

FECHA DE RECEPCIÓN: 7 de mayo de 2020

FECHA DE ACEPTACIÓN: 12 de noviembre
de 2020FECHA DE PUBLICACIÓN: 11 de febrero de
2021

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: Beca Salud Investiga "Dr. Abraam Sonis", otorgada por la Secretaría de Gobierno de Salud de la Nación a través de la Dirección de Investigación para la Salud, y Subsidio PID, 2012-0060, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

***AUTOR DE CORRESPONDENCIA:**
mdelea@anlis.gob.ar

Registro Nacional de Investigaciones en
Salud N°: IS002575

ANÁLISIS DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS, DESBALANCES GENÓMICOS Y VARIANTES DE SECUENCIA COMO CAUSA DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

*Analysis of chromosomal abnormalities, genomic imbalances,
and sequence variants as cause of congenital heart defects*

* **Marisol Delea**¹. Lic. en Biología.
Soledad Massara². Bioquímica.
Carlos David Bruque^{1,3}. Dr. en Biología.
Lucía Daniela Espeche¹. Lic. en Genética.
Melisa Ivana Taboas¹. Dra. en Biología.
Pablo Barbero¹. Dr. en Medicina.
María Paz Bidondo¹. Médica.
Rosa Liasovich¹. Dra. en Biología.
Boris Groisman¹. Médico.

Viviana Cosentino⁴. Dra. en Medicina.
Celeste Martinoli⁵. Médica.
Lilian Furforo^{1,6}. Bioquímica.
Mónica Ritler⁶. Dra. en Medicina.
Emilio Kolomenski⁷. Lic. en Ciencias Biológicas.
Jaen Oliveri⁷. Médica.
Paloma Brun⁷. Médica.
Sandra Rozental¹. Bioquímica.
Liliana Beatriz Dain^{1,7}. Dra. en Bioquímica.

¹ Centro Nacional de Genética Médica "Dr. Eduardo E. Castilla", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Hospital El Cruce "Dr. Néstor C. Kirchner", Provincia de Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁴ Hospital Gandulfo, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

⁵ Hospital de Niños "Sor María Ludovica", Provincia de Buenos Aires, Argentina.

⁶ Hospital Materno Infantil "Dr. Ramón Sardá", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁷ Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. INTRODUCCIÓN: Las cardiopatías congénitas (CC) son causadas por el desarrollo anómalo del corazón durante el período embrionario. Abarcan un amplio espectro de anomalías estructurales de las cavidades cardíacas o de los grandes vasos, con una prevalencia mundial de 6 a 9 por 1000 nacimientos. En Argentina constituyen un tercio de las anomalías congénitas (AC) al nacimiento. Si bien su etiología es heterogénea, se ha observado recurrencia familiar acorde con la influencia de factores genéticos. El objetivo del estudio fue evaluar la presencia de anomalías cromosómicas, desbalances genómicos o variantes de secuencias en una muestra de niños afectados con CC en Argentina. **MÉTODOS:** Se incluyó a 289 pacientes con CC de hasta 16 años. Se realizó un cariotipo para pacientes con otras AC y análisis por amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (MLPA) de regiones genómicas asociadas a CC para aquellos con CC conotruncal. En muestras seleccionadas, se analizaron desbalances genómicos por microarreglos de ADN (*array*-CGH) o variantes de secuencia en el gen *NKX2-5*. **RESULTADOS:** Hubo 9 pacientes que presentaron anomalías cromosómicas, 21 desbalances por MLPA y 8 por *array*-CGH. No se hallaron variantes patogénicas en *NKX2-5* en los casos estudiados. **DISCUSIÓN:** Se halló la causa de la afección en el 13% de los casos analizados. El estudio de pacientes con CC aisladas o asociadas a otras AC no había sido abordado previamente en Argentina mediante este algoritmo.

PALABRAS CLAVE: Cardiopatías congénitas; Genética médica; Anomalías cromosómicas; Desbalances genéticos

ABSTRACT. INTRODUCTION: Congenital heart diseases (CHD) are structural anomalies of the heart and great vessels present at birth. CHD encompass a broad spectrum of anomalies affecting around 0.6%-0.9% of all live births worldwide. In Argentina, CHD account for one-third of all birth defects. Their etiology is heterogeneous; however, family recurrence has been observed in accordance with the influence of genetic factors. The objective of the study was to analyze the presence of chromosomal abnormalities, genomic imbalances and/or sequence variants in a sample of children with CHD in Argentina. **METHODS:** A total of 289 patients with CHD up to 16 years old were included. Karyotyping was performed for patients with other birth defects, and genomic regions associated with CHD were studied by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in patients with conotruncal CHD. In selected samples, genomic imbalances and/or sequence variants were analyzed by array comparative genomic hybridization (a-CGH) or by direct sequencing of the *NKX2-5* gene, respectively. **RESULTS:** There were 9 patients with chromosomal abnormalities, 21 had genomic imbalances detected by MLPA and 8 by array-CGH. No pathogenic variants were found in *NKX2-5*. **DISCUSSION:** The genetic cause was found in 13% of the analyzed cases. This work represents the first study in patients with CHD either isolated or associated with other birth defects in Argentina.

KEY WORDS: Congenital heart diseases; Medical genetics; Chromosome anomalies; Genomic imbalances

INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas (CC) abarcan un conjunto de anomalías estructurales y funcionales que se originan durante la embriogénesis y afectan la estructura de las cavidades cardíacas y/o de los grandes vasos. Poseen una prevalencia mundial que oscila entre 6 y 9 por 1000 nacidos vivos¹ y constituyen una de las principales causas de muerte prenatal, neonatal e infantil y de morbilidad en edad pediátrica². La mayoría de las CC se presentan de manera aislada, sin otros defectos asociados, aunque en el 25 al 40% de los casos forman parte de una entidad sindrómica. Los defectos septales, como la comunicación interventricular (CIV) o interauricular (CIA), son las CC más comunes (alrededor del 50%) y constituyen la mayor proporción de los defectos cardíacos aislados³. Las CC del tipo conotruncal (CCC), como la tetralogía de Fallot (TDF), la trasposición de grandes vasos (TGV), la doble salida del ventrículo derecho (DSVD), entre otras, afectan la formación de los tractos de salida y el arco aórtico³, constituyen del 20 al 30% de las CC y son la primera causa de cianosis de origen cardíaco durante el primer año de vida⁴.

La etiología de las CC es heterogénea. En el 50-70% de los casos no existe una causa identificable para el defecto cardíaco, y se lo considera de etiología multifactorial por la interacción de factores genéticos y ambientales⁵. Entre las causas ambientales se encuentran los teratógenos, como la exposición materna a alcohol, diabetes pregestacional, talidomida, anticonvulsivantes, agentes infecciosos, etc⁶.

Entre los factores genéticos, las anomalías cromosómicas se detectan en un 9-18% de los pacientes, y en general en niños que poseen alguna otra anomalía además de la cardíaca⁷. Algunos ejemplos son las trisomías 21, 18, 13, la monosomía del X y las deleciones 5p o 4p⁸, entre otras. Las microdeleciones o microduplicaciones de regiones genómicas, comúnmente denominadas CNV (*Copy Number Variations*), se presentan entre el 5% y el 30% de los pacientes⁹⁻¹¹. Son más frecuentes en pacientes que poseen alguna otra anomalía extracardíaca¹², pero también se han identificado en individuos con CC aisladas (CCA)⁴. La más común es la microdelección en 22q11 (del22q11), que se observa en 13-18% de los pacientes con CCC^{13,14}.

En el 5-20% de los pacientes con CC se identifican alteraciones en un único gen. Algunas de ellas son causales de síndromes monogénicos, aunque también pueden conducir a la aparición de CCA¹⁵. La lista de genes implicados es dinámica, pero se estima que hay alrededor de 450 genes asociados a CC^{5,16,17}. *NKX2-5* fue el primer factor de transcripción para el cual se observó una asociación entre variantes génicas y CC^{17,18}. Es uno de los genes que ha sido más estudiado y en los que se han encontrado más variantes de secuencia en relación con estas patologías¹⁹.

Según diversos estudios, la presencia de defectos genéticos se relaciona con el desarrollo de la patología, aunque hasta la fecha no se conocen todas las variantes potencialmente patogénicas. En Argentina, aún son muy limitados los estudios orientados a conocer las diferentes causas genéticas

de las CC. Teniendo en cuenta estas observaciones, en el Departamento de Diagnóstico Genético del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM) se inició una línea de investigación con el objetivo de analizar regiones genómicas y genes candidatos en un grupo de pacientes argentinos con CC, para detectar variantes genéticas asociadas a la patología. En un estudio multicéntrico preliminar realizado en 2013 en 80 pacientes con CCC, se observó que el 21% poseía deleción 22q11 y el 6%, un desbalance en el brazo corto del cromosoma 17²⁰.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de anomalías cromosómicas, desbalances genómicos o variantes de secuencias en una muestra de afectados con CC en Argentina y, en un grupo de pacientes con CCC del estudio previo ya referido, abordar específicamente la presencia de variantes en el gen *NKX2-5*.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de una serie de casos, en el que se analizaron causas genéticas en pacientes con CC. La población blanco fueron los pacientes de hasta 16 años de edad con CC, atendidos en las instituciones participantes.

Se efectuó un muestreo por conveniencia entre junio de 2015 y febrero de 2019. Se incluyó a pacientes con CC detectados en maternidades de la Región Sanitaria VI de la provincia de Buenos Aires y la maternidad Sardá de la ciudad de Buenos Aires, que participan de la Red Nacional de Anomalías Congénitas (RENAC), así como el Hospital El Cruce Dr. Néstor Carlos Kirchner y el Hospital de Niños Sor María Ludovica, ambos de la provincia de Buenos Aires. Para el estudio específico de variantes en *NKX2-5* se incluyó a pacientes con CCC provenientes de cuatro hospitales de Resistencia (Chaco), La Plata (Buenos Aires), Neuquén Capital (Neuquén) y Salta Capital (Salta) en el período comprendido entre mayo de 2013 y mayo de 2014.

Se incluyó a pacientes de hasta 16 años con una anomalía estructural del corazón aislada o asociada a otras anomalías congénitas (AC). Los criterios de exclusión comprendieron: fetos muertos, presencia de ductus en recién nacidos menores a 37 semanas de gestación o de foramen oval y niños con síndrome de Down. Asimismo, quedaron excluidos los pacientes cuyos padres o representantes legales no otorgaron el consentimiento para participar en el estudio.

La muestra incluyó a 289 afectados: 98 con anomalías congénitas múltiples (ACM, 48 niñas y 50 niños) y 191 con CCA (96 niñas y 95 niños). Además, se incluyó a 62 pacientes con CCC (11 con ACM y 51 con CCA) del estudio multicéntrico previo, para los cuales solo se analizaron variantes en el gen *NKX2-5*.

La variable dependiente del estudio fue la CC con su descripción a campo abierto. Las variables independientes fueron: sexo (femenino, masculino, indeterminado); edad al diagnóstico (expresada en meses postnatales); presencia de otra anomalía congénita asociada (sí/no); anomalía/s congénita/s asociada/s (descripción a campo abierto); presencia de anomalía cromosómica (sí/no); anomalía

cromosómica (descripción a campo abierto); presencia de CNV (sí/no); descripción de la CNV (descripción a campo abierto); clasificación de la CNV (ver más abajo); presencia de variantes de secuencia (sí/no); variante de secuencia (descripción a campo abierto); y clasificación de la variante (ver más abajo).

En lo que respecta al algoritmo de estudio, se realizó la anamnesis completa para los afectados incluidos entre 2015 y 2019. A todos los pacientes con ACM se les efectuó el estudio citogenético para determinación del cariotipo, mientras que aquellos que presentaron CCC —ya sea aisladas o con otra anomalía mayor— fueron sometidos a un estudio de amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (MLPA, por sus siglas en inglés) para diagnóstico de delección 22q11.2. A posteriori, a un subgrupo de pacientes seleccionados con ACM se les realizó estudio de hibridación genómica comparada por microarreglos de ADN (a-CGH, por sus siglas en inglés).

El estudio citogenético se realizó por la técnica de bandeo G (tripsinización y coloración con Wright) en al menos 25 metafases/paciente con un nivel de resolución de 400-550 bandas a partir de sangre periférica anticoagulada con heparina y cultivada según protocolos estándar.

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante precipitación salina de una muestra de sangre periférica²¹.

Los desbalances en la región 22q11 y otras 5 regiones genómicas asociadas a CC se evaluaron mediante MLPA utilizando un kit comercial (SALSA MLPA P250, MRC-Holland, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante.

Para la evaluación de CNV mediante a-CGH se utilizó un microarreglo comercial (ISCA 8x60K, Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de la hibridación se analizaron con el programa Cytogenomics (Agilent). Las ganancias y pérdidas detectadas se valoraron como CNV benignas, de significado clínico incierto, probablemente benignas, probablemente patogénicas o patogénicas, teniendo en cuenta las recomendaciones del *American College of Medical Genetics and Genomics*²².

Para evaluar las variantes de secuencias en el gen *NKX2-5*, las regiones exónicas del gen y sus regiones intrónicas adyacentes se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores (*primers*) específicos¹⁹. Los productos amplificados se secuenciaron por el método de Sanger. La relevancia clínica de las variantes se valoró en forma similar a lo consignado en el apartado anterior por comparación con la secuencia de referencia para el gen²³.

El proyecto y su correspondiente consentimiento informado fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS).

RESULTADOS

La Tabla 1 resume las cardiopatías que se observaron en la serie de pacientes incluidos entre 2015 y 2019. La más frecuente fue la CIV, presente en 113 pacientes, seguida de CIA y atresia pulmonar (39 y 38 pacientes,

respectivamente). En esta serie de pacientes, el número de niños y niñas que ingresaron al estudio fue similar, tanto para aquellos que presentaron ACM como en el caso de CCA. La media de edad fue de 15,9 meses con un error estándar de 2,3 meses, y la mediana de edad al diagnóstico fue de 2,3 meses.

La Tabla 2 detalla aquellos casos que poseían un diagnóstico clínico presuntivo al momento de su inclusión, y la Tabla 3 resume los resultados obtenidos de los estudios citogenéticos realizados en los 98 afectados con ACM. Como se consigna, para 36 pacientes no fue posible realizar en forma completa el estudio. Entre los 62 restantes, 53 poseían un cariotipo normal y 9 presentaron alguna anomalía cromosómica. En el afectado que presentó una translocación aparentemente balanceada entre los cromosomas 1 y 2, se prosiguió con su estudio por a-CGH para estimar si existía alguna pérdida o ganancia submicroscópica de material genético (ver Tabla 4). La paciente que presentó la doble trisomía 47,XXX/47,XX,+14 fue detectada por a-CGH ante la dificultad de realizar el primer análisis del cariotipo y confirmada con posterioridad en un segundo análisis citogenético.

En 94/97 pacientes con CCC se completó el análisis de MLPA; 20 pacientes (21%) presentaron la del22q11 de 3 Mb: 7/22 pacientes con ACM (31%) y 13/72 con CCA (18%). Un paciente presentó una delección intragénica en el exón 7 del gen *TBX1*.

Con posterioridad, se analizó a 47 pacientes por a-CGH (Tabla 4). En todos los casos, las CNV que fueron clasificadas como patogénicas se corresponden con regiones previamente descritas en la literatura, y no se halló más de un paciente con una misma CNV. En 5 pacientes se observaron CNV para las cuales aún no se determinó si poseen o no relevancia clínica (VSI: variantes de significado incierto).

El análisis de la secuencia codificante del gen *NKX2-5*

TABLA 1. Descripción de las cardiopatías presentes en los pacientes estudiados*.

Cardiopatía	N
Comunicación interventricular	113
Comunicación interauricular	39
Atresia pulmonar	38
Coartación de aorta	32
Transposición de grandes vasos	30
Tetralogía de Fallot	26
Ductus arterioso [†]	26
Estenosis pulmonar	20
Hipoplasia de corazón izquierdo	17
Ventrículo único	13
Canal auriculoventricular	10
Otras	132

* Para simplicidad de la tabla, se describen en detalle las 11 cardiopatías congénitas presentes en al menos 10 pacientes, que se hallaron en un total de 247 pacientes; † En recién nacidos vivos con más de 37 semanas de gestación y no asociado a cardiopatías críticas ductus dependientes.

TABLA 2. Diagnósticos clínicos presuntivos entre los 289 pacientes estudiados.

Diagnóstico presuntivo	N	Causa posible
Displasia frontonasal	1	Génica
Síndrome microcolon megavejiga	1	Génica
Síndrome de Edwards (trisomía 18)	3	Cromosómica
Síndrome de Goldenhar	1	Génica
Síndrome de Noonan	1	Génica
Síndrome de Ohdo	1	Génica
Rasopatia	1	Génica
Ivemark	1	Génica
DiGeorge	18	Cromosómica
Williams	1	Cromosómica
Townes-Brocks	1	Génica
Treacher Collins	1	Génica
Total	31	

TABLA 3. Resultados de cariotipo en pacientes con anomalías congénitas múltiples.

Cariotipo	Número de pacientes
46,XX	28
46,XY	25
Trisomía 18	5
47,XX,+mar*	1
47,XXX/47,XX,+14†	1
46,XY,t(1;2)(q25;q21)‡	1
46,XX,del(15)(q11.2q13)	1
ND§	36
Total	98

* No se ha podido establecer la naturaleza del marcador; † Inicialmente detectado por a-CGH; ‡ No explica el fenotipo del paciente; § No determinado

TABLA 4. Desbalances hallados en pacientes con anomalías congénitas múltiples estudiados por *array*-CGH.

Relevancia clínica	Número de pacientes	Desbalance	Tamaño (megabases)
Normales	27		
Patogénicas	8	del*(1)(p36.33p36.23)	7,10
		dup†(7)(q35q36.3)	12,2
		del(2)(q24.2q31.1)	13,73
		del(5)(q22.2)	0,02
		del(7)(q36.1q36.3)	10,06
		del(8)(q21.11q21.3)‡	11,19
		(13)x3	-
		del(15)(q14)	6,22
		(X)x3,(14)x3	-
Variantes de significado incierto	5	del(3)(p26.3)	0,07
		del(5)(q15)	0,39
		dup(7)(p21.1)	0,41
		del(19)(q13.42q13.43)	1,03
		dup(20)(p13)	0,41
Benignas	4	dup(3)(p25.2)	0,07
		del(8)(p23.1)	0,51
		del(14)(q11.2)	0,60
		del(15)(q11.1q11.2)	1,99
Posiblemente benignas	3	dup(1)(p36.13)	0,02
		del(14)(q11.2)	0,30
		dup(19)(q11)	0,57
		del(22)(q11.23q12.1)	0,21
Total	47		

* del: Delección; † dup: Duplicación; ‡ Este paciente presentó una anomalía cromosómica: 46,XY,t(1;2)(q25;q21) aparentemente balanceada.

se presenta en la Tabla 5. Se hallaron 2 variantes noveles: una en un exón que codifica para un cambio sinónimo (no hay cambio de aminoácido) y su posición no está evolutivamente conservada (datos no mostrados); la otra variante novel es intrónica y no modificaría ni generaría sitios conservados de corte y empalme de exones de acuerdo con las predicciones bioinformáticas. Las demás variantes halladas ya fueron descritas previamente en la población general.

DISCUSIÓN

Las CC constituyen las AC más frecuentes y una de las principales causas de mortalidad perinatal. De acuerdo con los datos de la RENAC, que realiza vigilancia hospitalaria de AC en Argentina²⁴, la prevalencia de nacidos con CC en el período 2009-2018 fue de 4,2/1000 nacimientos. La etiología de las CC es mayoritariamente multifactorial, si bien se describió que existe recurrencia familiar tanto para casos sindrómicos como para casos aislados, con-

TABLA 5. Descripción de las variantes halladas en el gen *NKX2-5*.

Variante* (ADNc) [§]	Región del gen [†]	Número de pacientes
c.-104G>C	5'RNT	2
c.63A>G	Exón 1	48
c.334+618G>A‡	Intrón	1
c.335-723G>T	Intrón	2
c.335-682G>C	Intrón	22
c.335-672G>A	Intrón	2
c.335-88G>A	Intrón	1
c.450C>A	Exón 2	3
c.543G>A	Exón 2	3
c.921G>T‡	Exón 2	1
c.*61G>T	3'RNT	20

* Las variantes se nombraron teniendo en cuenta la secuencia de referencia (Ref-seq: NM_004378.1); † Las variantes halladas en los exones son todas sinónimas (no producirían un cambio aminoacídico), las variantes halladas en intrones no se encuentran en sitios canónicos de corte y empalme de exones (*splicing*) ni generan nuevos sitios; ‡ Variantes noveles (no se encuentran en bases de datos públicas ni en bibliografía); §ADNc: ADN copia; || RNT: región no traducida.

sistente con la contribución genética en el desarrollo de la patología⁵.

En este trabajo se detectaron anomalías cromosómicas en el 11,3% de los pacientes, entre las cuales la trisomía 18 fue la más frecuente. Este porcentaje fue mayor al observado por otros autores si se tiene en cuenta la exclusión de los pacientes con diagnóstico de síndrome de Down^{25,26}. Lamentablemente, en el 36,7% de los pacientes no fue posible determinar su cariotipo por falta de respuesta del cultivo celular. Esta situación es relativamente frecuente en los recién nacidos con ACM, que además tienen muy comprometida su salud (algunos fallecen antes de obtener una nueva muestra).

El síndrome de del22q11, también conocido como velocardiofacial/DiGeorge, es el síndrome de microdelección más común, y las CCC son una de las manifestaciones clínicas más frecuentes. No obstante, se han descrito pacientes con CCC aislada (CCCA) que presentan del22q11^{27,28}. Por lo tanto, para todos los pacientes de esta cohorte con CCC se analizó la presencia de desbalances en regiones asociadas a CC mediante MLPA. Estos resultados indican que la proporción de pacientes con del22q11 (21%) es similar a la consignada por otros autores^{29,30}, aunque algunos estudios refieren frecuencias más bajas, que oscilan entre 2,5% y 6,8%^{31,32}. Estas diferencias podrían deberse a la proporción de las distintas CCC estudiadas, ya que en pacientes con TDF o tronco arterioso persistente se observa una mayor frecuencia de la delección que en aquellos con TGV o DSVD³³. Asimismo, se ha señalado que pacientes de origen hispánico poseen mayor frecuencia de esta delección que otros grupos étnicos³⁴.

Si bien la frecuencia de del22q11 fue mayor en aquellos pacientes con al menos otra anomalía mayor extracardiaca (31% vs. 18%), cabe destacar que el 65% del total de

pacientes con esta delección presentaban CCCA. El diagnóstico temprano contribuye a la prevención y a un mejor manejo de las posibles complicaciones posteriores, como inmunodeficiencia, hipocalcemia, retraso del desarrollo y del habla, trastornos del comportamiento y enfermedades psiquiátricas frecuentes en el síndrome de del22q11³⁵. Estos signos clínicos no son evidentes al nacimiento, por lo que los resultados de este estudio son consistentes con el hallazgo de un alto porcentaje de CCCA entre los pacientes con la delección, en donde la mediana de edad al diagnóstico fue de 2,3 meses. En conjunto, las observaciones refuerzan la necesidad de realizar el estudio molecular a niños con CCC al nacimiento.

El análisis por MLPA también evidenció un paciente con una delección intragénica en el gen *TBX1*, en concordancia con varios trabajos que revelan su implicancia en CC^{36,37}.

En forma similar a lo ya observado⁹⁻¹¹, el 17% de las muestras analizadas por a-CGH presentan CNV patogénicas. Todos estos desbalances están ubicados en regiones previamente descritas en la literatura; aunque algunos pacientes muestran ciertas características clínicas diferentes, está documentado que existe expresividad variable para desbalances muy similares³⁸. Para aquellas CNV que se clasificaron como VSI, se realizará un relevamiento periódico de la literatura con el fin de determinar si existe información adicional que permita estimar o desestimar su implicancia en la patología.

Muchas de las anomalías halladas en el a-CGH poseen un tamaño mayor a 5 Mb, superior al límite de resolución del análisis citogenético por microscopía. La mayoría de estos casos, sin embargo, corresponden a fracasos técnicos en el estudio citogenético. Si bien en Argentina, particularmente en el ámbito de la salud pública, la utilización del a-CGH resulta más costosa (a pesar de que permite estudiar una mayor cantidad de muestras en un menor tiempo y con menor cantidad de recursos humanos), estos resultados indican que su aplicación es de vital importancia en esta población de pacientes para arribar a un diagnóstico certero. De hecho, el a-CGH se utiliza en muchos países como la opción diagnóstica inicial para el estudio de las causas genéticas en pacientes con ACM³⁹. En Argentina aún no se ha sistematizado su uso, aunque se cuenta con instituciones públicas, entre ellas el CNGM, con capacidad tecnológica y profesional para su aplicación.

Finalmente, los análisis realizados para evidenciar cambios de secuencia en el gen *NKX2-5* no arrojaron la presencia de variantes (incluidas las noveles halladas) que en principio se asocian a la afección en la muestra estudiada. Sin embargo, algunas variantes que no producen cambio de aminoácidos (variantes sinónimas) podrían ejercer un efecto modulador sobre la función del gen como factor de transcripción⁴⁰. En este sentido, sería interesante analizar en forma experimental la variante sinónima hallada en uno de los pacientes a los efectos de estimar si posee algún efecto biológico. Asimismo, y alternativamente, el hallazgo de variantes noveles en individuos de esta población

amerita el análisis de más sujetos a fin de establecer sus posibles implicancias en la patogenia de las CC. Por otro lado, dada la cantidad de genes que ya se relacionan con la patología¹⁵, es de esperar que el número de pacientes que presenten variantes de relevancia clínica en un gen determinado sea reducido. Si bien se ha señalado que alrededor del 5-20% de los pacientes con CC presentan variantes puntuales como causa de su afección, es sabido que ellas son más frecuentes en pacientes con antecedentes familiares o sindrómicos^{41,42}. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en la actualidad se está reemplazando el enfoque hacia el estudio de varios genes en paralelo mediante la secuenciación de nueva generación (o NGS, por sus siglas en inglés).

Este estudio posee algunas limitaciones. La investigación se realizó sobre una serie de casos, y la muestra de los pacientes incorporados fue por conveniencia. Por lo tanto, no es posible extrapolar los resultados al resto de la población, tanto en lo que se refiere a las características clínicas como a las frecuencias de las anomalías genéticas detectadas. Sin embargo, cabe destacar que las muestras provinieron de centros asistenciales de diferentes jurisdicciones del país. Otra limitación del estudio fue la imposibilidad de realizar estudios de a-CGH y de variantes de secuencia en el gen *NKX2-5* en un número más elevado de pacientes. En conclusión, tras el estudio de anomalías cromosómicas, desbalances genómicos y secuenciación del gen *NKX2-5* en pacientes con CC, se halló la etiología de la afección en el 13% de los casos, en el marco de un estudio de pacientes con CCA y CC asociadas a otras anomalías congénitas que no había sido abordado previamente mediante este algoritmo en Argentina.

RELEVANCIA PARA POLÍTICAS E INTERVENCIONES SANITARIAS

La posibilidad de identificar la causa de la CC evita un número excesivo e innecesario de consultas médicas en busca del diagnóstico; asimismo, permite orientar el tratamiento de los pacientes y evaluar los riesgos de recurrencia para eventualmente tomar decisiones de planificación familiar. El diagnóstico temprano de afectados con CCCA que presentan del22q11 facilita un adecuado seguimiento clínico y contribuye al manejo y prevención de las posibles complicaciones posteriores. A su vez, la

introducción en el ámbito público del estudio de a-CGH permite definir la causa de la CC en pacientes que, de otro modo, permanecerían sin diagnóstico.

RELEVANCIA PARA LA FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS EN SALUD

El desarrollo de este trabajo contribuye a conformar un equipo multidisciplinario integrado por médicos genetistas, cardiólogos, neonatólogos, epidemiólogos, citogenetistas, bioquímicos y biólogos moleculares para la investigación de las causas de las CC; a desarrollar protocolos de estudio con la participación de diferentes profesionales de la salud; a fortalecer la capacitación profesional en la interpretación de resultados derivados de la aplicación de nuevas tecnologías genómicas; y a proveer información al equipo de salud sobre las causas genéticas de las CC.

RELEVANCIA PARA LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

Los resultados del trabajo contribuyen a describir la presencia de alteraciones genéticas como posible causa de afección en niños de esta población con CC; a comprender los posibles mecanismos patológicos relacionados con su desarrollo; y a extender este tipo de abordajes a otras patologías de origen total o parcialmente genético.

AGRADECIMIENTOS

A las familias que aceptaron participar en este estudio y a los profesionales y técnicos de los distintos centros de salud: Lic. Noemí Buzzalino, Téc. Tania Castro, Téc. Belén Benavídez Mori, Dra. Laura Antonietti, Dra. Natalia Arrosipide, Dra. Emilia Scadizzo, Bioq. Verónica Qualina, Téc. Ezequiel Romero, Dra. Pilar Anoni, Dr. Fabián Tomasoni, Dra. Graciela Luna, Dra. María Luján Zalazar, Dra. Delfina Stremiz, Dr. Melvin Barrantes, Dr. Fernando Monti, Dra. Yamila Flores, Dra. Graciela Carballido, Dra. Viviana Heevel, Dra. Valeria Gómez, Dra. Natalia Molina, Dra. Cecilia Iraira, Dra. Claudia Cuesta, Dra. Valeria Vera, Dra. María Ángeles Vilardo, Dr. Leoncio Billordo, Dra. Jaquelin Garelo, Dr. Víctor Marques, Dra. María Márquez, Dra. Mirta Raggio, Dra. Olga Mangiante, Dra. Daniela Amor, Dra. Mónica Jewtuszyk, Dra. Blanca Senra, Dra. Natalia Izzo, Dra. Mariana Brautigam, Dra. Felicitas Fumiere, Dra. Graciela Fernández, Dra. María del Carmen Arbones y Dra. Norma Cecotti.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES: No hubo conflicto de intereses durante la realización del estudio.

Cómo citar este artículo: Delea M, Massara S, Bruque CD, Espeche LD, Taboas MI, Barbero P, et al. Análisis de anomalías cromosómicas, desbalances genómicos y variantes de secuencia como causa de cardiopatías congénitas. *Rev Argent Salud Pública*. 2021;13:e31. Publicación electrónica 11 de Feb 2021.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ van der Linde D, Konings EEM, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJM, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2011 [citado 20 Nov 2020];58:2241-2247. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2011.08.025>
- ² Ministerio de Salud de la Nación, Organización Panamericana de la Salud. Indicadores Básicos 2014 [Internet]. Buenos Aires: DEIS; 2014 [citado 16 Nov 2020]. Disponible en: http://www.deis.msal.gov.ar/wp-content/uploads/2018/04/indicadores_2014.pdf
- ³ Garg V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2006 [citado 20 Nov 2020];63(10):1141-1148. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5532-2>
- ⁴ Martínez Crespo JM, Puerto Navarro B, Gómez del Rincón O. Cardiopatías congénitas fetales: anomalías conotruncales. *Cienc Ginecol* [Internet]. 2002 [citado 20 Nov 2020];6(2):54-61. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-12802>
- ⁵ Zaidi S, Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ Res* [Internet]. 2017 [citado 20 Nov 2020];120:923-940. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309140>
- ⁶ Patel SS, Burns TL. Nongenetic risk factors and congenital heart defects. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 2013 [citado 20 Nov 2020];34(7):1535-1555. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00246-013-0775-4>
- ⁷ Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, et al. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 2011 [citado 20 Nov 2020];32(8): 1147-1157. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00246-011-0034-5>
- ⁸ Richards AA, Garg V. Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev* [Internet]. 2010 [citado 20 Nov 2020];6(2):91-97. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/157340310791162703>
- ⁹ Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy J, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res* [Internet]. 2014 [citado 20 Nov 2020];115(10):884-896. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304458>
- ¹⁰ Kim DS, Kim JH, Burt AA, Crosslin DR, Burnham N, Kim CE, et al. Burden of potentially pathologic copy number variants is higher in children with isolated congenital heart disease and significantly impairs covariate-adjusted transplant-free survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2016 [citado 20 Nov 2020];151(4):1147-1151.e4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.09.136>
- ¹¹ 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* [Internet]. 2008 [citado 20 Nov 2020];64(4):358-363. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e31818095d0>
- ¹² Azamian M, Lalani SR. Cytogenomic Aberrations in Congenital Cardiovascular Malformations. *Mol Syndromol* [Internet]. 2016 [citado 20 Nov 2020];7(2):51-61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1159/000445788>
- ¹³ Devriendt K, Eyskens B, Swillen A, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP. The incidence of a deletion in chromosome 22Q11 in sporadic and familial conotruncal heart disease. *Eur J Pediatr* [Internet]. 1996 [citado 20 Nov 2020];155(8):721. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/bf01957162>
- ¹⁴ Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygılı A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2003 [citado 20 Nov 2020];116A(2):129-135. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.10832>
- ¹⁵ Fahed AC, Roberts AE, Mital S, Lakdawala NK. Heart failure in congenital heart disease: a confluence of acquired and congenital. *Heart Fail Clin* [Internet]. 2014 [citado 20 Nov 2020];10(1):219-227. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hfc.2013.09.017>
- ¹⁶ Bakker MK, Bergman JEH, Krikov S, Amar E, Cocchi G, Cragan J, et al. Prenatal diagnosis and prevalence of critical congenital heart defects: an international retrospective cohort study. *BMJ Open* [Internet]. 2019 [citado 20 Nov 2020];9(7):e028139. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2018-028139>
- ¹⁷ Su W, Zhu P, Wang R, Wu Q, Wang M, Zhang X, et al. Congenital heart diseases and their association with the variant distribution features on susceptibility genes. *Clin Genet* [Internet]. 2017 [citado 20 Nov 2020];91(3):349-354. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/cge.12835>
- ¹⁸ Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* [Internet]. 1998 [citado 20 Nov 2020];281(5373):108-111. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.281.5373.108>
- ¹⁹ Kolomenski JE, Delea M, Simonetti L, Fabbro MC, Espeche LD, Taboas M, et al. An update on genetic variants of the NKX2-5. *Hum Mutat* [Internet]. 2020 [citado 20 Nov 2020];41(7):1187-1208. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/humu.24030>
- ²⁰ Delea M, Martinoli C, Picon C, Zalda MEP, Tolaba N, Buzzalino N, et al. Análisis de desbalances genómicos en pacientes con cardiopatías congénitas conotruncales. En: LX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) - Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS) [Internet]. Mar del Plata: SAIC/SAFIS; 2015 [citado 16 Nov 2020]. Disponible en: https://drive.google.com/file/d/1dT8Oz7wlgfF5Hk0lZUjQq4_dAECK9U/view
- ²¹ Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1988 [citado 20 Nov 2020];16(3):1215. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- ²² Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* [Internet]. 2011 [citado 20 Nov 2020];13(7):680-685. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182217a3a>
- ²³ 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. *Genet Med* [Internet]. 2015 [citado 20 Nov 2020];17(5):405-423. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- ²⁴ Groisman B, Bidondo MP, Barbero P, Gili JA, Liasovich R, RENAC Task Force. RENAC: National Registry of Congenital Anomalies of Argentina. *Arch Argent Pediatr* [Internet]. 2013 [citado 20 Nov 2020];111(6):484-494. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5546/aap.2013.484>
- ²⁵ Baker K, Sanchez-de-Toledo J, Munoz R, Orr R, Kiray S, Shiderly D, et al. Critical congenital heart disease—utility of routine screening for chromosomal and other extracardiac malformations. *Congenit Heart Dis* [Internet]. 2012 [citado 20 Nov 2020];7(2):145-150. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0803.2011.00585.x>
- ²⁶ Trevisan P, Zen TD, Rosa RFM, da Silva JN, Koshiyama DB, Paskulin GA, et al. Chromosomal abnormalities in patients with congenital heart disease. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2013 [citado 20 Nov 2020];101(6):495-501. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20130204>
- ²⁷ Bianca S, Ettore G. Sex ratio imbalance in transposition of the great arteries and possible agricultural environmental risk factors. *Images Paediatr Cardiol* [Internet]. 2001 [citado 20 Nov 2020];3(3):10-14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22368601>
- ²⁸ Mlynarski EE, Xie M, Taylor D, Sheridan MB, Guo T, Racedo SE, et al. Rare copy number variants and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Genet* [Internet]. 2016 [citado 20 Nov 2020];135(3):273-285. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-015-1623-9>
- ²⁹ Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1998 [citado 20 Nov 2020];32(2):492-498. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097\(98\)00259-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0735-1097(98)00259-9)
- ³⁰ Barisic I, Morozin Pohovski L, Petkovic I, Cvetko Z, Stipanovic G, Bagatin M. Screening of patients at risk for 22q11 deletion. *Coll Antropol* [Internet]. 2008 [citado 20 Nov 2020];32(1):165-169. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18494202>
- ³¹ Campos CMR, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigation of copy number variation in children with conotruncal heart defects. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2015 [citado 20 Nov 2020];104(1):24-31. Disponible en: <http://>

dx.doi.org/10.5935/abc.20140169

³² Zhang X, Xu Y, Liu D, Geng J, Chen S, Jiang Z, et al. A modified multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of 22q11.2 copy number variations in patients with congenital heart disease. *BMC Genomics* [Internet]. 2015 [citado 20 Nov 2020];16:364. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1590-5>

³³ 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* [Internet]. 2018 [citado 20 Nov 2020];138(21):e653-e711. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/CIR.0000000000000606>

³⁴ Bretelle F, Beyer L, Pellissier MC, Missirian C, Sigaudy S, Gamarre M, et al. Prenatal and postnatal diagnosis of 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2010 [citado 20 Nov 2020];53(6):367-370. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.07.008>

³⁵ Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* [Internet]. 1997 [citado 20 Nov 2020];34(10):798-804. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.34.10.798>

³⁶ Griffin HR, Topf A, Glen E, Zweier C, Stuart AG, Parsons J, et al. Systematic survey of variants in TBX1 in non-syndromic tetralogy of Fallot identifies a novel 57 base pair deletion that reduces transcriptional activity but finds no evidence for association with common variants. *Heart* [Internet]. 2010 [citado 20 Nov 2020];96(20):1651-1655. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2010.200121>

³⁷ Zhang M, Li FX, Liu XY, Hou JY, Ni SH, Wang J, et al. TBX1 loss-of-function mutation contributes to congenital conotruncal defects. *Exp Ther Med* [Inter-

net]. 2018 [citado 20 Nov 2020];15(1):447-453. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2017.5362>

³⁸ Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 [citado 20 Nov 2020];367(14):1321-1331. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1200395>

³⁹ Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med* [Internet]. 2020 [citado 20 Nov 2020];22:245-257. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>

⁴⁰ Reamon-Buettner SM, Sattlegger E, Ciribilli Y, Inga A, Wessel A, Borlak J. Transcriptional Defect of an Inherited NKX2-5 Haplotype Comprising a SNP, a Non-synonymous and a Synonymous Mutation, Associated with Human Congenital Heart Disease. *PLoS One* [Internet]. 2013 [citado 20 Nov 2020];8(12):e83295. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083295>

⁴¹ Jia Y, Louw JJ, Breckpot J, Callewaert B, Barrea C, Sznajder Y, et al. The diagnostic value of next generation sequencing in familial nonsyndromic congenital heart defects. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2015 [citado 20 Nov 2020];167A(8):1822-1829. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.37108>

⁴² Blue GM, Kirk EP, Giannoulatou E, Dunwoodie SL, Ho JWK, Hilton DCK, et al. Targeted next-generation sequencing identifies pathogenic variants in familial congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014 [citado 20 Nov 2020];64(23):2498-2506. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2014.09.048>



Esta obra está bajo una licencia de *Creative Commons* Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Reconocimiento – Permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra. A cambio se debe reconocer y citar al autor original. No comercial – esta obra no puede ser utilizada con finalidades comerciales, a menos que se obtenga el permiso.