

# **Titlul tezei: Screening genetic multiplu la nou-născutul cu malformație congenitală de cord**

Doctorand: **Elena Bitir (Moldovan)**

Conducător de doctorat: **Prof. Univ. Dr. Lucian Pușcașiu**

## **Rezumat**

Malformațiile congenitale de cord reprezintă cea mai frecventă patologie malformativă înregistrată în perioada neonatală. Identificarea etiologiei reprezintă principala etapă în procesul de reducere a frecvenței malformațiilor de cord. Se așteaptă ca studiile genetice să aducă informații importante cu privire la implicarea mutațiilor genice în generarea defectelor cardiace. Identificarea cu exactitate a condiției genetice care ar fi putut genera apariția unui defect cardiac reprezintă de cele mai multe ori, o provocare. Înțelegerea la nivel molecular a procesului de dezvoltare normală a aparatului cardiovascular, a permis identificarea a numeroase gene implicate în morfogeneza cardiacă. Astfel, cel mai frecvent mod de apariție este datorat mutațiilor specifice în diferite gene, care în corelație cu susceptibilitatea individuală generează apariția defectului structural. Existența mai multor mutații la același individ și interacțiunea acestora cu factorii de mediu, cresc probabilitatea ca acesta să asocieze o malformație cardiacă congenitală.

Gradul de originalitate al tezei constă în diagnosticarea genetică a nou-născuților cu malformații cardiace congenitale prin utilizarea unor tehnologii de ultimă generație. Studiul realizat a fost unul prospectiv, de tip cohortă, ce a inclus nou-născuți diagnosticați cu malformație cardiacă congenitală izolată internați în Terapie Intensivă Neonatală. Pacienții care prezentau un defect structural cardiac minor, care nu necesitau terapie chirurgicală, intervențională sau medicamentoasă imediată nu au fost înrolați. Lucrarea are la bază trei studii distincte prin care se urmărește realizarea unui prototip clinic și genetic al nou-născutului cu defect structural cardiac izolat.

**Primul studiu** - Profilul nou-născutului cu malformație congenitală de cord nonsindromică. Prin derularea acestuia s-a urmărit realizarea unui profil clinic specific nou-născutului cu malformație congenitală de cord, stabilirea factorilor de risc materni, precum și dovedirea specificității între factorii implicați și malformația cardiacă generată. Pentru obiectivarea studiului au fost urmăriți o serie de factori specifici: materni, fetali și neonatali. Pentru îndeplinirea obiectivelor, a fost elaborată o fișă individuală de studiu pentru fiecare nou-născut înrolat. Aceasta a cuprins informații legate de patologia maternă preexistentă sarcinii, date despre sarcina actuală, precum și date clinice și paraclinice ale nou-născutului. În derularea acestei cercetări s-a urmărit realizarea unui fenotip caracteristic pentru nou-născutul care necesită terapie specifică în perioada neonatală datorită asocierii unei malformații de cord.

**Al doilea studiu** - Screening-ul genetic al nou-născutului cu malformație congenitală de cord prin Multiplex ligation-dependent probe amplification. Metoda MLPA reprezintă standardul în diagnosticarea bolilor genetice determinate de prezența modificărilor structurale la nivelul ADN-ului. Tehnica se bazează pe reacția de polimerizare în lanț (PCR) de tip multiplex și permite o investigare simultană a variațiilor numărului de copii (VNC), cu studierea a până la 60 de secvențe genomice diferite ale ADN-ului studiat. Principalul obiectiv al acestui studiu a fost demonstrarea implicării VNC în etiologia malformației de cord izolate, nonsindromice. De asemenea, s-a urmărit dovedirea utilității tehnicii MLPA ca tehnică de primă intenție în identificarea VNC la nou-născuții cu malformație congenitală de cord nonsindromică. Prin aceeași tehnică de biologie moleculară s-a încercat demonstrarea asocierii între deleția în regiunea 22q11.21 și apariția malformațiilor cardiace

conotruncale, în lipsa unor caractere fenotipice specifice. Identificarea precoce a originii genetice în boala cardiacă malformativă este importantă deoarece acești copii asociază un risc crescut de complicații postoperatorii.

Analiza de tip MLPA a fost realizată folosind kit-ul SALSA MLPA P311 Congenital Heart Disease (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), conform protocolului producătorului, iar pentru electroforeza capilară s-a utilizat un sistem 3500xL Dx Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, SUA) cu 24 de capilare. Pacienții cu rezultate pozitive pentru deleția 22q11.2 au fost ulterior testați folosind kit-ul SALSA MLPA P250 DiGeorge, pentru confirmarea diagnosticului.

**Al treilea studiu** - Aportul tehnicilor de secvențiere în elucidarea etiologiei malformației de cord izolate. Pornind de la ipoteza mutațiilor la nivelul proteinelor structurale, prin utilizarea tehnicilor de secvențiere poate fi identificată etiologia genetică a defectului cardiac. Făcând comparație cu tehnici mai puțin laborioase, tehnicile de secvențiere permit o analiză fidelă a majorității variantelor genomice, având un randament crescut față de tehnicile standard. Interpretarea variantelor reprezintă o provocare, mai ales în situația cazurilor sporadice, unde există corelații limitate genotip-fenotip și intervine fenomenul de penetranță incompletă. Principalul obiectiv al prezentului studiu a fost demonstrarea implicării secvențelor nucleotidice modificate în etiologia malformației de cord izolate. De asemenea s-a urmărit dovedirea utilității tehnicii de secvențiere tip Sanger ca metodă complementară tehnicilor standard în identificarea VNC la nou-născuții cu malformație congenitală de cord nonsindromică. Un alt scop a fost reprezentat de identificarea relației de cauzalitate între modificarea secvențelor nucleotidice și apariția unui defect cardiac structural specific. În vederea clarificării semnalelor de aparentă duplicație, evidențiate în studiul precedent, s-a inclus în regiunea de interes pentru secvențierea Sanger și secvența de nucleotide testată prin metoda MLPA. Pentru secvențierea Sanger a ADN-ului s-au utilizat amorse specifice pentru fragmentul de interes care au fost create „de novo”, astfel încât să cuprindă atât exonul 1 al genei *GATA4* cât și o parte din intron, plus joncțiunea exon-intron. Tehnica a fost efectuată utilizând kit-ul BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, SUA), ampliconii fiind ulterior purificați cu BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, SUA), conform indicațiilor producătorului. Secvențierea propriu-zisă a fragmentelor s-a realizat cu ajutorul sistemului 3500xL Dx Genetic Analyzer cu 24 de capilare, iar rezultatele obținute au fost comparate cu datele disponibile în bazele de date genetice. Identificarea variantelor de secvență rs35813172, rs61277615 și rs73203482 demonstrează că, în anumite condiții, acestea pot deveni potențial patogene.

În ciuda cunoașterii specificității fiecărei modificări genice în parte, nu se cunoaște prevalența acestor variante în populația sănătoasă, fiind o limitare semnificativă în realizarea unui profil genetic real al acestei patologii. Este dificilă evidențierea cu certitudine a mecanismului genetic care a putut genera apariția unei malformații cardiace nonsindromice datorită heterogenității genice. Trebuie avut în vedere modelul dominant multigenic, care în contextul unei susceptibilități individuale poate determina o condiție patologică specifică.

Stabilirea indicațiilor, precum și a metodelor de diagnostic genetic, la nou-născuții cu o malformație cardiacă congenitală, va conduce la generarea unui protocol genetic specific unitaților de terapie intensivă neonatală. Dezvoltarea continuă a tehnicilor de diagnostic genetic s-a materializat prin identificarea de noi gene cu implicare directă în apariția malformațiilor congenitale de cord. Astfel, prin informațiile generate de testarea genetică, sfatul genetic și stabilirea riscului de recurență devin din ce în ce mai importante și de actualitate. Se dovedește încă o dată rolul abordării multidisciplinare în medicină, atât prin latura diagnostică, cât și terapeutică.