

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Maiara Anschau Floriani

**Investigação citogenética molecular
de alterações cromossômicas
associadas a síndromes de
microdeleção em pacientes
pediátricos portadores de
cardiopatias congênitas.**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2023**

Maiara Anschau Floriani

**Investigação citogenética molecular
de alterações cromossômicas
associadas a síndromes de
microdeleção em pacientes
pediátricos portadores de
cardiopatias congênitas**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito para a obtenção do grau de Doutora.

Orientador: Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa
Coorientador: Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen

**Porto Alegre
2023**

Catologação na Publicação

Floriani, Maiara Anschau

Investigação citogenética molecular de alterações cromossômicas associadas a síndromes de microdeleção em pacientes pediátricos portadores de cardiopatia congênita. / Maiara Anschau Floriani. -- 2023.

51 f. : graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2023.

Orientador(a): Rafael Fabiano Machado Rosa ;
coorientador(a): Paulo Ricardo Gazzola Zen.

1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.
2. cardiopatia congênita. 3. CNV. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Nada se faz sozinho.

Agradeço imensamente aos meus parceiros de jornada.

Aos mais próximos, Juli, Ceci, Alvará e Pipeta, e aos mais distantes, Mamãe Nica e Mana Vale.

Aos mestres Paulo e Rafael, quanto eu aprendi com vocês...

Ao 'lab' e suas histórias e amizades memoráveis...

Ao time VMO, Nicole, Claudia, Fernanda e a pessoa-inspiração Gisele, seguimos juntas nos próximos capítulos.

Obrigada por tanto e até breve!!

Resumo

Introdução: A cardiopatia congênita (CHD) é o tipo mais comum de defeito congênito, sendo uma das principais causas de mortalidade no primeiro ano de vida. As síndromes de microdeleções e microduplicações (MMS) podem estar associadas a malformações cardíacas. A compreensão dos fatores genéticos envolvidos nestas condições tem um impacto direto na decisão do tratamento. O objetivo foi identificar alterações genéticas associadas ao desenvolvimento de MMS em pacientes pediátricos com CHD avaliados em um serviço de referência do Sul do Brasil. **Métodos:** 210 participantes foram recrutados durante os anos de 2005 e 2006, na unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital pediátrico. MMs e regiões do cromossomo 22 foram avaliadas pelo kit *SALSA MLPA Probemix P245 Microdeletion Syndromes-1A* para detecção de variações de número de cópias (CNVs). **Resultados:** MMS foram detectados em 11 dos 207 pacientes (5,3%) avaliados. A deleção heterozigota na região do cromossomo 22q11.2 foi o CNV mais prevalente (5 dos 11 pacientes). Também foram detectadas deleções atípicas de *RTDR1* e uma duplicação em 22q11.2. O MLPA também identificou microdeleções nos genes *SNRPN* e *NF1* em pacientes com cariótipo normal. **Conclusão:** O estudo revelou a prevalência e variabilidade de alterações genômicas associadas com MMS em pacientes pediátricos com CHD. Os resultados trazidos pela utilização do MLPA são de grande ajuda no planejamento e cuidados especializados.

Palavras-chave: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; cardiopatia congênita; variação do número de cópias do DNA; Síndrome de deleção 22q11.2.

Abstract

Introduction: Congenital heart disease (CHD) is the most common type of congenital defect, reported to be one of the leading causes of mortality in the first year of life. Microdeletion and microduplication syndromes (MMS) can be associated with cardiac malformations. Understanding which genetic factors are involved in these conditions directly impacts treatment decisions. We aimed to identify genetic alterations associated with MMS in CHD pediatric patients evaluated in a reference service of Southern Brazil. **Methods:** 210 participants were recruited during 2005/2006, in the intensive care unit (ICU) of a pediatric hospital. MMs and regions of chromosome 22 were screened by SALSA MLPA Probemix P245 Microdeletions Syndromes-1A kit for detection of copy number variations (CNVs). **Results:** MMS were detected in 11 from 207 patients (5.3%). Heterozygous deletion in the 22q11.2 chromosome region was the most prevalent CNV (5 from the 11 patients). Also, atypical *RTDR1* deletion and 22q11.2 duplication were detected. MLPA was able to reveal microdeletions in *SNRPN* and *NF1* genes in patients with normal karyotype and FISH. **Conclusion:** Our study reported the prevalence and variability of genomic alterations associated with MMS in CHD pediatric patients. The results brought using MLPA are of great help in planning and specialized care.

Keywords: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; congenital heart disease; DNA Copy Number Variation; 22q11.2 Deletion Syndrome

Lista de abreviaturas

CGH: do inglês, *comparative genomic hybridization*

CHD: do inglês, *congenital heart disease*

CNV: do inglês, *copy number variation*

DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*

EDTA: do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*

FISH: do inglês, *fluorescence in situ hybridization*

HCSA: Hospital da Criança Santo Antônio

MLPA: do inglês, *multiplex ligation-dependent probe amplification*

PCR: do inglês, *polymerase chain reaction*

SNP: do inglês, *single nucleotide polymorphism*

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

Lista de Figuras

Figura 1 Variação da etiologia da cardiopatia congênita 12

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais síndromes de microdeleções e microduplicações descritas na literatura..... 10

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.1 Estratégias de análise genética e suas aplicações no estudo de síndromes de microdeleções e microduplicações.....	16
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 GERAL.....	25
3.2 ESPECÍFICOS.....	25
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
ANEXOS.....	49
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFCSPA.....	49
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da (ISCOMPA).....	50
ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA.....	51

1. REFERENCIAL TEÓRICO

As síndromes de microdeleções e microduplicações são definidas como um grupo de doenças clinicamente reconhecidas, caracterizadas por pequenas deleções ou duplicações de um segmento cromossômico, menor que 5 megabases (Mb) que abrange vários genes envolvidos em determinadas condições de saúde. O fenótipo é o resultado da haploinsuficiência ou aumento da expressão de genes específicos dentro de um intervalo crítico (WATSON et al., 2014).

Suspeita-se do diagnóstico pós-natal pelo aspecto clínico, podendo este ser confirmado por análise cromossômica molecular. As síndromes de microdeleção são melhor definidas que as síndromes de microduplicação. O significado de muitas microduplicações ainda não está claro (WATSON et al., 2014; WEISE et al., 2012).

Microdeleções e microduplicações clinicamente significativas parecem ocorrer de forma esporádica, apesar disso, famílias inteiras podem ser diagnosticadas depois que se descobre que uma criança tem alguma anormalidade (WATSON et al., 2014).

Inúmeras síndromes de microdeleção foram identificadas com manifestações amplamente variadas. Síndromes clinicamente bem descritas, para as quais o envolvimento de múltiplos genes foi estabelecido ou é fortemente suspeito, incluem síndrome de DiGeorge (microdeleção 22q11 ou 22q11.2DS), síndrome de Williams-Beuren (microdeleção 7q11), Neurofibromatose tipo 1 (microdeleção 17q11), Síndrome de Smith-Magenis (microdeleção 17p), entre outras. Portadores das síndromes de microdeleção ou microduplicação

apresentam incapacidade intelectual, atraso de desenvolvimento, alterações congênitas e/ou características dismórficas (CARVILL; MEFFORD, 2013; NEVADO et al., 2014). Na Tabela 1 são descritas as principais síndromes de microdeleções e microduplicações.

Tabela 1 - Principais síndromes de microdeleções e microduplicações descritas na literatura

Nome da síndrome	Locus gênico	OMIM
Síndrome de deleção 1p36	1p36	607872
Síndrome de microdeleção 2p16.1-p15	2p16.1-p15	612513
Síndrome de microdeleção/microduplicação 2q23.1	2q23.1	156200
Síndrome de Glass	2q32-q33	612313
Síndrome de microdeleção 3q29	3q29	609425
Síndrome de microduplicação 3q29	3q29	611936
Síndrome de Wolf-Hirschhorn	4p16.3	194190
Síndrome de Cri-du-Chat	5p15	123450
Síndrome de Sotos	5q35.3	117550
Síndrome Williams-Beuren	7q11.23	194050
Síndrome de duplicação de Williams-Beuren	7q11.23	609757
Síndrome de Langer-Giedion	8q24.11-q24.13	150230
Síndrome de microdeleção 9q22.3	9q22.3	-
Síndrome DiGeorge-2	10p13-p14	601362
Síndrome de Prader-Willi	15q11.2	176270
Síndrome de Angelman	15q11.2	105830
Síndrome de Witteveen-Kolk*/síndrome de microdeleção 15q24	15q24	613406
Síndrome de Rubinstein-Taybi	16p13.3	180849
Síndrome de Miller-Dieker	17p13.3	247200
Lisencefalia tipo 1	17p13.3	607432
Síndrome de Smith-Magenis	17p11.2	182290
Síndrome de Potocki-Lupski	17p11.2	610883
Síndrome de microdeleção NF1	17p11.2	613675
Síndrome de Koolen-de Vries	17q21.31	610443
Síndrome de microduplicação 17q21.31	17q21.31	613533
Síndrome DiGeorge	22q11.2	188400
Síndrome de microduplicação 22q11.2	22q11.2	608363
Síndrome de deleção distal 22q11.2	22q11.2	611867
Síndrome de Phelan-McDermid	22q13	606232
Síndrome de Rett	Xq28	312750
Síndrome de microduplicação de MECP	Xq28	300260

Adaptado de www.mrcholland.com

O conhecimento sobre a cardiopatia congênita - CHD (do inglês, *congenital heart disease*) aumentou muito desde sua descrição e classificação, facilitando o diagnóstico e possibilitando a intervenção clínica precoce ainda

durante o período pré-natal. O avanço do conhecimento na área da genética, definiu de forma precisa o papel dos genes responsáveis por diferentes síndromes, identificando reguladores e moduladores de sinalização molecular, críticos para a morfogênese cardíaca (CALCAGNI et al., 2017).

Apesar de toda a tecnologia aplicada ao diagnóstico e tratamento, a CHD ainda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, afetando cerca de 1,0% dos nascidos vivos, e quando associada a alterações extracardíacas afeta 25,0% desta mesma população, sendo caracterizada como uma síndrome (BRUNEAU, 2008; HOFFMAN; KAPLAN, 2002).

A maioria dos casos de CHD ocorre por motivos desconhecidos através da combinação de fatores genéticos e não genéticos (Figura 1) (BLUE et al., 2012). A etiologia genética é atribuída em cerca de 90,0% dos casos de CHD, apesar disso, 56,0% dos casos ficam sem resolução. As variações no número de cópias do DNA - CNVs (do inglês, *copy number variation*) e aneuploidias representam 23,0%, com tipos adicionais de variação genética sendo identificados por sequenciamento de alto rendimento (DIAB et al., 2021; FAHED; NEMER, 2012). As CNVs incluem duplicações e deleções cromossômicas com tamanho variado de 1 Kb a vários Mb e são utilizadas para identificar genes candidatos (ANDERSEN; TROELSEN; LARSEN, 2014; RICHARDS; GARG, 2010). Os primeiros genótipos de risco identificados para CHD foram mutações *de novo* (DNMs), muitas das quais ocorrem em genes modificadores de cromatina (DIAB et al., 2021).

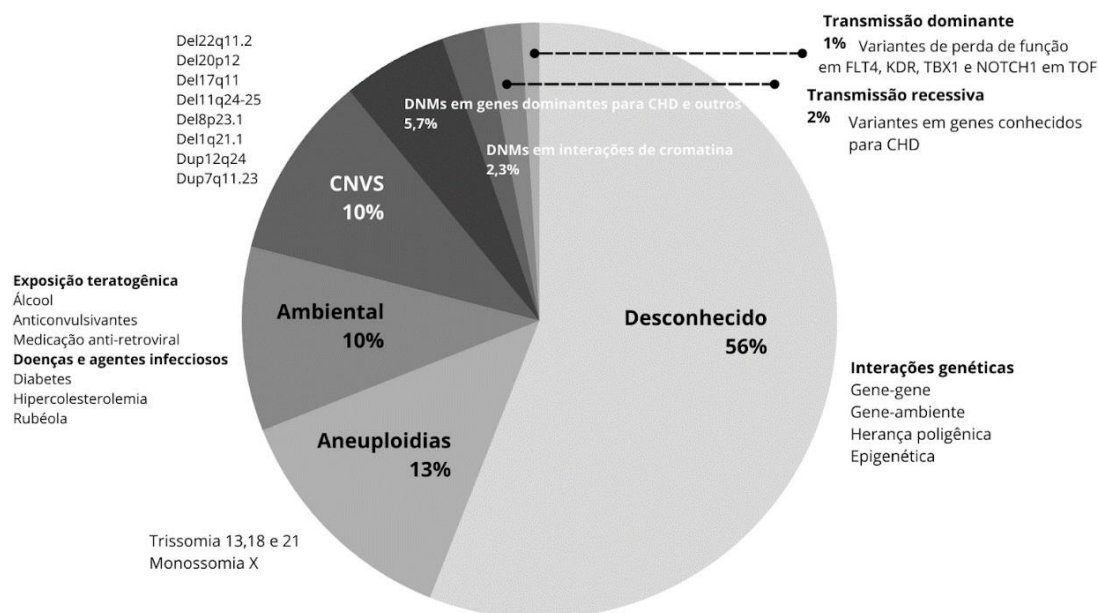


Figura 1 Variação da etiologia da cardiopatia congênita. Adaptado de Diab, 2021. DNMs - do inglês, *de novo mutation*. TOF - Tetralogia de Fallot (CAVADINO et al., 2021; HEDERMANN et al., 2021; JENKINS et al., 2007; JIN et al., 2017; KALISCH-SMITH; VED; SPARROW, 2020; ZAIDI et al., 2013; ZHANG et al., 2021).

Mudanças no número de cópias de segmentos específicos do DNA são frequentemente associadas à etiologia ou predisposição para a malformação cardíaca. Tais alterações podem incluir deleções e duplicações de inúmeros pares de bases ou alterações submicroscópicas - microdeleções e microduplicações - envolvendo apenas um único éxon (SCHOUTEN, 2002). A perda ou ganho de material genético desencadeia um efeito direto sobre a dosagem gênica, aumentando ou diminuindo o padrão de expressão dos genes afetados (BLUE et al., 2012). As CNVs, mutações somáticas, alterações nas taxas transcricionais e microRNA estão entre os mecanismos que podem explicar a base molecular da CHD (ANDERSEN; TROELSEN; LARSEN, 2014; RICHARDS; GARG, 2010).

Inúmeras CNVs já foram caracterizadas e associadas a síndromes clínicas com CHD. Uma das primeiras a ser descrita foi a deleção de 3 Mb do braço longo do cromossomo 22 (del22q11.2). A 22q11.2DS ou síndrome Velocardiofacial é a síndrome de microdeleção mais comum e apresenta um fenótipo variável, que vai desde características leves a graves e com risco de vida. A face longa e estreita com nariz tubular, fendas palpebrais finas e uma boca pequena estão presentes em mais de 90,0% dos casos. Além da CHD, os portadores apresentam hipocalcemia, imunodeficiência e desordens de neurodesenvolvimento (SIMMONS; BRUECKNER, 2017).

A região deletada do cromossomo 22 abrange o fator de transcrição *TBX1*. A haploinsuficiência deste gene está relacionado ao desenvolvimento anormal da faringe, corroborando com a clínica apresentada por portadores da síndrome. Outros estudos ainda mostram que *TBX1* está fortemente associado à remodelação da cromatina, sugerindo a utilização de drogas epigenética (FULCOLI et al., 2016; JEROME; PAPAIOANNOU, 2001).

Diretrizes atuais recomendam o rastreio de qualquer criança ou adulto com defeito cardíaco típico da síndrome 22q11.2DS, uma vez que existem importantes questões clínicas, de neurodesenvolvimento, psiquiátricas e reprodutivas específicas da idade para serem abordadas (PIERPONT et al., 2018).

Outras doenças genéticas como a síndrome de Williams (del7p11.23) e a síndrome de microduplicação 22q11.2 (22q11.2DupS) também são associadas a CNVs de tamanho variável, em genes sensíveis à dosagem e com amplo espectro fenotípico que inclui a CHD (ANDERSEN; TROELSEN; LARSEN, 2014; OU et al., 2008).

Defeitos de gene único que levam a síndromes com presença de CHD são frequentemente investigados. Mutações em *TBX5* causam duas condições marcadas por defeitos septais, a tetralogia de Fallot (TOF) e a rara síndrome de Holt-Oram (BABAN et al., 2014; MORI; BRUNEAU, 2004). Alterações em *GATA4* e *NKX2-5* também são amplamente estudadas, pois são genes conhecidos pela sua participação no desenvolvimento cardíaco normal (GARG et al., 2003; SCHOTT et al., 1998).

Apesar da quantidade significativa de estudos que tentam estabelecer os fatores causais da CHD, delineando as vias moleculares principais da cardiogênese, ainda restam dúvidas do real papel destes genes e seus padrões de expressão na patologia das malformações cardíacas, bem como sua correspondência com o fenótipo clínico do paciente.

Recentemente alguns estudos aumentaram significativamente a compreensão sobre a etiologia genética da CHD e vias moleculares associadas. A partir disso, se entende que não são identificados metade dos genes que compõem os 10,0% de CHD causados por mutações DNMs patogênicas. Isto indica que uma parte dos casos de CHD genética não resolvida apresenta DNMs patogênicas não reconhecidas (DIAB et al., 2021).

Espera-se que o conjunto de DNMs conhecidas ou transmitidas (dominante ou recessivamente), que contribuem para a CHD, aumentem nos próximos anos à medida que as coortes de CHD são recrutadas e analisadas. Essas iniciativas trazem à luz novos genes de risco para CHD, possibilitando a criação de painéis alvo que possam ter impacto clínico a curto prazo (DIAB et al., 2021).

Na tentativa de elucidar as causas genéticas da CHD, estão sendo utilizados escores de risco poligênicos (PRS). Estes escores eram utilizados inicialmente para quantificar o risco genético para doenças comuns, como doença coronariana aguda, doenças psiquiátricas e tipos de câncer (LEWIS; VASSOS, 2020). No contexto da CHD, eles são utilizados para oferecer uma visão potencial da etiologia genética dos pacientes cuja doença não pode ser explicada por causas monogênicas.

Devido a heterogeneidade das causas da CHD, a identificação precoce da malformação e possível associação às síndromes de microdeleções e microduplicações são importantes em termos de decisão clínica para intervenção médica rápida sempre que necessário (EL MALTI et al., 2016).

A maioria das crianças com CHD sobrevive até a idade adulta. Do ponto de vista clínico, a consulta com um geneticista, apoiando o cardiologista pediátrico, pode ser útil em crianças com síndromes genéticas quando as implicações cardíacas não são claras. Uma vez que a disponibilidade e precisão do rastreio pré-natal para problemas cardíacos varia, os pediatras devem permanecer vigilantes para os recém-nascidos que apresentem sintomas que sugiram CHD. As crianças com CHD precisam de cuidados pediátricos abrangentes que considerem o aumento do risco de problemas de crescimento, atraso no desenvolvimento, e distúrbios de saúde mental nesta população (SCOTT; NEAL, 2021).

Embora um longo caminho na identificação das causas de CHD tenha sido percorrido, são necessários mais trabalhos para finalizar a jornada diagnóstica de famílias com CHD. Poucos estudos foram publicados avaliando o perfil clínico e genético da CHD na América Latina, a maioria está relacionada

ao Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), um programa de investigação clínica e epidemiológica de fatores de risco na etiologia de anomalias congênitas (CASTILLA; ORIOLI, 2004). Existem explicações genéticas complexas sobre a CHD, mas serão necessárias estratégias de análise aplicadas a coortes grandes antes de fornecer diagnósticos moleculares a pacientes geneticamente não resolvidos.

A participação do geneticista na investigação de genes candidatos em pacientes com CHD pode ajudar no diagnóstico precoce e no manejo dos sintomas extracardíacos. A compreensão do desenvolvimento da CHD poderá auxiliar na incorporação de intervenções terapêuticas e preventivas que utilizem abordagens moleculares como método de triagem, ampliando o papel da genética no atendimento clínico, além de promover aconselhamento genético individualizado para os pacientes e seus familiares (CASTILLA; ORIOLI, 2004).

Assim, enfatiza-se a necessidade de testagem genética em indivíduos afetados para investigação de mutações, objetivando o desenvolvimento de novas medidas profiláticas, estratégias de tratamento e até mesmo novas terapias.

1.1 Estratégias de análise genética e suas aplicações no estudo de síndromes de microdeleções e microduplicações

As síndromes de deleção cromossômica diferem das síndromes de microdeleção pela sua capacidade de serem detectadas pelo exame de cariótipo. As microdeleções envolvem segmentos menores (1-3 Mb) e são identificadas apenas por sondas fluorescentes e análise por microarranjo cromossômico (DIGILIO; MARINO, 2016; JANSEN et al., 2015).

As metodologias de citogenética molecular melhoraram a capacidade de detecção de CNVs em sequências cromossômicas, possibilitando a obtenção rápida de resultados para pacientes com CHD. Os testes citogenéticos atuais, que incluem hibridização *in situ* fluorescente (FISH), *arrays* genômicos como SNP/CGH-array (hibridização genômica comparativa e polimorfismos de genes únicos baseado em microarranjos) e MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), podem auxiliar no diagnóstico molecular destes pacientes (LEE; IAFRATE; BROTHMAN, 2007; PIERPONT et al., 2018).

O exame de cariótipo com bandeamento G é o padrão-ouro para o diagnóstico de alterações cromossômicas, especialmente aneuploidias e grandes rearranjos estruturais (>5-10 Mb). Devido a impossibilidade de detectar alterações menores pelo cariótipo, foi desenvolvida a FISH, que através da hibridização do DNA alvo com sondas fluorescentes (RUDKIN; STOLLAR, 1977) aumentou o poder de resolução dos testes citogenéticos, melhorando a análise de cromossomos inteiros e sendo capaz de detectar microdeleções e/ou microduplicações e rearranjos cromossômicos complexos (>40 kb) (JENSEN, 2014). Sua principal limitação se dá pela detecção restrita de alterações, em virtude do conjunto de sondas disponíveis no mercado. Por ser uma investigação pontual, o teste diagnóstico deve ser direcionado de acordo com a suspeita clínica do paciente (GOZZETTI; LE BEAU, 2000). A fim de aumentar a disponibilidade de sondas comercializadas, Dorfman et al. (DORFMAN et al., 2021) publicou recentemente o método *in house* para desenvolvimento de sondas para FISH, fato que permite a personalização do teste com custo 8 vezes menor. Apesar disso, para análises de microdeleções e microduplicações a FISH não é indicada.

O MLPA aparece como uma opção de teste com alto rendimento, baixo custo com análise simultânea de 96 amostras e com resultados em até 24h, onde é possível detectar CNVs em genes específicos e pequenos rearranjos intragênicos (LEE; IAFRATE; BROTHMAN, 2007; SCHOUTEN, 2002; SLATER, 2003). Assim, permite o estudo de várias regiões do genoma em uma única reação (>40 sequências) e com sequências alvo curtas (60-80nt) pode identificar deleções e duplicações de genes únicos extremamente pequenas (<40kb) que não são detectadas por FISH, por exemplo. Mais de 300 conjuntos de sondas (*probes*) estão sendo comercializadas, direcionadas à investigação e diagnóstico de várias doenças genéticas (SCHOUTEN, 2002; STUPPIA et al., 2012). A limitação desta técnica se dá na incapacidade de detectar rearranjos balanceados e mosaicismos baixos, além de ser muito sensível em relação à qualidade do DNA utilizado (KOZLOWSKI; JASINSKA; KWIATKOWSKI, 2008).

Na mesma linha, o array-CGH é capaz de analisar o genoma completo em alta resolução, detectando rearranjos cromossômicos desbalanceados muito pequenos, sendo uma ótima ferramenta na análise de microdeleções e/ou microduplicações. Apesar disso, ainda possui um alto custo, limitando a sua utilização pelas instituições de saúde, especialmente filantrópicas (LEE; IAFRATE; BROTHMAN, 2007; STUPPIA et al., 2012).

Dentre as metodologias abordadas, a MLPA se apresenta como um promissor método de triagem genética e ferramenta de confirmação diagnóstica. Na investigação de síndromes de microdeleção e/ou microduplicação pode auxiliar no diagnóstico precoce, antecipando o manejo terapêutico. Atualmente existem mais de 300 kits de MLPA para diferentes condições clínicas, sendo 3

kits específicos para síndromes de microdeleções e microduplicações (P064, P245 e P297) (MRC HOLLAND, [s.d.]).

A técnica de MLPA pode ser utilizada no rastreamento neonatal não invasivo, sendo recomendada para a investigação de alterações genéticas em fetos com anormalidades ultrassonográficas e aumento da translucência nucal, mas que apresentaram cariótipo normal. Sua utilização é indicada na saúde suplementar para confirmação de diagnósticos e atualmente já está incorporada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para diagnóstico de doenças raras. Para estes casos, o valor não ultrapassa 250,00 reais/teste, sendo compatível a sua utilização com a sustentabilidade do sistema de saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR (ANS), [s.d.]).

Ao longo do tempo, coortes de pacientes com CHD vem sendo analisadas com o auxílio do MLPA. Pineda et al. (PINEDA et al., 2021), avaliaram 32 pacientes com CHD isoladas durante o período neonatal em diferentes hospitais de Bogotá. Foram encontrados CNVs na região cromossômica 22q11.2 em 7 pacientes (21,9%), 6 com deleção típica (18,7%) e 1 paciente com duplicação atípica (3,1%). Em coortes maiores, Floriani et al. (FLORIANI et al., 2021), identificaram CNVs em 7/207 pacientes (3,4%) com CHD associada ou não a uma síndrome: 2 pacientes com delGATA4 (1,0%) e 1 paciente com dup22q11.2 (0,5%), ambos sem diagnóstico prévio e 4 pacientes com del22q11.2 (22q11DS) (1,9%), com diagnóstico prévio por FISH. Na mesma linha, um estudo avaliou 212 pacientes adultos e pediátricos combinando técnicas de MLPA, análise de microarranjo cromossômico e *droplet digital PCR*. CNVs patogênicas foram detectadas em 5,2% (11/212), variantes de significado incerto (VUS) em 0,9% e CNVs benignos em 1,8% da coorte global de CHD. Apesar da combinação de

técnicas, os autores afirmam que o MLPA provou ser um método de rastreio genético altamente eficiente para coorte de pacientes com CHD (ZODANU et al., 2021).

Estes estudos evidenciam a capacidade de triagem do MLPA com entrega de probabilidade diagnóstica a estes pacientes. Sabe-se que a taxa de detecção de CNVs para CHD em estudos com pacientes não selecionados pode variar de 1,0-7,0%, já em recém-nascidos com CHD crítica este número sobe para 10,0%. Com isso, entende-se que sempre que bem indicado o MLPA pode ser utilizado como um teste de primeira linha (MILETIC et al., 2021).

A fim de contribuir para estes achados, o presente investigou a ocorrência de alterações genéticas e sua associação a síndromes de microdeleções e microduplicações, em pacientes pediátricos portadores de CHD internados, durante os anos de 2005 e 2006, na UTI Cardiológica do Hospital da Criança Santo Antônio - Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR (ANS). **Diretrizes de utilização para cobertura de procedimentos na saúde suplementar.** , [s.d.]. Disponível em:

<http://www.ans.gov.br/images/ANEXO/RN/Anexo_II_DUT_Rol_2018_alterado.pdf>

ANDERSEN, T. A.; TROELSEN, K. DE L. L.; LARSEN, L. A. Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 8, p. 1327–1352, abr. 2014.

BABAN, A. et al. Identification of *TBX5* mutations in a series of 94 patients with Tetralogy of Fallot. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 164, n. 12, p. 3100–3107, dez. 2014.

BLUE, G. M. et al. Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. **Medical Journal of Australia**, v. 197, n. 3, p. 155–159, ago. 2012.

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

CALCAGNI, G. et al. Congenital heart disease and genetic syndromes: new insights into molecular mechanisms. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 9, p. 861–870, 2 set. 2017.

CARVILL, G. L.; MEFFORD, H. C. Microdeletion syndromes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 23, n. 3, p. 232–239, jun. 2013.

CASTILLA, E. E.; ORIOLI, I. M. ECLAMC: The Latin-American Collaborative Study of Congenital Malformations. **Public Health Genomics**, v. 7, n. 2–3, p. 76–94, 2004.

CAVADINO, A. et al. Signal Detection in EUROmediCAT: Identification and Evaluation of Medication–Congenital Anomaly Associations and Use of VigiBase as a Complementary Source of Reference. **Drug Safety**, v. 44, n. 7, p. 765–785, jul. 2021.

DIAB, N. S. et al. Molecular Genetics and Complex Inheritance of Congenital Heart Disease. **Genes**, v. 12, n. 7, p. 1020, 30 jun. 2021.

DIGILIO, M. C.; MARINO, B. What Is New in Genetics of Congenital Heart Defects? **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, 1 dez. 2016.

DORFMAN, L. E. et al. Development and validation of homebrew FISH Probes for 22q11.2 deletion syndrome. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, 2021.

EL MALTI, R. et al. A systematic variant screening in familial cases of congenital heart defects demonstrates the usefulness of molecular genetics in

this field. **European Journal of Human Genetics**, v. 24, n. 2, p. 228–236, fev. 2016.

FAHED, A.; NEMER, G. Genetic Causes of Syndromic and Non-Syndromic Congenital Heart Disease. Em: COOPER, D. (Ed.). **Mutations in Human Genetic Disease**. [s.l.] InTech, 2012.

FLORIANI, M. A. et al. GATA4 Deletions Associated with Congenital Heart Diseases in South Brazil. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 10, n. 02, p. 092–097, jun. 2021.

FULCOLI, F. G. et al. Rebalancing gene haploinsufficiency in vivo by targeting chromatin. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11688, set. 2016.

GARG, V. et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 443–447, jul. 2003.

GOZZETTI, A.; LE BEAU, M. M. Fluorescence in situ hybridization: Uses and limitations. **Seminars in Hematology**, v. 37, n. 4, p. 320–333, out. 2000.

HEDERMANN, G. et al. Maternal obesity and metabolic disorders associate with congenital heart defects in the offspring: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 16, n. 5, p. e0252343, 27 maio 2021.

HOFFMAN, J. I. E.; KAPLAN, S. The incidence of congenital heart disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 12, p. 1890–1900, jun. 2002.

JANSEN, F. A. R. et al. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 45, n. 1, p. 27–35, jan. 2015.

JENKINS, K. J. et al. Noninherited Risk Factors and Congenital Cardiovascular Defects: Current Knowledge: A Scientific Statement From the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: *Endorsed by the American Academy of Pediatrics*. **Circulation**, v. 115, n. 23, p. 2995–3014, 12 jun. 2007.

JENSEN, E. Technical Review: *In Situ* Hybridization: AR Insights. **The Anatomical Record**, v. 297, n. 8, p. 1349–1353, ago. 2014.

JEROME, L. A.; PAPAIOANNOU, V. E. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. **Nature Genetics**, v. 27, n. 3, p. 286–291, mar. 2001.

JIN, S. C. et al. Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. **Nature Genetics**, v. 49, n. 11, p. 1593–1601, nov. 2017.

KALISCH-SMITH, J. I.; VED, N.; SPARROW, D. B. Environmental Risk Factors for Congenital Heart Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, n. 3, p. a037234, mar. 2020.

- KOZLOWSKI, P.; JASINSKA, A. J.; KWIATKOWSKI, D. J. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. **ELECTROPHORESIS**, v. 29, n. 23, p. 4627–4636, dez. 2008.
- LEE, C.; IAFRATE, A. J.; BROTHMAN, A. R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. **Nature Genetics**, v. 39, n. S7, p. S48–S54, jul. 2007.
- LEWIS, C. M.; VASSOS, E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. **Genome Medicine**, v. 12, n. 1, p. 44, dez. 2020.
- MILETIC, A. et al. Genetic evaluation of newborns with critical congenital heart defects admitted to the intensive care unit. **European Journal of Pediatrics**, v. 180, n. 10, p. 3219–3227, out. 2021.
- MORI, A. D.; BRUNEAU, B. G. TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed: **Current Opinion in Cardiology**, v. 19, n. 3, p. 211–215, maio 2004.
- MRC HOLLAND. , [s.d.]. Disponível em:
<<https://www.mrcholland.com/products>>. Acesso em: 16 out. 2022
- NEVADO, J. et al. New microdeletion and microduplication syndromes: a comprehensive review. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 suppl 1, p. 210–219, 2014.
- OU, Z. et al. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. **Genetics in Medicine**, v. 10, n. 4, p. 267–277, abr. 2008.
- PIERPONT, M. E. et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 21, 20 nov. 2018.
- PINEDA, T. et al. CNVs in the 22q11.2 Chromosomal Region Should Be an Early Suspect in Infants with Congenital Cardiac Disease. **Clinical Medicine Insights: Cardiology**, v. 15, p. 117954682110168, jan. 2021.
- RICHARDS, A.; GARG, V. Genetics of Congenital Heart Disease. **Current Cardiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 91–97, 1 maio 2010.
- RUDKIN, G. T.; STOLLAR, B. D. High resolution detection of DNA–RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. **Nature**, v. 265, n. 5593, p. 472–473, fev. 1977.
- SCHOTT, J.-J. et al. Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor *NKX2-5*. **Science**, v. 281, n. 5373, p. 108–111, 3 jul. 1998.
- SCHOUTEN, J. P. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 12, p. 57e–557, 15 jun. 2002.

SCOTT, M.; NEAL, A. E. Congenital Heart Disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 48, n. 3, p. 351–366, set. 2021.

SIMMONS, M. A.; BRUECKNER, M. The genetics of congenital heart disease... understanding and improving long-term outcomes in congenital heart disease: a review for the general cardiologist and primary care physician. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 29, n. 5, p. 520–528, out. 2017.

SLATER, H. R. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). **Journal of Medical Genetics**, v. 40, n. 12, p. 907–912, 1 dez. 2003.

STUPPIA, L. et al. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3245–3276, 8 mar. 2012.

WATSON, C. T. et al. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 15, n. 1, p. 215–244, 31 ago. 2014.

WEISE, A. et al. Microdeletion and Microduplication Syndromes. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 346–358, maio 2012.

ZAIDI, S. et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. 220–223, 13 jun. 2013.

ZHANG, T.-N. et al. Environmental Risk Factors and Congenital Heart Disease: An Umbrella Review of 165 Systematic Reviews and Meta-Analyses With More Than 120 Million Participants. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 640729, 11 mar. 2021.

ZODANU, G. K. E. et al. Systemic Screening for 22q11.2 Copy Number Variations in Hungarian Pediatric and Adult Patients With Congenital Heart Diseases Identified Rare Pathogenic Patterns in the Region. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 635480, 29 abr. 2021.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar a prevalência de alterações em regiões cromossômicas associadas a síndromes de microdeleção/microduplicação através da técnica de MLPA em pacientes pediátricos com cardiopatia congênita, hospitalizados pela primeira vez na unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA).

3.2 ESPECÍFICOS:

1. Verificar a taxa de identificação diagnóstica para os pacientes cardiopatas que apresentaram cariótipo e FISH normais;
2. Descrever os achados identificados através da técnica de MLPA e comparar com os aspectos clínicos dos pacientes;
3. Avaliar a contribuição da técnica de MLPA no rastreamento de síndromes de microdeleção/microduplicação dentro de uma amostra de pacientes cardiopatas pediátricos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

22q11 copy number variations in a Brazilian cohort of children with congenital heart disorders


Autores: Maiara Anschau Floriani, Andressa Schneiders Santos, Bruna Lixinski Diniz, Andressa Barreto Glaeser, Paulo Ricardo Gazzola Zen, Rafael Fabiano Machado Rosa

Publicado na Revista "*Molecular Syndromology*"

Mol Syndromol
(DOI:10.1159/000525247)

22q11 Copy Number Variations in a Brazilian Cohort of Children with Congenital Heart Disorders

Floriani M.A.^a · Santos A.S.^b · Diniz B.L.^a · Glaeser A.B.^a · Gazzola Zen P.R.^{c,d} · Machado Rosa R.F.^{c,d}

 [Author affiliations](#)

^aGraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

^bUnderdegree Program in Biomedicine, UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

^cDepartment of Internal Medicine, Clinical Genetics, UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

^dIrmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Congenital heart disease (CHD) is the most common type of congenital defect, reported to be one of the leading causes of mortality in the first year of life. Microdeletion and microduplication syndromes (MMS) are associated with cardiac malformations. Understanding which genetic factors are involved in these conditions directly impacts treatment decisions. We aimed to identify the occurrence of genetic alterations and their association with MMS in CHD pediatric patients evaluated in a reference service of Southern Brazil. **Methods:** Participants were recruited during 2010, in the intensive care unit (ICU) of a pediatric hospital. MMs and regions of chromosome 22 were screened by SALSA MLPA Probemix P245 Microdeletions Syndromes-1A kit for detection of copy number variations (CNVs). **Results:** MMS were detected in 11 from 207 patients (5.3%). Heterozygous deletion in the 22q11.2 chromosome region was the most prevalent CNV (5 from the 11 patients). Also, atypical *RTDRI* deletion and 22q11.2 duplication were detected. MLPA was able to reveal microdeletions in *SNRPN* and *NFI* genes in patients with normal karyotype and FISH. **Conclusion:** Our study reported the prevalence and variability of genomic alterations associated with MMS in CHD pediatric patients. The results brought using MLPA are of great help in planning and specialized care.

Keywords: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; congenital heart disease; DNA Copy Number Variation; 22q11.2 Deletion Syndrome

INTRODUCTION

Congenital heart disease (CHD) occurs at birth and is the most common type of congenital defect, characterized by a malformation in the heart or large vessels. Reported to be one of the leading causes of mortality in the first year of life, affecting 1% of newborns per year in the United States [Calcagni et al., 2017; Hoffman & Kaplan, 2002] and 1.3-1.7% in Brazil [Brazil Ministry of Health, 2021]. Due to its different forms, CHD prognosis becomes difficult if it is not identified early [El Malti et al., 2016]. Understanding which genetic factors are associated with these malformations, such as microdeletion and microduplication syndromes (MMS), is important for treatment decision making, especially for severe patients who require rapid medical intervention. Few papers have been published in Latin America studying the clinical and genetic profile of these patients. Most are related to the Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC), which is a program of clinical and epidemiological investigation of risk factors in the etiology of congenital anomalies [Castilla & Orioli, 2004].

At least 20% of CHD are attributed to single or multiple gene chromosomal alterations. Still other cases are related to a combination of genetic, epigenetic, and environmental factors. Among the genetic conditions associated, MMS are commonly reported. MMS originates from submicroscopic copy number variations (CNVs) in different regions of the genome, which in turn lead to specific subchromosomal gains or losses [Deak et al., 2011]. The 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS), Williams syndrome (del7p11.23) and 22q11.2 microduplication syndrome (22q11.2DupS) are frequently studied MMS and they have a broad phenotypic spectrum that includes CHD [Andersen et al., 2014; Ou et al., 2008]. The 22q11.2DS (OMIM:188400) is the most

common MMS and about 60-80% of cases have CHD, second only to Down syndrome in the group of syndromes associated with heart diseases [Goldmuntz, 2020; Mastroiacovo et al., 2005; Simmons & Brueckner, 2017].

Chromosomal microdeletions and microduplications can be detected by MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), which stands out for its high yield, low cost and possibility of simultaneous analysis with results in up to one day. It allows the analysis of different regions of the genome in a single reaction (>40 sequences) and with short target sequences (60-80nt) can identify small single gene deletions and duplications (<40 kb) that are not detected by fluorescent in situ hybridization (FISH), for example. Moreover, MLPA can be used as a genetic screening method acting as a diagnostic confirmation tool, facilitating personalized care. Thus, rare and complex cases that require surgical procedures and specialized care in reference centers are diagnosed more quickly, helping to optimize the flow of care [Lee et al., 2007; Schouten et al., 2002; Slater et al., 2003]. We aimed to identify the occurrence of genetic alterations and their association with MMS in CHD pediatric patients evaluated in a reference service of Southern Brazil.

METHODS

Participants were recruited from cardiac intensive care units (ICU) of the Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), Porto Alegre, RS, Brazil, a reference in the treatment of patients with CHD. The patients were evaluated by clinical geneticists and classified as syndromic and nonsyndromic according to the dysmorphisms. CHDs were described based on echocardiography, cardiac catheterization, and surgical description, following the classification suggested by Botto et al. [2001]. Family history was noted when present.

MLPA assay was performed using the SALSA MLPA Probemix P245 Microdeletions Syndromes-1A kit for CNVs screening in genes to different MMS and 22q11.2 chromosome region following the manufacturer's recommendations [MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands]. Probe sequences are described in Table 1. Molecular analysis was performed by ABI3130 sequencing and Coffalyser software [MRC-Holland]. For each sample analyzed, commercial controls in triplicate were used.

High resolution GTG-Banding karyotype and FISH technique for DiGeorge/Velocardiofacial syndrome (VCFS) (TUPLE1) were performed by Rosa et al. [2008] previously.

RESULTS

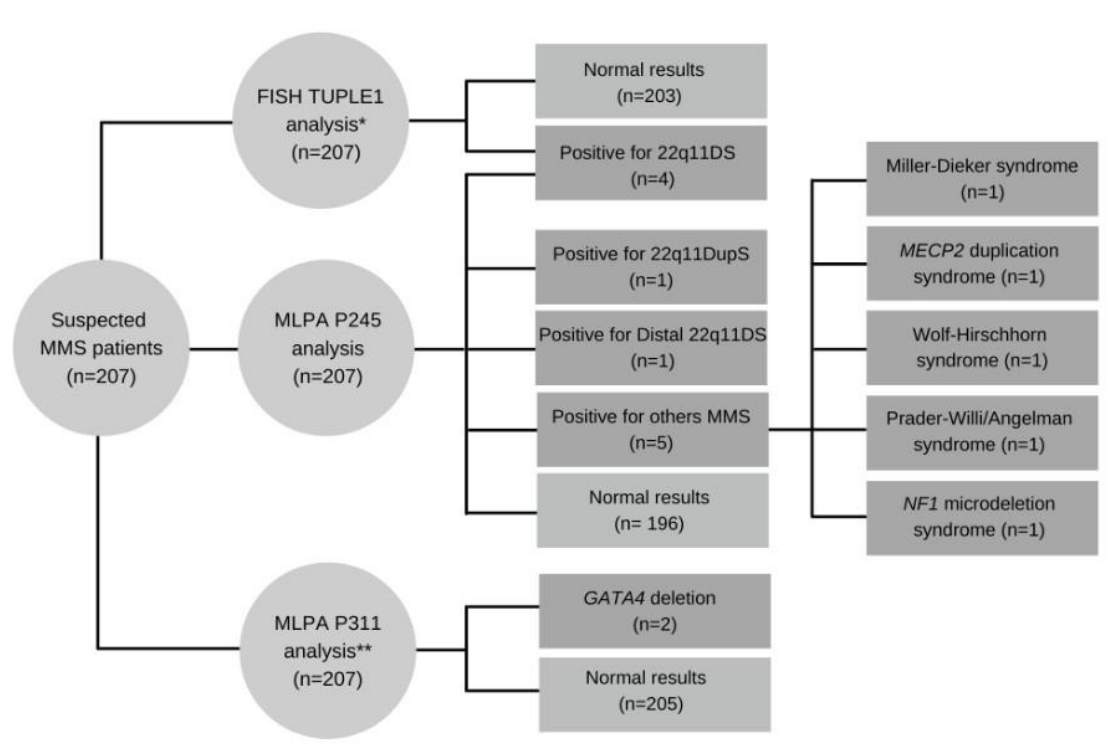
Total sample consisted of 207 CHD patients with 73 days (1 to 4934 days) median age and 52.7% male. Regarding origin, most patients came from countryside towns (58.9%) (only 12.6% were from the state capital). The main reasons for hospitalization in the ICU were cardiac surgery (74.8%) and catheterization (9.2%). Cyanotic and complex CHD were found in 68 (32.9%) and 67 patients (32.4%), respectively. The main CHD group consisted of septal defects (33.3%) and outflow tract defects (18.8%), with 17.4% ventricular septal defects, 15.9% atrial septal defects, 11.1% Tetralogy of Fallot, 10.6% aortic coarctation, and 9.7% atrioventricular septal defect; 15.5% of patients (32 cases) had a family history of CHD.

Sixty-four patients (30.9%) were classified as syndromic, based on the physical examination and at least one major extracardiac malformation was verified in 51.7% of the sample. Previous analysis using high-resolution karyotype revealed chromosomal abnormalities in 29 patients (14.0%) and FISH in 4 (1.9%). Down's syndrome was

detected in 11.6% of the cases, (mostly full trisomy 21; only 2 patients had 21q isochromosome). All individuals with 22q11.2 microdeletion had normal karyotypes.

MMS were detected in 11 patients by MLPA (5.3%) (Figure 1). Heterozygous deletion in the 22q11.2 chromosome region was the most prevalent CNV. Besides confirming the 22q11 deletions previously detected by Rosa et al. [2008] (P16, P77, P81 and P113), MLPA showed an atypical deletion in RTDR1 gene located on chromosome 22 (P186) and one heterozygous duplication of 22q11.2 region (22q11DupS; 0.5%) (P199), both changes not covered by FISH TUPLE 1 probe. Duplication occurred in a region close to the FISH probes hybridization site (chr22:19,523,027-20,891,214) (Genome Browser GRCh38/hg38).

Figure 1. Flowchart of MMS diagnostic by FISH and MLPA in CHD patients.

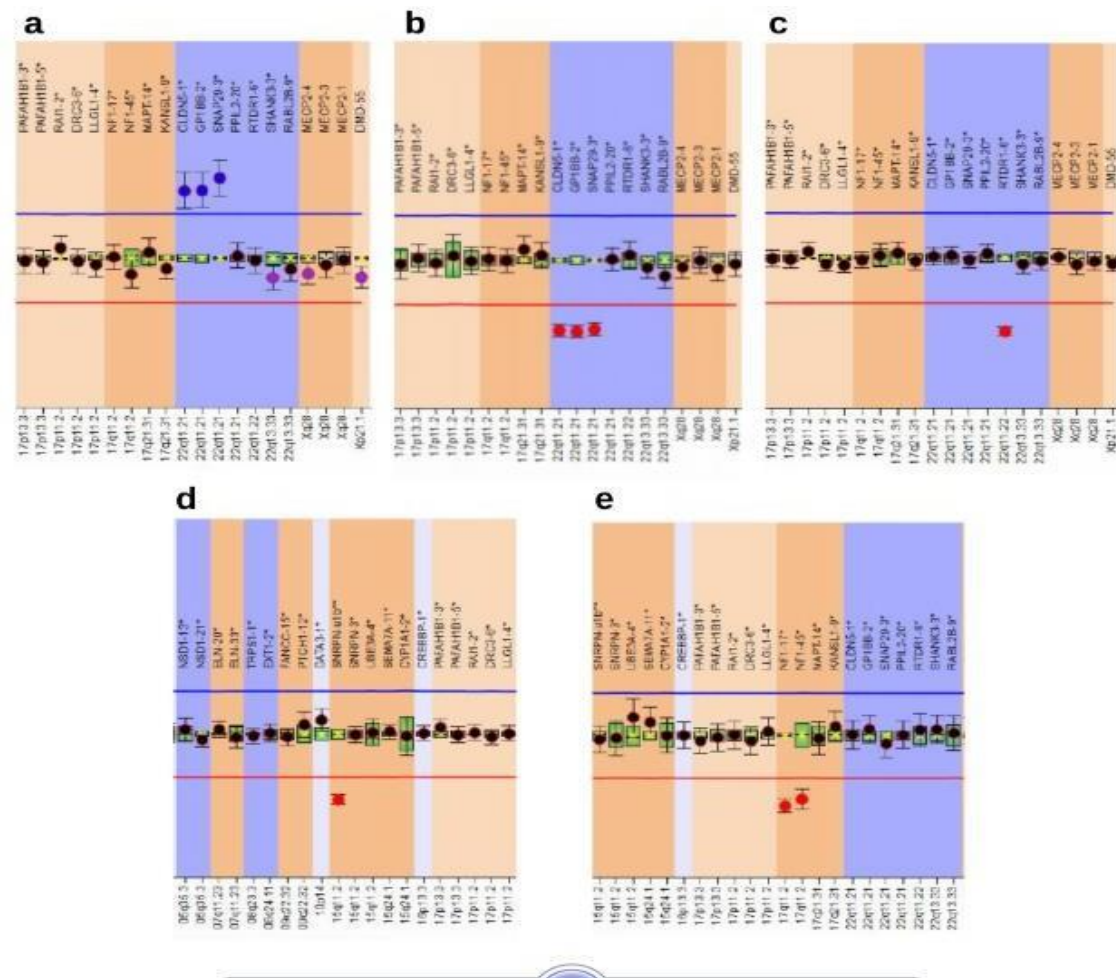


Legend: *Published data by Rosa et al. (2008). ** Published data by Floriani et al. (2021).

Additionally, MLPA was able to detect microdeletions in *SNRPN* (P157) and *NF1* genes (P203), and in patients with karyotype and FISH normal (Figure 2). Miller-Dieker

syndrome (del17p13.3), Trisomy X and Wolf-Hirschhorn syndrome (del4p16.3) were identified in patients P35, P42, P47, respectively, findings consistent with abnormal karyotype (Table 2). Clinical and cytogenetic findings were described in Table 2.

Figure 2. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) P245 Microdeletion syndromes-1A analysis of patients non detected/diagnosed by FISH.



Legend: (a) Patient 199 positive for duplication of *CLDN5*, *GP1BB*, *SNAP29* (22q11DupS); (b) Patient P16 positive for deletion of *CLDN5*, *GP1BB*, *SNAP29* (22q11DS); (c) Patient 186 positive for deletion of *RTDRI* (Distal 22q11.2DS); (d) Patient 157 positive for deletion of *SNRPN* (Prader-Willi/Angelman syndrome); (e) Patient 203 positive for deletion of *NF1* (NF1 microdeletion syndrome).

DISCUSSION

Methodologies applied to genetic syndromes research are also available to investigate CHD etiology, such as comparative genomic hybridization (CGH), quantitative multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR), high-resolution single nucleotide polymorphism (SNP) microarray analysis and MLPA [Guo et al., 2019; Liu et al., 2019; Wu et al., 2017]. The MLPA technique can be easily performed in laboratories and can provide good resolution by providing approximately 98.9% sensitivity and 97.8% specificity [Benard-Slagter et al., 2017].

We report an update on molecular assessment in pediatric patients with CHD. On study population recruitment, karyotype and subsequently FISH tests were performed in order to investigate 22q11.2DS given its high prevalence in individuals with CHD and clinical characteristics of patients. Some years after the conclusion of the study by Rosa et al. [2008], MLPA has emerged as an important tool to screening and diagnosis for genetic disorders.

Studies have demonstrated the reliable contribution of MLPA results for the identification of chromosomal abnormalities in patients with CHD [Campos et al., 2015; Cowan & Ware, 2015; Sørensen et al., 2012]. It is known that chromosomal abnormalities are important causes of CHD and when 22q11.2 microdeletion is ruled out, the CHD etiology remains generally unexplained, making genetic counseling and care planning difficult [Mademont-Soler et al., 2012]. In suspicious individuals with normal karyotype or abnormal ultrasound findings during prenatal care, MLPA can be used in screening and identifying genetic alterations [Kjaergaard et al., 2010; Kuo et al., 2014; Sørensen et al., 2012].

Our results showed alterations in chromosome 22 were prevalent, four individuals were diagnosed with 22q11.2DS and two of these had cyanotic, conotruncal, and complex

CHD (P77 and P113). Classical facial dysmorphisms were severely or mildly expressed phenotypes, despite this only patient P81 was classified as syndromic according Digilio et al. [2005]. *CLDN5*, *GP1BB*, and *SNAP29* were the most frequently altered genes, with microdeletions in 4 patients and microduplication in 1. Based on the probe sequences (Table 1) these genes are located in low copy repeat (LCR) 22 A-B region (*CLDN5*, *GP1BB* and *SNAP29*) and LCR22 E-F (*RTDR1*), but in a different genomic coordinate (chr22:19,523,024-20,891,214 and chr22:23,401,593-23,487,208) (GRCh38/hg38) from that analyzed by FISH TUPLE 1 [Hacıhamdioğlu et al., 2015]. In addition, *GATA4* deletions were identified in two patients as reported by Floriani et al. [2021] (Figure 1).

Table 1. SALSA MLPA Probemix P245 Microdeletions Syndromes-1A probe sequences used for CNVs analysis.

Syndrome	Gene	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)
1p36 deletion syndrome	<i>TNFRSF18</i>	CGGGTTTCTCAC-TGTGTTCCCTGG
	<i>TNFRSF4</i>	GCCGGCCAGCAA-TAGCTCGGACGC
	<i>GNBI</i>	CTAAGATCGGAA-GATGAGTGAGCT
2p16.1-p15 microdeletion syndrome	<i>GABRD</i>	CGGCGACTACGT-GGGCTCCAACCT
	<i>REL</i>	TATCACAGAACC-CGTAACAGTAAA
2q23.1 microdeletion/microduplication syndrome	<i>PEX13</i>	TGAGGATGACCA-TGTAGTTGCCAG
	<i>MBD5</i>	CCAGCTATACAA-GTTCCTGTGGGT
Glass syndrome (2q32-q33 microdeletion syndrome)	<i>MBD5</i>	CTGGAGATCTTC-CTCCTTTGGGT
	<i>SATB2</i>	TGCCATTTATGA-CGAGATCCAACA
	<i>SATB2</i>	AGAGAAGAACAC-GCCGAGTTTGTC
3q29 microdeletion/microduplication syndrome	<i>DLG1</i>	CTATGAAAGACA-GGATAAATGATG
	<i>DLG1</i>	CAGCTCAGAAGT-TCCATAGAACGG
	<i>BDHI</i>	GAAGTGGGCCAT-TCTAACACCCGT
	<i>KIAA0226</i>	GCTGGAGGACAG-ATGTGCCGTCTT
	<i>PIGG</i>	AAAAGCATTTCAG-GCTAGATGGTGG
Wolf-Hirschhorn syndrome, 4p16.3	<i>PIGG</i>	GAGTGTGACGTA-GTCCTTCTGCTC
	<i>LETM1</i>	CCTGTGTACACA-TCTCCAGAGGC
	<i>WHSC1</i>	GTGGGCATTTAT-TTCCCTTAATG
	<i>CCDC127</i>	ACGCCATGATCT-CAGAAAATCGGC
Cri-du-Chat syndrome, 5p15	<i>PDCD6</i>	AGGTGTCGTACG-AACAGTACCTGT
	<i>TERT</i>	TCTTTCTTTTAT-GTCACGGAGACC
	<i>SEMA5A</i>	ACTTGGGCTGGA-GTGCCACGTGG
Sotos syndrome, 5q35.3	<i>NSDI</i>	ACCCACCCACTG-TTATGCAGAACA
	<i>NSDI</i>	GGAAAGACTGTT-TGCAAATGTGGA
	<i>ELN</i>	TTTCCCGGCTTT-GGTGTCCGAGTC

Williams-Beuren duplication syndrome, 7q11.23	<i>ELN</i>	ACTCATCAACG-TTGGTGCTACTG
Langer-Giedion syndrome, 8q24.11-q24.13	<i>TRPS1</i>	CTCTTTTTTGGT-GCTGCTGGTTTC
	<i>EXT1</i>	GGTGATAATGTT-AAACCCACTTAA
9q22.3 microdeletion syndrome	<i>FANCC</i>	GATAACTCACGA-GATCATTGGCTT
	<i>PTCH1</i>	GTTAATGACTCC-CAAGCAAATGTA
DiGeorge syndrome-2, 10p13-p14	<i>GATA3</i>	GAGCAACGCAAT-CTGACCGAGCAG
	<i>MKRN3</i>	GGCTGCAGACCT-TGCACCCCATGG
	<i>NDN</i>	ACACTGCTGCGA-GGGTAGTGGGCA
Prader-Willi / Angelman syndrome, 15q11.2	<i>SNRPN</i>	ACCACCACCTGA-TGAAAGATACAC
	<i>SNRPN</i>	GATTCCTCGCTA-CTCCAATATGGC
	<i>UBE3A</i>	AGTGTATTGGA-AGTGAGCCACCA
Witteveen-Kolk syndrome / 15q24 microdeletion syndrome	<i>SEMA7A</i>	TACCCACAGAGA-CCTTCCAGGTGG
	<i>CYP11A1</i>	GTCAACCTGAAT-AATAATTTCCGGG
Rubinstein-Taybi syndrome, 16p13.3	<i>CREBBP</i>	AGCAGGTGAAAA-TGGCTGAGAACT
Miller-Dieker syndrome / Lissencephaly-1, 17p13.3	<i>PAFAH1B1</i>	TGTAGGCACTCT-ATAGATCAAGCT
	<i>PAFAH1B1</i>	CCAGAAAAATAT-GCATTGAGTGGT
Smith-Magenis syndrome / Potocki-Lupski syndrome, 17p11.2	<i>RAI1</i>	CCAAGGATCTCA-TCTGGCCACCGC
	<i>DRC3</i>	CGGATCTCCAAG-ATCGACTCCCTG
	<i>LLGL1</i>	CAGCAGTCTGCA-TCTCTGGGAGAT
NF1 microdeletion syndrome, 17q11.2	<i>NF1</i>	GGATCATGAAGA-ATTACTACGTAC
	<i>NF1</i>	TCTTGTGTCTT-TGGGTGTATTAG
Koolen-de Vries syndrome / 17q21.31 microduplication syndrome	<i>MAPT</i>	GTCGCCAGTGGT-GTCTGGGGACAC
	<i>KANSL1</i>	CCGCTTCTTACA-GCTCAGTACAGG
	<i>IL17RA</i>	GCAGAGTTATCT-GTCCTGCAGCTG
	<i>BID</i>	CTACTGGTGTTT-GGCTTCCTCCAA
	<i>CLDN5</i> , region AB	TTCGCCAACATT-GTCGTCCGCGAG
DiGeorge / 22q11.2 duplication / Distal 22q11.2 deletion syndrome	<i>GP1BB</i> , region AB	CACAACCGAGCT-GGTGCTGACCGG
	<i>SNAP29</i> , region CD	GTATCCACTTAC-CTGTATCATCCA
	<i>PPIL2</i> , distal 22q11	GAAGAGCCCTCA-ACCAGTGCCACT
	<i>RTDR1</i> , distal 22q11	GGTGTGTCATTT-TGACGTATCCCC
	<i>ARSA</i>	GGAGGATCAGAT-CTCCGCTCGAGA
Phelan-McDermid syndrome, 22q13	<i>SHANK3</i>	AAGCGGCGAGTT-TATGCCCAGAAC
	<i>RABL2B</i>	AATACACAAGCC-GTAAAATCGAGT
X chromosome copy number changes	<i>DMD</i>	AAACTCATAGAT-TACTGCAACAGT
	<i>MECP2</i> , exon 1	CATTAATCCTTA-ACATTCAAATTC
Rett syndrome / MECP2 duplication syndrome, Xq28	<i>MECP2</i> , exon 3	ACTTGTCTGCA-GACTGGCATGTT
	<i>MECP2</i> , exon 4	TTTCATCCTCCA-TGCCAAGGCCAA

CLDN5 (OMIM*602101) are prevalent in heart and skeletal muscle [Sirotkin et al., 1997]. 22q11.2DS cases with neurological and ocular disorders have been described presenting mutations in this gene. However, *CLDN5* pathways are not yet well defined to

explain its association with the CHD development in individuals diagnosed with 22q11.2DS [Cordovez et al., 2014; Y. Guo et al., 2020]. *SNAP29* deficiency (OMIM*604202) is related to CEDNIK syndrome with different clinical manifestations (microcephaly, severe neurological impairment, psychomotor retardation, facial dysmorphism, palmoplantar keratoderma and ichthyosis) [Sprecher et al., 2005]. Studies demonstrate that deletions in these genes can affect cardiovascular development [McDonald-McGinn et al., 2013; Motahari et al., 2019], as evidenced in our sample. Patients with Bernard-Soulier syndrome (BSS) and 22q11.2DS, or *GP1BB* deletion (OMIM*138720) are particularly susceptible to bleeding and thrombocytopenia [Bartsch et al., 2011; Emanuel et al., 2001], condition present in P113 patient, while patient P81 suffered from ecchymosis. There is no doubt that at least the 3Mb typically deleted region of chromosome 22q11.2 has a correlation with CHD development, including the *CLDN5*, *GP1BB* and *SNAP29* genes. However, the exact molecular mechanism of these CHD-associated genes still needs to be studied [Hou et al., 2020].

Karyotype analysis identified triple X, duplication 4p16.3 and deletion 17p13.3, results confirmed by MLPA proving its effectiveness in screening for common chromosomal alterations. MLPA identified *MECP2* duplication syndrome (dup Xq28, *MECP2*), Wolf-Hirschhorn syndrome (del4p16.3; *PIGG*, *LETMI* and *WHSC1*) and Miller-Dieker syndrome (del17p13.3, *PAFAH1B1*), bringing the detail of the damaged genes.

Patient P47 (del4p16.3) presented facial and foot dysmorphisms and patient P35 (del17p13.3, *PAFAH1B1*) has minor facial dysmorphisms (micrognathia, palpebral fissures upwards and wide nasal bridge), dysmorphisms in hands and fingers, and hypoactivity and hypotonia that may be linked to developmental delay. Bi et al. [2016] detected 4p16.3 CNVs (deletion and duplication) prenatally and abnormal ultrasound

findings such as clubfeet, heart defects, and cystic hygroma. *MECP2* duplication syndrome, a rare X-linked disorder that predominantly affects males, is also known to produce symptoms that include severe motor and cognitive problems, delayed or absent speech development, autistic features, seizures, ataxia, recurrent respiratory infections, and decreased survival [D’Mello, 2021]. The female patient (P42) identified with *MECP2* duplication syndrome has characteristics not compatible with the description.

Microdeletions in *SNRPN* (P157) and *NF1* (P203) genes, compatible with Prader-Willi/Angelman syndrome and *NF1* microdeletion syndrome were identified. The patient P203 presented *NF1* deletion with hypochromic spots, hair changes (head and sacrum), skeletal and hand changes (clinodactyly), in addition to facial dysmorphisms and CHD. Neurofibromatosis 1 (*NF1*) is an autosomal dominant disorder with a broad spectrum of clinical characteristic, as presence of multiple café-au-lait spots, neurofibromas, inguinal freckling, iris hamartomas, tumors, or skeletal abnormalities, learning disabilities are present in 50% of the patients. Mutation detection in *NF1* is still a challenge, and MLPA appears as one of the methodologies indicated in the identification of *NF1* syndrome [Ishida & Gupta, 2021].

Lee et al. [2019] reported a clinical experience with MLPA for microdeletion syndromes in prenatal diagnosis of 7,522 pregnant Korean women. A total of 124 women (1.6%) had genomic imbalances (gene loss (33.6%) and gene gain (66.4%)). Most cases with genomic imbalances showed no abnormal karyotype (64.5%). Further, Zhang et al. [2021] revealed a prevalence of 0.86% of 22q11.2 genomic imbalance in 6,034 Chinese patients with development delay and/or intellectual disability, where 71.2% were heterozygous deletions and 28.8% heterogeneous duplications. Most of these patients (65.4%) carried typical imbalance from LCR22 A to D, including *CLDN5*, *GP1BB*, and *SNAP29* genes. A screening by MLPA P245 and G-band karyotyping, followed by

confirmation of positive patients through MLPA P250 permitted a precise definition of the abnormal region.

Maran et al. [2020] suggest the possibility of using MLPA as a potential alternative diagnostic method in 22q11.2DS screening. Forty-two nonsyndromic Malaysians with CHD were evaluated by MLPA and confirmed the presence of deletions as detected by the FISH assay in two patients. FISH failed to detect deletions located outside the typical deletion region (LCR22 A-B to LCR22 D-E), and deletions outside of the 22q11.2 regions as well as duplications, a region covered by MLPA.

These up-to-date studies show that MLPA identification of microdeletions and microduplication within or close to the typical deletion region may prove to be relevant mainly in relation to the identification of candidate genes and the precise extension of the region involved [Jalali et al., 2008]. Also, MLPA data can contribute to the understanding of the genes involved in the etiology of MMS phenotype. Currently, more than 300 probes sets are commercialized aimed at the investigation and diagnosis of several genetic diseases [Sørensen et al., 2012; Stuppia et al., 2012]. Studies prove the high sensitivity and specificity of the method, providing a rapid and accurate clinical for prenatal identification of common chromosomal alteration [Omrani et al., 2014]. For rare diseases, the value does not exceed \$44.00 (USD) per test, being compatible with its use in health systems [Brazilian National Supplementary Health Agency, 2018]. However, the technique also has limitations related to the inability to identify balanced rearrangements, low mosaicism, and being sensitive to the quality of the DNA used [Kozłowski et al., 2008].

CONCLUSION

Molecular alterations are strongly associated with MMS in pediatric patients with CHD. Results brought by the use of MLPA are of great help in planning and specialized care in referral centers, allowing the diagnosis of patients with suspected MMS. This tool allows the identification of rare and complex cases, bringing relevance to the investigation of MMS especially in patients with CHD associated with mental retardation and developmental disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS,17/2551-0001063-9), Programa de Extensão Universitária do Ministério da Educação e Cultura (PROEXT), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (302931/2019-8).

STATEMENT OF ETHICS

Patient's parents agreed to participate in the study and informed consent was given and signed afterwards. The study was approved by the institutional Ethics Committee (number 2.315.917).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Authors declare they have no conflict of interest.

FUNDING SOURCES

This study was supported by FAPERGS (17/2551-- 0001063–9), Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul; PROEXT, Support Program for University Extension of MEC - Ministry of Education and Culture; and CAPES, Coordination of Superior Level Staff Improvement (001). Research productivity fellowship Brazil (CNPq) (301834/2016–4).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.A.F., A.S.S., B.L.D. and P.R.G.Z performed genetic testing and prepared the manuscript; M.A.F., A.B.G., and P.R.G.Z supervised genetic testing; M.A.F., A.S.S. and R.F.M.R. reviewed clinical data and edited the manuscript; M.A.F., A.S.S., B.L.D., reviewed the medical records; M.A.F., P.R.G.Z. and R.F.M. R. designed the study, supervised genetic tests, wrote and edited the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Andersen TA, Troelsen KLL, Larsen LA. Of mice and men: Molecular genetics of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71(8), 1327–1352. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1430-1>.
- Bartsch I, Sandrock K, Lanza F, Nurden P, Hainmann I, Pavlova A, et al. Deletion of human GP1BB and SEPT5 is associated with Bernard-Soulier syndrome, platelet secretion defect, polymicrogyria, and developmental delay. *Thromb Haemost.* 2011; 106(3), 475–483. <https://doi.org/10.1160/TH11-05-0305>.
- Benard-Slagter A, Zondervan I, de Groot K, Ghazavi F, Sarhadi V, Van Vlierberghe P, et al. Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for Detection of Key

- Copy Number Alterations in T- and B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *JMD*. 2017; 19(5), 659–672. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.05.004>.
- Bi W, Cheung SW, Breman AM, Bacino CA. 4p16.3 microdeletions and microduplications detected by chromosomal microarray analysis: New insights into mechanisms and critical regions. *Am J Med Genet A*. 2016; 170(10), 2540–2550. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37796>.
- Botto LD, Correa A, Erickson JD. Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects. *Pediatrics*. 2001; 107(3), E32. <https://doi.org/10.1542/peds.107.3.e32>.
- Brazilian National Supplementary Health Agency (ANS). Diretrizes de utilização para cobertura de procedimentos na saúde suplementar. Accessed 09 September 2021. http://www.ans.gov.br/images/ANEXO/RN/Anexo_II_DUT_Rol_2018_alterado.pdf.
- Brazil Ministry of Health. TabNet DATASUS. 2021. Accessed 09 September 2021. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>.
- Calcagni G, Unolt M, Digilio M, Baban A, Versacci P, Tartaglia M, et al. Congenital heart disease and genetic syndromes: New insights into molecular mechanisms. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017; 17(9). <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1360766>.
- Campos CMR, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigation of Copy Number Variation in Children with Conotruncal Heart Defects. *Arq Bras Cardiol*. 2015; 104, 24–31. <https://doi.org/10.5935/abc.20140169>.
- Castilla EE, Orioli IM. ECLAMC: The Latin-American collaborative study of congenital malformations. *J Community Genet*. 2004; 7(2–3), 76–94. <https://doi.org/10.1159/000080776>.
- Cordovez JA, Capasso J, Lingao MD, Sadagopan KA, Spaeth GL, Wasserman BN, et al. Ocular manifestations of 22q11.2 microduplication. *Ophthalmology*. 2014; 121(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.06.040>.
- Cowan JR, Ware SM. Genetics and genetic testing in congenital heart disease. *Clin Perinatol*. 2015; 42(2), 373–393, ix. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2015.02.009>.
- Deak KL, Horn SR, Rehder CW. The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: Variable expressivity and genomic complexity. *Clin Lab Med*. 2011; 31(4), 543–564, viii. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2011.08.008>.
- Digilio M, Marino B, Capolino R, Dallapiccola B. Clinical manifestations of Deletion 22q11.2 syndrome (DiGeorge/Velo-Cardio-Facial syndrome). *Images Paediatr Cardiol*. 2005; 7(2), 23–34.
- D’Mello SR. MECP2 and the biology of MECP2 duplication syndrome. *J Neurochem*. 2021. <https://doi.org/10.1111/jnc.15331>.
- El Malti R, Liu H, Doray B, Thauvin C, Maltret A, Dauphin C, et al. A systematic variant screening in familial cases of congenital heart defects demonstrates the

usefulness of molecular genetics in this field. *Eur J Hum Genet.* 2016; 24(2), 228–236. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.105>.

Emanuel BS, McDonald-McGinn D, Saitta SC, Zackai EH. The 22q11.2 deletion syndrome. *Adv Pediatr.* 2001; 48, 39–73.

Floriani MA, Glaeser AB, Dorfman LE, Agnes G, Rosa RFM, Zen PRG. GATA4 Deletions Associated with Congenital Heart Diseases in South Brazil. *J Pediatr Genet.* 2021; 10(2), 92–97. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1714691>.

Goldmuntz E. 22q11.2 deletion syndrome and congenital heart disease. *Am J Med Genet.* 2020; 184(1), 64–72. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31774>.

Guo Y, Singh LN, Zhu Y, Gur RE, Resnick A, Anderson SA, et al. Association of a functional Claudin-5 variant with schizophrenia in female patients with the 22q11.2 deletion syndrome. *Schizophr Res.* 2020; 215, 451–452. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.09.014>.

Guo Z, Li B, Tian P, Li D, Zhang Y, Li Q, et al. DGCR8 expression is altered in children with congenital heart defects. *Clin Chim Acta.* 2019; 495, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.03.1619>.

Hacıhamdioğlu B, Hacıhamdioğlu D, Delil K. 22q11 deletion syndrome: Current perspective. *Appl Clin Genet.* 2015; 8, 123–132. <https://doi.org/10.2147/TACG.S82105>.

Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39(12), 1890–1900. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)01886-7](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)01886-7).

Hou HT, Chen HX, Wang XL, Yuan C, Yang Q, Liu ZG, He GW. Genetic characterization of 22q11.2 variations and prevalence in patients with congenital heart disease. *Arch Dis Child.* 2020; 105(4), 367–374. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-316634>.

Ishida C, Gupta V. Genetics, Molecular Testing. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. 2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560712/>

Jalali GR, Vorstman JAS, Errami A, Vijzelaar R, Biegel J, Shaikh T, et al. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Human Mutation.* 2008; 29(3), 433–440. <https://doi.org/10.1002/humu.20640>.

Kjaergaard S, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, Gerdes T, et al. Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat Diagn.* 2010; 30(10), 995–999. <https://doi.org/10.1002/pd.2604>.

Kozłowski P, Jasinska, AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis.* 2008; 29(23), 4627–4636. <https://doi.org/10.1002/elps.200800126>.

Kuo YL, Chen CP, Wang LK, Ko TM, Chang TY, Chern, SR, et al. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of chromosome 22q11.2 deletion syndrome

associated with congenital heart defects. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2014; 53(2), 248–251. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2014.04.021>.

Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* 2007; 39 (7 Suppl), S48-54. <https://doi.org/10.1038/ng2092>.

Lee D, Na S, Park S, Go S, Ma J, Yang S, et al. Clinical experience with multiplex ligation-dependent probe amplification for microdeletion syndromes in prenatal diagnosis: 7522 pregnant Korean women. *Mol Cytogenet.* 2019; 12, 10. <https://doi.org/10.1186/s13039-019-0422-8>.

Liu Y, Chang X, Glessner J, Qu H, Tian L, Li D, et al. Association of Rare Recurrent Copy Number Variants with Congenital Heart Defects Based on Next-Generation Sequencing Data from Family Trios. *Front Genet.* 2019;10, 819. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00819>.

Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, Clusellas N, Margarit E, Martínez-Barrios E, et al. MLPA: A prenatal diagnostic tool for the study of congenital heart defects? *Gene.* 2012; 500(1), 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.030>.

Maran S, Faten SA, Lim SHE, Lai KS, Ibrahim WPW, Ankathil R, et al. Screening of 22q11.2DS Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification as an Alternative Diagnostic Method. *BioMed Res Int.* 2020; e6945730. <https://doi.org/10.1155/2020/6945730>.

Mastroiacovo P, Rossi P, Cancrini C, Azzari C, DiGilio M, Marino B, et al. Chromosome 22q. 11 deletion-Recommendations for Diagnosis and Treatment. IPINET: Italian Primary Immunodeficiencies Strategic Scientific Committee. 2005. http://www.aieop.org/stdoc/prot/rec_del22_en_06.pdf.

McDonald-McGinn DM, Fahiminiya S, Revil T, Nowakowska BA, Suhl J, Bailey A, et al. Hemizygous mutations in SNAP29 unmask autosomal recessive conditions and contribute to atypical findings in patients with 22q11.2DS. *J Med Genet.* 2013; 50(2), 80–90. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101320>.

Motahari Z, Moody SA, Maynard TM, LaMantia AS. In the line-up: Deleted genes associated with DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome: are they all suspects? *J Neurodev Disord.* 2019; 11(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s11689-019-9267-z>.

Omrani MD, Azizi F, Rajabibazl M, Safavi Naini N, Omrani S, Abbasi AM, et al. Can we rely on the multiplex ligation-dependent probe amplification method (MLPA) for prenatal diagnosis? *Iran J Reprod Med.* 2014;12(4), 263–268.

Ou Z, Berg JS, Yonath H, Enciso VB, Miller DT, Picker J, et al. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet Med.* 2008; 10(4), 267–277. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31816b64c2>.

Rosa RFM, Pilla CB, Pereira VLB, Flores JAM, Golendziner E, Koshiyama DB, et al. 22q11.2 deletion syndrome in patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit

in Brazil. *Am J Med Genet.* 2008; 146A(13), 1655–1661.

<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32378>.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(12), e57.

<https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>.

Simmons MA, Brueckner M. The Genetics of Congenital Heart Disease... Understanding and Improving Long Term Outcomes in Congenital Heart Disease: A Review for the General Cardiologist and Primary Care Physician. *Curr Opin Pediatr.* 2017; 29(5), 520–528. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000538>.

Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, Puech A, Das Gupta R, Patanjali SR, et al. Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics.* 1997;42(2), 245–251. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4734>.

Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KHA. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet.* 2003;40(12), 907–912. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.12.907>.

Sørensen KM, El-Segaier M, Fernlund E, Errami A, Bouvagnet P, Nehme N, et al. Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: Early diagnosis of syndromic patients. *Am J Med Genet.* 2012;158A(4), 720–725. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35214>.

Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Mizrahi-Koren M, Rapaport D, Goldsher D, Indelman M, et al. A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. *Am J Hum Genet.* 2005; 77(2), 242–251. <https://doi.org/10.1086/432556>.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(3), 3245–3276. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>.

Zhang Y, Liu X, Gao H, He R, Zhao Y. Identifying of 22q11.2 variations in Chinese patients with development delay. *BMC Med Genomics.* 2021; 14:26. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00849-z>.

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 Pediatrics.* 2017; 17(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12887-017-0863-3>

5. CONCLUSÃO

Alterações moleculares estão fortemente associadas à MMS em pacientes pediátricos com CHD. Os resultados trazidos pela utilização do MLPA são de grande ajuda no planejamento e atendimento especializado em centros de referência, fornecendo prováveis diagnósticos em pacientes com suspeita de MMS. Esta ferramenta permite a identificação de casos raros e complexos, trazendo relevância para a investigação de MMS especialmente em pacientes com CHD associada a atraso mental e de desenvolvimento.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras utilizadas estão armazenadas no Laboratório de Citogenética da UFCSPA e foram coletadas no âmbito do projeto “Prevalência e caracterização clínica dos pacientes que internam na Unidade de Tratamento Intensivo Cardiológica do Hospital da Criança Santo Antônio e detecção da síndrome de deleção 22q11 através de exame de cariótipo sincronizado e de técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH)” aprovado pelos CEP da UFCSPA, parecer n 153-06 (Anexo A) e da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, carta nº 004/06 (Anexo B).

O presente trabalho faz parte do projeto “Estudo molecular e citogenético molecular de pacientes portadores de cardiopatia congênita: em busca de novas etiologias”, aprovado sob parecer 1871676 (CEP/UFCSPA) (Anexo C).

Somente pacientes cujos pais consentiram em participar do estudo foram incluídos. Será mantido o anonimato dos indivíduos envolvidos, sendo os mesmos identificados apenas através de números.

As limitações deste estudo são devido ao carácter retrospectivo e à qualidade da amostra de DNA, onde não foi possível testar alguns pacientes (3 casos) e impossibilidade de nova coleta. Além disso, apesar do MLPA ser uma ótima ferramenta para detectar alterações genéticas, ele por si só não basta para concluir um diagnóstico, sendo necessário testagem complementar por PCR para confirmação, etapa que não ocorreu devido a falta de financiamento.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFCSPA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
APROVADO PELA CARTA Nº 380/2004-CONEP/CNS/MS
RUA SARMENTO LEITE, 245 – FONE: (51) 3224.8822
CEP 90050-170 – PORTO ALEGRE – RS - cep@fffcempa.tche.br

Of. 192/06-CEP

Porto Alegre, 13 de abril de 2006.

Ilmo. Sr.

Prof. Giorgio Adriano Paskulin


Nesta Faculdade

Senhor Professor

Informamos que seu projeto “Prevalência e Caracterização Clínica dos Pacientes que Internam na Unidade de Tratamento Intensivo Cardiológica do Hospital da Criança Santo Antônio e Detecção da Síndrome de Deleção 22q11 Através de Exame de Cariótipo Sincronizado e de Técnica de Hibridização in situ Fluorescente (FISH).”, Processo nº 048/05, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, na reunião de 13 de abril de 2006, sendo o projeto aprovado, conforme parecer consubstanciado nº 153-06, em anexo.

Outrossim informamos que de acordo com o Art. 4º, letra c, do Regulamento do CEP, V. Sa. deverá nos encaminhar relatórios semestrais do desenvolvimento do projeto.

Atenciosamente,



Prof. José Geraldo Vernet Taborda
Coordenador do CEP/FFFCMPA

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da (ISCMPA)



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Amnes Dias, 285 - Telefone: (51) 3214.8080 - Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br - E-mail: marketing@santacasa.tche.br



Compromisso com a excelência

Dr. Giorgio A. Paskulin
 Pesquisador Responsável
 Projeto 1014/05

Carta nº 004/06 CEP/ISCMPA

Porto Alegre, 10 de março 2006.

O Comitê de Ética em Pesquisas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, em resposta à solicitação do pesquisador responsável, referente ao projeto de pesquisa intitulado: *“Prevalência e caracterização clínica dos pacientes portadores de microdeleção 22q11 detectados através da técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH) que internam por suspeita de cardiopatia congênita numa Unidade de Tratamento Intensivo de um hospital pediátrico”*, que está sendo conduzido em nossa Instituição sob a responsabilidade do Dr. Giorgio A. Paskulin, emiti a seguinte informação:

“A Conep após o envio do presente projeto para avaliação, informa que o referido estudo não necessita da aprovação da mesma, sendo de responsabilidade do CEP a aprovação final. O presente Comitê após esta análise, não encontra óbices ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição”.

Sendo o que tínhamos para o momento, manifestamos nossos protestos de apreço e consideração.

Atenciosamente,

Dr. Cláudio Teloken
 Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo molecular e citogenético molecular de pacientes portadores de cardiopatia congênita: em busca de novas etiologias

Pesquisador: Rafael Fabiano Machado Rosa

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 61389516.0.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Estamos enviando o relatório parcial do projeto, com os resultados obtidos até o

Data do Envio: 20/12/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.201.348

Apresentação da Notificação:

Trata-se do envio de Relatório Parcial de projeto aprovado em 2016.

O mesmo encontra-se em andamento, dentro do cronograma.

Os resultados parciais obtidos já encontram-se organizados em um artigo submetido a periódico científico da área.

Objetivo da Notificação:

Apresentação de Relatório Parcial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos relatados durante a execução do estudo.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 3.201.348

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O relatório apresentado permite a verificação do andamento do projeto, que já possui produção científica relacionada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O relatório está adequado, apresentando resultados, obtidos dentro do cronograma previsto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O desenvolvimento da pesquisa está adequado ao proposto e os resultados obtidos pertinentes aos objetivos propostos.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	RELATORIO_PARCIAL_CARDIOPATIA_S_RAFANEL_ROSA_12_18.pdf	20/12/2018 20:15:57	Rafael Fabiano Machado Rosa	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 15 de Março de 2019

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))