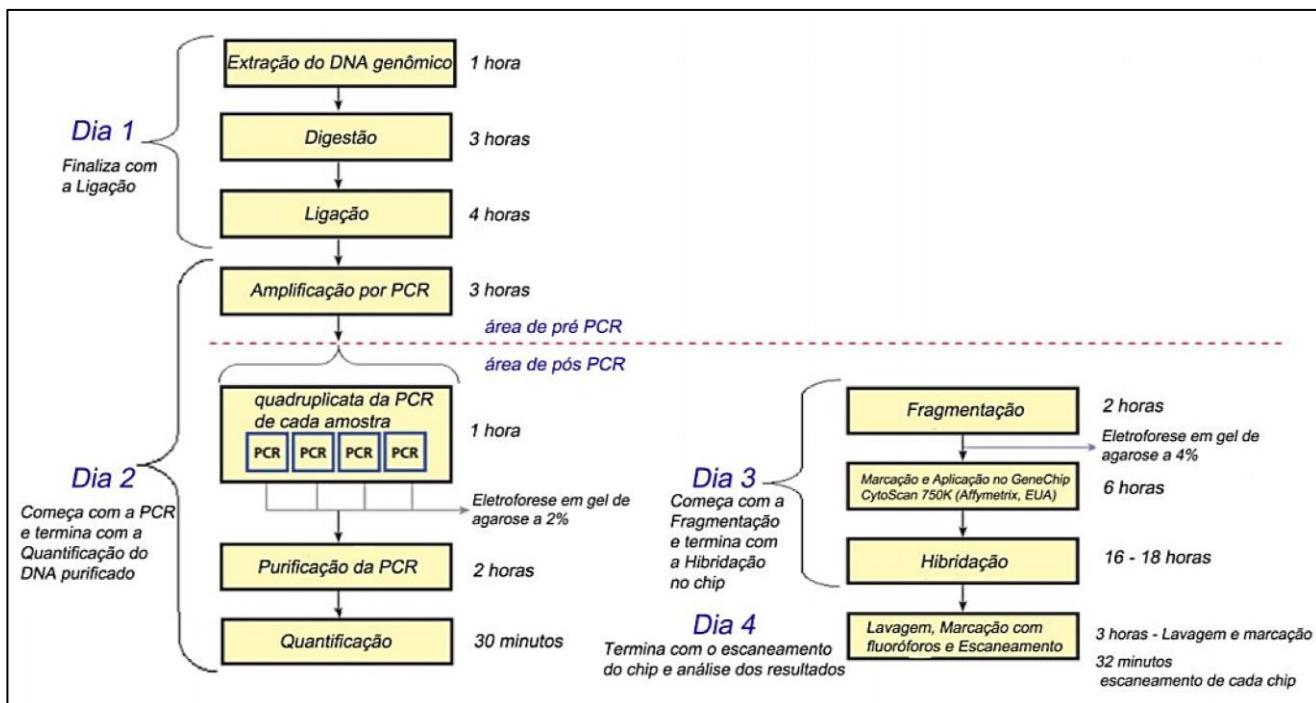


Figura 25. Protocolo de preparo de amostras da Affymetrix® CytoScan® 750k Array. Traduzido dos protocolos Affymetrix® CytoScan® 750k Array.

O DNA extraído das amostras dos pacientes passa por processo de digestão pela enzima Nsp I, conforme protocolo e reagentes disponibilizados pelo fabricante (Affymetrix, EUA), pela homogeneização de 5 µL da amostra de DNA (concentração 50-80 nG/µL), 11,55 µL de água DNase-free, 2 µL de tampão Nsp I (10x), 0,2 0µL de albumina bovina sérica(BSA) (100x) e 1µL da enzima Nsp I (10U/µL), seguida de incubação por 2 horas a 37° C e 20 minutos a 65° C. Aos fragmentos digeridos foram acrescentados 0,75 µL de adaptador Nsp I (50 µm), 2,50 µL de tampão da T4 DNA Ligase (10x) e 2 µL da enzima T4 DNA Ligase (400U/µL), e após homogeneização, incubados por 3 horas a 16° C e 20 minutos a 70° C. Os produtos da ligação foram diluídos em alíquotas de 75 µL e armazenadas a -20° C.

No segundo dia de processamento, ocorre a amplificação por PCR em quadruplicatas de cada amostra para aumentar a quantidade do DNA genômico. A reação foi realizada em termociclador com programação de 1 ciclo de incubação a 94° C por 3 minutos, 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 60° C por 45 segundos e 68° C por 15 segundos e um ciclo de 68° C por 7 minutos. Para a

reação de PCR foram utilizados 39,5 µL de água *DNAse-free*, 10,0 µL de tampão da TITANIUM™ Taq DNA Polimerase (10X), 20 µL de reagente GC-Melt, 14 µL de mistura de dNTP's (2,5mMcada), 4,5 µL do iniciador PCR *Primer 002* (100 µM) (Affymetrix, EUA) e 2 µL da enzima TITANIUMTM Taq DNA Polimerase (50X) (Clontech, EUA). Ao final do primeiro dia de protocolo é realizada eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 1X corado com 5 mG/mL de brometo de etídio. Uma amostra do material amplificado, quando submetido à campo elétrico com voltagem constante de 10 V/cm por uma hora, deve apresentar arraste entre 150-2000 pb, confirmando o sucesso do protocolo aplicado. A captura da imagem de eletroforese foi realizada com sistema *ImageMaster®VDS -Video-documentation System* (PharmaciaBiotech, EUA).

Os produtos de PCR realizadas em quadruplicata foram posteriormente reunidos para obtenção de volume final de 397 µL de amostra. A purificação foi realizada com o uso de esferas magnéticas (Affymetrix, EUA) que contém fragmentos de DNA aderidos à superfície para captura do DNA contido na amostra. Após homogeneização e centrifugação, o DNA adere-se às esferas magnéticas sendo selecionado por força magnética quando incubado na estante com ímãs MagnaRack™ (Life Technologies, EUA). O material passa por lavagem com tampão da purificação (Affymetrix, EUA) para liberação das esferas magnéticas e posteriormente o DNA capturado foi eluído em tampão de eluição (Affymetrix, EUA) para um volume final de 47 µL, com concentração de DNA \geq 3,0 µG/µL quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific, EUA). O material é armazenado à - 20° C até o terceiro dia de processamento.

A etapa de fragmentação do DNA amplificado é realizada com 123,5 µL de água *DNAse-free*, 158,4 µL de tampão de fragmentação 10x (Affymetrix, EUA) e 5,8 µL de reagente de fragmentação (2,5 U/ µL), em termociclador a 37° C por 35 minutos e 95° C por 15 minutos.

A próxima etapa de processamento é a marcação dos fragmentos com biotina. Foram aplicados à alíquota de 51 µL de DNA fragmentado 14,0 µL de tampão *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (5X), 2,0 µL de biotina 30mM e

3,5 µL de enzima TdT (30U/ µL). O material homogeneizado foi incubado em termociclador a 37º C por 4 horas, seguido de ciclo final a 95º C por 15 minutos.

Para a etapa de hibridação, foram utilizados 70,5 µL do DNA marcado com biotina, sendo adicionados os tampões de hibridação parte 1 (165 µL), parte 2 (15 µL), parte 3 (7 µL) e parte 4 (1 µL), além de 2 µL de OCR (*Oligo Control Reagent*, Affymetrix, EUA) e em termociclador a 95º C por 10 minutos sendo mantida posteriormente a 49º C para manutenção da denaturação na amostra. Aplicou-se 200 µL de cada amostra denaturada à a 49º C em cada GeneChip®, que contém oligonucleotídeos de captura arranjados em sua superfície. O GeneChip® passa por incubação de 16 a 18 horas em forno de hibridação (*Hybridization Oven 645*, Affymetrix, EUA) a 50º C, com rotação de 60 rpm.

Após a incubação os GeneChip® foram colocados em estação automatizada (*Fluidics Station 450*, Affymetrix, EUA), controlada pelo Affymetrix GeneChip® Command Console®-AGCC-versão4.1.2 (Affymetrix, EUA). Nessa estação foram realizadas sequências de lavagem com tampões de lavagem A e lavagem B (Affymetrix, EUA) e água *DNAse-free*. Ainda na estação automatizada (*Fluidics Station 450*, Affymetrix, EUA) os GeneChip® receberam aplicação de fluoróforos com lavagens em 500 µL do tampão de marcação 1, 500 µL tampão de marcação do 2 e 800 µL de *holding buffer* (Affymetrix, EUA) para estabilização. Essa etapa permitiu a formação da fluorescência nos GeneChip®, que são escaneados com laser no *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix, EUA), gerenciado pelo programa *Affymetrix GeneChip® Command Console®-AGCC*-versão4.1.2 (Affymetrix, EUA). A imagem dessa leitura pode ser observada com o programa de visualização *Affymetrix GeneChip Viewer* (Affymetrix, EUA).

As fluorescências capturadas são interpretadas e analisadas por meio do software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS) Software (Affymetrix, EUA).

3.2.5. Classificação das alterações de número de cópias

As alterações de número de cópias (CNVs) identificadas foram classificadas segundo descrito pelo *The International Standard Cytogenomic Array* (ISCA) Consortium (82).

A classificação das CNVs como benignas é reforçada quando presentes múltiplos registros no banco de dados *Database of Genomic Variants* (DGV) ou quando se tratar de região com ausência de genes. As CNVs foram classificadas como patogênicas quando localizadas em regiões que incluem a região crítica de síndromes de microdeleção/microduplicação ou se a CNV identificada envolve gene cuja alteração de dosagem causa alteração de fenótipo conhecida, com auxílio do banco de dados *ClinGen Dosage Sensitivity Map*. CNVs que não atenderam esses requisitos foram caracterizadas como variantes de significado incerto (VOUS) até nova caracterização (82). Os critérios utilizados para a classificação estão resumidos na Tabela 5. Para a validação dos achados cada um dos critérios deve ser aprofundado analisando os diversos bancos de dados disponíveis, casos descritos na literatura e especificidades do caso estudado.

Tabela 5. Critérios gerais de investigação da patogenicidade das CNVs.

ACHADOS E CRITÉRIOS OBSERVADOS NA CNV	INDICAM QUE A CNV É PROVAVELMENTE:	
	Patogênico	Benigno
Deleção	X	
Deleção em homozigose	X	
Duplicação		X
Amplificação (ganho de mais de uma cópia)	X	
Rico em genes	X	
Poucos genes		X
Contém genes OMIM mórbidos	X	
Envolve apenas elementos regulatórios		X
Presente em bases de dados de indivíduos saudáveis (por exemplo, DGV)		X
Presente em bases de dados de indivíduos alterados (por exemplo, DECIPHER)	X	
Em região já relacionada a uma síndrome	X	
Presente em parente alterado	X	
Presente em parente saudável		X
Herdado de um genitor saudável		X

Herdado de um dos genitores de forma expandida ou alterada	X
--	---

Adaptado de (82).

A interpretação dos resultados foi analisada em comparação com as plataformas públicas *Database of Genomic Variants* (DGV- <http://projects.tcag.ca/variation>); *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources data-base (DECIPHER)*; *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, <http://www.omim.org>), *ClinVar* (<http://www.clinvar.com/>).

3.2.6. Sequenciamento de Exoma

A análise de exoma foi aplicada para casos selecionados, de pacientes sem alterações patogênicas identificadas nos exames anteriores, e que apresentaram alteração de significado incerto no CMA (VOUS ou perda de heterozigosidade em *locus* de genes importantes para a cardiogênese) e/ou história clínica correlata.

O Sequenciamento de Exoma têm sido utilizado como alternativa moderna de investigação das DCCs, por permitir a identificação de grande número de variantes de sequência no genoma em uma única técnica. Com a aplicação de filtros de análise que permitem selecionar para estudo variantes de sequência em genes já relacionados à DCC, além de SNPs raros ou *de novo*, e genes com consequências funcionais deletérias (65).

A técnica de exoma é realizada utilizando o Sequenciamento de Nova Geração-NGS (do inglês, *next-generation sequencing*) que representa um novo marco nos estudos de genética humana. Diferentemente do sequenciamento de Sanger, muito utilizada desde os anos 70, o NGS permite uma análise mais abrangente realizada repetidas vezes em um mesmo experimento, o que resulta em um aprimoramento em termos de eficiência e de reduções de custo (83).

No sequenciamento de exoma, a técnica de NGS é direcionada somente no estudo dos exons (com uma capacidade de sequenciamento de até 95% dos

éxons). Embora correspondam à apenas ~1% do genoma humano, os exons tem grande importância nos estudos patofisiológicos, tendo em vista que 85% das variantes gênicas conhecidas foram identificadas em exons ou em suas regiões de *splicing* (83).

Nesse estudo o sequenciamento de exoma total foi realizado em empresa especializada (Macrogen InC, Coréia do Sul) em plataforma Illumina®, utilizando o kit *SureSelect Human All Exon V6* da Agilent Technologies para construção da biblioteca de exoma, com fragmentos de tamanho médio de 151 bp.

Para a realização do Sequenciamento de Exoma realiza-se a clivagem direcionada do genoma, seguida pela captura das regiões de interesse por hibridização. Em seguida são adicionados adaptadores aos flancos dos fragmentos selecionados, que facilitam a amplificação dos fragmentos para formação de uma biblioteca de DNA genômico. Os fragmentos selecionados são então sequenciados massivamente em paralelo, ou seja o material genético é sequenciado repetidas vezes (idealmente, de 20 a 80 repetições dependendo do *locus* gênico), formando milhares de *reads* (em tradução direta do inglês, leituras), ou seja de fragmentos de DNA de tamanho conhecido, que serão alinhados e comparados com o genoma padrão (83).

O funcionamento geral da técnica de sequenciamento de nova geração é apresentado com mais detalhes na Figura 27. A biblioteca é preparada por meio da fragmentação do DNA genômico e ligação à adaptadores específicos em ambas as extremidades dos fragmentos (Figura 27- A). Os fragmentos de DNA são fixados por hibridização em uma *flowcell* (chip com superfície para adesão das moléculas). Com a adição de nucleotídeos não marcados, ocorre a ampliação dos fragmentos ligados até que a outra extremidade do fragmento em expansão se ligue a um adaptador livre na *flowcell*, formando uma estrutura em ponte que favorece a amplificação dos fragmentos (conforme imagem de detalhamento, ao centro) (Figura 27- B e detalhe). O processo é repetido em diversos ciclos levando à formação de *clusters* com milhares de cópias do mesmo fragmento (Figura 27-C). São então adicionados nucleotídeos marcados com fluorescência. À medida que os nucleotídeos marcados são integrados à sequência e emitem fluorescência, captada sequencialmente em capturas de

imagens da *flowcell*. As fluorescências captadas nas imagens são convertidas em dados de texto, permitindo identificar a sequência de incorporação dos nucleotídeos (Figura 27- D). As diferentes *reads* formadas com os dados de captura de imagens e convertidas em texto são alinhadas e comparadas ao genoma de referência com uso de *softwares* de bioinformática ou plataformas automatizadas de análise, permitindo a identificação de variantes de sequência (Illumina, Inc, 2020) (Figura 27- E).

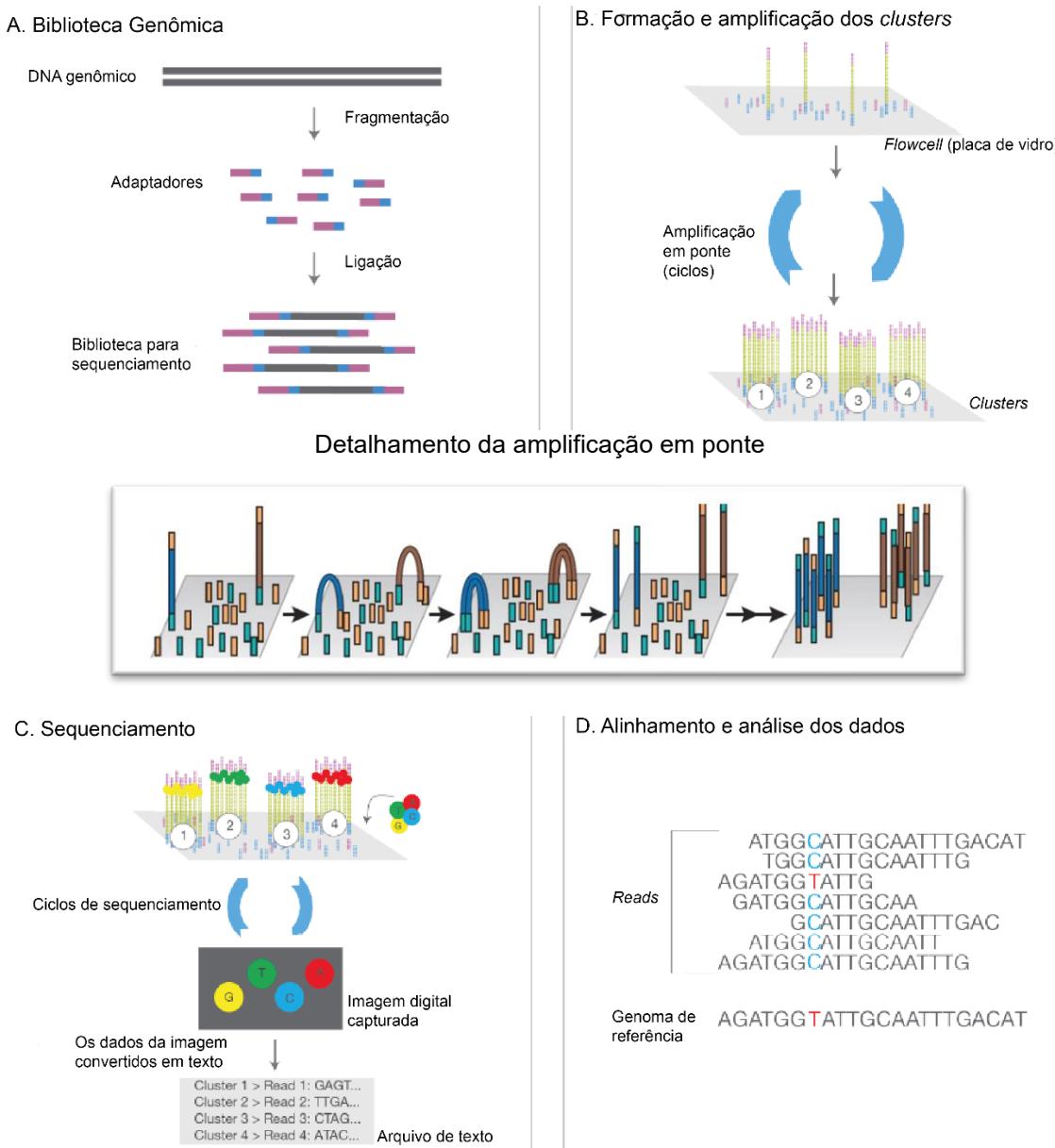


Figura 26. O sequenciamento de nova geração. Traduzido de Illumina, Inc, 2020.

A plataforma Illumina® utilizada realiza sequenciamento do tipo *paired-end*, no qual o sequenciamento é realizado a partir das duas extremidades de fragmentos de DNA com o tamanho entre 200-500bp, seguido pelo alinhamento das sequências nos sentidos *forward* e *reverse*, em pares. Essa técnica de sequenciamento produz o dobro de *reads* utilizando a mesma técnica de sequenciamento, o que permite a leitura das diversas repetições em paralelo, favorecendo a identificação de variantes de sequência. Além disso, o sequenciamento *paired-end* facilita o alinhamento ao genoma de referência,

tendo em vista que a distância entre as *reads* é conhecida, resultando em maior confiabilidade inclusive em regiões difíceis de sequenciar, como em regiões repetitivas do genoma (Danielsson *et al.*, 2014; Illumina®, Inc, 2020).

Após realizado o sequenciamento, a análise das variantes de sequência identificadas foi realizada pelo Laboratório de Genética da UnB, utilizando software comercial (Franklin- Genoox®) e classificadas segundo os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG).

3.2.7. Classificação das alterações identificadas por Exoma

As alterações identificadas no sequenciamento por exoma foram avaliadas e classificadas conforme o grau de patogenicidade seguindo o guia do *American College of Medical Genetics and Genomics* em conjunto com a *Association for Molecular Pathology* (85). A Classificação proposta por Richards e colaboradores leva em consideração os dados populacionais, dados computacionais e preditivos além de dados funcionais e análise de segregação para cada variável. À cada uma dessas variáveis são atribuídos pesos que analisados em conjunto permitem atribuir um grau de patogenicidade à cada variante, de acordo com o nível de evidência que podem ir de muito forte (PVS1), forte (PS1–4), moderada (PM1–6), ou de suporte (PP1–5). As variantes benignas englobam variantes com evidência isolada (BA1), evidência forte (BS1–4) ou de apoio (BP1–6) (85). Os critérios de classificação foram detalhados na Tabela 6.

Tabela 6.Critério de classificação de variantes do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG).

Variantes Patogênicas		
Evidência		Código e descrição da categoria
Muito Forte	PVS1	Variante que compromete a função proteica (em inglês, <i>null variant</i>) em um gene em que a perda de função (LOF, do inglês <i>loss of function</i>) é um mecanismo de doença bem estabelecido. Tipos de variante: sem sentido (<i>nonsense</i>), de mudança de quadro de leitura (<i>frameshift</i>), +/- 1 ou 2 sítios de splicing canônicos, códon de iniciação, deleção de exons
	PS1	Variação de aminoácido iguala a uma variante descrita como patogênica, independente da troca de nucleotídeos
Forte	PS2	Variante <i>de novo</i> em pacientes com a doença e sem história familiar positiva
	PS3	Variante em gene com estudos funcionais com evidência de efeito deletério
	PS4	Variante com maior prevalência em indivíduos afetados em relação aos controles
	PM1	Variante em regiões preferenciais (<i>hot spot</i>) ou domínio proteico importante sem variantes benignas identificadas
Moderada	PM2	Variante ausente ou de frequência extremamente baixa em controles em bancos de dados (p. ex. <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 Genomes</i> ou <i>ExAC</i>)
	PM3	Variante identificada em <i>trans</i> com variante patogênica em doenças recessivas
	PM4	Variante que altera o tamanho da proteína devido a deleções/duplicações <i>in frame</i> em região não-repetitiva ou do tipo <i>stop-loss</i>
Corrobórente	PM5	Variante que leva à troca de aminoácido (<i>missense</i>) em mesma posição de outra variante <i>missense</i> patogênica
	PM6	Variante possivelmente <i>de novo</i> , porém sem confirmação materna e paterna
	PP1	Co-segregação com doença que apresenta gene causador conhecido e que afeta múltiplos membros de uma família. (pode ser considerada

		evidência Moderada ou Forte se há mais dados de segregação disponíveis)
	PP2	Variante <i>missense</i> em gene com baixa taxa de variantes <i>missense</i> benignas ou que tem esse tipo de variante como mecanismo comum de doenças
	PP3	Múltiplas análises computacionais (p. ex. evolutiva, de impacto no <i>splicing</i>) que predizem efeito deletério no gene ou em seu produto
	PP4	Fenótipo do paciente ou história familiar tem forte relação com doença de causa genética única
	PP5	Fontes relevantes recentemente relataram a variante como patogênica
Evidência	Código e descrição da categoria	
Stand- alone	BA1	Frequência alélica menor que 5% nos bancos de dados genômicos (p.ex. <i>Exome Sequencing Project, 1000 Genomes</i> ou <i>ExAC</i>)
	BS1	Frequência alélica nos bancos de dados é maior do que a esperada para a doença
Forte	BS2	Variante observada em adultos hígidos para doença recessiva (homozigoto), dominante (heterozigoto) ou ligada ao X (hemizigoto) com previsão de penetrância completa em idade jovem
	BS3	Variante com estudos funcionais que demonstrem a ausência de efeitos deletérios na função da proteína ou <i>splicing</i>
	BS4	Ausência de co-segregação em membros afetados de uma família
	BP1	Variante <i>missense</i> em gene cuja causa conhecida de doenças são as variantes <i>nonsense</i>
Corroborante	BP2	Variante em <i>trans</i> com variante patogênica para doença com penetrância completa ou em <i>cis</i> com variante patogênica de qualquer forma de herança

BP3	Deleções/duplicações mantendo a fase de leitura (<i>in-frame</i>) em região repetitiva sem função conhecida
BP4	Múltiplas análises computacionais (p. ex. evolutiva, de impacto no <i>splicing</i>) que predizem ausência de efeito deletério no gene ou em seu produto
BP5	Variante identificada em caso com outra base molecular que explica o fenótipo
BP6	Fontes relevantes recentemente relataram a variante como benigna
BP7	Variante sinônima sem indicação de alteração do <i>splicing</i>

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A proposta de uma investigação genética ampla dos paciente com DCC advém de experiência prévia com grupo específico de pacientes que apresentavam DCCs e deficiência intelectual concomitantemente, realizado de 2014 a 2016 também no ambulatório do HUB (57). Naquele estudo, foram investigados 20 pacientes, e após a aplicação das técnicas de diagnóstico (cariótipo, MLPA e CMA), foram identificadas alterações genéticas que permitiram o diagnóstico em 75% dos casos (15 de 20). Ressalta-se que nesse estudo prévio, o enfoque na capacidade diagnóstica por meio das técnicas moleculares levou à não inclusão de pacientes que apresentavam aneuploidias conhecidas e de diagnóstico clínico (portanto, excluindo casos com Síndrome de Down, Turner, Patau, Edwards, Williams).

Os resultados da pesquisa de 2016, indicaram a importância do diagnóstico direcionado das microdeleções mais comuns, como a Síndrome da Deleção 22q11.2 (identificada em 9 pacientes dos 20). Além disso, no projeto de 2016, 5 pacientes permaneceram sem alteração patológica identificada (57). Uma das indicações finais do trabalho foi a ampliação do diagnóstico com inclusão da técnica de exoma. Os resultados desse estudo reduzido motivaram a ampliação da pesquisa com DCCs.

A expectativa de realização de um projeto de pesquisa mais amplo, forjada na observação de grandes projetos descritos na literatura científica foi confrontada com a realidade da pesquisa científica e da saúde pública brasileira. O desenho inicial desse estudo visava ampliar a oferta dos testes genéticos e seguimento de todos os pacientes com malformações cardíacas que passaram pelo ambulatório do HUB de 2014 a 2020. Um total de 235 pacientes apresentavam DCCS após avaliação especializada em genética médica e revisão detalhada dos prontuários de janeiro de 2014 a dezembro de 2020. Desses, 120 pacientes apresentavam os critérios de inclusão para participação no projeto e tiveram a etiologia genética de suas DCCs avaliadas pelo fluxograma de diagnóstico proposto.

A não inclusão de todos os pacientes com DCCs inicialmente selecionados para o estudo se deve a múltiplos fatores como:

- Alta incidência de óbitos nesse grupo de pacientes antes da conclusão do diagnóstico cardiológico e/ou da coleta de material para investigação genética;
- Perda de seguimento do paciente no atendimento médico em genética do HUB, por adesão à outras unidades de atendimento em genética no DF ou por dificuldade de acesso, especialmente para pacientes de outros estados;
- Perda de seguimento no ambulatório de genética por encaminhamento para ambulatório específico, como ocorreu com alguns pacientes com Síndrome de Down, Síndrome de Turner, que não foram incluídos no estudo por terem sido encaminhados antes mesmo da identificação da presença ou ausência de cardiopatia;
- Qualificação inadequada ou ausente da cardiopatia congênita no prontuário;
- Dificuldades no agendamento de retornos e coletas de pacientes em razão da pandemia de COVID-19, com fechamento do ambulatório de genética do HUB no período de março de 2020 a dezembro de 2021;

Um limitador importante do alcance desse estudo tem relação com a estrutura do Ambulatório de Genética do HUB e do Laboratório de Genética da FS/UnB, que bravamente abarcam tanto o lado clínico quanto a pesquisa em genética. Esses setores contam um número reduzido de especialistas que se revezam nos atendimentos ambulatoriais e nas análises citogenéticas. Por priorizar sempre a saúde do paciente, essa estrutura privilegia o atendimento clínico, o que muitas vezes leva ao encaminhamento dos pacientes para outros ambulatórios assim que alcançado o diagnóstico. Essa escolha forçosa dificulta os aspectos menos visíveis da pesquisa científica, como caracterização completa e continuada do fenótipo dos pacientes, limitada pela capacidade de

acompanhamento do Ambulatório. Além disso, o enfoque clínico em uma situação de recursos limitados leva a limitações e direcionamento dos exames diagnósticos para aqueles pacientes que mantêm seguimento ambulatorial. A baixa disponibilidade de recursos para pesquisa científica no Brasil e as dificuldades específicas de importação limitam a capacidade de aquisição de reagentes e consequentemente, impedem a ampla realização de procedimentos diagnósticos de custo mais elevado como CMA e exoma. Essa situação resultou na inviabilidade de inclusão de muitos pacientes com DCCs nesse estudo.

Pontua-se que apesar das dificuldades presentes e da impossibilidade de inclusão de diversos pacientes nesse estudo, a triagem de prontuários realizada no período de 2014 a 2020 revela que há um vasto conjunto de sujeitos e focos de estudos possíveis que compõe um amplo potencial de pesquisa subestimado na área de genética clínica.

Não foram identificados casos isolados de DCC encaminhados ao Ambulatório de genética do HUB durante o período analisado. Essa situação revela uma tendência clínica de baixo encaminhamento de casos isolados de DCC para avaliação pela área de genética médica, que pode se traduzir em subnotificação e diagnóstico tardio de DCC não-sindrômicas. Ressalta-se ainda o impacto do baixo encaminhamento de pacientes com DCC isolada para investigação genética, dificultando o aconselhamento genético, especialmente em casos de ocorrências familiares de DCC isolada.

Dos 120 pacientes avaliados, 68 casos alcançaram resultados causais pelo Cariótipo, 10 por MLPA e oito casos apresentaram CMA com alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas. 34 casos encaminhados para CMA não tiveram alterações causais identificadas que justificassem o fenótipo do paciente, sendo identificadas alterações de significado incerto (VOUS) em onze pacientes, além de cinco casos em que foram identificadas apenas regiões de ausência de heterozigose (AOH). Em um dos pacientes com resultado VOUS no CMA foi identificada variante patogênica no sequenciamento de exoma (asterisco na Figura 28).

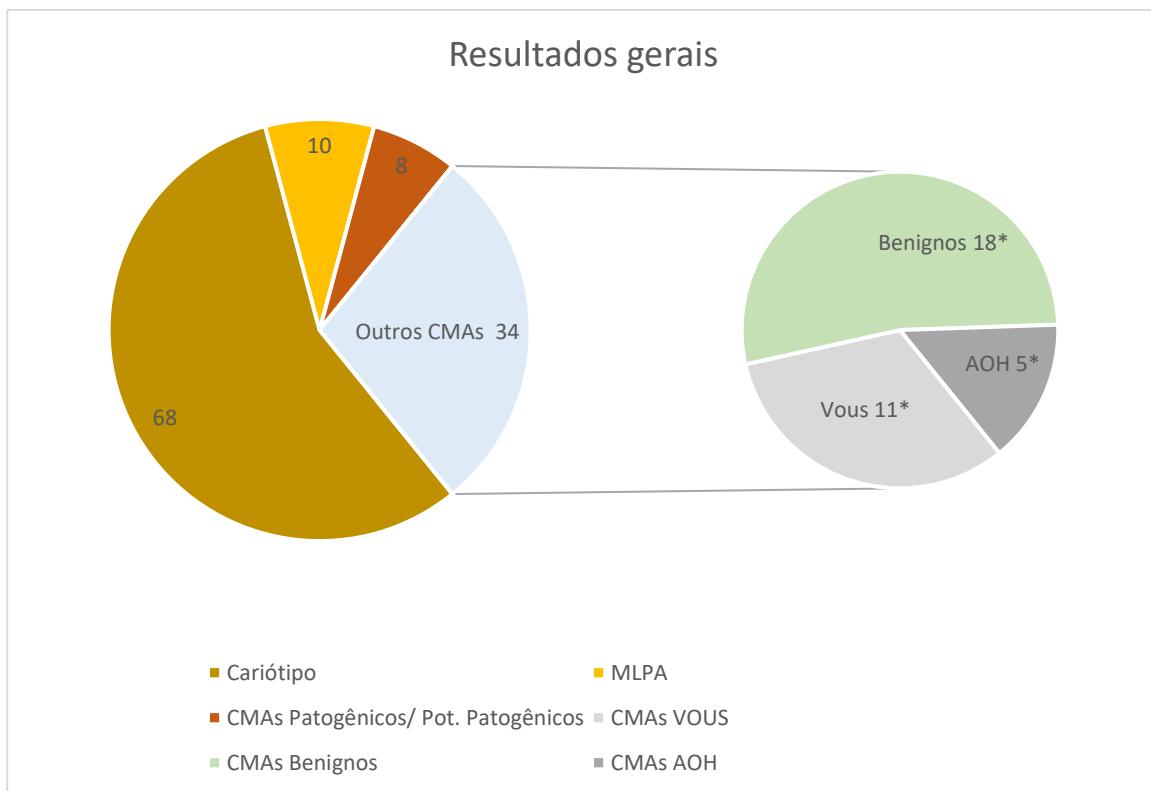


Figura 27. Resultados identificados por meio do fluxograma proposto.

A aplicação do fluxograma de triagem permitiu a identificação de alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas em 71,7% dos pacientes (86 de 120) avaliados até o momento, superando a expectativa de diagnóstico apresentada na literatura (3).

A capacidade diagnóstica alcançada nesse grupo pode estar relacionada à característica dos pacientes componentes do estudo, de apresentarem DCC em ocorrência sindrômica. Essa característica favorece efetividade das técnicas de identificação de CNVs utilizadas no estudo, diante da alta incidência dessas alterações em pacientes sindrômicos (2) (86).

Importante destacar que 65% (78 de 120) dos diagnósticos nesse estudo foram obtidos com uso das técnicas de Cariótipo e MLPA, de menor custo financeiro. Esse resultado confirma a importância do uso clínico dessas técnicas, ainda que estejam disponíveis opções mais modernas porém ainda financeiramente impactantes na realidade brasileira.

Os resultados obtidos nesse estudo foram iniciados por uma investigação clínica detalhada e capaz de orientar o melhor uso das técnicas de diagnóstico disponíveis. Desse modo, o fluxograma de diagnóstico clinicamente guiado utilizado representa um resultado importante que aumenta a capacidade diagnóstica ao mesmo tempo que disciplina o uso dos exames mais caros, fornecendo uma solução mais custo-efetiva.

Outro resultado desse estudo é que a presença de DCCs se revelou um importante indicador clínico da necessidade de encaminhamento do paciente para uma investigação genética ampliada. Esse entendimento é bem estabelecido para algumas síndromes, como no caso da SD22q11.2, em que até 75% dos pacientes são diagnosticados em investigações iniciadas pela presença de DCCs (74). Entretanto, o presente estudo permitiu ampliar esse entendimento para outras doenças, uma vez que possibilitou o diagnóstico genético em relação a outros fenótipos não usualmente associados à DCCs, como no caso P078 em que foi diagnosticada síndrome de WAGR e no caso P081* que identificou Ictiose familiar ligada ao X.

Esse resultado nos permite repensar o uso das ferramentas de diagnóstico genético na realidade brasileira. Em muitos casos o custo dos exames limita o acesso dos pacientes aos exames de CMA e Exoma, que ficam restritos a casos muito graves ou com diagnóstico clínico bem estruturado. Nossos resultados indicam que a aplicação de um grupo mais amplo de métodos diagnósticos para pacientes com DCCs favorece a identificação de diversas etiologias genéticas, inclusive em casos familiares.

Os resultados detalhados serão apresentados de acordo com a exame do fluxograma em que foi feito o diagnóstico genético.

4.1. RESULTADOS ALTERADOS NA INVESTIGAÇÃO POR CARIÓTIPO CONVENCIONAL

Dentre os pacientes com DCC submetidos ao fluxograma de triagem, foi realizada análise de cariótipo em 115 casos do grupo de pacientes, sendo que alguns pacientes foram indicados diretamente para MLPA ou já haviam realizado CMA. Destes, 68 pacientes apresentaram alterações patogênicas identificadas por cariótipo (Tabela 7).

Foram caracterizadas as alterações cromossômicas de 53 pacientes com Síndrome de Down, três com S. Turner, três com S. Patau, dois com S. Edwards, um com S. Williams (confirmada com FISH em laboratório externo), um paciente com Distúrbio da diferenciação sexual (DDS) e cinco pacientes com outros quadros sindrômicos não identificados.

Tabela 7. Resultados gerais dos pacientes diagnosticados por meio de cariótipo.

Paciente	Sexo	DCC	Outros fenótipos	Cariótipo
P001	F	AVSD , PCA	S.DOWN	47, XX,+21 [20]
P002	F	PCA, FOP	S.DOWN	47, XX,+21 [20]
P003	F	VSD	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P004	F	ASD, PCA	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P005	M	EP, FOP	S.DOWN	47,XY, +21 [20]
P006	F	AVSD, FOP	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P007	F	VSD	S.DOWN	47, XX,+21 [20]
P008	M	FOP	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P009	M	AVSD, FOP, PCA	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P010	F	ASD	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P011	M	FOP	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P012	F	ASD, PCA	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P013	M	EP, FOP	S.DOWN	47,XY,+21 [20]
P014	M	TOF	S.DOWN	47,XY,+21 [20]
P015	M	TOF	S.DOWN	47,XY,+21 [20]
P016*	M	ASD	Craniossinostose, ADNPM, Malformação de Chiari I, dismorfias. faciais, hérnia inguinal, polegar trifalângico.	46,XY,der(2)t(2;5)(q37.3;q 33.3) [30]*
P017	F	PCA, FOP	S.DOWN	47, XX,+21 [20]

P018	M	ASD	S.DOWN	47, XY,+21 [20]
P019	F	ASD, VSD	S.DOWN	47, XX,+21 [20]
P020	M	VSD	S.DOWN	47,XY,+21 [20]
P021*	M	AS, BAV	S. WILLIAMS	46,XY, del (7)(q11.23)mat *
P022	F	ASD, VSD, PCA	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P023	F	PCA, FOP	S.DOWN	47, XX,+21 [20]
P024	F	COA	S. TURNER	45,X [50]
P025	F	FOP	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P026	M	VSD	S.DOWN	47, XY,+21 [20]
P027	M	ASD, VSD, PCA	S.DOWN	47, XYqh-,+21 [20]
P028	M	VSD, FOP	S.DOWN	47, XY,+21 [20]
P029	F	AVSD, ASD, VSD, PCA, FOP, EP	S.EDWARDS	47, XX,+18 [20]
P030	M	AVSD	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P031	F	AVSD, ASD	S.DOWN	47, XX,+21 [20]
P032	M	FOP, RVH	S.DOWN	47,XY, +21 [20]
P033	M	ASD	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P034	M	FOP	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P035	M	FOP	S.DOWN	47, XY, +21 [40]; 46, XY [10]
P036	M	ASD	S.DOWN	47, XY,+21 [20]
P037	F	ASD	S.DOWN	47,XX, +21 [20]
P038	M	FOP, EP	DDS	45, XY, t(13,14) [30]
P039	M	PCA	S.DOWN	47,XY,+21 [20]
P040	F	ASD, VSD, PCA	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P041	M	AVSD	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P042	M	FOP, RVH	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P043	F	ASD	S.DOWN	47,XX, +21 [20]
P044	F	ASD	S.DOWN	47, XX, +21 [20]
P045	M	FOP	S.DOWN	47,XY, inv(9)(p12q13),+21 [30]
P046	M	AVSD, PCA, FOP	S.DOWN	47, XY,+21 [20]
P047	F	TOF	S.DOWN	47, XX,+21 [20]
P048	F	AVSD	S. PATAU	47, XX, +13 [20]
P049	M	VSD	S.DOWN	47,XY,+21 [20]
P050	F	ASD	S.DOWN	47, XX, +21[20]
P051	M	FOP	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P052	F	ASD	S.DOWN	47, XX, +21 [20]
P053	F	VSD	S. PATAU	47, XX, +13 [20]
P054	F	COA	S.TURNER	45,X [50]
P055	F	CoA, FOP, PCA	S.DOWN	47,XX,+21 [20]
P056	M	AVSD, FOP	S.DOWN	46,XY,+21,der(21;21)(q10 ;q10) [30]
P057	F	EP, FOP	S. PATAU	47, XX, +13 [20]
P058	M	FOP	S.DOWN	47,XY, +21[40]/46,XY [10]
P059**	M	FOP	Dismorfias faciais	47, XY,+mar [30]**

P060	M	PCA	DI severa, baixa estatura, microcefalia	47, XY, +der(9) t(2;9)(p25;q13)mat
P061**	F	ASD	Baixa estatura, hemangioma hepático	46,XX,inv(3)(p24.2;p14.1) pat
P062**	F	ASD	Úvula bífida, palato ogival, pescoço curto	46,XX add(3)p22 [Cariótipo Externo]**
P063**	F	VSD, PCA	S.EDWARDS	47, XX,+18 [20]
P064	M	AVSD	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P065	F	ASD, LSVC, PCA	S.DOWN	47, XX, +21 [20]
P066	M	FOP	S.DOWN	47, XY, +21 [20]
P067	F	FOP, IVT	S.TURNER	45,X [50]
P068	M	AVSD, EP	S.DOWN	47, XY, +21 [20]

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; AVSD: Defeito de septação atrioventricular completo; VSD: Defeito de septação ventricular; PCA: Persistência de canal arterioso; FOP: Forame oval patente; LSVC: Persistência da persistência da veia cava superior esquerda; IVT: Insuficiência de valva tricúspide; EP: Estenose de ramos pulmonares; CoA: Coactação de aorta; RVH: Hipertrofia de ventrículo direito; AS: Estenose de Aorta; BAV: Valva aórtica bicúspide; TOF: Tetralogia de Fallot; DDS: Distúrbio da diferenciação sexual

Os casos identificados na Tabela 7 com um asterisco indicam que a alteração identificada em cariótipo convencional (cromossomo marcador) foi confirmada com a técnica de FISH em laboratório privado. Os casos identificados na Tabela 7 com dois asteriscos indicam que a alteração foi detalhada com por CMA, na seção 5.3. No caso 10984, o CMA não identificou alterações causais (apenas alterações benignas) indicando que a inversão identificada ao cariótipo, ocorreu sem a formação de CNVs adjacentes.

Os fenótipos extra cardíacos apresentados pelos pacientes com síndromes identificadas correspondem ao espectro esperado para a síndrome e, portanto, não serão detalhados individualmente. Dentre os pacientes diagnosticados por meio do cariótipo, as DCCs mais frequentes são do grupo de defeitos de septação (Figura 29).

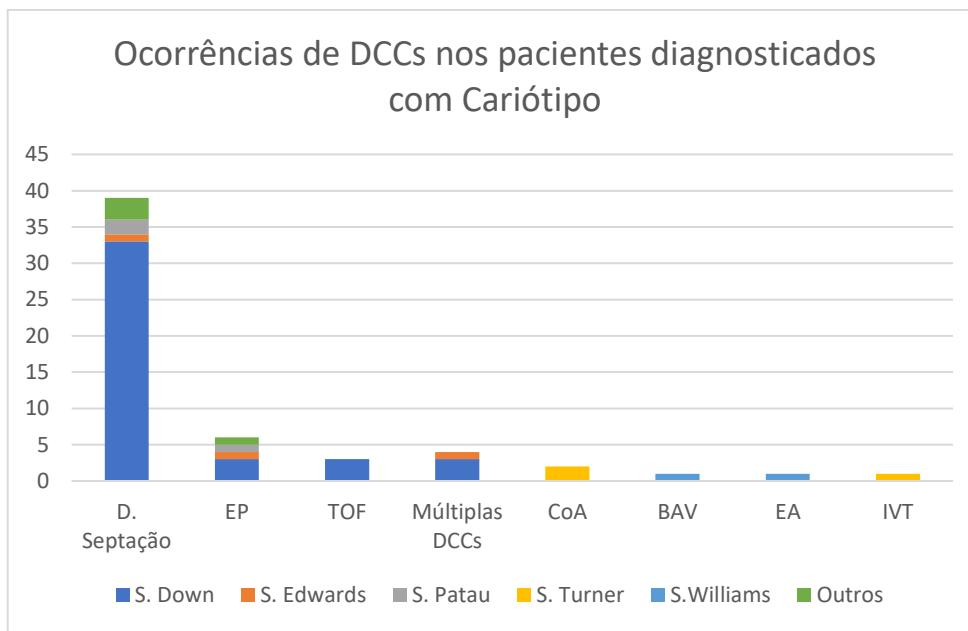


Figura 28.DCCs identificadas nos pacientes diagnosticados por cariótipo.

Observa-se a alta frequência de defeitos de septação nas síndromes diagnosticadas ao cariótipo e os casos de Síndrome de Turner com maior incidência de CoA, conforme prevalência descrita na literatura para essas síndromes (77). Um dos pacientes com S. Edwards apresentava múltiplos defeitos de septação além de EP, também corroborando a alta complexidade das cardiopatias identificadas em pacientes com a síndrome (77).

4.2. RESULTADOS ALTERADOS NA INVESTIGAÇÃO POR MLPA

A técnica de MLPA permite um diagnóstico genético rápido e preciso, mas que precisa estar direcionado por forte suspeita clínica. Portanto, o MLPA foi realizado nos casos de pacientes com fenótipos sugestivos de Síndrome da deleção 22q11.2 (SD22q11.2) ou Síndrome de Williams. A técnica de MLPA foi aplicada em 43 pacientes conforme indicação clínica. Muitos desses casos revelaram resolução espontânea de cardiopatias neonatais e/ou foram encaminhados para outros serviços ambulatoriais. A perda de segmento impediu recoletas de amostra e confirmações de fenótipo que impediram a inclusão no

estudo. Ainda assim, por meio do MLPA foram identificadas alterações em 10 pacientes incluídos no estudo sendo diagnosticados 4 pacientes com Síndrome de Williams-Beuren (o tamanho das alterações identificadas não foi dimensionado tendo em vista que o kit utilizado P245 possui somente 2 sondas na região) e 6 pacientes com SD22q11.2 de diferentes tamanhos (Tabela 8).

Nesse estudo, a técnica de MLPA contribuiu com baixo número de diagnósticos em comparação com as outras técnicas utilizadas. Cabe a comparação com estudo anterior desse Laboratório de Genética-UnB, em que as mesmas técnicas de diagnóstico, porém em grupo que apresentava concomitantemente DI e DCCs. No estudo de 2016, o MLPA foi a técnica mais eficiente e possibilitou o diagnóstico de 45% dos pacientes em casos de pacientes com DCCs e DI (57). Desse modo, ressalta-se que, em grupos com pacientes e fenótipos mais heterogêneos, o uso eficiente do MLPA requer uma indicação clinicamente orientada.

Cabe destacar que dos pacientes que não realizaram MLPA antes do CMA, houve somente um caso em que foi identificada alteração na região 22q11.2 por CMA (Paciente P086).

Tabela 8. Casos com diagnóstico por MLPA.

Paciente	Sexo	DCC	Cariótipo	MLPA	Classificação da alteração
P069	M	LVNC	46,XY [20]	Deleção 7q11.23	Patogênica
P070	F	ASD, VSD, PCA, IVM	46,XX [20]	Deleção 22q11.2-3Mb	Patogênica
P071	M	TAPVC	-	Deleção 22q11.2- TBX1 (EXON2) Herdada da mãe (Laboratório externo)	Patogênica
P072	M	EP, FOP	46,XY [20]	Deleção 7q11.23	Patogênica
P073	M	EV, CoA, AVSD	46,XY [20]	Deleção 22q11.2- 3Mb	Patogênica
P074	F	EP, FOP	46,XX [20]	Deleção 7q11.23	Patogênica

P075	F	EP	46,XX [20]	Deleção 7q11.23	Patogênica
P076	M	FOP	46,XY [20]	Deleção 22q11.2- 3Mb- <i>de novo</i>	Patogênica
P077	M	IAA, VSD, PCA	-	Deleção 22q11.2- 3Mb	Patogênica
P078	M	TOF, PA	-	Deleção 22q11.2- de ~1,5Mb	Patogênica

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; AVSD: Defeito de septação atrioventricular completo; VSD: Defeito de septação ventricular; PCA: Persistência de canal arterioso; FOP: Forame oval patente; LSVC: Persistência da persistência da veia cava superior esquerda; IVT: Insuficiência de valva tricúspide; EP: Estenose de ramos pulmonares; CoA: Coactação de aorta; RVH: Hipertrofia de ventrículo direito; AS: Estenose de Aorta; BAV: Valva aórtica bicúspide; TOF: Tetralogia de Fallot; LVNC: Ventrículo esquerdo não compactado.

A Figura 6 apresenta a forma como o resultado do MLPA é visualizado no software *Coffalyser* (MRC-Holland), mostrando a deleção típica de 3Mb da SD22q11.2, identificada nos pacientes P070, P073, P076, P077, 11201 (Figura 30). A região destacada em azul contém as sondas alvo do cromossomo 22, relacionadas à Síndrome 22q11.2, principal foco do kit P250 (MRC-Holland). Na parte superior da imagem consta a identificação de cada uma das sondas do kit, e o tamanho da sonda. Na parte de baixo da imagem, as sondas estão identificadas por posição genômica, identificando o cromossomo e posição de início da sonda. Cada sonda é representada na imagem por círculos. O círculo que representa cada sonda será posicionado com relação ao Ratio (barra lateral esquerda) que mensura a quantidade relativa de cada sonda comparada. Quando presentes em quantidade normal (Ratio~1) em relação aos controles, a sonda é representada em preto, entre as linhas azul e vermelha. Quando em quantidade menor que nos controles, a sonda é representada como círculo vermelho, abaixo da linha vermelha, representando deleção em hemizigose (Ratio~0,5) ou representando deleção em homozigose (Ratio ~0). O resultado de cada paciente é comparado com todas as amostras e controles da corrida: O

retângulo em volta de cada círculo, representa o intervalo de confiança (95%) calculado para aquela sonda em relação à variação da quantificação das amostras e controles de toda a corrida. Na Figura 30, a amostra apresenta deleção em hemizigose (Ratio ~0,5) de diversas sondas contíguas na região 22q11.2.

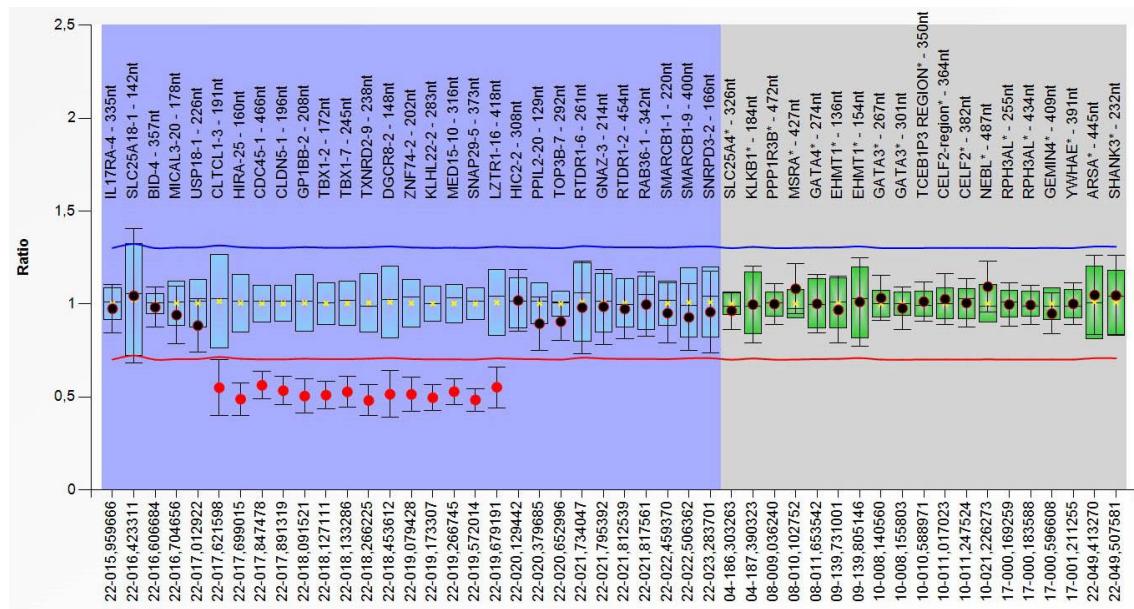


Figura 29. Deleção da região típica de 3Mb na região 22q11.2 na amostra do paciente P077.

Outros pacientes (P071 e P078) apresentaram deleções atípicas na região crítica da SD22q11.2 (Figura 31).

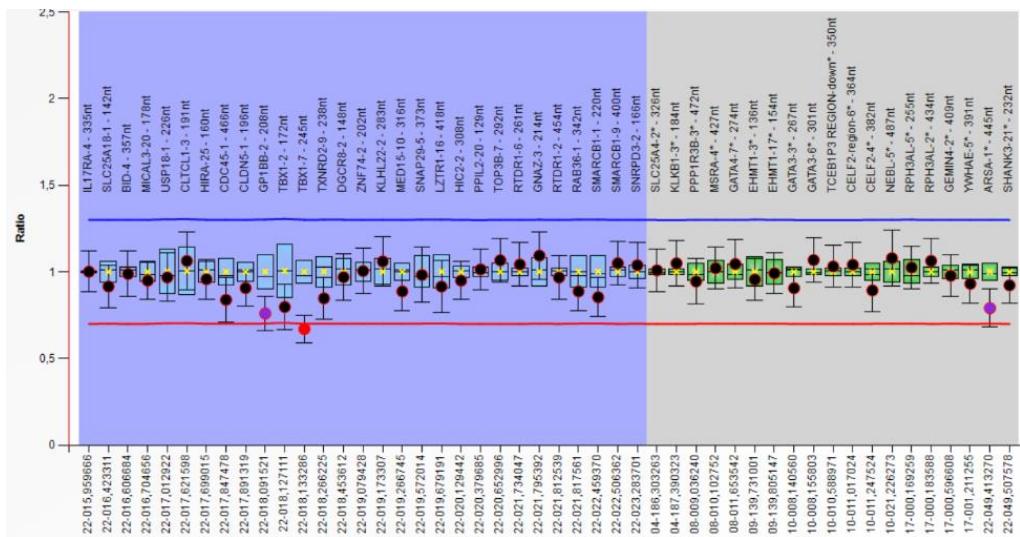


Figura 30. Deleção em 22q11.2 de ~1,5Mb identificada no paciente P078.

Os quadros clínicos dos pacientes em que foi identificada a deleção corroboram a diversidade fenotípica característica da SD22q11.2. Constam na literatura mais de 180 achados clínicos relacionados com a síndrome, entretanto nenhum dos sinais e sintomas está presente de forma obrigatória em todos os casos descritos. Apesar de não haver um sinal obrigatório da síndrome, foi possível identificar nos pacientes investigados dismorfias frequentemente relatadas para os portadores da SD22q11.2, diversas alterações cardíacas conotruncrais, além de algumas alterações menos recorrentes. Os principais fenótipos cardiológicos estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Fenótipos cardiológicos identificados nos pacientes com alterações identificadas por MLPA.

	S.Williams					SD22q11.2				
Fenótipos identificados	P069	P072	P074	P075	P070	P071	P073	P076	P077	P078
IAA										+
CoA										
Estenose de valva aórtica-EV-A								+		
EP			+	+	+					

PCA					+				+	
FOP		+	+					+		
AVSD							+			
ASD					+					
VSD					+				+	
IVM					+					
PA										+
LVNC	+									
TAPVC						+				
TOF										+

4.3. RESULTADOS DA ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA).

A técnica de CMA foi realizada em 42 pacientes nos quais não foram identificadas alterações patogênicas nos exames de cariótipo e/ou de análise por MLPA. A análise das principais ocorrências de DCCs no grupo de pacientes encaminhado para CMA foi resumida na Figura 32.

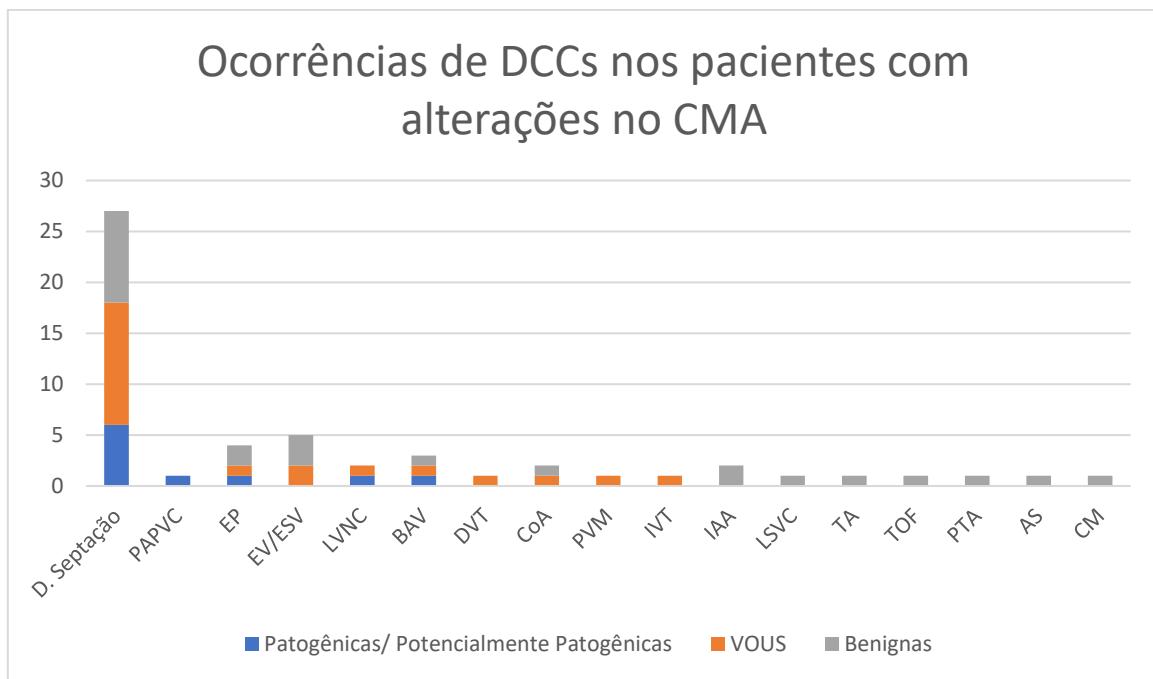


Figura 31. DCCs identificadas nos pacientes diagnosticados por CMA.

Observa-se alta frequência de defeitos de septação, conforme prevalência da literatura para DCCs (77). Conforme detalhado na introdução (Item 1.3), o processo de septação cardíaca envolve uma sequência de processos (elongação do tubo cardíaco primário, looping, diferenciação direita-esquerda) e diferentes linhagens celulares (SHF, diferenciação EMT, migração de NCCs). Em diferentes momentos da embriogênese, cada uma das vias metabólicas citadas contribui para a septação cardíaca: Via Wnt (PCP), Notch (formação de coxins e valvas), Tgf β (Transição EMT), BMP (septação do OFT), Nodal (diferenciação direita-esquerda), Shh (migração NCCs) e Vegf (migração NCCs); além de outras vias não detalhadas nesse estudo (Briggs *et al.*, 2012 e referências citadas no item 1.3). Com tamanha complexidade de formação, desde o início da cardiogênese até a maturação cardíaca, a septação cardíaca é provavelmente impactada por alterações incidentes em quaisquer dessas vias. Esse entendimento pode justificar a elevada representação epidemiológica dos defeitos de septação com diferentes etiologias genéticas.

Chama a atenção o grupo de 18 casos em que foram encontradas CNVs benignas ou não causais (Tabela 13). Nesse grupo destacado em cinza na Figura 32, observa-se a ocorrência de DCCs complexas como interrupção do arco

aórtico (IAA), persistência do canal arterial (PTA) e tetralogia de Fallot (TOF) que são associadas na literatura a diferentes variantes de sequência em genes de fatores de transcrição (Tabela 3) (55,70). Esse resultado do CMA não exclui uma etiologia genética causadora da DCC, e idealmente, tais pacientes podem se beneficiar de outros exames diagnósticos, sendo sugerida a realização de sequenciamento de exoma para ampliar a capacidade diagnóstica de pacientes com DCCs.

4.3.1. ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS POR CMA.

Em oito pacientes foram identificadas CNVs provavelmente patogênicas ou patogênicas (Tabela 10). O caso P081*, marcado com asterisco indica que foi realizado sequenciamento de exoma posterior.

Tabela 10. Alterações patogênicas e possivelmente patogênicas identificadas por CMA.

Paciente	Sexo	DCC	Cariótipo	MLPA	CMA	Classificação da alteração
P079	M	FOP	47, XY,+mar [30]	-	arr[hg19] 15q11.2q13.3(22,770, 421-32,439,281)x4 de 9,67 Mb	Patogênica
P078	F	EP, FOP	46,XX [20]	-	arr[hg19] 11p14.3p13(24,315,24 4-34,478,570)x1 de 10Mb Deleção na região Xp22.31: arr[hg19] Xp22.31(6,455,151- 8,135,568)x0 mat de 1,68 Mb	Patogênica
P081*	M	ASD, VSD, FOP, PCA	-	Normal	arr[hg19] Xp22.31(6,455,151- 8,135,568)x0 mat de 1,68 Mb arr[hg19] 3p25.2(12,639,852- 12,811,743)x3 pat de 170 Kb	Patogênica Provavelmente Patogênica
P082	M	LVNC, FOP, BAV	47,XY, +mar[20]/ 46, XY[30]	-	arr[hg19] 14q31.3q32.33(89,328 ,117-107,284,437)x3 de 17,95Mb	Patogênica

					arr[hg19] 10q26.2q26.3(129,480 ,529-135,426,386)x1 de 5,94Mb	Patogênica
P083	M	ASD	46,XY [20]	Normal	Deleção na região 2q37.3 arr[hg19] 2q37.3(240,526,165- 242,782,258)x1 de 2,25 Mb	Patogênica
P084	M	ASD, PCA	46,XY [20]	Normal	Deleção na região arr[hg19] 1q43q44(238,561,769- 249,224,684)x1 de 10,7 Mb	Patogênica
P085	F	ASD	46,XX der(3)add(3)p22 [Externo]	-	arr[hg19] 7q31.31q36.3(118,213 ,867-159,119,707)x3 de 40,90 Mb	Patogênica
P086	M	ASD	46,XY [20]	-	arr[hg19] 3p26.3p26.1(61,891- 5,965,980)x1 de 5,90 Mb	Patogênica
					Deleção na região arr[hg19] 22q11.21(19,754,878- 19,766,917)x1 de 12 Kb	Patogênica

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; VSD: Defeito de septação ventricular; PCA: Persistência de canal arterioso; FOP: Forame oval patente; EP: Estenose de ramos pulmonares;; BAV: Valva aórtica bicúspide; LVNC: Ventrículo esquerdo não compactado; PAPVC: Drenagem anômala parcial de veias pulmonares.

Tendo em vista a individualidade dos fenótipos e dos resultados obtidos, as alterações de cada paciente serão detalhadas na seção 6.1.

4.3.2. ALTERAÇÕES DE SIGNIFICADO INCERTO (VOUS) IDENTIFICADAS POR CMA

Em onze casos foram identificadas CNVs classificadas como VOUS (Tabela 11). Os casos marcados com asterisco indicam que foi realizado sequenciamento de exoma posterior.

Tabela 11. Alterações de significado incerto (VOUS) identificadas por CMA.

Paciente	Sexo	DCC	Cariótipo	MLPA	CMA	Classificação da alteração
P087*	M	ASD	46,XY [20]	Normal	arr[hg19] 1p31.3(61,704,029- 62,125,291)x3 de 421 Kb, mat	VOUS
P088	F	ASD, EV	46,XX,[20]	Normal	arr[hg19] 2p16.3(50,539,818- 50,615,382)x1 de 76 Kb	VOUS
P089	F	ASD, VSD	-	Normal	arr[hg19] 3p25.2(12,639,852- 12,839,971)x3 de 200 Kb	VOUS
P090	F	ASD, PAPV C, FOP	46,XX [30]	Normal	Duplicação na região Xp11.22 arr[hg19] (53,579,302- 53,676,961)x3 de 98 Kb	VOUS
P091	F	ASD	46,XX [20]	-	arr[hg19] 6q25.1 (150,132,598- 150,501,558)x3- 369kb (Laboratório Externo)	VOUS
P092	M	CoA, VSD;	46,XY [30]	Normal	arr[hg19] 16q23.1(77,400,820- 77,649,890)x1 de 240 Kb	VOUS
P093*	F	ASD, FOP	46,XX [30]	Normal	arr[hg19] 2q13(110,876,775- 110,980,295)x1 de 105,9 Kb	VOUS
P094	M	BAV	46, XY, 19qh-[20]	Normal	arr[hg19] 22q11.22q11.23(22,99 7,928-23,650,871)x1 de 652 Kb, mat	VOUS
P095	F	EP	46,XX [30]	Normal	arr[hg19] 2q13(110,504,318- 111,369,264)x3 de 865 Kb	VOUS
P096	F	ASD, VSD	46,XX [30]	Normal	arr[hg19] Xq13.3(74,193,804- 74,447,411)x1 de 254 Kb	VOUS

P097*	M	LVNC, MVP, IVT	46,XY [20]	-	arr[hg19] 13q12.129(23,996,606 -24,936,796)x1 de 940 Kb	VOUS
-------	---	----------------------	------------	---	--	------

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; VSD: Defeito de septação ventricular; PCA: Persistência de canal arterioso; FOP: Forame oval patente; LSVC: Persistência da persistência da veia cava superior esquerda; IVT: Insuficiência de valva tricúspide; EP: Estenose de ramos pulmonares; CoA: Coactação de aorta; RVH: Hipertrofia de ventrículo direito; AS: Estenose de Aorta; BAV: Valva aórtica bicúspide; TOF: Tetralogia de Fallot; LVNC: Ventrículo esquerdo não compactado;; PAPVC: Drenagem anômala parcial de veias pulmonares; MVP: Prolapso de valva mitral; EV: Estenose valvar; TVD: Displasia de valva tricúspide;

Tendo em vista a individualidade dos fenótipos e dos resultados obtidos, as alterações de cada paciente serão detalhadas na seção 6.2.

4.3.1. ALTERAÇÕES DE ZIGOSIDADE IDENTIFICADAS POR CMA

Em cinco casos foram identificadas apenas regiões de ausência de heterozigose (AOH) (Tabela 12). Os casos marcados com asterisco indicam que foi realizado sequenciamento de exoma posterior.

A ocorrência de grandes regiões de homozigose por todo o genoma aumenta a probabilidade de ocorrência de doenças recessivas, compondo quadro possivelmente patogênico. Em âmbito clínico, esse diagnóstico é suficiente para acompanhamento do paciente, sendo sugerida a ampliação do diagnóstico por sequenciamento quando há suspeita de doenças recessivas de manifestação tardia (Sund e Rehder, 2014).

Tabela 12. Casos com AOH identificadas por CMA.

Paciente	Sexo	DCC	Cariótipo	MLPA	CMA	% AOH no genoma autossômico
P098*	M	ASD	46,XY [20]	Normal	AOH de arr[hg19] 10q25.1q26.11(108,86 4,732-120,122,033) hmz de 11,2 Mb arr[hg19] 2q14.2q22.1(122,031, 367-137,963,150) hmz de 15,9 Mb	0,61%
P099	M	FOP, VSD, ASD, EV, TVD	46,XY [20]	Normal	arr[hg19] 14q21.1q22.2(43,163, 203-55,164,526) hmz de 12 Mb arr[hg19] 2q11.2q12.3(101,595, 234-109,556,365) hmz de 7,96 Mb	1,56%
P100*	M	FOP, VSD	46,XY [20]	-	arr[hg19] 11p11.2p11.12(44,081, 149-51,550,787) hmz de 7,47 Mb	0,72%
P101	F	ASD, FOP	46, XX [20]	-	arr[hg19] 11q11q13.3(54,827,20 7-68,729,545) hmz de 13,9 Mb arr[hg19] 7p15.3p14.1(25,363,6 32-37,576,674) hmz de 12,21 Mb	0,44%
P102*	F	ASD	46,XX [20]	-	arr[hg19] 22q11.22q13.32(22,57 9,821-49,380,710) hmz de 26,80 Mb	0,96%

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; VSD: Defeito de septação ventricular;

PCA: Persistência de canal arterioso; FOP: Forame oval patente; LSVC: Persistência

da persistência da veia cava superior esquerda; IVT: Insuficiência de valva tricúspide; EP:

Estenose de ramos pulmonares; CoA: Coactação de aorta; RVH: Hipertrofia de ventrículo

direito; AS: Estenose de Aorta; BAV: Valva aórtica bicúspide; TOF: Tetralogia de Fallot;

LVNC: Ventrículo esquerdo não compactado;; PAPVC: Drenagem anômala parcial de

veias pulmonares; MVP: Prolapso de valva mitral; EV: Estenose valvar; TVD: Displasia

de valva tricúspide;

4.3.2. ALTERAÇÕES BENIGNAS IDENTIFICADAS POR CMA

Em 18 casos não foram identificadas CNVs ou AOH (ausência de heterozigose) causais ou VOUS. Todas as alterações identificadas correspondem a polimorfismos comuns na população, ou CNVs reportadas em indivíduos hígidos do banco de dados DGV, sendo classificadas como benignas (Tabela 13).

Tabela 13. Casos com alterações benignas identificadas por CMA.

Paciente	Sexo	DCC	Cariótipo	MLPA	CMA	Classificação da alteração
P103	M	IAA	46, XY, 19qh-	-	Normal	Benigna
P104	M	CoA	46,XY [20]	Normal	Normal	Benigna
P105	F	ASD	46,XX [30]	Normal	Normal	Benigna
P106	M	ASD, FOP, EP	46, XY, 15ps+[30]	Normal	Normal	Benigna
P107*	M	FOP, PCA, LSVC, BAV	46,XY [20]	Normal	Normal	Benigna
P108*	F	TA, VSD, FOP, PCA IAA	46,XX [30]	Normal	Normal	Benigna
P109	F	ASD	46,XX [30]	Normal	Normal	Benigna
P110	M	EV, ESV	46,XY [20]	Normal	Normal	Benigna
P111	F	PCA	46,XX [20]	Normal	Normal	Benigna
P112	M	ASD, EV	46,XY [20]	Normal	Normal	Benigna
P113	M	EV	46, XY[20]	Normal	Normal	Benigna
P114	F	ASD	46,XX [30]	Normal	Normal	Benigna
P115	M	VSD, FOP	46,XY [20]	Normal	Normal	Benigna
P116	F	ASD	46,XX [30]	Normal	Normal	Benigna
P117	M	TOF, EP, PCA	46,XY [20]	Normal	Normal	Benigna

P118	M	ASD, VSD, PCA	46,XY[30]	-	Normal	Benigna
P119	F	PTA	46,XX [20]	Normal	Normal	Benigna
P120	F	AS e CM	46,XX [20]	Normal	Normal	Benigna

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; VSD: Defeito de septação ventricular; PCA: Persistência de canal arterioso; FOP: Forame oval patente; LSVC: Persistência da persistência da veia cava superior esquerda; IVT: Insuficiênciam de valva tricúspide; EP: Estenose de ramos pulmonares; CoA: Coactação de aorta; RVH: Hipertrofia de ventrículo direito; AS: Estenose de Aorta; BAV: Valva aórtica bicúspide; TOF: Tetralogia de Fallot; LVNC: Ventrículo esquerdo não compactado;; PAPVC: Drenagem anômala parcial de veias pulmonares; MVP: Prolapso de valva mitral; EV: Estenose valvar; ESV: estenose supravalvar; TVD: Displasia de valva tricúspide; CM: Cardiomegalia; PTA: tronco arterioso persistente; TA: Atresia de tricúspide;

Os casos marcados com asterisco indicam que foi realizado sequenciamento de exoma posterior, e esses casos (P107* e P108*), seus fenótipos e os resultados obtidos estão detalhados na seção 6.3.

4.4. RESULTADOS DA ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE EXOMA.

Durante a realização do projeto tivemos a oportunidade de encaminhar alguns casos para realização de sequenciamento de exoma. Tendo em vista o suporte financeiro restrito para esse tipo de análise, esses casos foram selecionados na tentativa de identificar variantes de sequência capazes de elucidar o fenótipo cardíaco e/ou fenótipos extra cardíacos dos pacientes, investigados em outros projetos do Laboratório de Genética da UnB.

Foram realizados nove sequenciamentos de exoma em pacientes com DCCs, sendo seis casos com alterações de significado incerto no CMA (P098*, P087*, P100*, P102*, P093*, P097*); dois casos com alterações benignas nos exames realizados (P107* e P108*); e um caso com alteração patogênica identificada no CMA (P081*) que foi encaminhado também para exoma, visando melhor caracterização (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados dos casos selecionados para sequenciamento de exoma.

Pac.	DCC	Variante	Efeito na Proteína	Zigosidade	Classificação ACMG
P098*	ASD	-	-	-	Normal
P087*	ASD	-	-	-	Normal
P100*	FOP, VSD	-	-	-	Normal
P081*	ASD, VSD, FOP, PCA	-	-	-	Normal
P107*	FOP, PCA, L SVC, BAV	Chr9-NOTCH1: c.4684G>A, pat	p.Ala1562Thr	Het	VUS PM2/PP2
P108*	TA, VSD, FOP PCA, IAA	-	-	-	Normal
P102*	ASD	-	-	-	
P093*	ASD, FOP	Chr6-FOXC1: c.213_214insT	p.Gln72fs	Het	Possivelmente patogênica PVS1/PM2
P097*	LVNC, MVP, IVT	-	-	-	-

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; VSD: Defeito de septação ventricular; PCA: Persistência de canal arterioso; FOP: Forame oval patente; L SVC: Persistência da persistência da veia cava superior esquerda;; BAV: Valva aórtica bicúspide; LVNC: Ventrículo esquerdo não compactado; MVP: Prolapso de valva mitral; IVT: Insuficiência de valva tricúspide

Tendo em vista a individualidade dos fenótipos e dos resultados obtidos, as alterações de cada paciente serão detalhadas na seção 6, sendo destacados com asterisco cada caso listado acima, e detalhados os resultados do sequenciamento de exoma dos pacientes.

5. DETALHAMENTO CLÍNICO DOS CASOS

5.1. CASOS COM ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS POR CMA.

Paciente P079

Paciente do sexo masculino encaminhado por quadro de epilepsia com 1 ano e 2 meses. Ao longo do acompanhamento ambulatorial foi identificado quadro de ADNPM, TEA, além de dismorfias como macrostomia, orelhas proeminentes, fendas palpebrais oblíquas para baixo, hipertelorismo ocular. Investigação cardiológica identificou FOP sem resolução espontânea.

Na análise do cariótipo foi identificada presença de um cromossomo extranumerário não identificável, 47, XY,+mar [30]. Com a realização do CMA, identificou-se no cromossomo 15 um segmento triplicado (22,770,421-30,374,368)x4 seguido de um segmento duplicado (31,073,668-32,439,281)x3, compondo uma alteração de 9,67Mb abaixo do centrômero do cromossomo 15 (Figura 33).

Desse modo é possível inferir que o cromossomo marcador visível ao cariótipo é composto por porções do cromossomo 15, embora não seja possível, por meio das técnicas empregadas, identificar o posicionamento dos seguimentos identificados no marcador formado. A alteração identificada é patogênica e *de novo*, não tendo sido identificada alteração no cariótipo dos pais do probando.

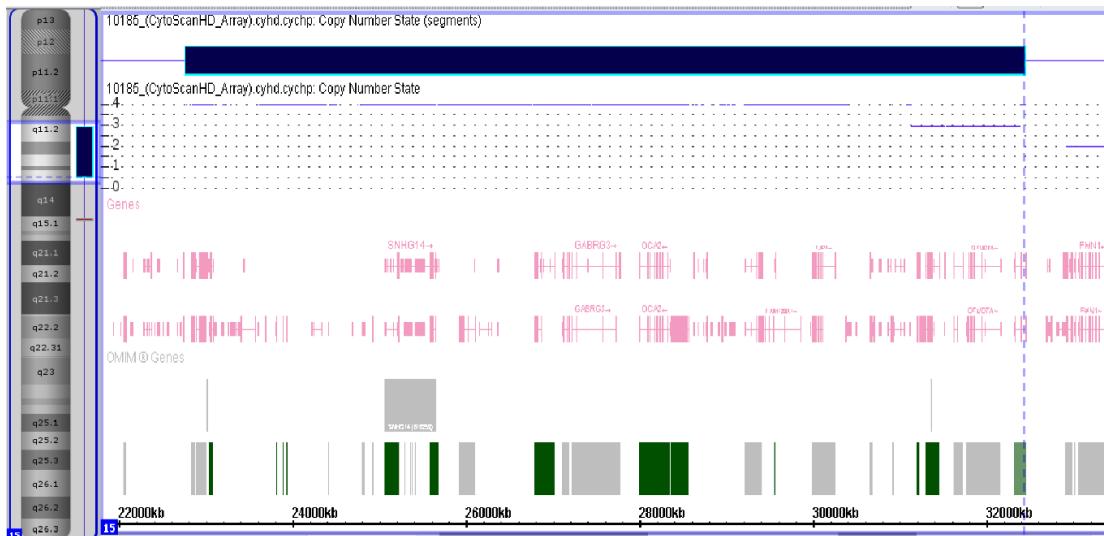


Figura 32. arr[hg19] 15q11.2q13.3(22,770,421-32,439,281)x4 identificada no paciente P079.

Os achados clínicos e diagnósticos indicam a ocorrência da Síndrome Dup15p, que tem em seu quadro clínico características apresentadas por esse paciente como: atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), deficiência intelectual (DI), transtorno do espectro autista (TEA), epilepsia, além de características faciais como fendas palpebrais oblíquas para baixo. As alterações genéticas mais recorrentes na síndrome são na forma de cromossomo marcador supranumerário, podendo ocorrer na forma tetrassômica e na forma trissômica, como no caso do nosso probando (89).

A região afetada no paciente tem uma sobreposição com a região crítica das síndromes de Prader-Willi/Angelman. Estudos indicam que as cópias extras do gene *UBE3A* causem o fenótipo autista. Há indicação de que o cluster de genes receptores GABA (*GABRB3*, *GABRA5* e *GABRG3*) esteja associado à atrasos no desenvolvimento, casos de epilepsia, encefalopatia epilética, tendo alterações descritas também em casos de pacientes do espectro autista (89).

Está presente também na região, o gene *HERC2*, associado a desordens do neurodesenvolvimento. Estudos com animais *knock-out* identificaram associação entre fenótipos Angelman-like e a redução da dosagem do gene por deleção ou variante, entretanto o aumento de dosagem do gene não foi avaliado (90). Alterações *missense* em gene da mesma família, a ubiquitinase *HERC1*,

são recorrentes em pacientes com DCCs, sendo identificado como gene candidato para explicar alterações cardíacas (91).

PACIENTE P078

A paciente encaminhada com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), catarata e nistagmo. Aos 6 meses de vida foi avaliada pelo oftalmologista que detectou córnea transparente, aniridia total, catarata e nistagmo horizontal pendular bilateral. Apresenta EP e FOP, além de fenótipo complexo com fendas retas, epicanto bilateral, nistagmo horizontal, raiz nasal baixa, discreta hipoplasia de asas nasais, filtro curto e marcado, orelhas proeminentes, lábios grossos, retrognatia, cabelos esparsos e ralos, mancha morfológica extensa no flanco direito, hérnia umbilical, pregas palmares profundas, clinodactilia de terceiro dedo bilateral, sobreposição do 2º sobre o 3º pododáctilo bilateralmente, genitália externa feminina normal, baixa estatura e hipotonía.

Foi identificada deleção de 10,16 Mb na região 11p14.3p13 (Figura 35). A alteração é classificada como patogênica. Os genes *WT1* e *PAX6* foram deletados por completo confirmando o diagnóstico de síndrome WAGR, compatível com o fenótipo do paciente.

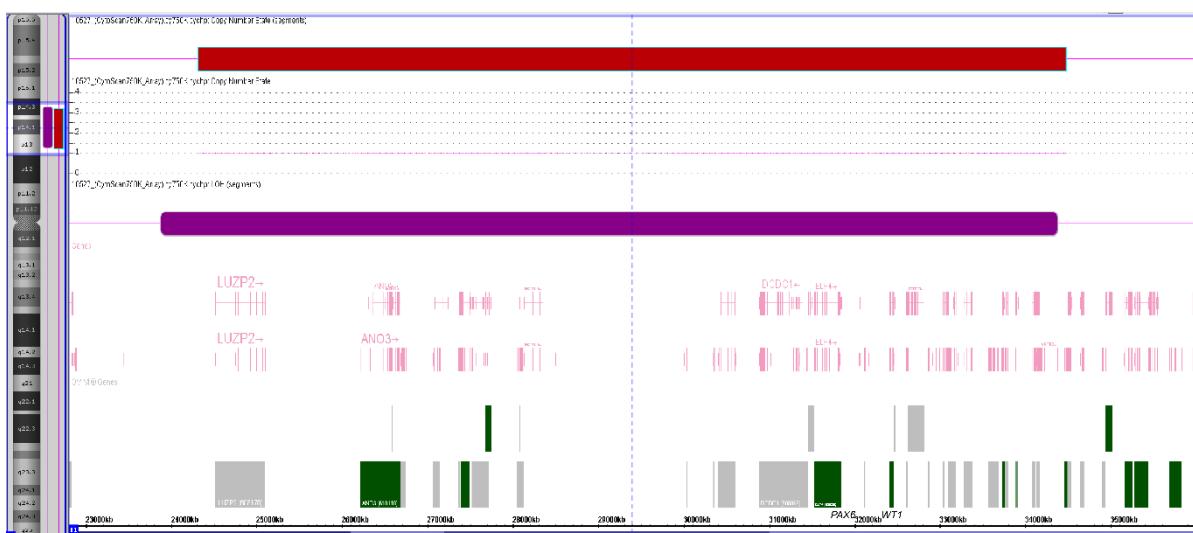


Figura 33. Deleção de 10,16 Mb na região arr[hg19] 11p14.3p13(24,315,244-34,478,570)x1 identificada no paciente P078.

O gene *PAX6* (OMIM 607108) é um fator de transcrição que atua no desenvolvimento do cérebro. Embora atue na regulação de DII1, um dos ligantes da via Notch (92), não há uma associação definida entre a alteração encontrada no paciente e etiologia cardíaca da paciente. Entretanto, a deleção é patogênica e causal para os demais fenótipos da paciente. Esse caso é discutido com maior detalhamento em artigo recente do Laboratório de Genética-UnB a respeito da Síndrome WAGR (93).

Importante destacar que a avaliação do histórico da probanda identificou ocorrência de citomegalovírus congênito durante a gravidez. Embora a patogênese detalhada seja ainda inconclusiva e os relatos de casos sejam escassos, diversas infecções virais já foram associadas a DCCs, entre elas rubéola e citomegalovírus (94).

Paciente P081*

Paciente do sexo masculino apresentando fenótipo de dismorfias faciais, hipotireoidismo congênito, rim multicístico e ictiose. O fenótipo cardíaco apresentava ASD e VSD. A investigação do histórico familiar identificou que o probando apresenta ainda um irmão com o mesmo fenótipo de ictiose sem alterações cardíacas. A mãe apresenta fenótipo cardíaco de CoA.

A análise por microarray identificou uma deleção em homozigose de 1,68 Mb na região Xp22.31 arr[hg19] (6,455,151-8,135,568)x0 (Figura 37). A região deletada contém 6 genes dos quais 4 constam no OMIM. Entre eles, o gene *STS* (300747) é relacionado à ocorrência de ictiose, fenótipo presente no paciente. A alteração identificada é patogênica e justifica parte do quadro do paciente.

Foi identificada alteração similar na genitora do paciente sendo, portanto, herdada. A genitora apresenta CoA, porém não apresenta alteração fenotípica relacionada à ictiose, possivelmente devido à compensação de dosagem pelo segundo cromossomo X não alterado. O paciente possui apenas um

cromossomo X e portanto, apresenta a deleção em homozigose (vide diferença de coloração na Figura 36), exibindo o fenótipo relacionado.

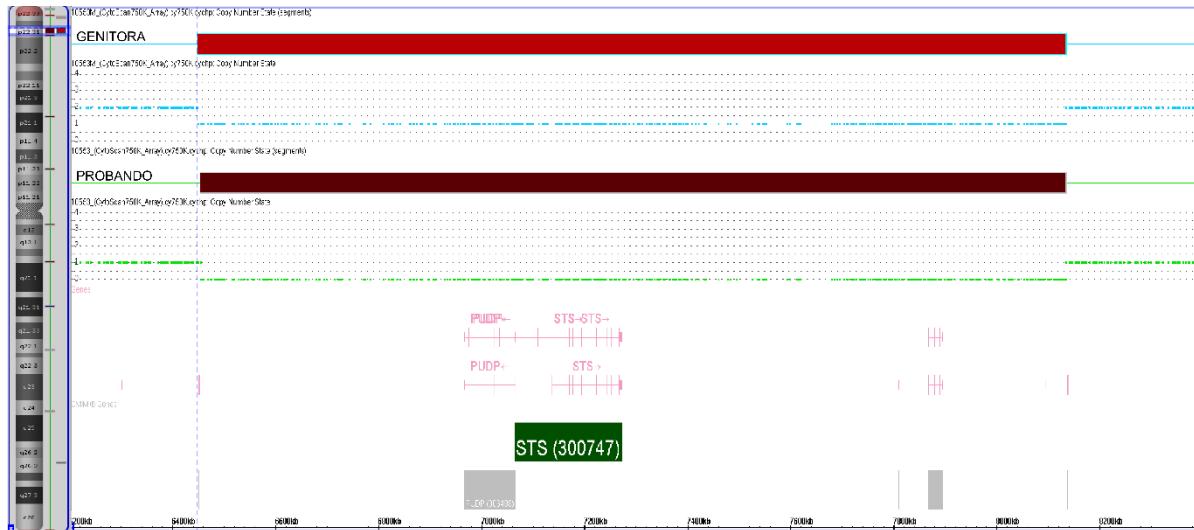


Figura 34. Deleção em homozigose de 1,68 Mb na região Xp22.31 arr[hg19] (6,455,151-8,135,568)x0 identificada no paciente P081*.

No CMA do probando foi identificada ainda uma duplicação na região 3p25.2 de 172 Kb. A alteração foi herdada do pai, de tamanho semelhante. Na região estão localizados apenas dois genes *RAF1* e *TMEM40* (Figura 37).

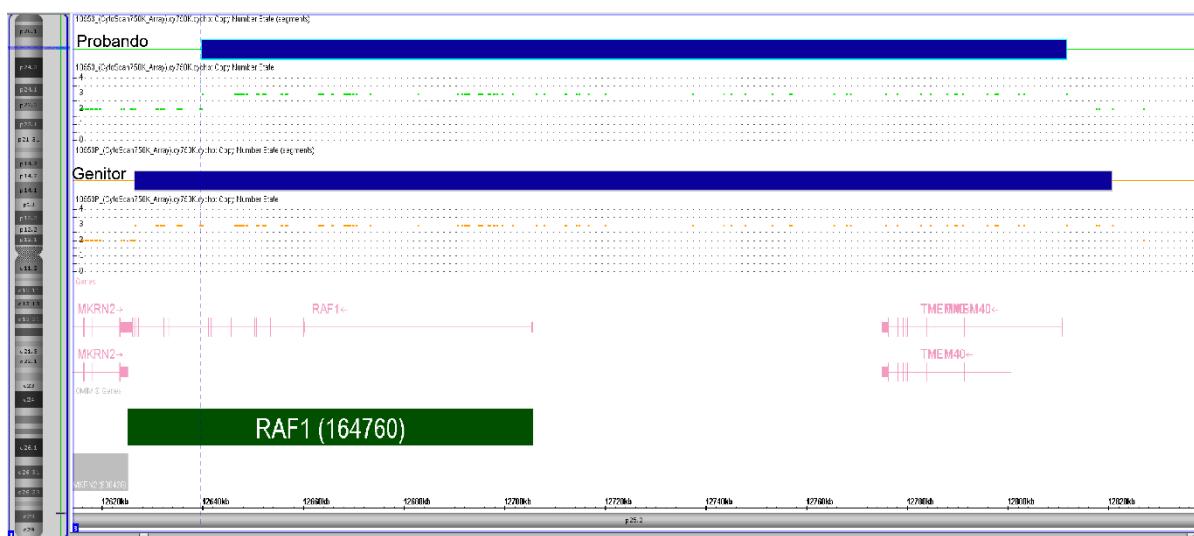


Figura 35. Duplicação de 172 Kb na região 3p25.2 arr[hg19] (12,626,587-12,820,795) identificada no paciente P081*.

Alteração na mesma região foi identificada no genitor do paciente sendo, portanto, herdada. Após investigação familiar foi identificado que o pai do probando apresenta características da síndrome de Noonan, além de baixa estatura e dificuldades de aprendizado relatadas. Entretanto, não apresenta fenótipo cardíaco.

A duplicação na região 3p25.2 foi classificada com patogênica, tendo sido herdada de pai afetado. O gene *RAF1* (OMIM 164760) é um gene candidato da síndrome de Noonan, e em casos não sindrômicos alterações nesse gene tem sido associadas à diferentes DCCs (95).

Foi realizada ainda investigação por exoma, que não identificou variantes que expliquem o quadro do paciente.

PACIENTE P082

Paciente do sexo masculino atendido na UTI Neonatal do HUB, após nascimento a termo, 37 semanas, com crescimento intrauterino restrito. Consta relato de que, devido à alteração cromossômica identificada no irmão mais velho previamente, foi realizada prévia análise cromossômica em líquido amniótico com resultado 46,XY (laboratório externo). No exame externo consta observação de “translocação balanceada nos pais” (SIC), sem detalhamento.

O paciente tem um irmão (A2) 2 anos mais velho com deficiência intelectual grave, ausência de fala e marcha, além de baixa estatura, testa alta e abaulada, pálpebras obliquas para baixo, filtro curto, boca em carpa, palato estreito, orelhas pequenas com hélice dobrada, retrognatia, covinhas laterais ao queixo, campodactilia e clinodactilia de quintos quirodáctilos bilateral, hipotrofia

muscular acentuada em MMII e restrição da extensão do joelho, além de pés evertidos. A genitália masculina apresenta micropênis, hipoplasia de bolsa escrotal e criotorquidízia bilateral. O irmão do probando (A2) não apresenta DCC.

Após nascimento do probando, no exame físico identificou-se microcefalia, testa curta, hemangioma em glabella, sobrancelhas arqueadas, columela nasal e filtro labial curtos, boca em carpa, orelhas com hélices sobredobradas e lobo grande, retrognatia. Além de campodactilia e clinodactilia de quintos quirodáctilos bilateral, pés com sindactilia parcial bilateral. O paciente se enquadra ainda nos percentis de baixa estatura. Investigação cardiológica revelou ventrículo esquerdo não-compactado (LVNC), valva aórtica bicúspide (BAV) e FOP. A genitália masculina apresenta micropênis, hipoplasia de bolsa escrotal e criotorquidízia bilateral. Em acompanhamento posterior, foi identificado ADNPM, com posterior diagnóstico de deficiência intelectual grave, ausência de fala e marcha.

Realizado exame de cariótipo do probando, foi identificado cromossomo marcador em diversas metáfases (47,XY, +mar[20]/ 46, XY[30]).

Para melhora caracterização foi realizado CMA do probando que identificou duplicação na região 14q31.3q32.33 de 17,95Mb. A alteração é classificada como patogênica.

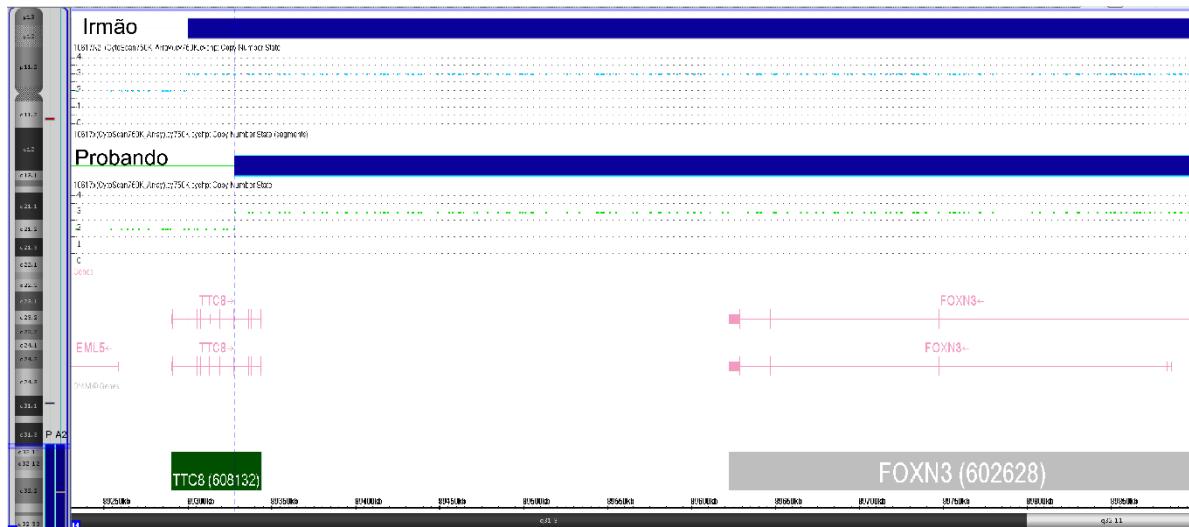


Figura 36. Duplicação 14q31.3q32.33 de 17.95 Mb identificada no probando P082 e em seu irmão.

As duplicações identificadas nos irmãos são similares e envolvem o gene *TTC8* (OMIM 608132). Esse gene codifica proteína que compõe o complexo proteico necessário para a ciliogênese. Os cílios celulares atuam em diversos processos embriológicos e fisiológicos e estão presentes em diversos tecidos e tipos celulares. Por atuar em nessa diversidade de tecidos a proteína *TTC8* apresenta diferentes isoformas, resultantes de splicing alternativo (96). Os cílios celulares atuam em diferentes vias de sinalização como na via Shh e na via Wnt, especialmente na definição da polaridade planar. Entretanto é difícil estimar o efeito de alterações em genes envolvidos na ciliogênese devido a redundância de genes envolvidos na formação e ação dos cílios (May-Simera *et al.*, 2015).

O gene *FOXN3* (OMIM 602628), duplicado nos dois irmãos, é gene candidato para explicar malformações craniofaciais e cerebrais (98). Estudos com diferentes tipos de câncer detalham que *FOXN3* atua na regulação da transição epitélio-mesenquimal pela ativação da via TGF- β e inibição da via Wnt/ β -catenina (99). Trabalhos de embriogênese de anfíbios identificaram que em *Xenopus*, o gene *FOXN3* atua na trabeculação ventricular e também em malformações craniais (100).

O gene *JAG2* (OMIM 602570), duplicado nos dois irmãos, expressa um ligante ativador da via Notch, que em conjunto com *JAG1* promovem a

sinalização necessária à maturação das câmaras cardíacas. Os dois ligantes não têm funções redundantes: JAG2 promove a trabeculação e JAG1 atua principalmente durante a maturação ventricular e posterior compactação. Alterações na ativação desses ligantes levam à diferentes gradações de LVNC e favorecem a hipótese de que essa cardiomiopatia tem uma origem congênita (101). A via Notch também atua no início da formação dos coxins endocárdicos para a formação das valvas cardíacas, sinalizando o início da transição epitélio-mesenquimal. Variantes de sequência que comprometem a ativação da via Notch estão associadas ao fenótipo de BAV (36). A alteração no número de cópias do gene *JAG2* pode ter contribuído para o fenótipo que está presente no probando.

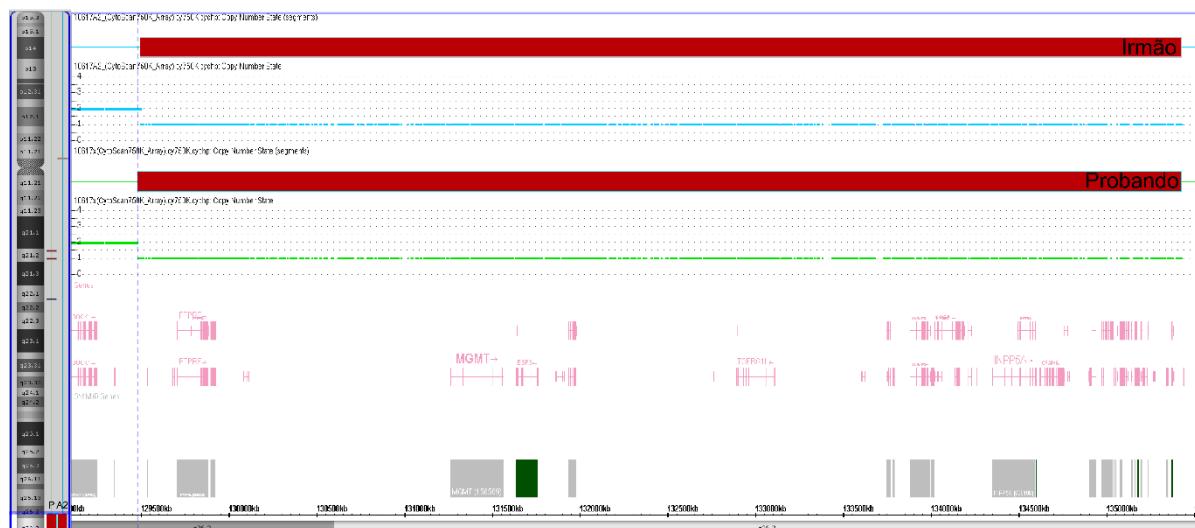


Figura 37. Deleção terminal no cromossomo 10 dos irmãos, arr[hg19] 10q26.2q26.3(129,480,529-135,426,386)x1 de 5,94Mb.

Foi identificada ainda no probando e em seu irmão deleção terminal no cromossomo 10, arr[hg19] 10q26.2q26.3(129,480,529-135,426,386)x1 de 5,94Mb. A duplicação e a deleção identificadas no CMA não detalham a alteração identificada ao cariótipo 47,XY, +mar[20]/ 46, XY[30], de modo que o cromossomo marcador visualizado é possivelmente formado por heterocromatina.

O gene *VENTX* (OMIM 607158) presente na região deletada (linha pontilhada na Figura 37) atua no estabelecimento do padrão ventral do embrião

na fase de blástula, prevenindo que as células da região se diferenciem em células de destinação dorsal. Sua expressão é promovida por WNT8 e BMP, limitando o acúmulo de β-catenina na porção dorsal do embrião, e favorecendo a manutenção da sinalização Notch na porção ventral (102).

O caso dos irmãos com CNVs similares chama a atenção devido a ocorrência de DCC no probando e sua ausência no irmão mais velho. Ambos apresentam duplicação no número de cópias de fatores de transcrição que atuam em importantes vias da embriogênese, *JAG2* e *FOXN3* (Tabela 3).

Sabe-se que diversos genes envolvidos na cardiógenese apresentam grande sensibilidade para alterações no número de cópias, tendo em vista que essas alterações interferem no alcance dos limiares necessários para o correto funcionamento das vias, e consequentemente para o desenvolvimento de estruturas embrionárias (73).

A haploinsuficiência genômica é um mecanismo patogênico em diversas doenças complexas, inclusive nos DCCs. É um relevante indicador a ser observado na análise de CNVs e variantes de sequência, sendo destacado em plataformas como o *Genome Aggregation Database (gnomAD)*, que chega a estabelecer pontuações preditivas de patogenicidade para os genes, *pLI* (103). A haploinsuficiência genômica é vista ainda como possível alvo de terapia gênica, explorando a possibilidade de regulação epigenética de genes em haploinsuficiência (104).

Cabe lembrar sempre que o desenvolvimento ocorre sempre em um ambiente de interação espaço-temporal entre diferentes vias, logo, em interação com diferentes moléculas. A compensação de dosagem por outros genes ou vias que não apresente dosagem alterada podem explicar casos de expressividade variável e de variabilidade intrafamiliar comuns nas DCCs (73).

Paciente P083

Paciente do sexo masculino com microcefalia, deficiência intelectual, dismorfias faciais e clinodactilia bilateral. O fenótipo cardíaco é de ASD.

A análise por microarray identificou uma deleção na região 2q37.3 arr[hg19] 2q37.3(240,526,165-242,782,258)x1 de 2,25 Mb. A mesma deleção foi identificada também na mãe e no irmão do paciente (Figura 41).



Figura 38. Deleção na região 2q37.3 arr[hg19] 2q37.3(240,526,165-242,782,258)x1 de 2,25 Mb identificada no paciente P083. Extraída de publicação de publicação de nosso grupo (105).

A região deletada contém 46 genes dos quais 26 constam no OMIM. A microdeleção 2q37 é uma das deleções subteloméricas mais comuns e compõe a Síndrome da microdeleção 2q37, caracterizada por deficiência intelectual, obesidade, braquidactilia e cardiopatia congênita. A alteração identificada foi classificada como patogênica.

A literatura a respeito da síndrome indica o gene *HDAC4* como gene candidato a explicar o fenótipo da síndrome, especialmente o quadro de DI,

obesidade e braquidactilia (60). Entretanto, a alteração identificada em nosso paciente não inclui o gene *HDAC4*. Tal resultado revela a que a deleção dos demais genes da região também apresentam potencial relevância no fenótipo da Síndrome da microdeleção 2q37. A discussão desse caso foi ampliada em artigo publicado por nossa equipe (105) (Apêndice 2- Artigo *Genotype and phenotype correlation in a family with a 2q37 deletion downstream of HDAC4*).

Paciente P084

Paciente do sexo masculino encaminhado pelo fenótipo de fenda palatina, apresenta ainda hipoplasia de lábio superior, microretrognatia. Exames clínicos identificaram agenesia de corpo caloso, ASD e PCA.

A análise por microarray identificou uma deleção na região arr[hg19] 1q43q44(238,561,769-249,224,684)x1 de 10,7 Mb (Figura 42).



Figura 39. Deleção na região arr[hg19] 1q43q44(238,561,769-249,224,684)x1 de 10,7 Mb identificada no paciente P084.

A região deletada contém 106 genes dos quais 32 constam no OMIM. Devido ao tamanho e a quantidade de genes envolvidos a deleção é classificada como patogênica. A região 1q43-q44 é associada a alterações estruturais no

cérebro, e considerada um *locus* candidato a explicar alterações do corpo caloso (106). Também emerge como *locus* relacionado às DCC, havendo inclusive relato de uma paciente com ASD, a mesma DCC presente em nosso paciente, e um segundo caso com TOF e agenesia de corpo caloso (107). A deleção identificada explica portanto o quadro fenotípico apresentado pelo paciente.

PACIENTE P085

Paciente do sexo feminino nascida em Barreiras-BA. Em ultrassom pré-natal na 16 e 19 semanas foi identificado derrame pleural em hemitórax esquerdo e suspeita de deslocamento cardíaco à direita. O ecocardiograma fetal identificou foco ecogênico do tipo “golf ball”. Foi indicada a realização de cariótipo fetal, que identificou material adicional de origem desconhecida no braço curto do cromossomo 3, cariótipo fetal 46,XX add(3)p22 (em laboratório externo).

Ao nascer, identificou-se testa abaulada, baixa implantação da orelha esquerda, hélices sobredobradas e pescoço curto. Apresentou refluxo gastroesofágico sendo identificado em exame de laringoscopia a presença de úvula bifida e palato ogival. Avaliação audiométrica ao nascimento (“teste da orelhinha”) identificou ausência de resposta bilateral. Ecocardiograma ao nascimento identificou ASD, PCA e leve espessamento da valva pulmonar. O PCA identificado ao nascimento resultou em fechamento espontâneo, e não foram identificadas alterações de espessamento de valvas, permanecendo somente fenótipo de ASD.

Realizado o CMA visando caracterizar a alteração de cariótipo, foi identificada uma deleção de 5,90Mb na região 3p26.3p26.1 (Figura 43).

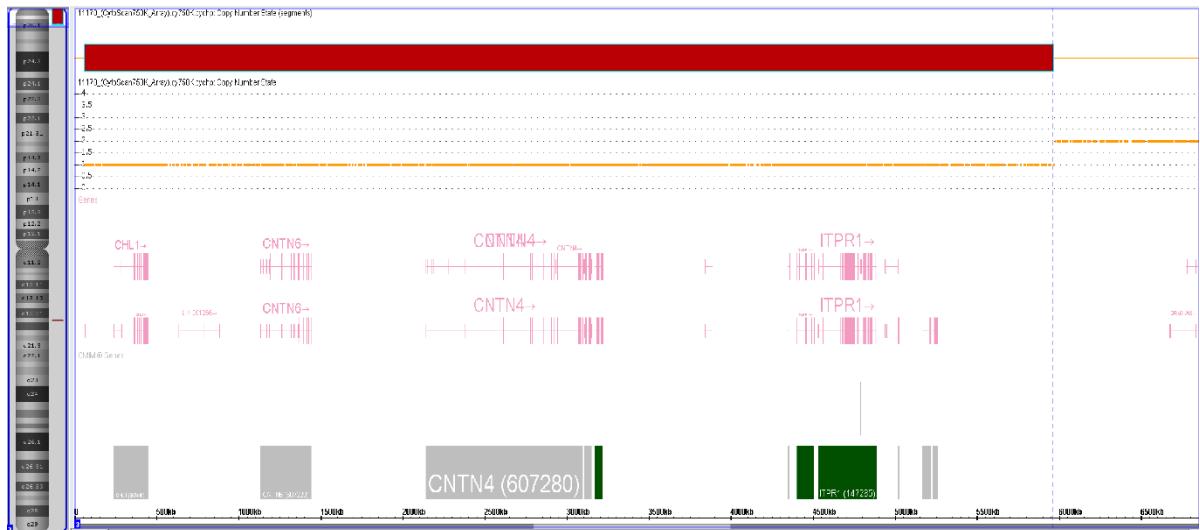


Figura 40. Deleção de 5,90Mb identificada no paciente P085, arr[hg19] 3p26.3p26.1(61,891-5,965,980)x1.

Foi identificada ainda outra CNV, uma duplicação de 40,90Mb no braço longo do cromossomo 7 (Figura 44). A deleção no cromossomo 3 e a duplicação no cromossomo 7, ambas as CNVs em posição telomérica, detalham o cromossomo derivativo identificado ao cariótipo externo como 46,XX der(3)add(3)p22.

A duplicação no cromossomo 7 envolve 365 genes dos quais 196 estão relacionados no OMIM. Não foi possível realizar o exame dos genitores tendo em vista a perda de segmento ambulatorial.

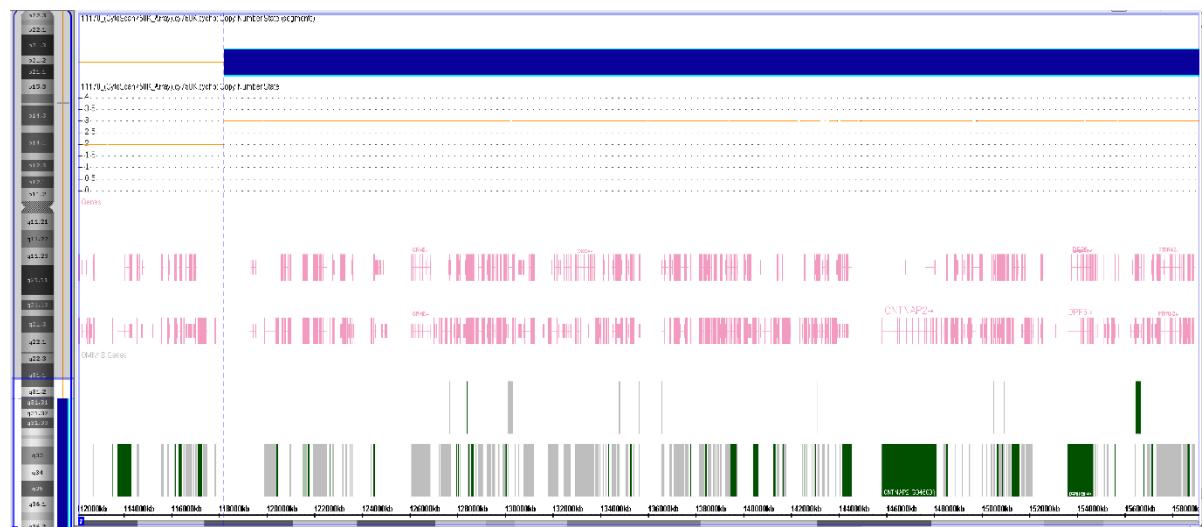


Figura 41. Duplicação de 40,90Mb na região arr[hg19] 7q31.31q36.3(118,213,867-159,119,707)x3.

Na região duplicada do cromossomo 7, destaca-se a presença do gene *SHH* (OMIM 600725), que participa no posicionamento das células cardiológicas e também atua na diferenciação, manutenção celular das NCCs (43). Destaca-se a atuação relevante do gene na protrusão mesocárdica dorsal (DMP), mecanismo essencial para a formação dos coxins endocárdicos que promovem a delimitação das câmaras cardíacas (45). Consta na literatura, relato de caso envolvendo trissomia parcial do cromossomo 7, em paciente com defeito de septação (VSD naquele caso), e revisão de literatura que identificou a ocorrência de DCCs relatadas em outros seis casos de trissomia parcial do braço cromossomo 7 (108).

Ao longo da história da genética clínica, a inovação técnica ampliou o entendimento dos achados do cariótipo clássico. A caracterização de cromossomos marcadores e de translocações identificadas ao cariótipo tem na hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *Fluorescence In Situ Hybridization*) uma importante ferramenta. A ampliação do uso dos *microarrays* fornece uma ferramenta adicional para essas caracterizações, que permite ainda identificar translocações aparentemente balanceadas ao cariótipo, mas que ocultam microdeleções e/ou microduplicações, além de outros rearranjos ainda mais complexos (109).

Nosso grupo do Laboratório de Genética-UnB tem obtido diversos resultados no uso do CMA para caracterização de achados de cariótipo, como ocorreu nos pacientes P079, 10984 e P085 desse estudo.

Paciente P086

Paciente do sexo masculino apresentando ASD, clinodactilia de quintos quirodáctilos bilateral, mancha café com leite intraclavicular e mancha hipocrônica supra glútea, além de baixo peso, baixa estatura e atraso de fala.

A análise por microarray identificou uma deleção na região arr[hg19] 22q11.21(19,754,878-19,766,917)x1 de 12 Kb (Figura 45).

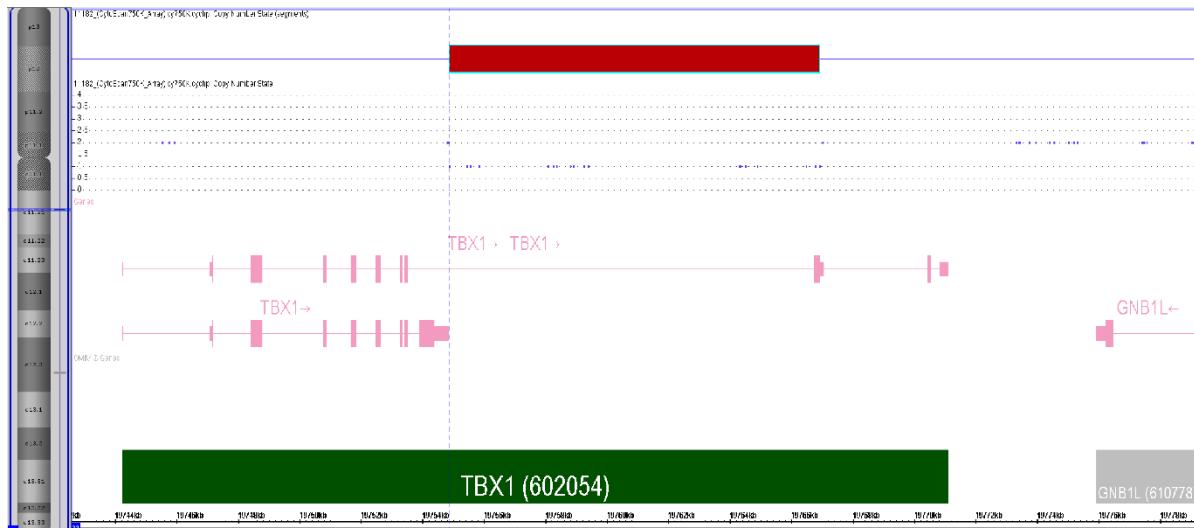


Figura 42. Deleção de 12 Kb na região arr[hg19] 22q11.21(19,754,878-19,766,917)x1, identificada no paciente P086.

O gene *TBX1* (OMIM 602054), é um dos genes candidatos a explicar diversos fenótipos presentes na SD22q11.2 (110), sendo classificada como uma alteração patogênica.

A região deletada é pequena e intragênerica, não tendo sido detectada no exame de MLPA. O tamanho da deleção identificada e a posição mais distais das sondas presentes no kit de MLPA utilizado justificam a impossibilidade de identificação da alteração no MLPA.

Em estudo de análise de fetos com DCCs oriundos de interrupção de gravidez foram identificados duas CNVs de menos de 9Kb no gene *TBX1*. Um dos casos revelou uma microduplicação em paciente com TGA e VSD. O outro caso relatou paciente com TOF em que foi identificada microdeleção de 0,85 Kb no gene *TBX1* (arr 22q11.21 (19,746,363-19,747,209)x1, dn) que não foi detectada por hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *Fluorescence In Situ Hybridization*).

O caso identificado por Cheng e colaboradores em 2014 e do paciente P086 reforçam a importância do uso de múltiplos métodos diagnósticos,

especialmente em casos com forte suspeita clínica. Destaca-se ainda o reforço da associação do gene *TBX1* e as DCCs (110).

5.2. CASOS COM ALTERAÇÕES DE SIGNIFICADO INCERTO (VOUS) IDENTIFICADAS POR CMA

Paciente P087*

Paciente do sexo masculino com ASD do tipo *óstium secundum* de 10,5 mm , baixa estatura, microcefalia, atraso de fala. Apresenta prega palmar única a esquerda, quinto quirodáctilo curto, coxins em quirodáctilos. Após cariotípico e MLPA sem alterações, foi identificado no CMA uma duplicação na região 1p31.3 de 421Kb, arr[hg19] 1p31.3(61,704,029-62,125,291)x3. Posteriormente identificou-se que a alteração foi herdada da genitora que apresenta duplicação na mesma região com 426Kb. A duplicação identificada envolve apenas três genes (*NFIA*, *NFIA-AS1*, *MGC34796*) (Figura 48).

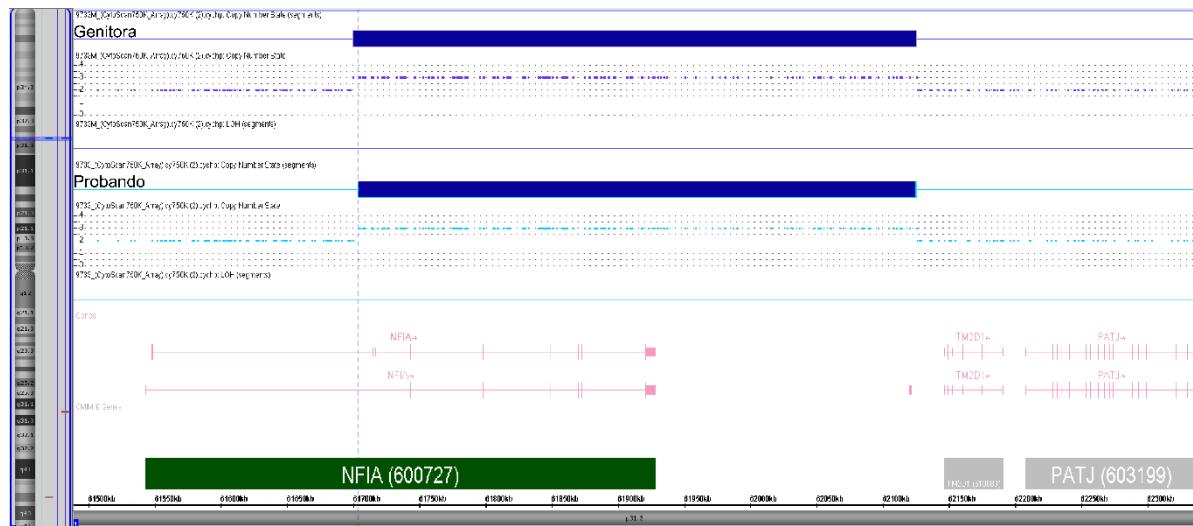


Figura 43. Duplicação de 421 Kb no paciente P087* herdada da genitora.

O gene *NFIA* (OMIM #600727) atua na regulação da gliogênese no desenvolvimento dos sistemas nervoso durante a embriogênese. O gene *NFIA* atua na repressão da via Notch nos progenitores neurais, por meio da repressão de um dos genes promotores da via, *HES1*. Estudos com ratos com o gene silenciado identificaram aumento da expressão do promotor *HES1* e a manutenção da via Notch ativa, mantendo as células em um estado

indiferenciado. Quando a expressão de *NFIA* é ativada, leva à repressão de *HES1* e consequente silenciamento da via Notch, ocorrendo a diferenciação de células neurais na região dos ventrículos cerebrais (111).

O gene *NFIA* têm sido associado à síndrome BRMUTD (OMIM#613735) (do inglês, *brain malformations with or without urinary tract defects*) com fenótipo de macrocefalia, agenesia do corpo caloso, ventriculomegalia, outras malformações cerebrais, alterações crânio faciais e defeitos do trato urinário.

Os poucos casos na literatura envolvendo alterações nesse gene descrevem variantes de sequência em heterozigose (112). Há uma descrição de caso de uma deleção intragênica, envolvendo os exons 4-9 do gene *NFIA*, com quadro fenotípico similar ao descrito para a síndrome BRMUTD (113). Consta na base de dados *DECIPHER* três casos de duplicações em posição similar à do probando com fenótipo relatado de DI, ADNPM e atraso de fala. Em nenhum dos casos descritos na literatura ou no *DECIPHER* foi identificada ocorrência de DCCs.

Embora esteja associado com uma síndrome identificável, as descrições descrevem variantes de sequência ou duplicação do gene *NFIA*. Além disso, a presença da duplicação em genitora hígida e a ausência de correlação com o fenótipo leva a classificação da alteração como VOUS.

Foi realizado sequenciamento de exoma no âmbito do projeto de Microcefalias, entretanto não foram identificadas variantes patogênicas.

Paciente P088

Paciente do sexo feminino com suspeita de Síndrome acro-cardio-facial, apresentando ASD, EV. Apresenta dolicocefalia, testa abaulada, hipertelorismo ocular, fenda labial unilateral a esquerda e desabamento da aba nasal junto a fenda. Identificou-se sindactilia na mão esquerda e pés tortos bilateralmente. Apresenta genitália ambígua, cuja investigação levou a identificação de tumores renais bilateralmente. Apresentava atraso de desenvolvimento grave, não sendo possível melhor caracterização posterior por perda de seguimento ambulatorial.

Após cariótipo e MLPA normais, o CMA identificou deleção na região 2p16.3 de 76 Kb (Figura 49).

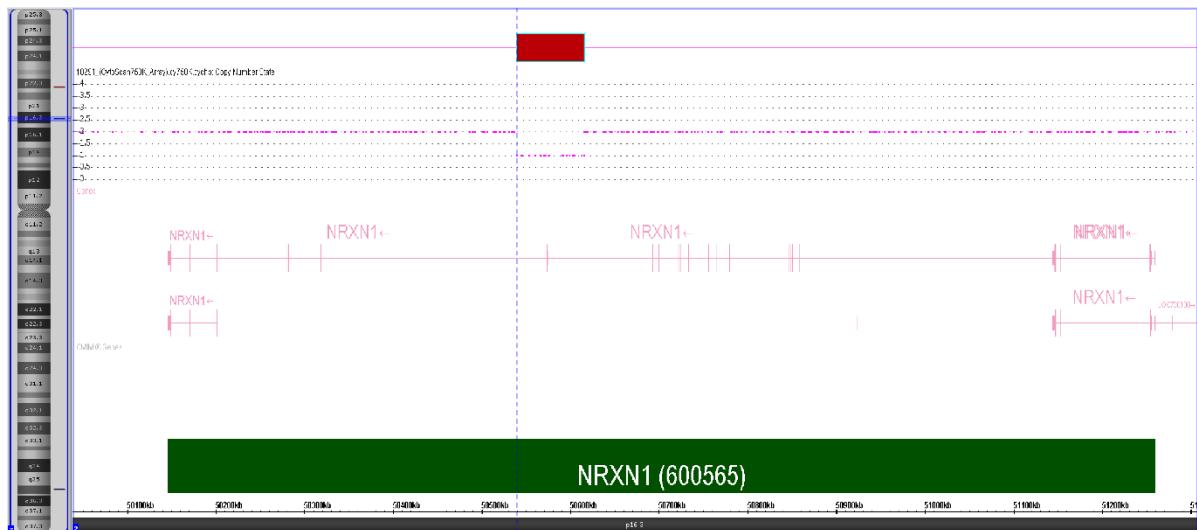


Figura 44. Deleção de 76Kb na região arr[hg19] 2p16.3(50,539,818-50,615,382)x1.

A deleção de tamanho reduzido envolve um éxon do gene *NRX1* (OMIM 600565), relacionado com a síndrome Pitt-Hopkins, que apresenta DI severa e dismorfias faciais. Entretanto, as alterações descritas Pitt-Hopkins envolvem alterações autossômicas recessivas. Desse modo, a variante identificada foi classificada como de significado incerto (VOUS).

A região do gene *NRX1* contém diversas regiões repetitivas em posições invertidas. A alta homologia dessas repetições pode levar à formação de estruturas cruciformes durante o pareamento cromossômico, cuja instabilidade genômica pode levar à deleções de diferentes tamanhos (Chen *et al.*, 2013b).

Além da instabilidade cromossômica, o gene *NRX1* é um membro da família das neurexinas que atuam no estabelecimento e manutenção das sinapses entre neurônios. Essas moléculas apresentam diversas isoformas originadas por *splicing* alternativo, compondo ainda mais o quadro dessa região de intensa variabilidade genética (Al Shehhi *et al.*, 2019).

Deleções nessa região tem sido associadas a quadros do espectro do autismo, de déficit de atenção e hiperatividade, DI, convulsões, além de quadros de bipolaridade e esquizofrenia. As alterações em *NRX1* cursam com diversos níveis de expressividade e penetrância nesses diferentes fenótipos tornando

complexo o aconselhamento genético, mas configurando risco aumentado para DI e desordens psiquiátricas (Al Shehhi *et al.*, 2019).

Estudos *in vitro* com células do tecido cerebral de pacientes do espetro autista que presentavam deleção em *NRX1* identificaram proliferação anormal de células da glia além da atividade aumentada da Via Notch (116).

Em que pese a indicação de risco para alterações cerebrais e a relevância da via Notch para a cardiogênese, estudos adicionais são necessários para detalhamento do quadro da paciente e correlação com a deleção identificada, o que foi dificultado pela perda de segmento ambulatorial. A alteração foi portanto classificada como VOUS.

Paciente P089

A paciente apresentava ASD, VSD, além de torcicolo congênito e atrofia de rim esquerdo.

O CMA da paciente identificou uma duplicação de 200Kb na região 3p25.2, envolvendo os genes *RAF1*, *TMEM40*, *CAND2*. A alteração foi classificada como VOUS (Figura 50).

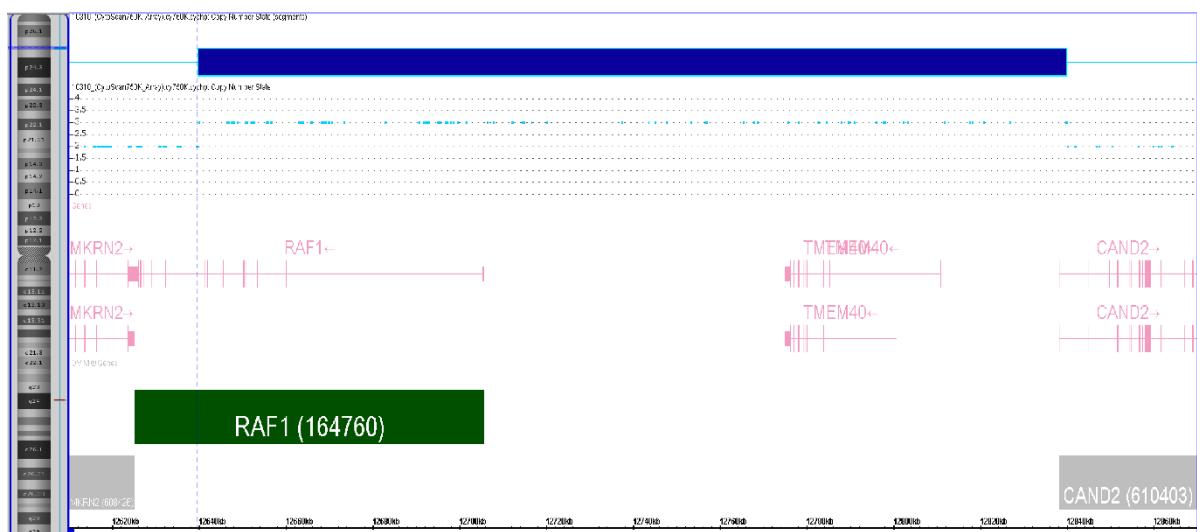


Figura 45. Duplicação de 200Kb encontrada no paciente P089 na região arr[hg19] 3p25.2(12,639,852-12,839,971)x3.

Diversas alterações tem relacionado o gene RAF1 com DCCs devido a sua importância na via Ras-MAPK do desenvolvimento (95). As alterações identificadas em *RAF1*, e deleção no paciente P081* e duplicação no paciente P089 e as correlações com a literatura de DCCS foram mais amplamente discutidas em artigo científico submetido (em revisão).

Paciente P090

Paciente do sexo feminino com ASD, PAPVC e FOP. Apresenta ainda DI, microcefalia e disgenesia de corpo caloso.

A análise por microarray identificou uma duplicação de 98 Kb na região arr[hg19] Xp11.22(53,579,302-53,676,961)x3 (Figura 34).

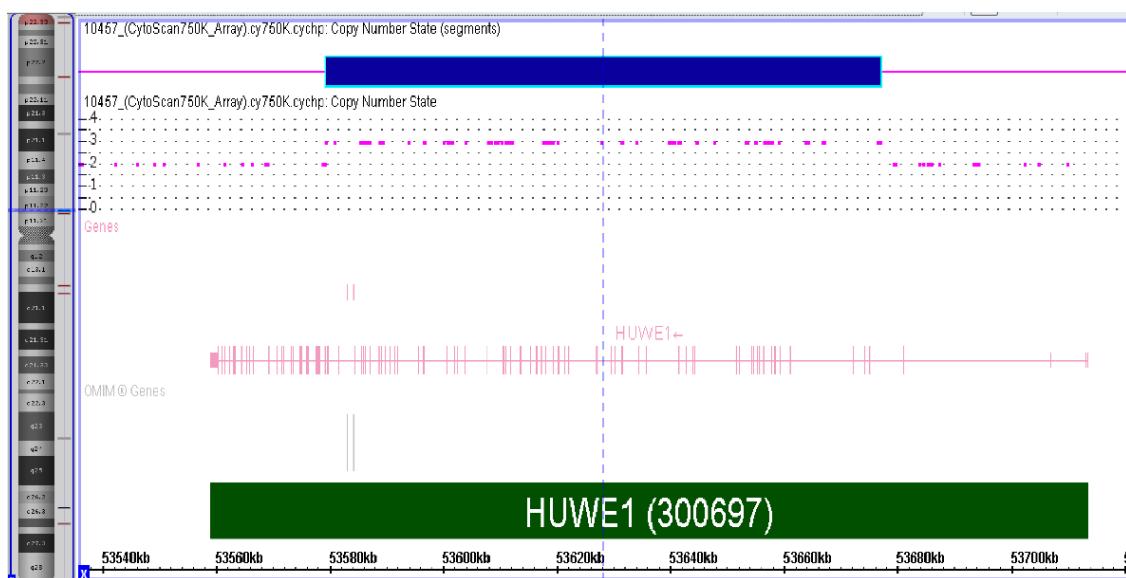


Figura 46. Duplicação de 98 Kb na região arr[hg19] Xp11.22(53,579,302-53,676,961)x3 no paciente P090.

A região alterada envolve três genes, todos listados no OMIM. Desses, destaca-se o gene *HUWE1* (OMIM 330697). Na literatura, variantes de sequência no gene *HUWE1* têm sido associadas com deficiência intelectual sindrômica ligada ao X, denominada *Turner-type* (OMIM 300697). Entretanto, nos casos presentes na literatura eram de portadores de variantes de sequência no gene, diferente do paciente em tela que apresenta uma duplicação. No banco de dados *Decipher* a variante é classificada como possivelmente benigna. O

CNV foi interpretado como de significado incerto na plataforma automatizada Franklin-Genoox (Franklin.genoox.com). Alguns grupos reportam duplicações nessa região em pacientes com deficiência intelectual (117). Desse modo, a alteração identificada é classificada como VOUS.

Além disso, estão presentes em dose aumentada dois microRNAs (miRs), *MIR98* (300810) e *MIRLET7F2* (300721). Embora permaneça como um campo ainda pouco explorado, a regulação pós-transcricional mediada por microRNAs (miRs) é reconhecida como mecanismo de controle de processos de definição de linhagem celular e formação de tecidos. Os microRNAs (miRs), especialmente a alteração de dosagem e sua expressão, têm sido recentemente associados com doenças cardiovasculares e DCC (118). Investigações promissoras têm sido realizadas inclusive na tentativa de utilizar os miRNAs presentes na circulação materna como biomarcadores que poderia indicar a presença de DCC nos fetos em desenvolvimento (119).

Paciente P091

Paciente do sexo feminino, quinta filha de casal não consanguíneo e hígido. A paciente apresenta hidrocefalia, macroglossia, polidactilia pós-axial à esquerda, hipertelorismo ocular, hidronefrose bilateral, malformação mulleriana e hipoplasia genital. Apresenta epilepsia e atividade cerebral desorganizada ao exame de eletroencefalograma. Inventário ósseo identificou diversos desvios ósseos. O fenótipo cardiológico é de ASD.

Foi realizado cariótipo em laboratório externo com resultado normal. O exame de CMA identificou uma duplicação na região 6q25.1 de 369kb (imagem indisponível).

A alteração identificada leva a duplicação dos genes *RAET1E* (609243), *RAET1G* (609244), *ULBP2*(605698), *ULBP1*(605697), *RAET1L*(611047), *ULBP3*(605699), *PPP1R14C*(613242).

Destaca-se a ocorrência da síndrome de microdeleção da região 6q24-q25 com fenótipo de DI, DCCs, dismorfias faciais e distúrbio de crescimento. O gene *PPP1R14C*, expresso no tecido cerebral e cardíaco é um dos genes candidatos a explicar os fenótipos de DCCs e ADNPM presentes nos pacientes afetados pela síndrome (120). Entretanto, a síndrome descrita está associada à quadro de deleção de uma região maior do que identificada nessa paciente. A alteração identificada foi classificada como VOUS.

PACIENTE P092

Paciente do sexo masculino, apresenta CoA e VSD. Foi identificado ao exame macrocefalia, testa abaulada, narinas antevertidas, malformação auricular à direita, criotorquidíia à direita.

Por meio do CMA identificou uma deleção de 240 Kb na região 16q23.1(77,411,910-77,651,587)x1 (Figura 54). Por perda de segmento ambulatorial, os genitores não foram testados.

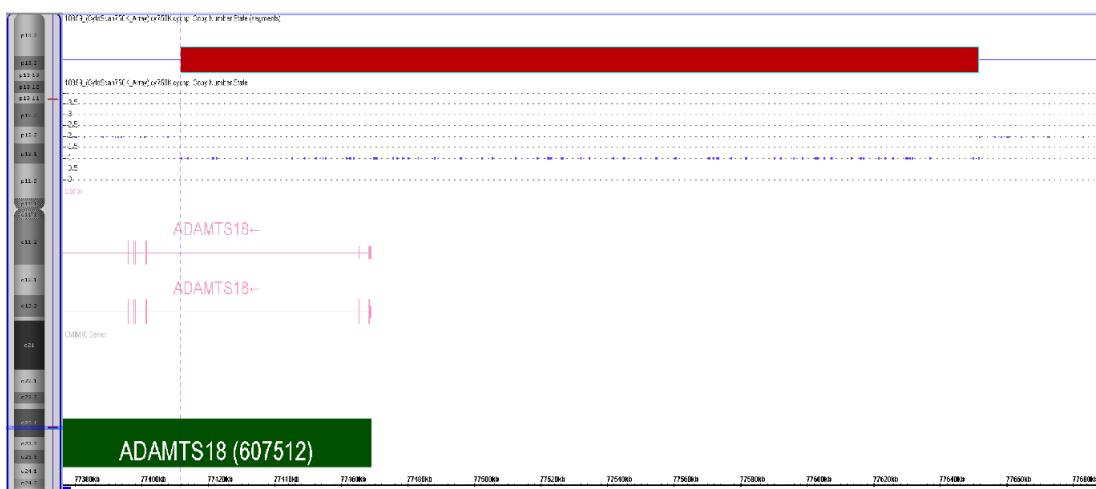


Figura 47. Deleção de 240 Kb na região arr[hg19] 16q23.1(77,411,910-77,651,587)x1.

A alteração identificada levou a deleção da porção distal do gene *ADAMTS18* (OMIM 607512), um gene sensível a alterações de dosagem, mecanismo responsável por alterações de córnea, conforme classificação do OMIM. Estudos recentes têm associado variantes de sequência patogênicas no

gene *ADAMTS18* com alterações na formação dos arcos aórticos, devido a erros no acúmulo de matriz extracelular e alteração na diferenciação das células da crista neural durante a embriogênese (121).

A alteração dessa função do gene *ADAMTS18* poderia explicar as malformações identificadas no paciente como Coarctação de Aorta e de septação ventricular, cujos processos embrionários dependem da migração das células da crista neural. Entretanto, não é possível afirmar que a deleção da porção distal do gene identificada no paciente é suficiente para provocar alterações significativas como as descritas na literatura. A alteração foi classificada, portanto, como VOUS.

Paciente P093*

A paciente apresentou quadro cardiológico com ASD e FOP. O exame clínico demonstrou que a paciente apresenta ainda microcefalia e glaucoma congênito.

Durante a investigação, foi realizado CMA por meio do qual identificou-se microdeleção de 105,9 Kb na região arr[hg19] 2q13(110,876,775-110,980,295)x1.

Estão presentes na região apenas dois genes *NPHP1*, e o RNA longo não codificante, *LINC00116*. A alteração foi classificada como VOUS (Figura 57).

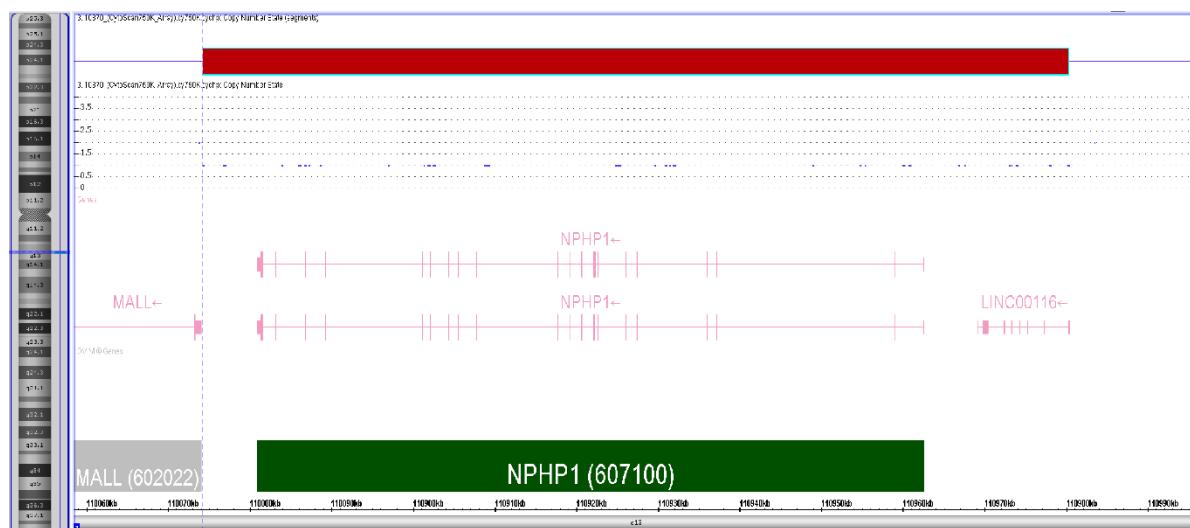


Figura 48. Deleção do gene *NPHP1* identificada no paciente P093*.

O gene *NPHP1* (OMIM 607100) é um gene causal para a nefronoftise e associado ainda à síndrome de Joubert, ambas de herança autossômica recessiva. A região 2q13 é composta por diversas LCRs, formando uma região de instabilidade genômica que predispõe à recombinação homóloga não-alélica e a alterações de número de cópias. Esse gene atua ainda na sinalização celular e adesão entre célula e matriz celular, fazendo parte de um complexo de moléculas ligadas à actina e microtúbulos (122). Destaca-se as descobertas recentes da importância da matriz extracelular em diversos processos da cardiogênese, em especial na transição EMT necessária para a septação cardíaca (55,56).

NPHP1 está relacionado ainda à fenótipos de retinopatia e alterações renais em um espectro de grande variabilidade fenotípica. Datta e colaboradores (2021) caracterização a haploinsuficiência de *NPHP1* em ratos e sua correlação com o fenótipo de retinopatia. O grupo sugere que a variabilidade e a penetrância da retinopatia em humanos pode depender de variantes de sequência adicionais em outros genes de sinalização ciliar (123).

Foi realizado sequenciamento de exoma sendo identificada variante *frameshift* no gene *FOXC1* (*FOXC1:c.213_214insT*). A variante é classificada como provavelmente patogênica, tendo em vista que a variante identificada compromete a função proteica (em inglês, *null variant*) em um gene em que a perda de função (LOF) é um mecanismo de doença bem estabelecido (PVS1). Além disso a variante identificada tem frequência extremamente baixa em controles em bancos de dados (PM2).

Alterações no gene *FOXC1* (OMIM 601090) são causais para a Síndrome de Axenfeld-Rieger, uma condição autossômica dominante que é caracterizada por alterações oftalmológicas resultantes de disgenesia do segmento anterior dos olhos, podendo ocorrer ainda perda auditiva, hipoplasia de maxilar, anomalias dentais e pele redundante abdominal e DCCs (124). Em investigações sobre a síndrome, variantes de sequência no gene *FOXC1* foram associadas ao quadro de glaucoma. Gripp e colaboradores (2012) caracterizaram um caso da síndrome em um paciente com glaucoma congênito e BAV, em que foi identificada variante em *FOXC1* (*c.508C>T; p.Arg170Trp*) herdada da genitora,

que não apresentava DCC. Entretanto a avó materna do probando apresentava quadro de glaucoma e ASD, mas não foi possível confirmar a presença da variante na avó (124).

A fisiopatologia das alterações em *FOXC1* está provavelmente associada à alterações nos padrões de migração e diferenciação de células mesenquimais que atuam na formação dos olhos, mecanismo também essencial na cardiogênese. *FOXC1* é fortemente expresso também nas NCCs, responsáveis pela formação dos coxins endocárdicos essenciais para a septação cardíaca (125).

Em outro estudo, Fuse e colaboradores (2007) caracterizaram a ocorrência de variantes de sequência em *FOXC1* em duas famílias japonesas. Uma das probandas apresentava glaucoma congênito, ASD e EP, sendo identificada a variante *missense* Ala85Pro. O segundo caso reportado pelo grupo apresentava uma microdeleção em heterozigose de 17 nucleotídeos, que leva a troca de fase de leitura, gerando uma proteína truncada. A alteração foi herdada do genitor, em outro caso familiar de glaucoma com cinco afetados (126). Ressalta-se a correlação entre haploinsuficiência de fatores do tipo transcrição *Forkhead Box* (FOX) e transtornos do desenvolvimento. O grupo postula ainda que todas as variantes de sequência descritas no domínio *forkhead*, como é o caso da paciente P093*, podem levar à redução da capacidade de transativação de *FOXC1* (126).

Em estudo anterior de nosso grupo foi caracterizado um paciente com cardiopatia complexa (ASD, VSD, DORV, TOF) sendo sugerido o gene *FOXC1* (duplicado naquele paciente) como gene-candidato para explicar as alterações cardiológicas apresentadas (57).

PACIENTE P094

Paciente do sexo masculino, encaminhada por Malformação de Dandy-Walker com fenótipo cardíaco de BAV.

O caso P094, não foi indicado previamente para MLPA, devido ao fenótipo não indicativo de SD22q11.2 porém o CMA identificou uma deleção 652 Kb na

região 22q11.22q11.23(22,997,928-23,649,562)x1. A deleção foi herdada da genitora. As posições das LCRs indicadas na figura foram identificadas conforme *UCSC Genome Browser*.

Na região deletada contém os genes *MIR650*, *MIR5571*, *IGLL5*, *RSPH14*, *GNAZ*, *RAB36*, *BCR*, *FBXW4P1*. A alteração foi classificada como possivelmente patogênica.

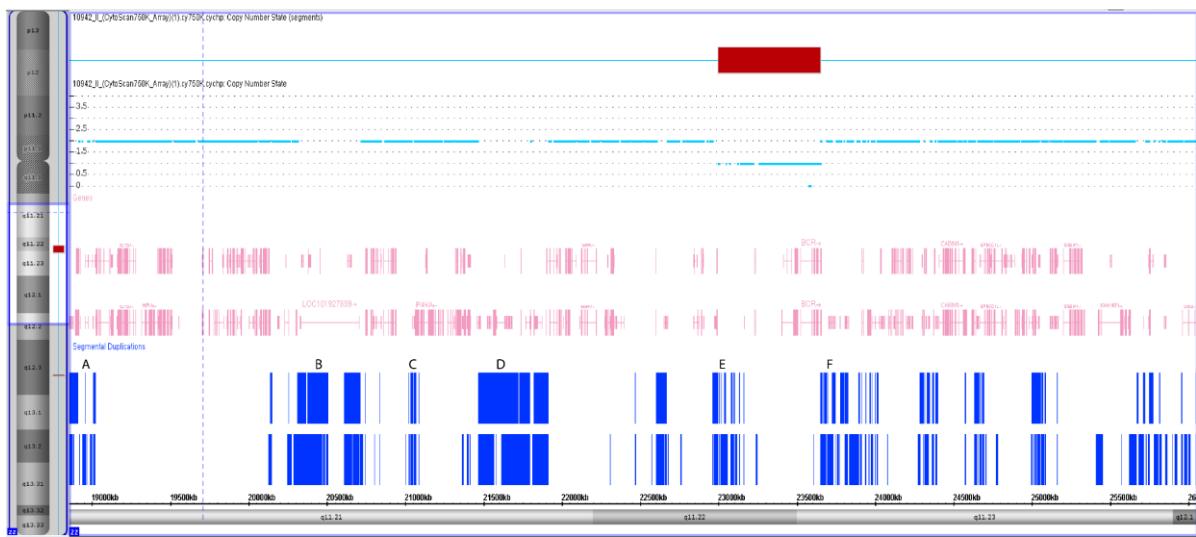


Figura 49. Deleção identificada de 652 Kb na região arr[hg19] 22q11.22q11.23(22,997,928-23,649,562)x1 de 652 Kb.

As posições das LCRs foram identificadas conforme *UCSC Genome Browser*.

A alteração identificada corresponde à posição das chamadas deleções distais tipo II da SD22q11.2, que não envolvem o gene *TBX1* (Figura 22 da Introdução). O kit de MLPA utilizado possui quatro sondas em genes dessa região (duas no gene *RSPH14*, uma em *GNAZ*, uma em *RAB36*, vide Anexo 1), sendo provável que a alteração fosse identificada por essa metodologia.

A deleção distal tipo II identificada envolve as LCR E-F, com deleção de aproximadamente 0,7Mb, e apresenta um fenótipo mais brando comparado à SD22q11.2 clássica, sendo sub-identificada clinicamente, como ocorreu com nosso paciente. É uma alteração rara: constam oito descrições na literatura de deleções tipo II, além de poucos casos relatados no *DECIPHER* (127,128). Mikhail e colaboradores apresentaram quatro dessas descrições, hipotetizando que o fenótipo da deleção distal tipo II é menos propenso a incluir DCCs (1 de 8

casos descritos na literatura) e ocorre predominantemente *de novo* (1 caso familiar descrito na literatura) (127). Nosso paciente se assemelha à descrição mais antiga descrita, sobre paciente que apresentava deleção familiar herdada do genitora e DCC (IAA) (Rauch *et al.*, 1999). Como no caso descrito por (Rauch *et al.*, 1999), a genitora de nosso paciente, embora tendo a mesma deleção distal, apresentava apenas dismorfias faciais brandas.

As diferenças fenotípicas e de origem identificadas em nosso paciente em comparação com outros pacientes descritos corroboram a hipótese de que as deleções 22q11.2 distais não compõe um quadro homogêneo (127). Além disso, o paciente descrito amplia o restrito rol de casos de deleção 22q11.2 distal tipo II que apresenta DCC.

Paciente P095

Paciente do sexo feminino com EP, disfunção miccional, quintos quirodáctilos encurtados bilateralmente. A investigação do histórico familiar revelou aborto anterior da genitora, um irmão com trigonocefalia e outro irmão com FOP.

Realizados cariótipo e MLPA com resultados normais, foi encaminhado para CMA que identificou alto índice de consanguinidade, com doze diferentes regiões de AOH com tamanho maior que 5Mb, nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11 e 22. As duas maiores regiões de AOH estão no braço longo do cromossomo 2 com 47,02Mb e 25,77Mb;



Figura 50. Regiões de homozigose maiores que 5Mb identificadas na paciente P095, apresentadas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11 e 22. As duas maiores regiões de AOH no braço longo do cromossomo 2 com 47,02Mb e 25,77Mb;

Além disso, foi identificada duplicação de 495 Kb na região 2q13, levando à duplicação do gene *NPHP1* (#OMIM 607100) (Figura 59). Destaca-se a posição da duplicação 2q13(110,876,905-111,371,702)x3 as regiões repetitivas nesse *locus* (em azul, embaixo). A alteração foi classificada com VOUS.

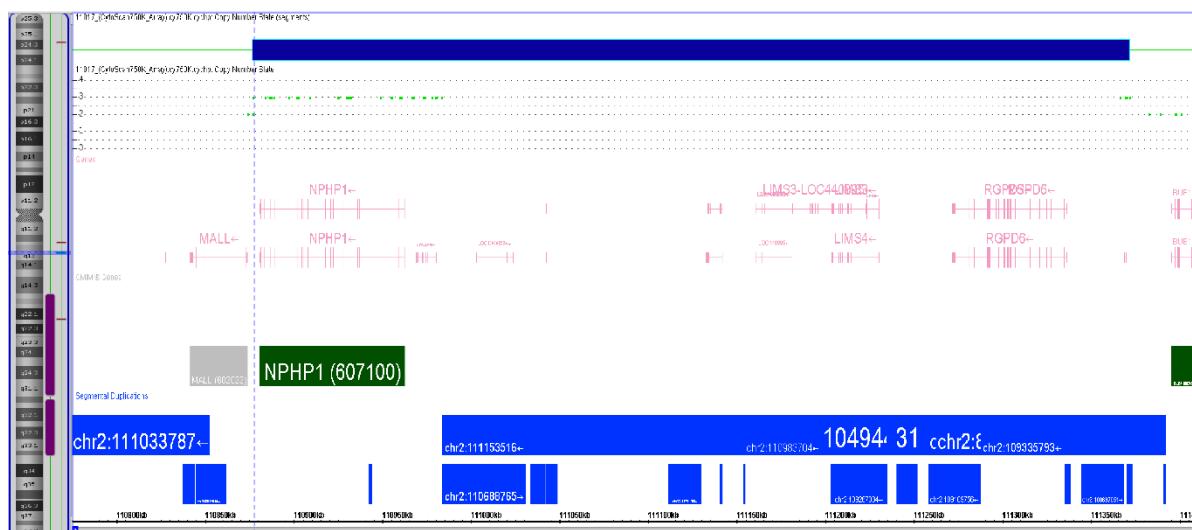


Figura 51. Alterações identificadas no cromossomo 2 da paciente P095.

O grupo de Dasouki e colaboradores realizou estudo com 134 pacientes com DCC e detalha a região 2q13 com alta frequência de CNVs nesse grupo de pacientes, associando as duplicações no gene *NPHP1* em casos de lesões valvulares, alterações de arco aórtico e TOF (129).

O caso requer melhor caracterização, e realização de exoma para identificação de outras variáveis genéticas, conforme discussão do caso P093* que apresentou deleção do mesmo gene.

PACIENTE P096

A paciente foi encaminhada por múltiplas dismorfias, sendo identificada ASD e VSD. Apresenta fronte ampla, com implantação alta de cabelos. Fendas palpebrais retas, epicanto bilateral, raiz nasal baixa, narinas antevertidas, filtro naso-labial longo e pouco marcado, apêndice pré-auricular pequeno à direita. Prega palmar única à esquerda, clinodactilia bilateral discreta. Apresenta ainda quadro de ADNPM.

O cariótipo e o MLPA não identificaram alterações. No CMA foi identificada deleção de 254 Kb na região Xq13.3. A região deletada compreende somente o gene *ABCB7* (OMIM 300135).

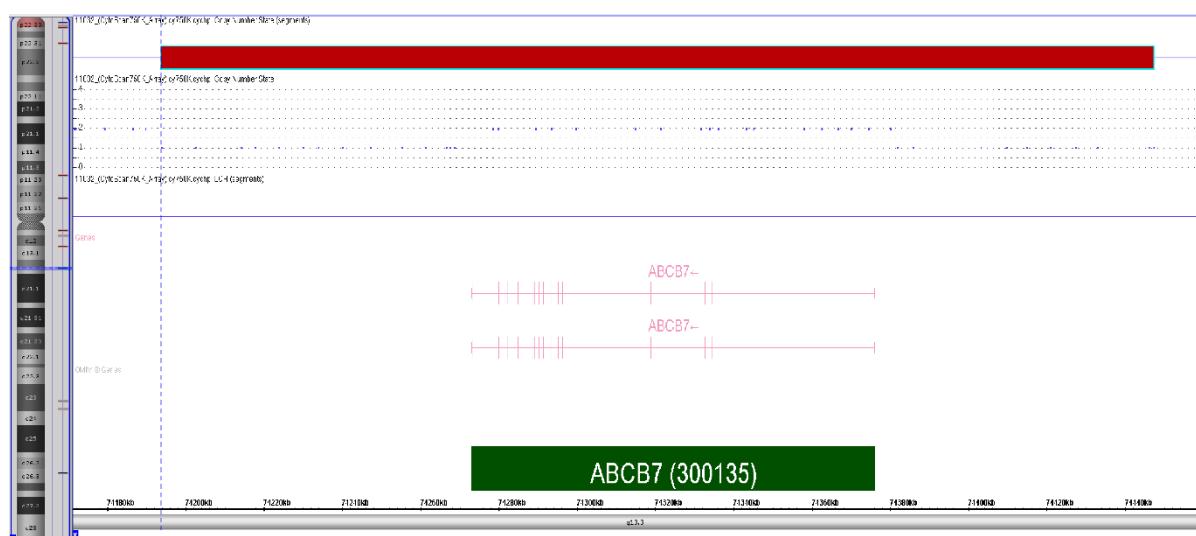


Figura 52. Deleção de 254 Kb em arr[hg19] Xq13.3(74,193,804-74,447,411)x1 com deleção completa do gene *ABCB7*.

ABCB7 é o gene causal de um distúrbio de neurodesenvolvimento denominado anemia sideroblástica com ataxia ligada ao X, uma doença mitocondrial causada por alteração no genoma nuclear tendo sido descritas

variantes de sequência e deleções causais. Em estudos com modelos animais a deleção de *ABCB7* é letal em fêmeas, tendo ainda uma associação tecido específica que altera a letalidade e patogenicidade da deleção (130). Em humanos, variantes de sequência de perda de função e deleções foram caracterizadas em mulheres portadoras do quadro sindrômico (131). Embora não tenha relação direta com o fenótipo da paciente, a alteração identificada é classificada como VOUS.

Paciente P097*

O paciente é um homem de 39 anos com diagnóstico de ventrículo esquerdo não-compactado, prolapo de valva mitral, insuficiência de valvas mitral e tricúspide. Apresenta ainda hipertrofia adenoidiana e baixa acuidade visual.

O caso chama a atenção desde o ambulatório, tendo em vista que a cardiomiopatia não compactada apresenta alta mortalidade neonatal (132) porém nosso paciente é um homem de 39 anos. A literatura descreve os casos sintomáticos e mais graves na infância, sendo os casos mais brandos e assintomáticos diagnosticados na juventude (133,134).

O CMA realizado identificou diversas regiões de AOH e um percentual de homozigose de ~3.4% indicando uma consanguinidade estimada de quarto grau (135). Foi identificada deleção de 151.5kb na região 13q12.12 (chr13:24.304.477-24.455.937).

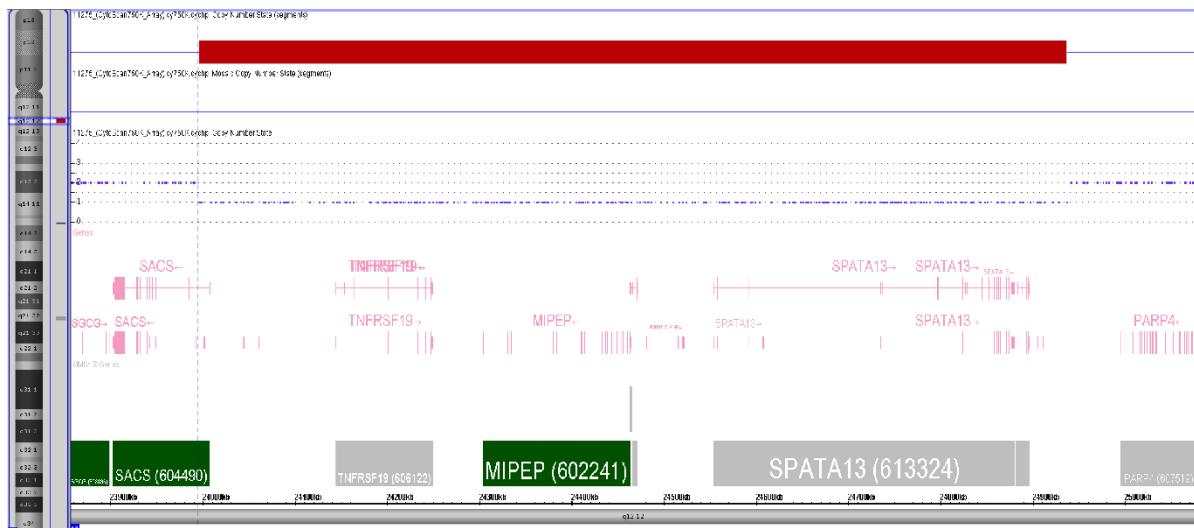


Figura 53. Deleção de 151.5kb identificada no paciente P097* envolvendo o gene *MIPEP*.

A região deletada contém os genes *SACS*, *TNFRSF19*, *MIPEP*, *C1QTNF9B*, *SPATA13* e *C1QTNF9*. Deleções e variantes de sequência em homozigose no gene *MIPEP* (OMIM 602241) foram descritas anteriormente em pacientes com miocárdio não compactado (133). Tendo em vista que a deleção identificada ocorre em heterozigose, a alteração foi inicialmente classificada como VOUS, pois requer a ocorrência de variante no alelo presente do gene *MIPEP*.

Foi realizada análise por exoma na tentativa de identificar variantes de sequência no gene *MIPEP* que caracterizaria a variante em homozigose, porém não foi identificada variante. Entretanto, o resultado do Sequenciamento de Exoma realizado revelou-se de baixa confiabilidade por limitação técnica. No sequenciamento realizado a cobertura de *reads* para esse gene já é mínima por padrão (50 *reads*). No caso em tela, a capacidade de cobertura foi ainda menor devido à presença da deleção anteriormente identificada por CMA (contagem média de 10 *reads* no gene *MIPEP*, com alguns exons chegando a 37 *reads*, e alguns com zero *reads*).

A possibilidade de variantes de sequência no gene *MIPEP* será avaliada posteriormente por sequenciamento de SANGER para ampliar a capacidade de sequenciamento, tendo em vista a deleção apresentada pelo paciente.

Na análise de exoma desse paciente foi identificada uma variante *missense* em heterozigose chr11:MYBPC3:c.2728C>A, que leva à troca de aminoácidos p.Pro910Thr. A alteração é classificada como VUS tendo em vista que apesar de ser rara na população (potencial patogênico moderado PM2), a variante identificada não tem predições patogênicas ou estudos funcionais descritos.

A variante identificada é intrigante tendo em vista que o gene *MYBPC3* (OMIM 600958) é outro dos genes candidatos à explicar a patogênese da não compactação do miocárdio ventricular, junto ao gene *MIPEP* deletado no paciente (133,134).

Wessels e colaboradores (2015) estudaram ocorrências familiares de cardiomiopatias hipertróficas e não compactadas e identificaram diversos casos de variantes de sequência em *MYBPC3* em homozigose ou heterozigotos compostos em pacientes com ventrículo esquerdo não-compactado e defeitos de septação (132).

O gene *MYBPC3* também foi associado a cardiomiopatias hipertróficas. Em um estudo que avaliou centenas de casos, se discutiu a ocorrência de variantes de sequência em diferentes genes contribuindo para a patologia. O grupo alerta para a relação entre expressividade variável de fenótipos e a necessidade de investigação aprofundada de casos de genótipo complexo (136). O caso do paciente P097* parece se adequar a essa possibilidade tendo em vista que as alterações genéticas identificadas isoladamente não justificam o quadro do paciente, mas potencialmente o efeito dessas variáveis em conjunto podem compor um genótipo causal complexo.

5.3. CASOS COM ALTERAÇÕES DE ZIGOSIDADE IDENTIFICADAS POR CMA.

Paciente P098*

Paciente do sexo masculino em atendimento no Ambulatório de genética desde 2002, retorna pela possibilidade de realização de exames diagnósticos. Foi encaminhado ao serviço por suspeita de distúrbio de desenvolvimento sexual, resistência androgênica leve. Apresenta micropênis, hipospádia períneo-escrotal. Durante investigação clínica foi identificado defeito de septação atrial (ASD), transtorno do espectro autista (TEA-nível 1 sem DI) e TDAH, prega palmar única, campodactilia de quintos quirodáctilos (familiar), hérnia inguinal bilateral. Na história familiar identificou-se que os genitores são primos em terceiro grau.

A análise por microarray corroborou o histórico familiar, identificando diversas regiões de ausência de heterozigose (AOH). Na análise, destaca-se uma região de ausência de heterozigose (AOH) de 11,2 Mb na região 10q25.1q26.11: arr [hg19] (108,864,732-120,122,033) hmz (Figura 46).

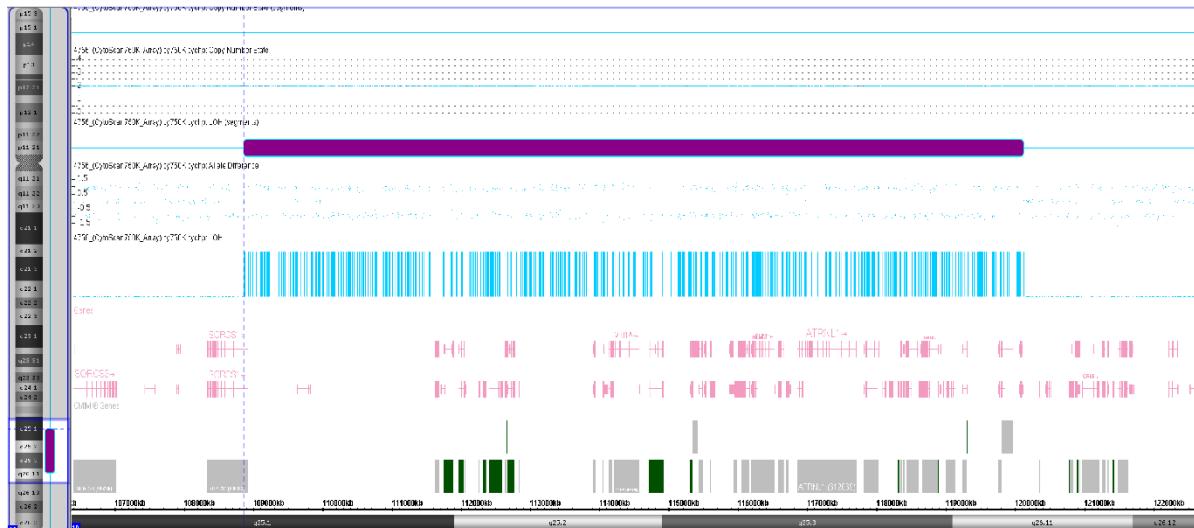


Figura 54. AOH de 11,2 Mb na região 10q25.1q26.11: arr [hg19] (108,864,732-120,122,033) hmz identificada no paciente P098*.

Essa região envolve 71 genes, dos quais 42 estão listados no OMIM.

Destaca-se a presença nessa região do gene *SHOC2* (OMIM 602775). Esse gene está envolvido na regulação da via metabólica RAS/MAPK, crítica para o desenvolvimento cardiológico, sendo relacionada às RASopatias e ao fenótipo Noonan-like com cabelo anágeno. Em Consulta ao banco ClinVar 71% das citações relacionadas a esse gene são classificadas como VOUS, provavelmente patogênicas ou patogênicas.

Na região com ausência de heterozigose encontra-se ainda o gene *SMC3* (OMIM 606062) cujas variantes de sequência têm sido relacionadas à casos da Síndrome de Cornélia de Lange tipo 3 (OMIM 610759), em que se estima ocorrência de DCC em 56% dos casos.

A alteração identificada requer investigação mais apurada da ocorrência de variantes de sequência, em especial nos genes citados, além de outros genes que poderiam justificar o quadro sindrômico do paciente.

Foi realizado sequenciamento de exoma que não identificou variantes de sequência patogênicas na região de AOH do cromossomo 10. Não foram identificadas outras variantes que justifiquem o quadro do paciente, sendo o sequenciamento de exoma de resultado inconclusivo.

PACIENTE P099

Paciente do sexo masculino, apresenta cardiopatia complexa composta por FOP, VSD, ASD, EV, TVD. Apresentava ainda características extra cardíacas de lábio leporino e fenda palatina, além de fronte ampla e nariz largo.

A análise por microarray identificou diversas regiões de ausência de heterozigose (AOH), compatível com consanguinidade. A maior região de AOH está localizada do cromossomo 2 (15,9 Mb) e a menor delas está localizada no cromossomo 11 (7,4 Mb). A AOH marcada no cromossomo X é um artefato técnico decorrente do sexo genético do paciente, que apresenta apenas um cromossomo X (Figura 47).



Figura 55. Grandes regiões de AOH no paciente P099.

A análise inicial dos genes presentes nessas regiões AOH não identificou genes potencialmente relacionados ao fenótipo de cardiopatia do paciente. Exames complementares de investigação de variantes de sequência são sugeridos para ampliação da compreensão do quadro do paciente.

Paciente P100*

Paciente do sexo masculino, original de Luziânia-GO. Apresenta ASD e FOP, alteração auditiva à esquerda, torcicolo congênito a direita e fendas palpebrais oblíquas para cima e estrabismo. Apresentou baixa estatura e baixo peso. A genitora tem diabetes, que estava descompensada no período pré-concepcional, em uso de insulina.

A análise por microarray identificou uma área de ausência de heterozigose pericentromérica de 5,99 Mb na região 11p11.2p11.12 arr[hg19] (45,560,405-51,550,787) hmz e de 13,9 Mb na região 11q11q13.3: arr[hg19] 11q11q13.3(54,827,207-68,729,545) hmz (Figura 51). Apresenta, portanto, dissomia segmentar parcial do cromossomo 11.

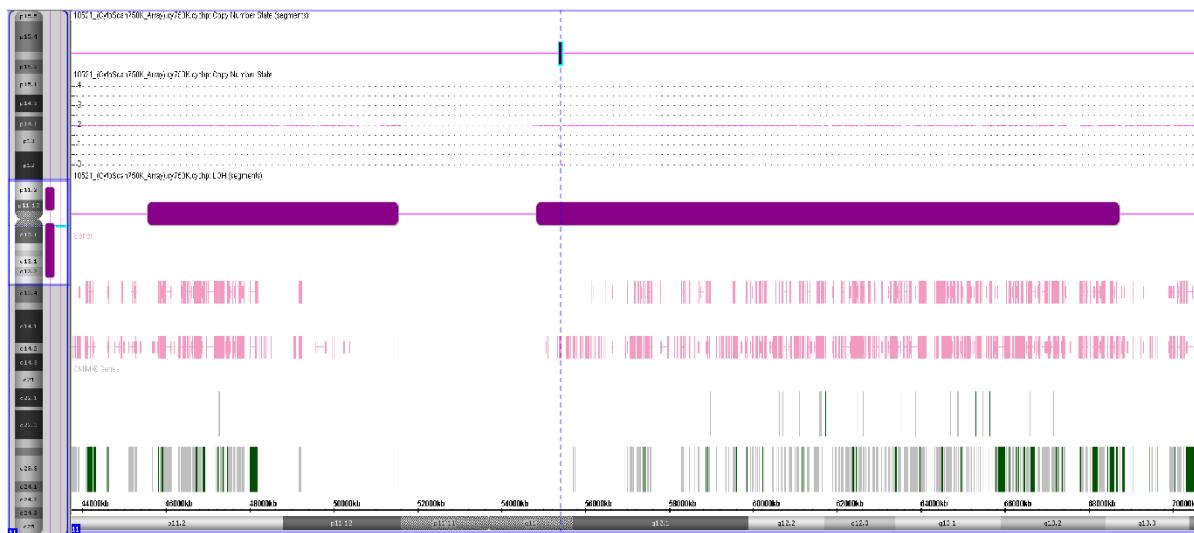


Figura 56. AOH pericentromérica de no cromossomo 11 identificada no paciente P100*.

A região alterada no braço curto do cromossomo 11 envolve 75 genes, dos quais 41 listados no OMIM. A região alterada no braço longo do cromossomo 11 envolve 454 genes, sendo 271 genes citados no OMIM. A análise inicial dos genes em homozigose nessas regiões não identificou genes relacionados ao fenótipo de cardiopatia do paciente. Desse modo, relata-se a alteração até que seja possível estabelecer alguma correlação genótipo-fenótipo. Exames complementares de investigação de variantes de sequência são necessários.

A diabetes materna é um conhecido fator de risco ambiental para a ocorrência de DCCs, com correlação epidemiológica positiva. Há forte correlação entre casos de diabetes e a hiperglicemia materna durante o primeiro trimestre de gravidez e casos de defeitos cardíacos, de grandes vasos e do tubo neural. Para casos de diabetes tipo 1, descreve-se maior ocorrência de defeitos conotruncais e de septação (137). A patogênese já estabelecida inclui o estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia que impacta vias de sinalização essenciais para a cardiogênese, como Wnt, Notch, TGF- β . Há estudos ainda que relatam alterações epigenéticas decorrentes da diabetes materna, gerando efeitos espaço temporais diversos no embrião (137).

Foi realizado ainda o sequenciamento de exoma entretanto não foram identificadas variantes patogênicas. A possibilidade de influência ambiental

complica a avaliação da correlação entre o genótipo identificado e fenótipo do paciente.

PACIENTE P101

Paciente do sexo feminino encaminhada por ADNPM e DI. Ao exame físico identificou-se dentes supranumerários, ausência de incisivos superiores e clinodactilia bilateral. Apresentou algumas crises convulsivas, e exames posteriores revelaram hidronefrose bilateral. A paciente apresenta ainda cabelos crespos, diferente de todos os familiares. O exame clínico indicava possível síndrome cardio-facio-cutânea. A investigação cardiológica identificou ASD e FOP.

No CMA foi identificada região de homozigose em arr[hg19] 7p15.3p14.1(25,363,632-37,576,674) hmz de 12,2 Mb. Estão contidos na região 110 genes, dos quais 60 apresentam descrições no OMIM.

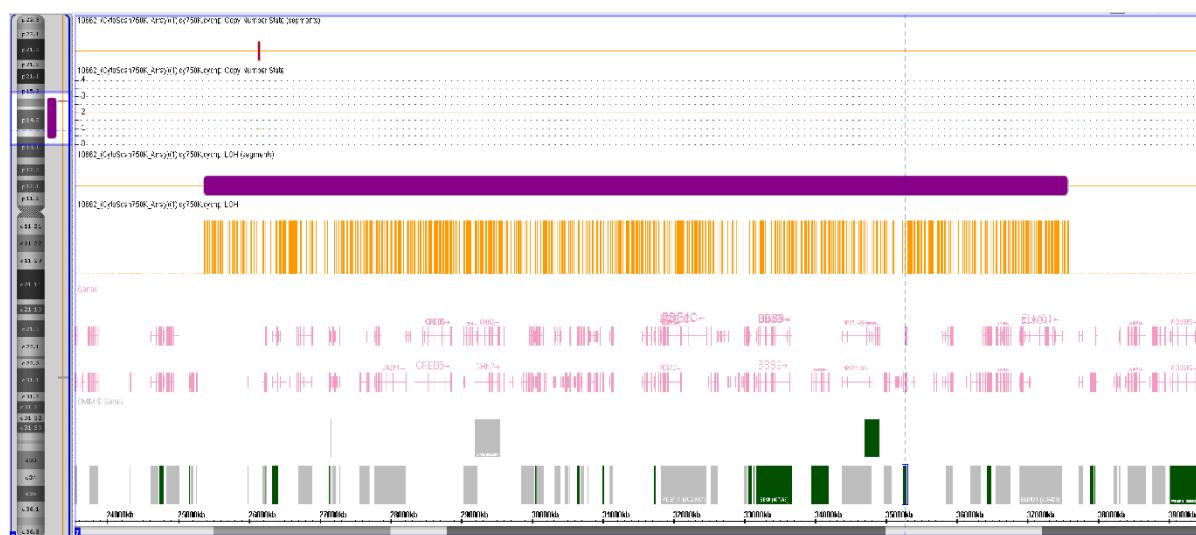


Figura 57. Região de homozigose identificada na paciente, arr[hg19] 7p15.3p14.1(25,363,632-37,576,674) hmz de 12,2 Mb.

Destaca-se que a presença de variantes de sequência em genes situados em regiões de AOH apresentam grande potencial patogênico. O gene *TBX20*,

presente na região alterada (linha pontilhada na Figura 52), codifica um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento cardíaco (21). Variantes de sequência de perda de função no gene *TBX20* já foram diretamente relacionadas a ocorrência de ASD, podendo explicar o fenótipo da paciente (138). Indica-se a realização de exames complementares para a ocorrências de variantes de sequência nesse gene.

Paciente P102*

A paciente apresenta fenótipo de ASD, além de microcefalia, telecanto e epicanto bilateralmente, raiz nasal baixa e nariz de ponta globosa, atresia de coanas, perda auditiva moderada bilateralmente, clinodactilia em quinto quirodáctilo bilateral e sindactilia do segundo e terceiro quirodáctilos bilateralmente, e *dimple* sacral. O histórico familiar não tem indicativo de consanguinidade.

Foi identificada uma região de homozigose de 26,80Mb no cromossomo 22, arr[hg19] 22q11.22q13.32(22,579,821-49,380,710) hmz. A alteração contém 453 genes, sendo 263 relacionados a doenças no OMIM. Destaca-se que AOH identificada não inclui o gene *TBX1* localizado na banda q11.21 (linha pontilhada da Figura 55).

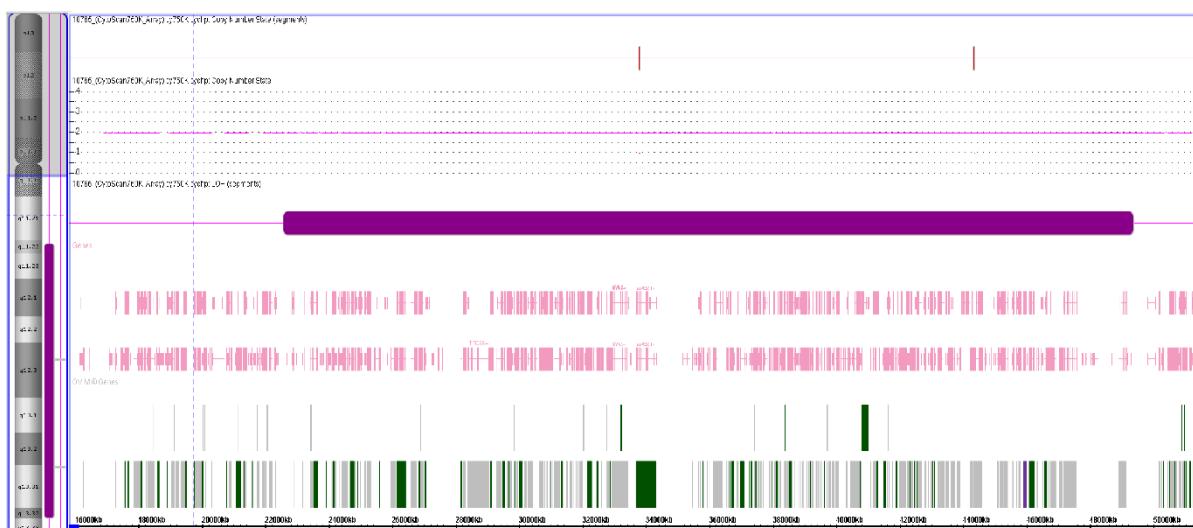


Figura 58. AOH identificada no cromossomo 22 do paciente P102*.

Foi realizada ainda investigação por exoma, entretanto o resultado foi inconclusivo, pois não identificou alterações na região de homozigose, nem outras variantes patogênicas que expliquem o quadro da paciente.

5.4. CASOS COM ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS POR EXOMA.

PACIENTE P107*

O paciente apresentou quadro cardiológico com FOP, PCA, LSVC, BAV. No exame físico foi identificada trigonocefalia, fontanela anterior patente, fendas palpebrais oblíquas para cima, fenda labial frustra, palato alto, *dimple* sacral, peso e estatura abaixo do percentil adequado.

A investigação neurológica do paciente identificou DI, TEA com estereotipias e disfunção sensorial auditiva com transtorno de linguagem (trocas fonéticas atípicas). Foi identificada em tomografia cranial relação não harmônica entre lobos frontais e o restante do encéfalo.

Durante a investigação, foi realizado Sequenciamento de Exoma em laboratório privado, onde foi identificada variante patogênica no gene *NOTCH1*, herdada do pai (*NOTCH1* (GRCh37) chr9: 136,505,007 C>Tc.4684G>A, p.Ala1562Thr- ENST00000277541, pat.)

Posteriormente foi realizada anamnese do pai, sendo identificada baixa estatura e face sindrômica, sendo solicitada investigação cardiológica, ainda pendente.

O probando apresenta valva aórtica bicúspide (BAV). A patologia que leva à formação errônea de apenas duas cúspides na transição para a artéria Aorta decorre de mecanismos de necrose inadequada, perda de fibrina e apoptose inadequada de células musculares vasculares, além da perda de matriz

extracelular e expressão aumentada de metaloproteinases que contribuem para a perda de conexão celular e apoptose (139)

Apesar da descrição de variantes de sequência em diversos genes relacionados ao fenótipo, o gene *NOTCH1* (OMIM 190198) é um gene causal confirmado para BAV (140), com variantes de sequência identificadas em casos familiares e esporádicos. O gene atua de forma direta nas decisões de destino da célula e de inibição da apoptose. A via Notch está ainda envolvida na migração das NCCs, essenciais para a formação adequada de valvas e septos cardíacos (140,33,139).

A persistência da veia cava superior esquerda (LSVC, do inglês *Persistent left superior vena cava*) é uma variação anatômica não patológica que pode ocorrer de forma isolada ou em conjunto com malformações cardíacas. É de importante notificação especialmente em casos de DCCs devido ao potencial de complicações das intervenções cirúrgicas de correção. Do ponto de vista embriológico, a anomalia decorre de uma falha na regressão da veia cardinal esquerda, que deveria ser ocluída formando o ligamento de Marshall (16). Junto ao FOP e PCA também presentes, o probando apresenta três anomalias cardiovasculares decorrentes da transição da circulação fetal para neonatal. O PCA em particular também decorre de erro na proliferação e migração de células musculares vasculares em interação com a proliferação de células endoteliais, guiadas pela estrutura da matriz extracelular. Esse processo decorre da sinalização Vegf, Tgf β e Notch (141).

O percentual de resultados obtidos com a técnica de sequenciamento de exomas (22,2%, 2 dos 9 avaliados) estão de acordo com o que é reportado na literatura. Estima-se que a capacidade de detecção dos exomas varie de 2% a 46% dos casos, sendo maior na investigação de casos que apresentem fenótipo extracardíaco (142). Destaca-se que a variabilidade fenotípica e a complexidade genômica das DCCs como grupo de estudo afetam capacidade de resolução do exoma. Em estudo de revisão da literatura sugere-se que um melhor uso da técnica depende do desenho experimental aplicado, sendo mais eficiente em estudos mais direcionados, em que o grupo de pacientes apresente a mesma DCC, por exemplo (142).

Reuter e colaboradores em um estudo recente (2020) utilizaram o sequenciamento de exoma para avaliar 111 famílias de pacientes pediátricos com DCCs. Eles identificaram variantes de sequência causais em 12,6% dos casos (14 das 111 famílias), das quais 11 famílias apresentavam características extracardíaco (86). O grupo ressaltou a mesma preocupação que levantamos no caso do paciente P097*, em que foi identificada variante em heterozigose de significado incerto, que pelas regras da ACMG não deve ser reportada. De modo similar ao nosso estudo, o grupo canadense também identificou casos de pacientes com CNVs classificados como VOUS e concomitantemente variantes de sequência não descritas ou de significado incerto. No estudo canadense eles ponderaram que aplicando regras menos restritas de classificação, os resultados de variantes relevantes para o grupo de pacientes sobe para 19,8% (22 de 111) (86).

6. REFLEXÕES SOBRE OS RESULTADOS ALCANÇADOS E PERSPECTIVAS FUTURAS.

A proposta apresentada nesse trabalho reflete um dos objetos de desejo da pesquisa em genética: identificar a etiologia dos fenótipos observados nos ambulatórios e detalhados em nossos prontuários. Do ponto de vista da pesquisadora, a intenção é sempre esmiuçar ao máximo os objetos de estudo, os dados coletados, as hipóteses que se apresentam. Entretanto, os resultados obtidos ao longo dessa investigação foram temperados pela realidade dos fatos: de que nossos “objetos” de estudo são seres humanos, inseridos em famílias de diferentes contextos, diferentes situações econômicas, sociais e geográficas, que modularam nosso acesso às informações familiares, aos detalhamentos de exames complementares, e muitas vezes limitaram até o acesso ao próprio paciente, restringindo nosso grupo amostral.

A capacidade direta de atuação dos pesquisadores envolvidos também foi modulada, tendo em vista a ousadia de realizar projetos de pesquisa científica na realidade do Brasil de 2017 a 2022, atravessada pelo contexto de uma pandemia mundial, com suas restrições de mobilidade e contato social,

limitações orçamentárias e até questionamentos ideológicos sobre a relevância da ciência.

Ainda assim, os resultados obtidos permitiram a identificação de alterações genéticas patogênicas ou provavelmente patogênicas em 89 pacientes, trazendo benefícios ao manejo clínico, ampliando as compreensões sobre prognóstico, e fornecendo aconselhamento adequado para pacientes e/ou familiares.

Esses resultados renovam a esperança e o compromisso com diagnóstico genético, tendo em vista, a capacidade atual de diagnóstico, as perspectivas trazidas pela constante revisão e evolução das tecnologias genômicas, e sua potencial implementação no laboratório de genética da UnB e nos diversos Serviços de Referência preconizados na Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras pela Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014.

Outros esforços de detalhamento dos fenótipos a nível individual se revelam cada vez mais essenciais para validação dos achados genômicos. A complexidade da etiologia das DCCs sugere a aplicação de novos olhares sobre os CNVs e variantes de sequência não causais identificadas. Um caminho consiste na realização do chamado *deep phenotyping*, na qual os componentes individuais dos fenótipos são observados e caracterizados, visando promover uma análise precisa das anormalidades fenotípicas de cada paciente naquele contexto genômico (143).

Apontamos questionamento no caso do Paciente P097*. Quando são identificadas alterações genéticas que isoladamente não justificam o quadro do paciente (VOUS, duplicações com patogenicidade pouco estudada, variantes de sequência em heterozigose, variantes de sequência que alteram *splicing*, etc.), surge a demanda pela investigação do efeito dessas variáveis em conjunto. Essa busca é especialmente importante em doenças complexas, oligogênicas, que apresenta expressividade e penetrância variáveis, como as DCCs. A literatura tem apontado para a necessidade de revisão e constante questionamento das regras vigentes de classificação de CNVs e variantes (86). Nosso grupo tem contribuído para o enriquecimento dessas discussões com artigos submetidos em revisão e já publicados (144,105).

Em outra abordagem, foi sugerida a criação do “Projeto Fenoma humano”, com a criação de bancos de dados compartilhados de características fenotípicas de estudos de coorte e populacionais. Freimer e Sabatti (2003) propõe o enfrentamento dessa complexa abordagem sugerindo benefícios como a mudança de perspectiva: ao invés de buscar genótipos comuns para uma patologia, seria possível buscar por fenótipos compartilhados em amostras populacionais genotipadas (145).

Em que pese os questionamentos éticos e econômicos dessas e de outras novas abordagens e tecnologias, apresentamos na Tabela 15 alterações identificadas nesse estudo com potencial para o estabelecimento ou ampliação de associações entre genótipo e fenótipo. Os resultados obtidos motivam a ampliação correlação genótipo-fenótipo no grupo de pacientes em alguns casos, bem como a correlação entre as alterações identificadas e os mecanismos embriológicos das DCCs em estudos futuros por meio *deep phenotyping*, de estudos com organismos modelo e estudos funcionais.

Tabela 15. Investigações sugeridas para perspectivas futuras.

GENÓTIPO	FENÓTIPO
Duplicação Xp11.22 -gene HUWE1(OMIM 330697)	DI
Duplicação e Deleção de RAF1(OMIM 164760) (Artigo em revisão)	ASD e VSD Fenótipo <i>Noonan-like</i>
Duplicação TTC8 (608132), FOXN3 (602628), JAG2 (602570) e Deleção VENTX (607158)	LVNC, BAV E FOP
Microdeleção 2q37	ASD e síndrome da microdeleção 2q37.
Microdeleção 1q43q44	ASD e agenesia do corpo caloso
Duplicação SHH (600725)	ASD e malformações múltiplas
Deleções intragênicas em TBX1 (OMIM 602054)	ASD
Deleção intragênicas em NRX1 (OMIM 600565)	ASD e Síndrome Acro-cardio-facial

Deleção intragênica em ADAMTS18 (OMIM 607512)	CoA, VSD
Deleção NPHP1 (OMIM 607100) e variante FOXC1:c.213_214insT	ASD, FOP
Duplicação NPHP1 (OMIM 607100)	FOP
Deleção distais tipo II (LCRs E-F) da SD22q11.2 (OMIM 611867)	BAV e malformação de Dandy-Walker
Deleção ABCB7 (OMIM 300135)	ASD, VSD
Deleção MIPEP (OMIM 602241)	LVNC, MVP, IVT
Variante NOTCH1: C>Tc.4684G>A	FOP, PCA, LSVC, BAV

Siglas da tabela: ASD: Defeito de septação atrial; AVSD: Defeito de septação atrioventricular completo; VSD: Defeito de septação ventricular; FOP: Forame oval patente;

LVNC: Ventrículo esquerdo não compactado; ; BAV: Valva aórtica bicúspide;

MVP: Prolapso de valva mitral; IVT: Insuficiênci a de valva tricúspide; LSVC: Persistência da persistência da veia cava superior esquerda;

Os dados levantados até o momento motivam o estabelecimento das seguintes perspectivas futuras para o encaminhamento do estudo:

- Ampliação do grupo amostral e aplicação dos exames diagnósticos através da busca ativa de pacientes que perderam segmento e do acolhimento de novos pacientes no ambulatório de genética do HUB;
- Realização de exames de sequenciamento de exoma nos pacientes em que não foram identificadas alterações por meio do fluxograma aplicado, visando a identificação de alterações genômicas patogênicas;
- Verificar a possibilidade de estabelecimento de correlação genótipo-fenótipo no grupo de pacientes, bem como a correlação entre as alterações identificadas e os mecanismos embriológicos das DCCs por meio de *deep phenotyping*, de estudos com organismos modelo e estudos funcionais.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pela investigação de etiologia genética permitiram a identificação de alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas em 71,7% dos pacientes (86 de 120) avaliados até o momento, superando a expectativa de diagnóstico apresentada na literatura e alcançando o objetivo geral do estudo realizado.

O grupo amostral que atendeu aos critérios de inclusão apresentou fenótipos variados de DCCs, alinhado com a variabilidade fenotípica descrita na literatura, apresentando defeitos simples e associações de múltiplas DCCs.

A metodologia proposta se mostrou válida para o diagnóstico clínico na realidade brasileira com 65% (78 de 120) dos diagnósticos obtidos com uso das técnicas de Cariótipo e MLPA, de menor custo financeiro. Destaca-se que essas técnicas e o CMA já estão previstas no rol de exames diagnósticos da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras pela Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014.

Ainda assim, os resultados obtidos demonstram que a presença de DCCs justificam a indicação para aplicação de técnicas moleculares como CMA pois ampliam a capacidade de detecção de casos sindrômicos ou familiares não clinicamente observados.

As relações genótipo-fenótipo foram sugeridas em diversos casos, sob a ótica da cardiogênese e dos diferentes processos e vias metabólicas envolvidas na formação do embrião humano.

Foi evidenciada a complexidade da classificação de variantes patogênicas relacionadas a DCCs com uso de NGS, em especial de sequenciamento de exoma. Ressalta-se a importância da fenotipagem para a classificação das variantes identificadas, além de propor o entendimento crítico e a experimentação de novas possibilidades de classificação, contribuindo para a evolução das classificações internacionais de alterações genômicas.

Concluído o presente trabalho, confirma-se, portanto, dados já conhecidos da pesquisa científica brasileira, que se revelam válidos também para o Distrito Federal: um importante caminho para a ampliação da capacidade diagnóstica em genética é o fortalecimento dos ambulatórios de genética, com recursos financeiros e humanos direcionados não só ao necessário atendimento clínico, mas especificamente para a ampliação da capacidade de pesquisa e diagnóstico das unidades de genética do Distrito Federal.

É urgente a superação das dificuldades burocráticas, de desconhecimento e falta de vontade política dos gestores e governantes a respeito do diagnóstico e tratamento de doenças genéticas e de doenças raras. Tais obstáculos precisam ser ultrapassados em níveis municipais, distritais e estaduais, visando a implementação prática dos serviços de referência preconizados pela Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, nos termos Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014, que já se aproxima de uma década de publicação, sem implementação plena.

Espera-se que esse trabalho contribua para essa conscientização e com a esperança renovada de poder, em breve, replicar os conhecimentos e técnicas adquiridos nesse estudo para todas e todos os pacientes brasileiros que dele necessitarem por meio do Sistema Único de Saúde.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Triedman JK, Newburger JW. Trends in Congenital Heart Disease: The Next Decade. *Circulation*. 21 de junho de 2016;133(25):2716–33.
2. Costain G, Silversides CK, Bassett AS. The importance of copy number variation in congenital heart disease. *NPJ Genom Med*. 14 de setembro de 2016;1:16031.
3. Zaidi S, Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ Res*. 17 de março de 2017;120(6):923–40.
4. Azhar M, Ware SM. Genetic and Developmental Basis of Cardiovascular Malformations. *Clin Perinatol*. março de 2016;43(1):39–53.
5. Jorgensen M, McPherson E, Zaleski C, Shivaram P, Cold C. Stillbirth: The heart of the matter. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014;164(3):691–9.
6. Ministério da Saúde, organizador. Síntese de evidências para políticas de saúde: diagnóstico precoce de cardiopatas congênitas [Internet]. 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sintese_evidencias_politicas_cardiopatias_congenitas.pdf
7. Silva LDC, Pavão T da CA, Souza JCB, Frias L de MP. Diagnóstico precoce das cardiopatias congênitas: Uma revisão integrativa. 1 [Internet]. 19 de dezembro de 2018 [citado 5 de setembro de 2019];9. Disponível em: <http://www.jmphc.com.br/jmphc/article/view/336>
8. Organização das Nações Unidas. Relatório Sobre os Objetivos de Desenvolvimento do Milénio [Internet]. 2000 [citado 30 de setembro de 2019]. Disponível em: https://www.unric.org/pt/images/stories/2015/PDF/MDG2015_PT.pdf
9. Chaix MA, Andelfinger G, Khairy P. Genetic testing in congenital heart disease: A clinical approach. *World J Cardiol*. 26 de fevereiro de 2016;8(2):180–91.
10. Tian Y, Yuan L, Goss AM, Wang T, Yang J, Lepore JJ, et al. Characterization and in vivo pharmacological rescue of a Wnt2-Gata6 pathway required for cardiac inflow tract development. *Dev Cell*. 16 de fevereiro de 2010;18(2):275–87.
11. World Health Organization WH. International statistical classification of diseases and related health problems [Internet]. World Health Organization; 2015 [citado 26 de novembro de 2020]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246208>
12. Bergersen L, Ad E, Jm G, Gr M, Rc F, Mj B, et al. Report from The International Society for Nomenclature of Paediatric and Congenital Heart Disease: cardiovascular catheterisation for congenital and paediatric cardiac disease (Part 1 - Procedural nomenclature). *Cardiol Young*. 11 de fevereiro de 2011;21(3):252–9.

13. Houyel L, Khoshnood B, Anderson RH, Lelong N, Thieulin AC, Goffinet F, et al. Population-based evaluation of a suggested anatomic and clinical classification of congenital heart defects based on the International Paediatric and Congenital Cardiac Code. *Orphanet J Rare Dis.* 3 de outubro de 2011;6:64.
14. Jacobs JP, Franklin RCG, Béland MJ, Spicer DE, Colan SD, Walters HL, et al. Nomenclature for Pediatric and Congenital Cardiac Care: Unification of Clinical and Administrative Nomenclature - The 2021 International Paediatric and Congenital Cardiac Code (IPCCC) and the Eleventh Revision of the International Classification of Diseases (ICD-11). *World J Pediatr Congenit Heart Surg.* setembro de 2021;12(5):E1–18.
15. Botto LD, Lin AE, Riehle-Colarusso T, Malik S, Correa A, National Birth Defects Prevention Study. Seeking causes: Classifying and evaluating congenital heart defects in etiologic studies. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol.* outubro de 2007;79(10):714–27.
16. Tan CMJ, Lewandowski AJ. The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life. *Fetal Diagn Ther.* 2020;47(5):373–86.
17. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 19 de junho de 2002;39(12):1890–900.
18. Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen JOB, Danis D, Gourdine JP, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res.* 8 de janeiro de 2019;47(D1):D1018–27.
19. Vincent SD, Buckingham ME. How to Make a Heart. Em: Current Topics in Developmental Biology [Internet]. Elsevier; 2010 [citado 2 de abril de 2020]. p. 1–41. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007021531090001X>
20. Lindsey SE, Butcher JT, Yalcin HC. Mechanical regulation of cardiac development. *Front Physiol* [Internet]. 21 de agosto de 2014 [citado 7 de setembro de 2020];5. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4140306/>
21. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circ Res.* 16 de janeiro de 2015;116(2):341–53.
22. Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. outubro de 2013 [citado 3 de abril de 2020];3(10). Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3784811/>
23. Gittenberger-de Groot AC, Bartelings MM, Deruiter MC, Poelmann RE. Basics of Cardiac Development for the Understanding of Congenital Heart Malformations. *Pediatric Research.* fevereiro de 2005;57(2):169–76.
24. Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell.* 22 de setembro de 2006;126(6):1037–48.

25. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68–75.
26. Sharma M, Pruitt K. Wnt Pathway: An Integral Hub for Developmental and Oncogenic Signaling Networks. *Int J Mol Sci*. 28 de outubro de 2020;21(21).
27. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. outubro de 2011;43(10):745–56.
28. Palomer E, Buechler J, Salinas PC. Wnt Signaling Dereulation in the Aging and Alzheimer's Brain. *Front Cell Neurosci [Internet]*. 2019 [citado 2 de abril de 2021];13. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00227/full>
29. Wu G, Ge J, Huang X, Hua Y, Mu D. Planar cell polarity signaling pathway in congenital heart diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:589414.
30. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;291:21–71.
31. Boutros M, Mlodzik M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev*. maio de 1999;83(1–2):27–37.
32. Brunt L, Scholpp S. The function of endocytosis in Wnt signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(5):785–95.
33. Luxán G, D'Amato G, MacGrogan D, de la Pompa JL. Endocardial Notch Signaling in Cardiac Development and Disease. *Circ Res*. 8 de janeiro de 2016;118(1):e1–18.
34. Krebs LT, Deftos ML, Bevan MJ, Gridley T. The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Dev Biol*. 1º de outubro de 2001;238(1):110–9.
35. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 1º de março de 2004;131(5):965–73.
36. MacGrogan D, Luxán G, de la Pompa JL. Genetic and functional genomics approaches targeting the Notch pathway in cardiac development and congenital heart disease. *Brief Funct Genomics*. janeiro de 2014;13(1):15–27.
37. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *WIREs Developmental Biology*. 2013;2(1):47–63.
38. Azhar M, Schultz JEJ, Grupp I, Dorn GW, Meneton P, Molin DGM, et al. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev*. outubro de 2003;14(5):391–407.
39. Yamagishi T, Ando K, Nakamura H. Roles of TGFbeta and BMP during valvulo-septal endocardial cushion formation. *Anat Sci Int*. setembro de 2009;84(3):77–87.

40. Wang J, Greene SB, Martin JF. BMP signaling in congenital heart disease: new developments and future directions. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol.* junho de 2011;91(6):441–8.
41. Barnes RM, Black BL. Nodal Signaling and Congenital Heart Defects. Em: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H, organizadores. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology* [Internet]. Tokyo: Springer; 2016 [citado 18 de agosto de 2020]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500272/>
42. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCL de SE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal.* 20 de março de 2018;16(1):11.
43. Gabriel GC, Young CB, Lo CW. Role of cilia in the pathogenesis of congenital heart disease. *Semin Cell Dev Biol.* fevereiro de 2021;110:2–10.
44. Fernandes-Silva H, Correia-Pinto J, Moura RS. Canonical Sonic Hedgehog Signaling in Early Lung Development. *Journal of Developmental Biology.* março de 2017;5(1):3.
45. Digilio MC, Pugnaloni F, De Luca A, Calcagni G, Baban A, Dentici ML, et al. Atrioventricular canal defect and genetic syndromes: The unifying role of sonic hedgehog. *Clin Genet.* fevereiro de 2019;95(2):268–76.
46. Washington Smoak I, Byrd NA, Abu-Issa R, Goddeeris MM, Anderson R, Morris J, et al. Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Developmental Biology.* 15 de julho de 2005;283(2):357–72.
47. Bertola DR, Castro MAA, Yamamoto GL, Honjo RS, Ceroni JR, Buscarilli MM, et al. Phenotype-genotype analysis of 242 individuals with RASopathies: 18-year experience of a tertiary center in Brazil. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* dezembro de 2020;184(4):896–911.
48. Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev.* junho de 2009;19(3):230–6.
49. Jhang WK, Choi JH, Lee BH, Kim GH, Yoo HW. Cardiac Manifestations and Associations with Gene Mutations in Patients Diagnosed with RASopathies. *Pediatr Cardiol.* 1º de dezembro de 2016;37(8):1539–47.
50. De Lartigue,. VEGF Remains Central Target for Antiangiogenic Therapy Despite Challenges [Internet]. OncLive. 2016 [citado 20 de maio de 2021]. Disponível em: <https://www.onclive.com/view/vegf-remains-central-target-for-antiangiogenic-therapy-despite-challenges>
51. Lambrechts D, Carmeliet P. Genetics in zebrafish, mice, and humans to dissect congenital heart disease: insights in the role of VEGF. *Curr Top Dev Biol.* 2004;62:189–224.

52. Gu C, Rodriguez ER, Reimert DV, Shu T, Fritzsch B, Richards LJ, et al. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell*. julho de 2003;5(1):45–57.
53. Shabana NA, Shahid SU, Irfan U. Genetic Contribution to Congenital Heart Disease (CHD). *Pediatr Cardiol*. janeiro de 2020;41(1):12–23.
54. Stevens CA, Bhakta MG. Cardiac abnormalities in the Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet*. 20 de novembro de 1995;59(3):346–8.
55. Williams K, Carson J, Lo C. Genetics of Congenital Heart Disease. *Biomolecules* [Internet]. 16 de dezembro de 2019 [citado 19 de outubro de 2020];9(12). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995556/>
56. Barisón MJ, Pereira IT, Waloski Robert A, Dallagiovanna B. Reorganization of Metabolism during Cardiomyogenesis Implies Time-Specific Signaling Pathway Regulation. *Int J Mol Sci*. 29 de janeiro de 2021;22(3).
57. Figueiredo ACV. Identificação de regiões genômicas candidatas à etiologia genética de cardiopatia congênita associada à deficiência intelectual. 5 de agosto de 2016 [citado 23 de novembro de 2020]; Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/21782>
58. Diab NS, Barish S, Dong W, Zhao S, Allington G, Yu X, et al. Molecular Genetics and Complex Inheritance of Congenital Heart Disease. *Genes* (Basel). 30 de junho de 2021;12(7):1020.
59. Ang SY, Uebersohn A, Spencer CI, Huang Y, Lee JE, Ge K, et al. KMT2D regulates specific programs in heart development via histone H3 lysine 4 di-methylation. *Development*. 1º de março de 2016;143(5):810–21.
60. Williams SR, Aldred MA, Der Kaloustian VM, Halal F, Gowans G, McLeod DR, et al. Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *Am J Hum Genet*. 13 de agosto de 2010;87(2):219–28.
61. Bajolle F, Zaffran S, Bonnet D. Genetics and embryological mechanisms of congenital heart diseases. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 1º de janeiro de 2009;102(1):59–63.
62. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *PNAS*. 21 de julho de 2009;106(29):12031–6.
63. Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med*. 21 de janeiro de 2010;362(3):239–52.
64. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JAS, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 19 de 2015;1:15071.

65. Fahed A, Gelb B, Seidman J, E Seidman C. Genetics of Congenital Heart Disease: The Glass Half Empty. *Circulation research*. 15 de fevereiro de 2013;112:707–20.
66. Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, et al. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res*. outubro de 2008;64(4):358–63.
67. Lavrichenko K, Johansson S, Jonassen I. Comprehensive characterization of copy number variation (CNV) called from array, long- and short-read data. *BMC Genomics*. 17 de novembro de 2021;22:826.
68. Geng J, Picker J, Zheng Z, Zhang X, Wang J, Hisama F, et al. Chromosome microarray testing for patients with congenital heart defects reveals novel disease causing loci and high diagnostic yield. *BMC Genomics [Internet]*. 17 de dezembro de 2014 [citado 5 de setembro de 2019];15(1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378009/>
69. Jansen F a. R, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, et al. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. janeiro de 2015;45(1):27–35.
70. Saliba A, Figueiredo ACV, Baroneza JE, Afiune JY, Pic-Taylor A, Oliveira SF, et al. Genetic and genomics in congenital heart disease: a clinical review. *J Pediatr (Rio J)*. 14 de agosto de 2019;
71. Du Q, de la Morena MT, van Oers NSC. The Genetics and Epigenetics of 22q11.2 Deletion Syndrome. *Front Genet*. 2019;10:1365.
72. Burnside RD. 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features. *Cytogenet Genome Res*. 2015;146(2):89–99.
73. Strachan T, Read A. Genética Molecular Humana. Artmed Editora; 2016. 810 p.
74. Karbarz M. Consequences of 22q11.2 Microdeletion on the Genome, Individual and Population Levels. *Genes (Basel)*. 22 de agosto de 2020;11(9):E977.
75. Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Immunol Rev*. 2019;287(1):186–201.
76. Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, et al. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*. agosto de 2011;159(2):332-339.e1.
77. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL, et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 20 de 2018;138(21):e653–711.

78. Pawlak M, Niescierowicz K, Winata CL. Decoding the Heart through Next Generation Sequencing Approaches. *Genes (Basel)*. 7 de junho de 2018;9(6).
79. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*. 1º de setembro de 1960;20(3):613–6.
80. ISCN 2020 | Karger Book [Internet]. [citado 11 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www.karger.com/Book/Home/279152>
81. Peyvandi S, Lupo PJ, Garbarini J, Woyciechowski S, Edman S, Emanuel BS, et al. 22q11.2 deletions in patients with conotruncal defects: data from 1,610 consecutive cases. *Pediatr Cardiol*. outubro de 2013;34(7):1687–94.
82. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 14 de maio de 2010;86(5):749–64.
83. Danielsson K, Mun LJ, Lordemann A, Mao J, Lin CHJ. Next-generation sequencing applied to rare diseases genomics. *Expert Rev Mol Diagn*. maio de 2014;14(4):469–87.
84. Illumina, Inc. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2020;16.
85. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. maio de 2015;17(5):405–23.
86. Reuter MS, Chaturvedi RR, Liston E, Manshaei R, Aul RB, Bowdin S, et al. The Cardiac Genome Clinic: implementing genome sequencing in pediatric heart disease. *Genet Med*. junho de 2020;22(6):1015–24.
87. Briggs LE, Kakarla J, Wessels A. The pathogenesis of atrial and atrioventricular septal defects with special emphasis on the role of the dorsal mesenchymal protrusion. *Differentiation*. julho de 2012;84(1):117–30.
88. Sund KL, Rehder CW. Detection and reporting of homozygosity associated with consanguinity in the clinical laboratory. *Hum Hered*. 2014;77(1–4):217–24.
89. Kalsner L, Chamberlain SJ. Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 duplication syndromes. *Pediatr Clin North Am*. junho de 2015;62(3):587–606.
90. Cubillos-Rojas M, Schneider T, Hadjebi O, Pedrazza L, de Oliveira JR, Langa F, et al. The HERC2 ubiquitin ligase is essential for embryonic development and regulates motor coordination. *Oncotarget*. 30 de agosto de 2016;7(35):56083–106.

91. Morton SU, Quiat D, Seidman JG, Seidman CE. Genomic frontiers in congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 16 de julho de 2021;1–17.
92. Dorà E, Price DJ, Mason JO. Loss of Pax6 Causes Regional Changes in Dll1 Expression in Developing Cerebral Cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience [Internet].* 2019 [citado 18 de abril de 2022];13. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00078>
93. Souza VS de, Cunha GCR da, Versiani BR, Oliveira CP de, Rosa MTAS, Oliveira SF de, et al. Characterization of Associated Nonclassical Phenotypes in Patients with Deletion in the WAGR Region Identified by Chromosomal Microarray: New Insights and Literature Review. *MSY.* 11 de fevereiro de 2022;1–15.
94. Gianolio L, Fumagalli M, Manfredini V, Mannarino S, Giacomet V, Zuccotti GV. Ventricular septal defect and aortic hypoplasia in congenital cytomegalovirus infection: occasional finding or underdetected correlation? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 28 de abril de 2021;1–3.
95. Luo C, Yang YF, Yin BL, Chen JL, Huang C, Zhang WZ, et al. Microduplication of 3p25.2 encompassing RAF1 associated with congenital heart disease suggestive of Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* agosto de 2012;158A(8):1918–23.
96. Riazuddin SA, Iqbal M, Wang Y, Masuda T, Chen Y, Bowne S, et al. A Splice-Site Mutation in a Retina-Specific Exon of BBS8 Causes Nonsyndromic Retinitis Pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 14 de maio de 2010;86(5):805–12.
97. May-Simera HL, Petralia RS, Montcouquiol M, Wang YX, Szarama KB, Liu Y, et al. Ciliary proteins Bbs8 and Ift20 promote planar cell polarity in the cochlea. *Development.* 1º de fevereiro de 2015;142(3):555–66.
98. Samaan G, Yugo D, Rajagopalan S, Wall J, Donnell R, Goldowitz D, et al. Foxn3 is essential for craniofacial development in mice and a putative candidate involved in human congenital craniofacial defects. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 de setembro de 2010;400(1):60–5.
99. Zhang J, Hu Z, Wen C, Liao Q, He B, Peng J, et al. MicroRNA-182 promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXN3 in gallbladder cancer. *Oncol Lett.* março de 2021;21(3):200.
100. Naumann B, Schmidt J, Olsson L. FoxN3 is necessary for the development of the interatrial septum, the ventricular trabeculae and the muscles at the head/trunk interface in the African clawed frog, *Xenopus laevis* (Lissamphibia: Anura: Pipidae). *Dev Dyn.* maio de 2019;248(5):323–36.
101. D'Amato G, Luxán G, de la Pompa JL. Notch signalling in ventricular chamber development and cardiomyopathy. *FEBS J.* dezembro de 2016;283(23):4223–37.
102. Castro Colabianchi AM, Revinski DR, Encinas PI, Baez MV, Monti RJ, Rodríguez Abinal M, et al. Notch1 is asymmetrically distributed from the

beginning of embryogenesis and controls the ventral center. *Development*. 17 de julho de 2018;145(14):dev159368.

103. Samocha KE, Robinson EB, Sanders SJ, Stevens C, Sabo A, McGrath LM, et al. A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease. *Nat Genet*. 1º de setembro de 2014;46(9):944–50.
104. Fulcoli FG, Franzese M, Liu X, Zhang Z, Angelini C, Baldini A. Rebalancing gene haploinsufficiency in vivo by targeting chromatin. *Nat Commun*. 3 de junho de 2016;7:11688.
105. Moretti PN, Figueiredo ACV, Saliba A, Versiani BR, Oliveira SF, Pic-Taylor A, et al. Genotype and phenotype correlation in a family with a 2q37 deletion downstream of HDAC4. *Am J Med Genet A*. agosto de 2020;182(8):1861–4.
106. Nagamani SCS, Erez A, Bay C, Pettigrew A, Lalani SR, Herman K, et al. Delineation of a deletion region critical for corpus callosal abnormalities in chromosome 1q43-q44. *Eur J Hum Genet*. fevereiro de 2012;20(2):176–9.
107. Wu XL, Li R, Fu F, Pan M, Han J, Yang X, et al. Chromosome microarray analysis in the investigation of children with congenital heart disease. *BMC Pediatr*. 04 de 2017;17(1):117.
108. Scelsa B, Bedeschi FM, Guerneri S, Lalatta F, Introvini P. Partial Trisomy of 7q: Case Report and Literature Review. *J Child Neurol*. 1º de maio de 2008;23(5):572–9.
109. Tsuchiya KD, Opheim KE, Hannibal MC, Hing AV, Glass IA, Raff ML, et al. Unexpected structural complexity of supernumerary marker chromosomes characterized by microarray comparative genomic hybridization. *Molecular Cytogenetics*. 21 de abril de 2008;1(1):7.
110. Chen M, Yang YS, Shih JC, Lin WH, Lee DJ, Lin YS, et al. Microdeletions/duplications involving TBX1 gene in fetuses with conotruncal heart defects which are negative for 22q11.2 deletion on fluorescence in-situ hybridization. *Ultrasound Obstet Gynecol*. abril de 2014;43(4):396–403.
111. Piper M, Barry G, Hawkins J, Mason S, Lindwall C, Little E, et al. NFIA Controls Telencephalic Progenitor Cell Differentiation through Repression of the Notch Effector Hes1. *J Neurosci*. 7 de julho de 2010;30(27):9127–39.
112. Zhang Y, Lin CM, Zheng XL, Abuduxikuer K. A novel NFIA gene nonsense mutation in a Chinese patient with macrocephaly, corpus callosum hypoplasia, developmental delay, and dysmorphic features. *Mol Genet Genomic Med*. novembro de 2020;8(11):e1492.
113. Rao A, O'Donnell S, Bain N, Meldrum C, Shorter D, Goel H. An intragenic deletion of the NFIA gene in a patient with a hypoplastic corpus callosum, craniofacial abnormalities and urinary tract defects. *Eur J Med Genet*. fevereiro de 2014;57(2–3):65–70.

114. Chen X, Shen Y, Zhang F, Chiang C, Pillalamarri V, Blumenthal I, et al. Molecular analysis of a deletion hotspot in the NRXN1 region reveals the involvement of short inverted repeats in deletion CNVs. *Am J Hum Genet.* 7 de março de 2013;92(3):375–86.
115. Al Shehhi M, Forman EB, Fitzgerald JE, McInerney V, Krawczyk J, Shen S, et al. NRXN1 deletion syndrome; phenotypic and penetrance data from 34 families. *Eur J Med Genet.* março de 2019;62(3):204–9.
116. Raciti M, Salma J, Spulber S, Gaudenzi G, Khalajzeyqami Z, Conti M, et al. NRXN1 Deletion and Exposure to Methylmercury Increase Astrocyte Differentiation by Different Notch-Dependent Transcriptional Mechanisms. *Front Genet.* 2019;10:593.
117. Santos-Rebouças CB, de Almeida LG, Belet S, Dos Santos SR, Ribeiro MG, da Silva AFA, et al. Novel microduplications at Xp11.22 including HUWE1: clinical and molecular insights into these genomic rearrangements associated with intellectual disability. *J Hum Genet.* abril de 2015;60(4):207–11.
118. Nagy O, Baráth S, Ujfalusi A. The role of microRNAs in congenital heart disease. *EJIFCC.* 24 de junho de 2019;30(2):165–78.
119. Islas JF, Moreno-Cuevas JE. A MicroRNA Perspective on Cardiovascular Development and Diseases: An Update. Em: International journal of molecular sciences. 2018.
120. Meloni VA, Guilherme RS, Oliveira MM, Migliavacca M, Takeno SS, Sobreira NLM, et al. Cytogenomic delineation and clinical follow-up of two siblings with an 8.5 Mb 6q24.2-q25.2 deletion inherited from a paternal insertion. *Am J Med Genet A.* setembro de 2014;164A(9):2378–84.
121. Ye S, Yang N, Lu T, Wu T, Wang L, Pan YH, et al. Adamts18 modulates the development of the aortic arch and common carotid artery. *iScience.* 25 de junho de 2021;24(6):102672.
122. Boone PM, Campbell IM, Baggett BC, Soens ZT, Rao MM, Hixson PM, et al. Deletions of recessive disease genes: CNV contribution to carrier states and disease-causing alleles. *Genome Res.* setembro de 2013;23(9):1383–94.
123. Datta P, Cribbs JT, Seo S. Differential requirement of NPHP1 for compartmentalized protein localization during photoreceptor outer segment development and maintenance. *PLoS One.* 2021;16(5):e0246358.
124. Gripp KW, Hopkins E, Jenny K, Thacker D, Salvin J. Cardiac anomalies in Axenfeld-Rieger syndrome due to a novel FOXC1 mutation. *Am J Med Genet A.* janeiro de 2013;161A(1):114–9.
125. Gauthier AC, Wiggs JL. Childhood glaucoma genes and phenotypes: Focus on FOXC1 mutations causing anterior segment dysgenesis and hearing loss. *Exp Eye Res.* janeiro de 2020;190:107893.

126. Fuse N, Takahashi K, Yokokura S, Nishida K. Novel mutations in the FOXC1 gene in Japanese patients with Axenfeld-Rieger syndrome. *Mol Vis*. 27 de junho de 2007;13:1005–9.
127. Mikhail FM, Burnside RD, Rush B, Ibrahim J, Godshalk R, Rutledge SL, et al. The recurrent distal 22q11.2 microdeletions are often de novo and do not represent a single clinical entity: a proposed categorization system. *Genet Med*. janeiro de 2014;16(1):92–100.
128. Rauch A, Pfeiffer RA, Leipold G, Singer H, Tigges M, Hofbeck M. A novel 22q11.2 microdeletion in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet*. fevereiro de 1999;64(2):659–66.
129. Dasouki MJ, Wakil SM, Al-Harazi O, Alkorashy M, Muiya NP, Andres E, et al. New Insights into the Impact of Genome-Wide Copy Number Variations on Complex Congenital Heart Disease in Saudi Arabia. *OMICS*. janeiro de 2020;24(1):16–28.
130. Pondarré C, Antiochos BB, Campagna DR, Clarke SL, Greer EL, Deck KM, et al. The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet*. 15 de março de 2006;15(6):953–64.
131. Protasova MS, Grigorenko AP, Tyazhelova TV, Andreeva TV, Reshetov DA, Gusev FE, et al. Whole-genome sequencing identifies a novel ABCB7 gene mutation for X-linked congenital cerebellar ataxia in a large family of Mongolian ancestry. *Eur J Hum Genet*. abril de 2016;24(4):550–5.
132. Wessels MW, Herkert JC, Frohn-Mulder IM, Dalinghaus M, van den Wijngaard A, de Krijger RR, et al. Compound heterozygous or homozygous truncating MYBPC3 mutations cause lethal cardiomyopathy with features of noncompaction and septal defects. *Eur J Hum Genet*. julho de 2015;23(7):922–8.
133. Eldomery MK, Akdemir ZC, Vögtle FN, Charng WL, Mulica P, Rosenfeld JA, et al. MIPEP recessive variants cause a syndrome of left ventricular non-compaction, hypotonia, and infantile death. *Genome Med*. 1º de novembro de 2016;8(1):106.
134. Srivastava S, Yavari M, Al-Abcha A, Banga S, Abela G. Ventricular non-compaction review. *Heart Fail Rev*. 7 de julho de 2021;
135. Wang JC, Ross L, Mahon LW, Owen R, Hemmat M, Wang BT, et al. Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: evaluating the incidence and clinical utility. *Eur J Hum Genet*. maio de 2015;23(5):663–71.
136. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledueil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 6 de maio de 2003;107(17):2227–32.

137. Basu M, Garg V. Maternal hyperglycemia and fetal cardiac development: Clinical impact and underlying mechanisms. *Birth Defects Res.* 1º de dezembro de 2018;110(20):1504–16.
138. Monroy-Muñoz IE, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Muñoz-Medina JE, Angeles-Martínez J, García-Trejo JJ, et al. Novel mutations in the transcriptional activator domain of the human TBX20 in patients with atrial septal defect. *Biomed Res Int.* 2015;2015:718786.
139. Harrison OJ, Visan AC, Moorjani N, Modi A, Salhiyyah K, Torrens C, et al. Defective NOTCH signaling drives increased vascular smooth muscle cell apoptosis and contractile differentiation in bicuspid aortic valve aortopathy: A review of the evidence and future directions. *Trends Cardiovasc Med.* fevereiro de 2019;29(2):61–8.
140. Garg V. Notch Signaling in Aortic Valve Development and Disease. Em: Nakanishi T, Markwald RR, Baldwin HS, Keller BB, Srivastava D, Yamagishi H, organizadores. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology* [Internet]. Tokyo: Springer; 2016 [citado 19 de abril de 2022]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500291/>
141. Ovali F. Molecular and Mechanical Mechanisms Regulating Ductus Arteriosus Closure in Preterm Infants. *Front Pediatr.* 25 de agosto de 2020;8:516.
142. Broberg M, Hästbacka J, Helle E. From Stem Cells to Populations—Using hiPSC, Next-Generation Sequencing, and GWAS to Explore the Genetic and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Defects. *Genes (Basel).* 16 de junho de 2021;12(6):921.
143. Robinson PN. Deep phenotyping for precision medicine. *Hum Mutat.* maio de 2012;33(5):777–80.
144. Vaqueiro AC, de Oliveira CP, Cordoba MS, Versiani BR, de Carvalho CX, Alves Rodrigues PG, et al. Expanding the spectrum of TBL1XR1 deletion: Report of a patient with brain and cardiac malformations. *Eur J Med Genet.* janeiro de 2018;61(1):29–33.
145. Freimer N, Sabatti C. The human genome project. *Nat Genet.* maio de 2003;34(1):15–21.

9. APÊNDICES

9.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

9.2. ARTIGOS PUBLICADOS

Saliba, A., **Figueiredo, A.C.V.**, Baroneza, J.E., Afiune, J.Y., Pic-Taylor, A., Oliveira, S.F., Mazzeu, J.F., 2019. Genetic and genomics in congenital heart disease: a clinical review. *J Pediatr (Rio J)*.
<https://doi.org/10.1016/j.jped.2019.07.004>

Moretti, P.N., **Figueiredo, A.C.V.**, Saliba, A., Versiani, B.R., Oliveira, S.F., Pic-Taylor, A., Mazzeu, J.F., 2020. Genotype and phenotype correlation in a family with a 2q37 deletion downstream of HDAC4. *Am J Med Genet A* 182, 1861–1864. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61620>

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1- SONDAS PRESENTES NO KIT DE MLPA P250.

Identificação da sonda	Tipo	Gene	Posição genômica	Região avaliada
01082-L15012	Teste	<i>IL17RA</i>	22-015.959666	CES
05457-L07613	Teste	<i>SLC25A18</i>	22-016.423311	CES
01767-L07389	Teste	<i>BID</i>	22-016.606684	CES
05458-L04861	Teste	<i>MICAL3</i>	22-016.704656	CES
07528-L04863	Teste	<i>USP18</i>	22-017.012922	CES
05462-L05809	Teste	<i>CLTCL1</i>	22-017.621598	LCR22A – LCR22B
01214-L02328	Teste	<i>HIRA</i>	22-017.699015	LCR22A – LCR22B
05463-L05808	Teste	<i>CDC45</i>	22-017.847478	LCR22A – LCR22B
01218-L06270	Teste	<i>CLDN5</i>	22-017.891319	LCR22A – LCR22B
05464-L10114	Teste	<i>GP1BB</i>	22-018.091521	LCR22A – LCR22B
05408-L07614	Teste	<i>TBX1</i>	22-018.127111	LCR22A – LCR22B
10810-L14347	Teste	<i>TBX1</i>	22-018.133286	LCR22A – LCR22B
01223-L05814	Teste	<i>TXNRD2</i>	22-018.266225	LCR22A – LCR22B
08475-L08486	Teste	<i>DGCR8</i>	22-018.453612	LCR22A – LCR22B
05927-L07395	Teste	<i>ZNF74</i>	22-019.079428	LCR22B – LCR22C
01227-L05815	Teste	<i>KLHL22</i>	22-019.173307	LCR22B – LCR22C
01231-L15877	Teste	<i>MED15</i>	22-019.266745	LCR22B – LCR22C
01235-L00773	Teste	<i>SNAP29</i>	22-019.572014	LCR22C – LCR22D
01521-L00951	Teste	<i>LZTR1</i>	22-019.679191	LCR22C – LCR22D
13302-L15009	Teste	<i>HIC2</i>	22-020.129442	LCR22D – LCR22E
07529-L04870	Teste	<i>PPIL2</i>	22-020.379685	LCR22D – LCR22E
13299-L14649	Teste	<i>TOP3B</i>	22-020.652996	LCR22D – LCR22E
08484-L09139	Teste	<i>RTDR1 (RSPH14)</i>	22-021.734047	LCR22E – LCR22F
08478-L08489	Teste	<i>GNAZ</i>	22-021.795392	LCR22E – LCR22F
08479-L08490	Teste	<i>RTDR1 (RSPH14)</i>	22-021.812539	LCR22E – LCR22F
05932-L04872	Teste	<i>RAB36</i>	22-021.817561	LCR22E – LCR22F
05928-L07969	Teste	<i>SMARCB1</i>	22-022.459370	LCR22F – LCR22G
05933-L05812	Teste	<i>SMARCB1</i>	22-022.506362	LCR22F – LCR22G
08481-L08492	Teste	<i>SNRPD3</i>	22-023.283701	LCR22G – LCR22H
12093-L15011	Controle	<i>SLC25A4</i>	04-186.303263	4q35-qter
01217-L00694	Controle	<i>KLKB1</i>	04-187.390323	4q35-qter
01243-L07392	Controle	<i>PPP1R3B</i>	08-009.036240	8p23
01240-L00787	Controle	<i>MSRA</i>	08-010.102752	8p23
01226-L03844	Controle	<i>GATA4</i>	08-011.653542	8p23
05059-L07380	Controle	<i>EHMT1</i>	09-139.731001	9q34.3
05058-L07382	Controle	<i>EHMT1</i>	09-139.805147	9q34.3
01225-L09140	Controle	<i>GATA3</i>	10-008.140560	10p14 DGR2
07636-L07321	Controle	<i>GATA3</i>	10-008.155803	10p14 DGR2
01232-L17068	Controle	<i>TCEB1P3 REGION</i>	10-010.588971	10p14 DGR2

01234-L00781	Controle	<i>CELF2-region</i>	10-011.017024	10p14 DGR2
01522-L00952	Controle	<i>CELF2</i>	10-011.247524	10p14 DGR2
08480-L15878	Controle	<i>NEBL</i>	10-021.226273	10p14 DGR2
01735-L07385	Controle	<i>RPH3AL</i>	17-000.169259	17p13.3
04081-L25903	Controle	<i>RPH3AL</i>	17-000.183588	17p13.3
01238-L07390	Controle	<i>GEMIN4</i>	17-000.596608	17p13.3
13603-L03531	Controle	<i>YWHAE</i>	17-001.211255	17p13.3
01093-L00661	Controle	<i>ARSA</i>	22-049.413270	22q13
06787-L07383	Controle	<i>SHANK3</i>	22-049.507581	22q13

Relação de sondas presentes no kit P250 (MRC-Holland). Na posição genômica identifica-se o cromossomo e a posição genômica de início da sonda. As sondas apresentam tamanhos entre 129 e 487 bp. As sondas destacadas em vermelho estão localizadas na região da deleção típica de 3Mb da Síndrome 22q11.2, que se apresenta entre as regiões de repetição de poucas cópias LCR22A e LCR22D (MRC-Holland).

10.2. ANEXO 2- SONDAS PRESENTES NO KIT DE MLPA P245.

KIT P245 (MRC-Holland)			
SÍNDROME	REGIÃO CITOGENÉTICA	OMIM	NÚMERO DE SONDAS
Deleção 1p36	1p36	607872	4
Deleção 2p16.1-p15	2p16.1-p15	612513	2
Deleção/duplicação 2q23.1	2q23.1	156200	2
Glass	2q32-q33	612312	2
Deleção 3q29	3q29	609425	4
Duplicação 3q29	3q29	611936	
Wolf-Hirschhorn	4p16.3	194190	4
Cri-du-Chat	5p15	123450	4
Sotos	5q35.3	117550	2
Williams-Beuren por deleção	7q11.23	194050	2
Williams-Beuren por duplicação	7q11.23	609757	
Langer-Giedion	8q24.11-q24.13	150230	
Deleção 9q22.3	9q22.3		2
DiGeorge 2	10p13-p14	601362	1
Prader-Willi	15q11.2	176270	5
Angelman	15q11.2	105830	
Witteveen-Kolk/deleção 15q24	15q24	613406	2
Rubinstein-Taybi	16p13.3	180849	1

Miller-Dieker	17p13.3	247200	2
Lissencefalia tipo-1	17p13.3	607432	
Smith-Magenis	17p11.2	182290	3
Potocki-Lupski	17p11.2	610883	
Deleção de NF1	17p11.2	613675	2
Koolen-de-Vries	17q21.31	610443	2
Duplicação 17q21.31	17q21.31	613533	
Deleção 22q11.2	22q11.2	188400	7
Duplicação 22q11.2	22q11.2	608363	
Deleção distal 22q11.1	22q11.2	611867	
Phelan-McDermid	22q13	606232	3
Rett	Xq28	312750	5
Duplicação MECP2	Xq28	300260	

Relação de sondas presentes no kit P245(MRC-Holland). Na posição genômica identifica-se o cromossomo e a posição genômica de início da sonda. As sondas apresentam tamanhos entre 129 e 487 nt.