CIBELE DIEDRICHS

**Investigação de variação do número de cópias em fetos portadores de
ventriculomegalia e malformação Dandy Walker**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

São Paulo
2017

CIBELE DIEDRICHS

**Investigação de variação do número de cópias em fetos portadores de
ventriculomegalia e malformação Dandy Walker**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Diedrichs, Cíbele

Investigação de variação do número de cópias em fetos portadores de ventriculomegalia e malformação Dandy Walker / Cíbele Diedrichs. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho.

Descritores: 1.Sistema nervoso central 2.Cuidado pré-natal 3.Citogenética
4.Hidrocefalia 5.Vermis cerebelar 6.Desoxirribonucleases

USP/FM/DBD-397/17

*Ao meu pai, **Luiz Carlos Diedrichs**, meu exemplo, sempre me ensinando os valores da vida além de incentivar constantemente para eu ir atrás dos meus objetivos e nunca desistir frente às adversidades.*

*À minha mãe, **Celia Maria Diedrichs**, o cerne da família, mostrando diariamente que com amor, determinação, educação e respeito podemos alcançar tudo que sonhamos.*

*Aos meus irmãos mais velhos **Luiz Eduardo, Simone e Letícia Diedrichs** pelo amor e parceria em todos os momentos. Cada um com seu jeito, personalidades diferentes, mas certamente são exemplos seguidos por mim.*

*Aos meus cunhados, **Alessandra Ayan e Matheus de Moraes Carvalho**, pelo apoio e conselhos nessa jornada.*

*Ao meu namorado, **Renato Zago Lopes da Silveira**, pelo amor e carinho, compreensão, ajuda com a parte técnica do trabalho, além de sempre me apoiar em minhas escolhas.*

Agradecimento Especial

Ao **Prof. Mario Henrique Burlacchini de Carvalho**, meu orientador e professor, pela confiança depositada em mim desde a primeira vez que optei em realizar o mestrado. Seus ensinamentos certamente guiaram meu caminho dentro da medicina fetal e seu exemplo de postura e ética lapidou grande parte da minha vida profissional, acadêmica e pessoal. Dentre as adversidades durante esses anos de estudo, ajudou-me a encarar todos os desafios e assim concluir mais essa etapa acadêmica com muito aprendizado.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, Professor Titular da Disciplina de Obstetrícia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter me recebido e cedido oportunidade cedida de realizar minha pesquisa.

A **Profª Drª Rossana Pulcineli Vieira Francisco**, vice coordenadora do programa de pós-graduação em Obstetrícia e Ginecologia, por ter cedido o apoio financeiro essencial pela realização desse estudo.

Ao **Dr. Antonio Gomes de Amorim Filho**, meu professor, que sempre esteve presente nos ambulatórios de medicina fetal disposto a ajudar com a coleta das amostras, discutir artigos e dar conselhos sobre a tese.

À **Juliana Valente Codato Marinelli**, minha amiga e colega de pós-graduação, pela amizade, apoio nos momentos difíceis e conselhos durante esses anos de aprendizado.

À **Lucinda Cristina Pereira**, funcionária administrativa, por me orientar na parte burocrática da pós-graduação e sempre disposta a responder todas minhas perguntas.

A todos os **funcionários da Clínica Obstétrica**, pelo carinho e colaboração durante toda a minha jornada.

Às **gestantes**, minha fonte de incentivo para realizar esse estudo e que mesmo num momento delicado de suas vidas colaboraram com a pesquisa.

A todos os **colegas pós-graduandos, residentes e estagiários** que convivi nesses anos nos ambulatórios e nas reuniões clínicas no HCFMUSP, pelos ensinamentos, aprendizados e bom relacionamento profissional e pessoal.

A todos os **assistentes** da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, que contribuíram de alguma forma para minha formação profissional, científica e acadêmica.

*Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*

Fernando Pessoa.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso. Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	2
2	OBJETIVO.....	5
2.1	Geral.....	5
2.2	Específico	5
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1	Análise genética pré-natal	7
3.2	Malformação Dandy-Walker	13
3.3	Ventriculomegalia	17
4	CASUÍSTICA E MÉTODO	24
4.1	Desenho do estudo.....	24
4.2	Aprovação do projeto de pesquisa	24
4.3	Seleção da população estudada.....	24
4.4	Critérios de Inclusão	24
4.5	Critérios de Exclusão	25
4.6	Casuística.....	25
4.7	Ética	26
4.8	Metodologia estatística	26
4.9	Métodos	26
4.9.1	Exame morfológico fetal.....	26
4.9.2	Exame ultrassonográfico do cérebro fetal	27
4.9.3	Acompanhamento da ventriculomegalia e Malformação de Dandy-Walker	27
4.9.4	Protocolo assistencial	28
4.9.5	Cariótipo fetal	28
4.9.6	Cordocentese.....	28
4.9.7	Pesquisa infecciosa	29
4.9.8	Método de análise molecular	30
4.10	Coleta de dados	31

4.11	Variáveis.....	31
4.12	Análise citogenômica.....	32
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Caracterização da população estudada	35
5.1.1	Grupo de Malformação Dandy Walker	36
5.1.2	Grupo de ventriculomegalia	37
5.2	Análise dos resultados	38
5.3	Resultados obtidos através SNP array.....	38
5.3.1	Grupo dos fetos portadores de Malformação Dandy Walker	38
5.3.2	Grupo de fetos portadores de ventriculomegalia	40
6	DISCUSSÃO.....	44
6.1	Casos de Malformação Dandy Walker	45
6.2	Casos de Ventriculomegalia	47
7	CONCLUSÃO	56
8	ANEXOS	58
8.2	Consentimento Livre e Esclarecido	60
8.2.1	Consentimento livre e esclarecido para Malformação de Dandy-Walker	60
Anexo B		60
8.2.2	Consentimento livre e esclarecido para ventriculomegalia	62
9	REFERÊNCIAS	71

Lista de abreviaturas e siglas

CGH array....	do inglês, <i>comparative genomic hybridization array</i>
CNV	do inglês, <i>copy number variation</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
FISH	do inglês, <i>fluorescent in situ hybridization</i>
HCFMUSP....	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Kb	Do inglês, kilobyte.
LCR	líquido cefalorraquidiano
MDW	malformação Dandy-Walker
MF	Malformação Fetal
MLPA	do inglês, <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
NGS	do inglês, <i>next generation sequencing</i>
PCR	<i>QF</i> – do inglês, <i>quantitative fluorescence polymerase chain reaction</i>
SNC	sistema nervoso central
SNP array.....	do inglês, <i>single nucleotide polymorphism array</i>
VM	Ventriculomegalia
VUS.....	do inglês, <i>variants of uncertain clinical significance</i>

Lista de figuras

Figura 1. Imagem ultrassonográfica evidenciado agenesia de vermis cerebelar associada ao alargamento anteroposterior da cisterna magna caracterizando a malformação Dandy-Walker. Seta indicando a agenesia de vermis	15
Figura 2. Imagem ultrassonográfica evidenciando VM leve. Seta indicando a dilatação ventricular	18
Figura 3. Caracterização da população desse estudo.....	36
Figura 4. Casos de MDW e a distribuição das CNVs identificas pelo SNP <i>array</i>	39

Lista de tabelas

Tabela 1.	Casos de MDW citados na revisão de literatura, discriminando o número de casos estudados, a região cromossômica alterada e os genes encontrados....	21
Tabela 2.	Casos de ventriculomegalia citados na revisão de literatura, discriminando o número de casos estudados, a região cromossômica alterada e os genes encontrados	22
Tabela 3.	Descrição da população estudada nesse grupo de MDW.....	37
Tabela 4.	Descrição da população estudada nesse grupo e os resultados neonatais encontrados	37
Tabela 5.	Descrição dos casos de fetos com MDW submetidos à SNP <i>array</i> quanto ao gênero fetal, alteração cromossômica e tamanho em kb.....	40
Tabela 6.	Casos de ventriculomegalia submetidos ao SNP <i>array</i> e a descrição das CNV encontradas, discriminando o gênero fetal, região cromossômica e tamanho em Kb	41
Tabela 7.	Descrição dos casos estudados por SNP <i>array</i> casos de perda de heterozigosidade (LOH) encontrados discriminando o gênero fetal, alteração genômica, região cromossômica e tamanho em Kb	42

Resumo

Diedrichs C. *Investigação de variação do número de cópias em fetos portadores de ventriculomegalia e malformação Dandy Walker*. [Dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2017.

INTRODUÇÃO: A ventriculomegalia é a malformação congênita de sistema nervoso central (SNC) mais prevalente, e a malformação Dandy Walker (apesar de menos prevalente) é, assim como a ventriculomegalia, uma doença com um importante impacto pré e pós-natal na morbidade e mortalidade fetal. A etiologia dessas patologias é heterogênea e o fator genético está entre as principais causas. A técnica mais usada no período pré-natal para rastreamento genético é o cariótipo por banda G; contudo esta técnica não revela todas as anormalidades genéticas. Portanto, em fetos com alteração morfológica ultrassonográfica detectada e cariotipagem tradicional normal, o estudo molecular pode ser oferecido para uma investigação etiológica e aconselhamento genético. **OBJETIVO:** Este estudo visa investigar a presença de CNVs (do inglês, *copy number variations*) utilizando cariotipagem por *array* em amostras de DNA obtidas de fetos portadores de ventriculomegalia (VM) ou Malformação de Dandy-Walker (MDW), com resultado de cariótipo clássico normal. **MÉTODO:** Foram selecionadas 29 gestantes com fetos portadores de VM e MDW. Das 29 amostras colhidas, 2 foram excluídas devido PCR positivo para infecções congênicas e outras 3 excluídas devido cariótipo por banda G apresentando anomalias cromossômica. Um total de 24 fetos foram incluídos no estudo, sendo 19 portadores de ventriculomegalia e 5 casos de MDW diagnosticados na ultrassonografia pré-natal. Todos os casos apresentavam cariótipo por banda G normal e PCR negativo para infecções congênicas no líquido amniótico. O DNA fetal foi extraído do cordão umbilical através da cordocentese entre 20 e 34 semanas e foi analisado pelo SNP *array*. As CNVs encontradas foram comparadas com banco de dados e literatura e posteriormente classificadas patogênicas, significado clínico incerto (VUS; do inglês *variation of uncertain clinical significance*) ou benignas. **RESULTADOS:** Nos 5 fetos com MDW a média da idade gestacional do diagnóstico foi de 26,8 semanas (SD 1,78 semanas). Todos os fetos eram do sexo feminino. Encontradas 6 CNVs. Todas consideradas benignas. Nos 19 fetos portadores de VM, a média do diâmetro no nascimento foi de 29,9 mm (DP 15,21mm). A média da idade gestacional do diagnóstico foi de 27 semanas (DP: 3,41 semanas). O sexo masculino representou 57,8% dos casos e o feminino, 42,1%. Foram encontradas 41 CNVs (22 benignas e 16 VUS) além de 15 eventos de perda de heterozigosidade (LOH). Nenhuma CNV foi considerada patogênica. **CONCLUSÃO:** Foi possível detectar CNVs utilizando cariotipagem por *array* em 22, dos 24 casos selecionados de VM e MDW; determinar qual a região cromossômica alterada, além de associar essas regiões com genes envolvidos. Os genes envolvidos foram estudados e comparados com o banco de dados. Contudo para correlacionar os achados ultrassonográficos com os achados citogenômicos encontrados ainda necessitamos de mais estudos acumulativos para enriquecer os bancos de dados existentes e melhorar a assistência pré-natal, diagnóstico e prognóstico dos pacientes portadores de ventriculomegalia e malformação Dandy Walker.

Descritores: sistema nervoso central; cuidado pré-natal; citogenética; hidrocefalia; vermis cerebelar; desoxirribonucleases.

Abstract

Diedrichs C. *Investigation of variation of the number of copies in fetuses with ventriculomegaly and malformation Dandy Walker*. [Dissertation]. Sao Paulo. Medicine School, University of São Paulo, 2017.

BACKGROUND: Ventriculomegaly is the most prevalent congenital central nervous system (CNS) anomalies. Dandy Walker malformation (DWM), although lower prevalent, is, like ventriculomegaly, a disease with a significant prenatal and postnatal impact on fetal morbidity and mortality. The etiology of these pathologies is heterogeneous and the genetic factor is among the main causes. The most used technique in the prenatal period for genetic tracing is the K-band karyotype. However, this technique does not reveal all genetic abnormalities. Therefore, in fetuses with detected ultrasound morphological alteration and normal traditional karyotyping, the molecular study may be offered for an etiological investigation and genetic counseling. **OBJECTIVE:** To investigate copy number variations (CNVs) using a single nucleotide polymorphism (SNP) array and identify changes in chromosomal regions in fetuses with ventriculomegaly (VM). **METHOD:** Twenty nine pregnant women with fetuses with ventriculomegaly and DWM were selected. Of the 29 samples collected, 2 were excluded due to positive PCR for congenital infections and another 3 excluded due to G-band karyotype presenting chromosomal abnormalities. A total of 24 fetuses were included in the study, 19 of whom had ventriculomegaly and 5 MDW cases diagnosed on prenatal ultrasonography. All cases presented normal G-band karyotype and negative PCR for congenital infections in the amniotic fluid. The fetal DNA was extracted from the umbilical cord by cordocentesis between 20 and 34 weeks and was analyzed by the SNP array. The CNV were compared with databases and literature and then classified into three groups: pathogenic CNVs, CNVs with uncertain clinical significance (VUS) and benign CNVs. **RESULTS:** In the 5 fetuses with MDW the mean gestational age of the diagnosis was 26.8 weeks (SD 1.78 weeks). All fetuses were female. Found 6 CNVs. All CNVs considered benign. In the 19 fetuses with MV, the mean of the cerebral ventricle diameter at birth was 29.9 mm (SD 15.21 mm). The mean gestational age of the diagnosis was 27 weeks (SD: 3.41 weeks). The male gender represented 57.8% of the cases and female, 42.1%. We found 41 CNVs (22 benign and 16 VUS) in addition to 15 heterozygosity loss (LOH). No CNV was considered pathogenic. **CONCLUSION:** It was possible to detect CNVs using array in 22 of the 24 selected cases of VM and DWM; determine the altered chromosomal region, and associate these regions with the genes involved. The genes involved were studied and compared to the database. However, to correlate ultrasonographic findings with the cytogenetic anomalies detected, we still need more cumulative studies to enrich existing databases and improve prenatal care, diagnosis and prognosis of patients with VM and DWM.

Descriptors: central nervous system; prenatal care; cytogenetics; hydrocephalus; cerebellar vermis; deoxyribonucleases.

1 INTRODUÇÃO

As anomalias do sistema nervoso central (SNC) estão entre as malformações congênitas mais graves. A ventriculomegalia (VM) é a anomalia mais prevalente de SNC diagnosticada por ultrassonografia pré-natal, com prevalência de 0,3 a 10 por 1000 nascimentos¹, e aproximadamente 0,15% são detectadas entre 6 a 22 semanas². A malformação Dandy Walker (MDW) tem uma incidência menor (1 a cada 38 mil nascimentos)³, contudo é igualmente grave e também com importante impacto na mortalidade e morbidade pré-natal e pós-natal.

A VM é caracterizada pelo alargamento dos ventrículos laterais, com medição do átrio superior a 10 mm. A causa é o desequilíbrio entre a produção e a reabsorção do líquido cefalorraquidiano (LCR)⁴. A MDW representa grande parte das anomalias de fossa posterior do cérebro e pode ser caracterizada pelo alargamento da cisterna magna com comprometimento ou não de cerebelo.

A etiologia dessas doenças é heterogênea e o fator genético está entre as principais causas. As técnicas para essa investigação genética são: análise citogenética com cariótipo convencional (Banda G), FISH (do inglês, *Fluorescent In Situ Hybridization*), inovando, o PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)⁵, mais recentemente, com a evolução da genética e do estudo da biologia molecular foram criados métodos de detecção de alterações cromossômicas menores, os chamados métodos de análise citogenômica. Dentre esses métodos é citado o MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification*), a metodologia de *array*, e finalmente os métodos de NGS (sequenciamento de nova geração)⁵.

O mais comumente usado é o cariótipo convencional (Banda G). Contudo, artigos mostram que essa técnica não revela todas as alterações genéticas, de forma que, nos fetos com alterações ultrassonográficas e cariótipo normal, sejam ofertados a análise por método citogenético molecular.

Importante citar um estudo realizado com 21.698 pacientes com atraso no desenvolvimento, déficit intelectual, autismo e múltiplas anomalias congênitas no qual, após a análise com o *array* realizou diagnóstico em 15% a 20% de alterações no DNA enquanto que o cariótipo por banda G fez o diagnóstico em apenas 3%⁶.

Assim, diante da gravidade dos casos das anomalias de sistema nervoso central fetal, especialmente as ventriculomegalias e malformação Dandy-Walker, em que a maioria dos casos apresenta cariótipo fetal normal, acreditamos que devemos dar uma continuidade na investigação, com a aplicação do SNP *array*; com o qual acreditamos ser capaz de detectar muito mais variações estruturais do DNA fetal e, portanto, contribuir para a investigação etiológica da malformação e no seu aconselhamento genético.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar por meio da técnica de *array* alterações de regiões cromossômicas em de fetos portadores de ventriculomegalia e malformação Dandy Walker com avaliação citogenética normal.

2.2 Específico

- Investigar a presença de variação do número de cópias gênicas (CNVs) utilizando cariotipagem por *array*.
- Determinar qual região cromossômica está presente a CNV encontrada.
- Determinar se essa CNV é do tipo deleção ou duplicação.
- Determinar o tamanho dessa alteração cromossômica.
- Correlacionar os achados ultrassonográficos com os achados citogenômicos encontrados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Análise genética pré-natal

Em 1956 é descrito que as células humanas são compostas por 46 cromossomos. Assim, em 1959 Lejeune descreve a trissomia do cromossomo 21, a qual anos depois foi descrita como a etiologia da Síndrome de Down⁷.

Posteriormente também foram desvendadas as trissomias do cromossomo 13 e do cromossomo 18 por Patau e Edwards respectivamente⁷. Essas descobertas descritas foram o ponto crucial de início para desenvolvimento de novas pesquisas no DNA humano.

Em decorrência a essas novas informações foram surgindo técnicas de análise citogenéticas no diagnóstico pré-natal. Essas técnicas foram inicialmente descritas em 1966, primeiramente como cultura de células obtidas em testes invasivos⁸.

Em 1970, teve início a análise cromossômica através do bandamento G (ou cariotipagem) com um grande número de anomalias cromossômicas sendo detectadas em resolução de 5-10Mb⁸.

Nos anos 1990, com desenvolvimento tecnológico, iniciou-se o uso da técnica de *PCR-QF* (PCR quantitativa fluorescente) que é capaz de detectar anormalidade em uma região cromossômica específica envolvendo principalmente as alterações em 13, 18, 21, X e Y com resultados mais rápidos e com menor custo. Junto com essa técnica, também foi desenvolvido o método *FISH* (hibridação *in situ* fluorescente) que é útil quando usado em conjunto com a análise de cariótipo tradicional, sendo capaz de detectar

microdeleções e microduplicações intersticiais ou deleções e duplicações subteloméricas. Contudo, ambas as técnicas são capazes apenas de analisar uma região cromossômica restrita⁹.

Já nos últimos anos, a análise genômica (em painel de arranjos) por *microarrays* vem adquirindo uma relevância significativa, tornando-se atualmente uma ferramenta fundamental dentro da medicina diagnóstica.

O estudo nesta técnica em expressão genética em amostras biológicas começou por volta de 1995¹⁰, inicialmente aplicada em estudo na área oncológica. Possui vantagens sobre os outros métodos citados anteriormente, por ser mais eficiente e capaz de analisar centenas de genes em uma lâmina de microscópio (*chip*), é de fácil manuseio, com alta taxa de detecção de mutações e comparação de sequências, além de poder ser aplicado tanto para DNA (ácido desoxirribonucleico) quanto para RNA (ácido ribonucleico)¹¹.

Além disso, a análise tradicional pelo bandamento G é limitada para detecção das alterações cromossômicas num tamanho maior que 5 Mb. Com o *array* é possível detectar alterações menores, entre 50 a 100kb, duplicações e deleções submicroscópicas¹².

A triagem por *array* consiste na hibridação do DNA do paciente em um painel de sondas representativas pré-determinadas do genoma. O DNA fetal a ser testado (obtido por biópsia de vilo corial, amniocentese ou cordocentese) é extraído da amostra, submetido à ação enzimática, marcado com fluorocromos, e hibridado em lâminas (*chips*) contendo sondas específicas e representativas do genoma⁸.

Existem dois tipos de *array*: CGH e SNP *array*. As duas técnicas conseguem detectar alteração no número de cópias. No CGH (do inglês, *comparative genomic*

hybridization) ou hibridação genômica comparativa é realizado uma análise comparativa; ou seja, o DNA fetal é marcado com a substância fluorescente com uma cor enquanto que o DNA controle é marcado com outra cor. Assim, a intensidade dos sinais emitidos é analisada. As duplicações e deleções são detectadas com mais ou menos sinais emitidos, respectivamente.

No SNP *array* (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*), só o DNA fetal é hibridado na plataforma do *array* (não tem o DNA controle), e a presença ou ausência de uma sequência de DNA específica é avaliada pela intensidade do sinal emitido¹³.

Com o uso do *array*, vamos identificar as variações no número de cópias do genoma, sendo possível determinar as regiões de ganhos e/ou de perdas do material genômico de interesse. A variação do número de cópias gênicas é conhecida como CNVs (do inglês, *copy numbers variations*). A CNV é um segmento de DNA que possui um tamanho de aproximadamente 1kb que apresenta um número variável de cópias quando comparados ao genoma de referência.

Contudo a interpretação das CNVs é desafiadora, uma vez que dependendo da região ou tamanho, pode possuir um potencial patogênico ou ser apenas uma variante de significado clínico incerto (VUS); do inglês, *variants of uncertain clinical significance*¹⁴.

A tendência atual é o aumento substancial no número de pesquisas com a técnica do *array*, pois a capacidade de detecção de anomalias cromossômicas submicroscópicas através desse método supera a da análise convencional por bandamento G, além de reduzir o tempo para a liberação do laudo para o paciente¹⁵.

A análise por *array* não detecta alterações genômicas balanceadas, diferentemente da cariotipagem convencional. No entanto, mesmo as translocações balanceadas

detectadas pelo bandamento G não podem ser consideradas como resultados normais para o feto, uma vez que os pontos de quebra dos rearranjos podem encobrir disrupções gênicas capazes de refletirem fenótipos clínicos relevantes, além de influenciarem o aconselhamento genético para as famílias envolvidas¹⁶.

Muitas malformações congênitas podem ser investigadas na fase pré-natal pelo método de *array*, como por exemplo, casos de portadores de hérnia diafragmática, holoprosencefalia, malformações cardíacas conotrunciais, entre outras. Entre as anomalias consideradas importantes ao nascimento, estão as alterações de sistema nervoso central como a malformação Dandy-Walker e a ventriculomegalia as quais estão presentes em muitos casos atendidos pelo ambulatório de medicina fetal do complexo do Hospital das Clínicas.

Com uma propensão atual para desenvolvimento de novos testes genéticos para rastreio e diagnóstico no período pré-natal, a análise citogenômica se tornou um importante objeto de estudo dentro da Medicina Fetal.

Atualmente, inúmeras são as pesquisas realizadas para tentar detectar novos genes, desarranjos, deleções, duplicações genéticas os quais poderiam ser a justificativa para as alterações fetais encontradas isoladamente ou em casos repetidos na família.

Como exemplo, cita-se uma pesquisa composta por quatro fetos com holoprosencefalia e cariótipo normal. Após a aplicação da técnica *array*, foram detectados ganhos e perdas do número de cópias gênicas em todos os casos, além de deleções recorrentes em 15q14 e em 15q22 em dois dos quatro casos. Contudo os autores concluem que são necessárias mais pesquisas para estabelecer os genes referentes às regiões cromossômicas envolvidos do desenvolvimento cerebral¹⁷.

Outro estudo realizado em casos selecionados de fetos com aumento de translucência nugal, os quais também apresentavam cariótipo sem alteração, que após a análise por esta técnica molecular *microrray* detectou CNVs patogênicas em seis dos 48 fetos além de microdeleções e microduplicações¹⁸.

Wapner et al., em um estudo multicêntrico, selecionou mais de 4000 gestantes com alterações ultrassonográficas fetais. Foi realizada amniocentese em todas as pacientes e o líquido amniótico analisado tanto pelo método de banda G como por *array*. Esta última detectou todas as aneuploidias diagnosticadas pelo cariótipo tradicional; além de detectar CNV com relevância clínica em 6% dos casos¹⁶.

Becvárová et al., selecionaram 110 fetos com alterações ultrassonográficas e extraiu amostras de DNA através de biópsia de vilo corial, amniocentese ou cordocentese e produto de abortamento. A análise por SNP *array* foi realizada em 108 amostras (ocorreram falhas no exame sendo excluídas as duas amostras). No total foram detectadas CNVs em 29 das 108 amostras ($29/108 = 27\%$)¹⁹.

Outro artigo, publicado na China em 2015, selecionou 46 fetos com alteração morfológica pré-natal de sistema nervoso central e com resultado de cariótipo por banda G normal. Nesses fetos foram coletadas amostras de DNA obtidos por meio da cordocentese de 46 gestantes entre 21 e 27 semanas. Dessas amostras, 30 foram analisadas com o CGH *array* e 16 casos foram analisados pelo SNP *array*. Neste estudo foram detectados CNVs em 17 casos (37%). Contudo nenhuma deleção ou duplicação foram encontradas nos 29 casos restantes. Dos casos com alteração cromossômica, CNV patogênica foram encontradas em cinco fetos com malformação de SNC. Em três casos (6,5%) foram encontrados alterações sem significado clínico determinado (VUS), e em 9 casos (19,6%) fetos as CNVs foram consideradas possivelmente benignas¹².

Trková M et al., na República Tcheca, analisaram 913 resultados de biópsia de vilo corial. Todas essas amostras foram testadas com QF – PCR e cariótipo convencional. Nos resultados normais fizeram uma nova análise com *array*, o qual detectou em 13 casos alterações cromossômicas significantes. Depois desse estudo, optaram por realizar o *array* em todos os casos em que o cariótipo seja normal e o feto apresente anomalias ultrassonográficas²⁰.

Zhang Y et al., em 2015, realizaram um estudo citogenômico com *array* em 651 fetos com malformações observadas na ultrassonografia pré-natal e cariótipo tradicional normal. Encontraram CNV em 475 casos (73% dos casos). Dessas CNVs, 11,5% eram clinicamente significantes. Também observado VUS em 2% dos casos²¹.

Ganesamoorthy et al., publicaram um estudo com 104 fetos com achados ultrassonográficos de anomalias. Em todos os fetos foram realizados cariótipo tradicional e SNP *array*. O *array* melhorou a taxa de detecção para CNV patogênica em 2,9%, e para CNV possivelmente patogênica em 9,6%. Nesse estudo, o autor conclui que mesmo com uma sensibilidade maior para detecção e melhor resolução, nem sempre esse resultado traz benefício para o diagnóstico, pois em muitos casos esse teste encontra apenas CNV com significado clínico incerto. Assim, ele reforça a necessidade de saber interpretar os achados do exame além de um adequado aconselhamento ao paciente antes e depois do teste²².

Liao et al., em 2014, estudaram 99 casos de fetos com defeito cardíaco congênito (associado ou não a outras malformações fetais) e cariótipo por banda G normal. Ao realizar SNP *array* foi detectado CNV em 19 fetos (19%), contudo em 3% as CNVs não tinham significado clínico conhecido. Em cinco casos foram detectadas síndromes conhecidas relacionadas microdeleção/microduplicação. Nos fetos com defeito

cardíaco e malformação de sistema nervoso central a taxa de detecção foi significativamente maior em relação às outras anomalias. Os autores concluem que é válida a realização do *array* em fetos portadores de defeitos cardíacos congênitos, principalmente se associado com alterações neurológicas²³.

Em Rotterdam, o estudo foi para analisar a aplicabilidade do SNP *array* para um rápido diagnóstico no pré-natal. Além disso, também foi conduzido concomitantemente um estudo piloto prospectivo o qual incluiu 61 fetos com alteração ultrassonográfica e cariotipagem normal. Foi observado CNV em 6,5% dos casos. Este estudo também analisou a posição dos pais em relação aos resultados do exame. Descrevem que em 90% dos casos os pais optam por serem informados dos resultados adversos para a infância de seus filhos, e 55% dos pais também gostariam de saber sobre os resultados adversos para a vida adulta daquele feto²⁴.

Tang et al., publicaram um estudo com 39 fetos portadores de cardiopatia congênita os quais foram submetidos ao SNP *array* para detecção de CNV. Em 97,4% dos casos foram detectados CNVs. VUS foram observados em 5,1% e CNV clinicamente significante em 17,9%. O autor conclui que comparado ao cariótipo tradicional o SNP *array* fornece uma melhora significativa na detecção de alteração de aberrações cromossômicas submicroscópicas²⁵.

Uma revisão de literatura realizada por Miller et al. concluiu que o *array* é capaz de diagnosticar de 15 a 20 % mais alterações citogenômicas no período pós-natal em pacientes portadores de atraso intelectual, autismo e múltiplas anomalias congênitas quando comparado ao cariótipo por banda G⁶.

3.2 Malformação Dandy-Walker

A malformação Dandy-Walker (MDW) representa grande parte das anomalias de fossa posterior e foi descrita inicialmente em 1887 por Sutton.

De acordo com a classificação de Tentori-Donati²⁶, as anomalias de fossa posterior são divididas em:

- Malformação Dandy-Walker a qual é caracterizada pela tríade clássica: hipoplasia ou ausência de vermis cerebelar, elevação de tentório e alargamento anteroposterior de cisterna magna.
- Megacisterna (cisterna magna com medida anteroposterior maior que 10 mm)
- Cisto da bolsa de Blake que resulta em um deslocamento para cima do vermis cerebelar, o qual é normal. Além de tentorium e tamanho da cisterna sem alterações.
- Hipoplasia de vermis cerebelar com cisterna magna de tamanho normal.

Abaixo, imagem ultrassonográfica ilustrativa (figura 1) de uma paciente atendida no ambulatório de medicina fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com diagnóstico de malformação de fossa posterior sendo evidenciada agenesia de vermis cerebelar.

Figura 1. Imagem ultrassonográfica evidenciado agenesia de vermis cerebelar associada ao alargamento anteroposterior da cisterna magna caracterizando a malformação Dandy-Walker. Seta indicando a agenesia de vermis

Fonte: imagem de exame realizado pela equipe no ambulatório de medicina fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

A etiologia da MDW é diversa. Há associação com anomalias cromossômicas, síndromes gênicas (Síndrome de Meckel-Gruber, Síndrome de Walker-Warburg)³. Também possui relação com atraso intelectual, o qual está presente em até um terço dos pacientes²⁷.

Apresenta incidência reduzida, um em cada trinta e oito mil nascimentos, contudo está presente em até 12% dos casos de hidrocefalia neonatal³.

É frequente a associação de MDW com anomalias genéticas, malformações de sistema nervoso central como meningoceles e agenesia de corpo caloso. Também pode estar correlacionado com alterações nos sistemas circulatório, gastrointestinal, urogenital e anomalias de face²⁸.

Em 17% a 54% (dependendo da forma clínica) conseguimos detectar a alteração cromossômica. Além disso, mais de 50 síndromes gênicas são relacionadas com as variantes da MDW²⁹.

Com dificuldade de orientação a respeito do prognóstico fetal e aconselhamento genético aos pais, os estudos citogenômicos a respeito dessa malformação se tornam um importante aliado em busca de descoberta de novos genes causadores da doença.

Um estudo observacional retrospectivo descreve seis casos de MDW, sem outras malformações associadas. Após análise citogenética tradicional detectou anomalias cromossômicas em 3 casos, sendo que em dois desses eram deleções subteloméricas em 6p³⁰.

Pesquisadores italianos publicaram um artigo referente ao estudo de crianças portadoras de MDW. Dos 13 casos estudados, 3 foram detectados CNV e nos 8 restantes não foi evidenciado alteração cromossômica através do *array*. Desses 3 casos, todos apresentaram deleção no braço longo do cromossomo 3 (3q22.3q25.31; 3q23q26.1; 3q24). Um dos casos também apresentou deleção no 11p11.2. Em todos os 3 pacientes, a deleção do braço longo do cromossomo 3 incluía os genes *ZIC1* e *ZIC4*, sugerindo então alguma associação desses genes com a doença³¹.

Outro estudo realizado na China submeteu o sangue de oito fetos com MDW os quais não apresentaram alteração na análise cariótipo tradicional. Contudo, quando foi realizada a análise citogenética através do método DNA *microarray* foi possível identificar em três casos a mesma variação no número de cópias de segmentos de DNA (CNV) do cromossomo 7p21 (tanto duplicação como deleção). Região esta, em que são incluídos os genes *NDUFA4* e *PHF14*, os quais são associados a doenças do sistema nervoso central.³²

Na Alemanha, foi realizada uma análise minuciosa de 14 pacientes que já possuíam diagnóstico de deleções no cromossomo 13 através do método *array*. Foi possível descrever que através dessa técnica é viável observar exatamente onde está o defeito do

braço longo do cromossomo 13 e correlacionou o genótipo com o fenótipo dessas alterações. Como exemplo, MDW com a deleção do cromossomo 13 (13q32.2-q33.1), agenesia de corpo caloso (13q32.3-q33.1), microftalmia (13q31.3-13qter) e encefalocele (13q31.3-qter)³³.

Libotte et al., relataram um caso de USG pré-natal alterado com achados sugestivos de MDW e pé torto congênito. Foi realizado *SNP array* identificando uma perda de material genético de 18 Mb na região 1q25.3-32.1. A síndrome da deleção do 1q tende a evoluir com retardo intelectual, microcefalia e pescoço curto. O autor conclui que achados clínicos, mesmo quando suaves, com o uso do *array* é possível elucidar melhor o prognóstico fetal e como manejar melhor esses pacientes³⁴.

3.3 Ventriculomegalia

Ventriculomegalia (VM) é caracterizada pelo alargamento dos ventrículos laterais, com medida do átrio maior que 10 milímetros (mm). Pode ter como etiologia o desequilíbrio entre a produção e a reabsorção do líquido cefalorraquidiano (LCR)⁴.

O LCR é produzido em sua maior parte no plexo coroide do ventrículo lateral, se dirigindo inicialmente ao terceiro ventrículo através do forâmen de Monro, posteriormente ao quarto ventrículo através do aqueduto de Sylvius, seguindo ao espaço subaracnóideo através dos forâmens de Luschka e Megendie e finalmente é absorvido nos seios venosos cranianos³.

As principais etiologias dessa enfermidade são: estenose de aqueduto de Sylvius, Chiari II, malformação de Dandy-Walker associada à agenesia dos forâmens de Luschka e Megendie, agenesia de corpo caloso, processos infecciosos (citomegalovírus,

toxoplasmose), trombose de seios sagital, compressão extrínseca por tumores e papiloma de plexo coroide³.

Abaixo a figura 2 representa imagem ultrassonográfica de dilatação do ventrículo lateral diagnosticado em feto de uma gestante atendida no HCFMUSP.

Figura 2. Imagem ultrassonográfica evidenciando VM leve. Seta indicando a dilatação ventricular

Fonte: Imagem de exame realizado pela equipe no ambulatório de medicina fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

A classificação das ventriculomegalias pode ser descritas como leve (medida do átrio superior a 10 mm e inferior a 15 mm); ou grave (medida do átrio superior a 15 mm)⁴.

Comumente há outras alterações morfológicas associadas nos casos de ventriculomegalias grave, contudo, o índice de aneuploidias é maior nas ventriculomegalias leves (3-15%)⁴.

Nicolaidis et al., estudaram 267 casos de ventriculomegalia. Observaram que em apenas 3% dos casos de ventriculomegalia isolada foram diagnosticados cromossomopatias, em contrapartida em 36% dos casos de ventriculomegalia associada a outras malformações foram detectados defeitos cromossômicos³⁵.

O prognóstico fetal e o aconselhamento genético, assim como nos casos de MDW permanecem obscuros pela falta de informação a respeito da causa desse tipo de desordem neurológica.

Na Palestina houve casos recorrentes, em famílias locais, de hidrocefalia congênita. Em um dos casos foi realizado o método *SNP array* (semelhante a esta pesquisa) sendo identificadas múltiplas regiões de homozigossidade (não descrita exatamente as localizações), afetando os genes *LAMB*; *B3GNT1*; *FLVCR2*; *POMT2*; *CCDC88C*. Destacando-se o gene *POMT2* o qual foi citado na literatura por ter sido encontrado num caso com quadro clínico semelhante³⁶.

Nos Estados Unidos, um estudo publicado em 2010, selecionou pacientes de três famílias paquistanesas consanguíneas para investigação de casos de hidrocefalia e hidranencefalia decorrentes de vasculopatia proliferativa (Síndrome de Fowler). O resultado da técnica de *SNP array* mostrou um link entre a síndrome e o cromossomo 14q24.3, onde é codificado o gene *FLVCR2*. Foi a primeira vez que se descreveu um gene que esteja correlacionado com a Síndrome de Fowler³⁷.

Schumann et al., em recente publicação, estudaram através do *SNP array*, fetos com apenas malformação de SNC em gestações que foram interrompidas. Foram analisados 33 fetos. Foram detectadas dezoito CNVs, 17 eram submicroscópicas; ou seja, não detectadas pelo cariótipo tradicional.

Nos casos de ventriculomegalia foram observadas diversas CNVs descritas abaixo:

- Deleção no gene *SPIRE1*, na região cromossômica 18p11.21
- Duplicação no gene *GULP1* e *DIRC1*, na região cromossômica 2q32.1-2q32.2
- Deleção no gene *NETO*, na região cromossômica 16q12.11
- Deleção no gene *CNTN6*, na região 3p26.3
- Deleção no gene *ARHGAP10*, na região 4q31.23.

- Duplicação no gene *KIF1A* e *AQP12A* na região 2q37.3.
- Duplicação no gene *IGSF11*, na região 3q13.32

Neste mesmo estudo, Schumann et al. também descreveram CNVs em MDW. Em um feto com MDW foi detectado uma duplicação na região cromossômica 17p11.2-17p12 onde há 42 genes envolvidos. Essa duplicação é correlacionada com a Síndrome Potocki-Lupski. Também em um feto com MDW observou-se duplicação no gene *PTPRD* na região 9p23. Em outro caso detectou deleção na região 6p25.1-6p25.3 que codifica mais de 35 genes RefSeq (segundo NCBI, o Gene RefSeq é definido como sequências genômicas a ser usada como referência para os genes bem caracterizados). Dentro desses genes está o *FOXC1*. Estudos mostram que este gene está envolvido na maior parte dos casos de MDW³⁸.

Sun e colaboradores realizaram o *array* em fetos com cariótipo normal. Estudaram 46 casos de fetos com anomalias de SNC com ou sem outras alterações ultrassonográficas associadas. Foram detectados CNVs em 37% dos casos. Os autores descrevem um caso de VM em que foi detectada duplicação no cromossomo 22q21 no qual está incluso 43 OMIM genes como o gene *TBX1*. Em outro feto, este com MDW detectou deleção cromossomo 2q13-q14.1 região que compreende os genes: *PAX8*, *IL1B*, *MERTK* e *IL1RN*. Como já havia sido descrito anteriormente esses genes estão associados ao déficit no desenvolvimento neurológico, defeitos cardíacos e malformações faciais e digitais¹².

Nesse mesmo artigo também é descrito um caso de MDW em que foi detectado deleção no gene *ABC7* na região cromossômica Xq13.3¹².

Um estudo caso controle retrospectivo publicado recentemente, comparou 154 casos de fetos com ventriculomegalia leve isolada com 190 fetos normais e identificou

14 CNVs patogênicas em 13 fetos no grupo de ventriculomegalia e 3 CNV patogênica no grupo controle³⁹.

Abaixo segue o resumo (tabela 1) dos artigos citados nessa revisão de literatura referentes à Malformação Dandy Walker:

Tabela 1. Casos de MDW citados na revisão de literatura, discriminando o número de casos estudados, a região cromossômica alterada e os genes encontrados

Autor	Ano	Número Casos (N)	Região Cromossômica	Principais Genes
Kichhoff M	2009	13	13q32.2-q33.1	não descrito
Guibaud L	2012	6	6p	não descrito
Liao C	2012	8	7p21	NDUFA4; PHF14
Ferraris A	2013	13	3q22.3; 3q25.31; 3q23q26.1; 3q24; 11p11.2	ZIC1; ZIC4
Libotte F	2015	1	1q25.3-32.1	não descrito
Schumann M	2016	33	17p11.2-17p12; 9p23; 6p25.1-6p25.3	PTPRD; FOXC1; entre outros

E a seguir, segue o resumo (tabela 2) dos artigos citados na revisão de literatura referentes à ventriculomegalia:

Tabela 2. Casos de ventriculomegalia citados na revisão de literatura, discriminando o número de casos estudados, a região cromossômica alterada e os genes encontrados

Autor	Ano	Número Casos (N)	Região Cromossômica	Genes
Meyer	2010	3	14q24.3	<i>FLVCR2</i>
Abumansour, I. S.	2015	3	não descrita	<i>LAMB; B3GNT; FLVCR; POMT2;CCDC88C</i>
Sun L	2015	46	22q21	<i>TBX1</i>
Schumann M	2016	33	18q11.21; 2q32.1-2q32.2; 16q12.11; 3q26.3; 4q31.23; 2q37.3; 3q13.32	<i>SPIRE1; GULP1; DIRC1; NETO; CNTN6; ARHGAP10; KIF1A; AQP12A; IGSF11</i>
Hu	2017	154	16p11.2; 3p23.3; 17p13.3; 6q27; 10q26.3; 2p25.3; 6q27; 17q12; 8p23.2; 22q11.22q11.23; 10q11.22 22q11.12; 8q21.2q21.3; 3p26.3	Não descritos

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo e descritivo.

4.2 Aprovação do projeto de pesquisa

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em 27/11/2013 (número do parecer: 448.660). (Anexo A)

4.3 Seleção da população estudada

Gestantes as quais preencheram os critérios de inclusão e exclusão adotados, atendidas no ambulatório de medicina fetal do HCFMUSP.

4.4 Critérios de Inclusão

- Fetos portadores de ventriculomegalia leve ou grave, não associadas ao defeito de tubo neural.
- Fetos portadores de malformação Dandy-Walker

- Gestantes que concordaram em realizar o procedimento invasivo para cariótipo fetal e pesquisa de infecção fetal
- Concordância em participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.5 Critérios de Exclusão

- Feto com cromossomopatias no resultado do cariótipo por citogenética
- Feto com pesquisa de infecção no líquido amniótico (PCR) positiva.
- Feto com amostra de sangue colhido através da cordocentese com resultado do teste de Kleihauer Betke apresentando menor que 100% de amostra fetal.

4.6 Casuística

O estudo envolveu 29 gestantes de fetos portadores de ventriculomegalia e Malformação Dandy-Walker, diagnosticados por meio da ultrassonografia, atendidas no Ambulatório de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) no período de maio de 2014 a março de 2016.

Nas gestantes selecionadas, foi realizada a coleta de sangue fetal através da cordocentese e coleta de líquido amniótico através da amniocentese para pesquisa de infecção fetal (PCR) em líquido amniótico.

4.7 Ética

As gestantes atendidas nesse ambulatório as quais preencheram os critérios de inclusão foram convidadas a participar da pesquisa. Após informação sobre o projeto de pesquisa as pacientes assinaram o TCLE tanto para os casos de ventriculomegalia quanto para os casos de malformação Dandy Walker, os quais foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital (Anexos B e C).

4.8 Metodologia estatística

Análise estatística foi realizada usando SPSS 17.0. Dados numéricos são apresentados como média e desvio padrão (DP) para as variáveis estatísticas.

4.9 Métodos

4.9.1 Exame morfológico fetal

A ultrassonografia morfológica consiste no estudo sistemático e ordenado de todas as estruturas reconhecíveis à ultrassonografia, de cada segmento do feto, além do cordão umbilical e placenta. O exame além do sistema nervoso central envolve a avaliação da face, pescoço, coluna vertebral, tórax, abdome, genitália externa e extremidades.

4.9.2 Exame ultrassonográfico do cérebro fetal

O exame do cérebro fetal envolve a avaliação do polo cefálico e do sistema nervoso central. O aparelho utilizado foi o Voluson E8. No polo cefálico, são avaliados: o contorno craniano, regularidade, ecogenicidade além da relação diâmetro bi parietal e diâmetro occipito-frontal. O sistema nervoso central na linha media são examinados os pedúnculos cerebrais, tálamos, cavo do septo pelúcido, foice do cérebro. Os ventrículos laterais são examinados as paredes, dimensões, plexo coroide, largura do átrio em corte transversal. E em um plano transversal baixo, os hemisférios cerebelares, vermes cerebelar, cisterna magna. No corte sagital é avaliado também o corpo caloso.

4.9.3 Acompanhamento da ventriculomegalia e Malformação de Dandy-Walker

Após o diagnóstico de ventriculomegalia ou Malformação de Dandy-Walker fetal foi realizado o aconselhamento do prognóstico fetal e neonatal. Todos os casos foram submetidos à realização de ultrassonografia morfológica para avaliação de malformações associadas e ecocardiografia fetal para avaliação detalhada do coração fetal.

Faz parte do aconselhamento destas duas patologias a oferta de cariótipo fetal o qual pode ser realizado por amniocentese ou cordocentese e pesquisa infecciosa no líquido amniótico.

4.9.4 Protocolo assistencial

Os casos de ventriculomegalia leve ou MDW sem malformações associadas e com cariótipo fetal normal foram acompanhados a cada quatro semanas, para avaliação da progressão da dilatação ventricular e o parto programado no termo da gestação conforme conduta obstétrica. Os casos com alteração do cariótipo fetal ou dilatação ventricular grave, receberam aconselhamento da equipe de medicina fetal responsável pelas malformações do SNC.

4.9.5 Cariótipo fetal

O cariótipo fetal foi oferecido de rotina para os casos de ventriculomegalia e ou malformação de Dandy-Walker. Foi realizado em sangue fetal obtido por cordocentese, mediante a punção com agulha fina da veia umbilical.

4.9.6 Cordocentese

A técnica de cordocentese consiste na coleta de sangue fetal através da punção dos vasos do cordão umbilical. Após análise ultrassonográfica criteriosa para avaliar posição fetal e placentária assim como biometria fetal se faz um planejamento da punção para escolha de um trajeto mais favorável.

Antes de iniciar o procedimento é preciso realizar antisepsia e anestesia no local da pele a ser puncionado.

Utiliza-se agulha espinhal com comprimento mínimo de 9 cm e calibre G20 ou G22. Durante todo o procedimento há orientação com transdutor convexo de 3,5 MHz (Voluson E8, General Electric, Austria) e observação rigorosa do corpo e ponta da agulha.

Quando há o término da coleta das amostras, retira-se a agulha e se observa a hemostasia.

Para essa pesquisa, foi coletado um total de três ml de sangue fetal. Parte da amostra (1 ml) foi separada para extração de DNA, 1 ml para cariótipo fetal e 1 ml para hemograma fetal e teste de Kleihauer Betke. Usualmente na cordocentese é coletado apenas 2 ml, contudo essa quantidade extra de 1 ml não adiciona nenhum risco à mãe ou ao feto.

Esse ml extra que separamos, mantivemos em refrigeração até no máximo 7 dias para evitar degradação da amostra e nesse período foi realizado a extração do DNA no Laboratório da Obstetrícia da FMUSP. Após a extração do DNA o mesmo foi quantificado e congelado. Nos casos em que posteriormente foram incluídos nos critérios de seleção, foram descongelados e submetidos ao *array*.

4.9.7 Pesquisa infecciosa

Na assistência pré-natal dessas gestantes é realizada a pesquisa de infecção congênita por meio de sorologia materna para citomegalovírus, rubéola e toxoplasmose, herpes vírus. No feto, os 10 ml necessários de líquido amniótico são obtidos na mesma punção realizada para a coleta de sangue fetal. Esse líquido é analisado por meio do *PCR* qualitativo para toxoplasmose, parvovírus B19 e citomegalovírus e herpes vírus.

4.9.8 Método de análise molecular

I – Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico foi utilizado o kit QIAamp DNA Blood Midi Kit (250) (QIAGEN, Valencia, Califórnia) segundo protocolo fornecido pelo fabricante com algumas modificações. Em seguida à extração, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanoview - GE®) e diluídas em TE (Tris-EDTA 10:1) com concentração final próxima de 50 ng/uL.

II – *Array* genômico

Para os experimentos foi utilizada a plataforma Illumina IScan (Illumina Technology®) utilizando o chip HumanCytoSNP-12 DNA e seguindo as instruções do fabricante.

Para a realização da técnica é necessário 4µL de DNA a uma concentração final próxima de 50ng/µL. As amostras extraídas são transferidas para uma placa MSA3 específica para que o DNA possa ser desnaturado e logo depois de neutralizado por reagentes específicos fornecidos no kit. Em decorrência, é realizada a etapa de amplificação genômica, na qual as amostras são incubadas a 37°C por 20-24 horas.

Na próxima etapa, pós-PCR, o DNA primeiramente é fragmentado por ação de uma enzima e após precipitado usando 2-propanol e PM1. A placa com as amostras fica invertida por pelo menos 1 hora à temperatura ambiente para que o pellet possa secar. Após, o DNA precipitado, o mesmo é suspenso novamente em um reagente denominado RA1 e aplicado nos BeadChips. Estes são então incubados a 48°C por aproximadamente 16 horas para que ocorra a hibridação das amostras. Seguida a

hibridação, o BeadChip é lavado e preparado para o processo de coloração. Nesta etapa o DNA não hibridado é removido e os nucleotídeos marcados com fluorocromos específicos são adicionados.

Após a lavagem, os *arrays* são analisados por um laser scanner, e a intensidade dos sinais é medida com o auxílio de softwares específicos disponibilizados pelo fabricante, como o KaryoStudio e o GenomeStudio.

Todos os *arrays* foram realizados no laboratório de Citogenômica do LIM 03 no HCFMUSP.

4.10 Coleta de dados

Os casos foram selecionados durante os atendimentos realizados no Ambulatório de Medicina Fetal do HCFMUSP.

Os resultados dos cariótipos fetais e pesquisa de infecção em líquido amniótico foram coletados através do sistema informatizado HCMED do HCFMUSP.

Os dados do parto, do recém-nascido e da evolução pós-parto, foram obtidos através de contato telefônico e sistema informatizado da Enfermaria da Clínica Obstétrica (nos casos em que o parto foi realizado no serviço).

4.11 Variáveis

As variáveis descritas no estudo são:

- Idade materna (expressa em anos);

- Idade gestacional no momento do encaminhamento para o serviço (expressa em semanas e dias);
- Medida do ventrículo lateral fetal no momento do encaminhamento para o serviço (expressa em mm) nos fetos portadores de VM;
- Medida do ventrículo lateral fetal no USG de terceiro trimestre (expressa em mm) nos fetos portadores de VM;
- Diagnóstico ultrassonográfico da malformação cerebral;
- Dados obtidos pelo *array*;
- Idade gestacional do desfecho da gestação (expresso em semanas e dias);
- Via de parto (parto normal ou cesárea);
- Desfecho gestação (óbito fetal, nascido vivo, óbito neonatal);
- Evolução RN (desenvolvimento referido pela mãe);
- Correlação com o sexo fetal (masculino ou feminino).

4.12 Análise citogenômica

As análises dos resultados foram divididas em duplicações e deleções, região cromossômica alterada e quais os genes descritos nos bancos de dados que possivelmente estão envolvidos na região afetada.

Os dados obtidos da análise citogenômica pela técnica de *array* foram submetidos à análise utilizando os seguintes bancos de dados:

- Database of Genomic Variants (DGV, disponível em: <<http://projects.tcag.ca/variation/>>),
- Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER, disponível em: <<http://decipher.sanger.ac.uk/>>),
- UCSC Genome Bioinformatics (disponível em: <<http://genome.ucsc.edu>>).

Essa consulta aos bancos de dados foi realizada para classificação das CNVs encontradas em benignas, patogênicas ou VOUS.

Foram consideradas CNVs benignas as alterações genômicas observadas em amostra de indivíduos normais, catalogadas no banco de dados DGV e assim, classificadas como polimórficas. Foram consideradas CNVs patogênicas as alterações genômicas relatadas que englobavam genes associados ao fenótipo clínico observado. E foram consideradas VUS as alterações genômicas que não envolviam genes conhecidos, que poderiam ou não estar relacionados às alterações clínicas observadas.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população estudada

Foram selecionadas para este estudo 29 gestantes as quais foram submetidas à cordocentese e amniocentese. Das 29 amostras colhidas, duas amostras foram excluídas por apresentarem PCR positivo em líquido amniótico (um caso IgM positivo para citomegalovírus e um caso IgM positivo para toxoplasmose); todas essas eram amostras referentes ao grupo da ventriculomegalia. Outras três foram excluídas devido detecção de aneuploidias (dois casos de MDW apresentado trissomia do cromossomo 18 e um caso de ventriculomegalia com trissomia do cromossomo 21).

Dentre os 24 casos incluídos, 5 foram diagnosticados à ultrassonografia com malformação Dandy Walker e 19 casos diagnosticados com ventriculomegalia.

A figura abaixo (figura 3) ilustra a caracterização da população desse estudo.

Figura 3. Caracterização da população desse estudo
Fonte: da autora

Para a análise dos resultados estudamos as duas malformações cerebrais separadamente.

5.1.1 Grupo de Malformação Dandy Walker

A média da idade materna nesse grupo foi de 32,4 anos (DP:7,33) e com 3 gestações (DP:1,87). O diagnóstico foi realizado com 26,8 semanas (DP:1,78). O parto cesárea foi realizado em todos os casos em uma de idade gestacional de 37,6 semanas (DP:0,72). Todos os fetos eram do sexo feminino. Abaixo segue a tabela descrevendo a população selecionada para o grupo de MDW.

Tabela 3. Descrição da população estudada nesse grupo de MDW

Variáveis	Média	DP	Casos (n)
Idade materna (anos)	32	7,33	
Idade gestacional de referência (semanas)	26,8	1,78	
Parto cesárea (%)	100		05
Sexo feminino (%)	100		05
Óbito neonatal	15.7		01

*DP: Desvio padrão

5.1.2 Grupo de ventriculomegalia

A média da idade materna nesse grupo foi de 28 anos (DP: 6,88) e paridade de 2 gestações (DP: 1,24), com diagnóstico realizado na 27ª semana (DP: 3,41) e a punção com a mesma idade gestacional. A medida média do átrio último trimestre de gestação, com 36 semanas, foi de 29,9 mm (DP: 15,21). O parto cesariana foi realizado em 11 casos (57,8%) e o parto normal em 8 casos (42,1%), em uma de idade gestacional média de 38 semanas e 1 dia (DP: 2,03). O sexo masculino representou 57.8% (11 casos) da amostra e o feminino 42.1% (8 casos).

Tabela 4. Descrição da população estudada nesse grupo e os resultados neonatais encontrados

Variáveis	Média	DP	Casos (n)
Idade materna (anos)	28	6.08	
Idade gestacional de referência (semanas)	27	3.41	
Medida do átrio (mm)	29	15.21	
Parto normal (%)	57.8		11
Parto cesárea (%)	42.1		08
Sexo masculino (%)	57.8		11
Sexo feminino (%)	42.1		08
Ventriculomegalia severa (%)	73.6		14
Ventriculomegalia Leve (%)	23.6		05
Óbito neonatal	15.7		03

* DP: Desvio padrão

5.2 Análise dos resultados

As alterações cromossômicas identificadas foram classificadas como benignas ou de significado clínico incerto (VUS), ou patogênicas.

Alterações patogênicas são aquelas alterações que justificaram as alterações fenotípicas observadas. Também foi pesquisado se havia algum gene afetado que foi associado previamente com uma doença.

Alterações benignas foram assim chamadas quando as variações cromossômicas encontradas não se correlacionaram com a clínica encontrada no feto, ou quando houve descrição na literatura de sobreposição da CNV em indivíduos normais.

Já as alterações com significado clínico incerto, as chamadas VUS, são aquelas em que não houve correlação direta das alterações fetais do presente estudo com as síndromes descritas na literatura contudo, se repetiram em mais de um paciente.

5.3 Resultados obtidos através SNP array

5.3.1 Grupo dos fetos portadores de Malformação Dandy Walker

Nesse grupo analisamos 5 amostras de MDW. Em uma das amostras ocorreu erro na etapa de hibridação. Em 4 amostras encontramos alteração no número de cópias no método de SNP array. Dois casos apresentaram 2 CNVs (um feto apresentou duas duplicações e o outro, duas deleções) e os outros dois casos apresentaram 1 CNV em cada (um caso deleção e no outro caso, duplicação).

Todas as variações no número de cópias foram consideradas benignas. A figura 4 elucida os casos de MDW e a distribuição dos resultados.

Figura 4. Casos de MDW e a distribuição das CNVs identificadas pelo SNP array

* del = deleção

* dup = duplicação

* CNV = do inglês, *copy number variation*

* MDW = malformação Dandy Walker

Abaixo, segue a tabela (tabela 5) identificando o resultado do SNP array no grupo de fetos portadores de MDW descrevendo o gênero fetal, alteração cromossômica obtida e seu tamanho. Em anexo (Anexo D) encontra-se o local do cromossomo de início e término das CNVs encontradas.

Tabela 5. Descrição dos casos de fetos com MDW submetidos à SNP *array* quanto ao gênero fetal, alteração cromossômica e tamanho em kb

Caso	Sexo	Alteração	Tamanho (kb)
1	F	dup 14q11.2	211,114
2	F	dup 1q31.1 dup 7q11.23	274,301 471,644
3	F	del 2p11.2 del 5q22.2	232,212 141,192
4	F	del 8q12.1-q12.3	9,335,373
5	F	Falha na hibridação	-----

* del = deleção

** dup= duplicação

5.3.2 Grupo de fetos portadores de ventriculomegalia

Dezenove fetos foram incluídos nesse grupo. Dentre os casos, identificamos 41 CNVs e 15 alterações do tipo perda de heterozigosidade. Dezesseis CNVs foram classificadas como VUS e com tamanho entre 250kb e 1890kb (mediana de 412kb). Vinte e três CNVs foram classificadas como benignas e com tamanho variando entre 115kb e 2079kb (mediana de 225kb). Nenhuma CNV encontrada foi classificada como patogênica. Em um dos fetos não encontramos nenhuma CNV.

Em anexo (ANEXO E) há a descrição dos casos com a região cromossômica afetada e local onde começa e termina a anomalias encontradas.

A tabela 3 se refere às CNVs (duplicações ou deleções), o gênero fetal, a região cromossômica afetada e a classificação da CNV. E em seguida, a tabela 4 descreve os eventos de LOH.

Tabela 6. Casos de ventriculomegalia submetidos ao SNP *array* e a descrição das CNV encontradas, discriminando o gênero fetal, região cromossômica e tamanho em Kb

Caso	Gênero Fetal	Alteração	Região	Tamanho (Kb)	Classificação
1	M	del	2p16.3	250	VUS
2	M	dup	1p35.2	306	BENIGNO
3	F	sem alteração			
4	F	dup	8p23.2	126	BENIGNO
		dup	15q26.3	242	BENIGNO
5	F	dup	12p11.21	225	BENIGNO
6	M	dup	Xp11.23	1,017	VUS
		dup	Xq28	1,849	VUS
7	M	dup	10q11.22	745	BENIGNO
		dup	Xq28	1,846	VUS
8	F	del	2p25.3	173	BENIGNO
		dup	7q11.23	493	VUS
9	M	dup	1p36.33	541	BENIGNO
		dup	9p13.1-p12	2,079	BENIGNO
		dup	Xp11.23	1,084	VUS
		dup	Xq28	1,234	VUS
10	M	del	2p16.3	250	VUS
		del	2q37.3	514	BENIGNO
		del	4q13.1	615	BENIGNO
		del	8q24.23	116	BENIGNO
11	M	dup	5p13.1	259	BENIGNO
		dup	Xp11.23	1,028	VUS
12	M	dup	1q43	191	BENIGNO
		dup	17p11.2	360	BENIGNO
		dup	Xp11.23	1,075	VUS
		dup	Xq28	1,834	VUS
13	F	del	11p11.12	1,027	BENIGNO
		dup	22q11.21	130	BENIGNO
14	F	Del	8q21.3	115	BENIGNO
15	F	Dup	Xp11.23	1	VUS
		Dup	Xq28	1,177	VUS
16	F	Dup	14q32.33	226	BENIGNO
17	F	Dup	6q27	268	BENIGNO
		Del	15q11.2	125	BENIGNO
		Dup	15q13.3	323	BENIGNO
18	F	Dup	17p13.3	121	BENIGNO
19	M	Dup	7q11.23	412	VUS
		Dup	17q21.31	129	BENIGNO
		Dup	Xp11.23	1,003	VUS
		Dup	Xq28	1,162	VUS

* dup = duplicação

** del = deleção

*** F= feminino

**** M = masculino

Tabela 7. Descrição dos casos estudados por SNP array casos de perda de heterozigosidade (LOH) encontrados discriminando o gênero fetal, alteração genômica, região cromossômica e tamanho em Kb

Caso	Gênero fetal	Alteração genômica	Região cromossômica	Tamanho(kb)
14	F	LOH (x2)	1q25.2-q32.1	27,741
		LOH (x2)	1q32.1-q32.3	7,415
		LOH (x2)	3p24.2-p.24.1	6,452
		LOH (x2)	5q31.1-q31.3	8,620
		LOH (x2)	6p24.2-p.22.3	9,856
		LOH (x2)	6q11.1-q13	9,248
		LOH (x2)	7p14.1-p12.2	6,611
		LOH (x2)	7q34-q36.1	10,230
		LOH (x2)	9q21.33-q31.1	12,510
		LOH (x2)	12q13.13-q21.1	19,247
		LOH (x2)	14q11.2-q13.3	13,697
		LOH (x2)	14q23.1-q23.3	4,448
15	M	LOH (x2)	17q25.1-q25.3	4,818
			Xq28	1,176
19	M	LOH (x2)	7q11.21-q11.22	3,309
			Xq28	1,159

*F = feminino

**M= masculino

*** LOH = perda de heterozigose

6 DISCUSSÃO

Optamos por realizar o *array* em sangue fetal por ser um material livre contaminação de células maternas, resultando assim numa análise mais certa com o mínimo de contaminação de células maternas.

Encontramos nos resultados as aberrações cromossômicas do tipo duplicação, deleção, e o evento genético de perda da heterozigose (LOH).

Duplicação ocorre quando um fragmento do cromossomo aparece mais de uma vez. Essa alteração tende a ser mais benigna quando comparada a deleção ou ao LOH.

Deleção se caracteriza quando há uma perda total ou parcial de um segmento do cromossomo. As deleções maiores podem ser terminal ou intersticial (próxima ao centrômero). Quando a deleção envolve apenas um segmento do cromossomo (o paciente irá apresentar um cromossomo normal e seu homólogo deletado) poderá gerar uma falta de capacidade dessa única cópia funcionar normalmente na ausência da outra cópia homóloga e isso resultará no evento de perda de heterozigose gerando uma haploinsuficiência. Esse evento genético pode resultar em uma dosagem reduzida do gene normal não sendo suficiente para produzir um fenótipo normal. Portanto, poderá haver relevância clínica, pois regiões cromossômicas com perda de número de cópias podem conter genes essenciais e essa haploinsuficiência celular pode resultar na variação do quadro clínico podendo implicar em manifestações clínicas relevantes ou até mesmo resultar numa clínica incompatível com a vida (40).

6.1 Casos de Malfomação Dandy Walker

Todas as variações no número de cópias foram consideradas supostamente benignas até o momento de finalizarmos esse estudo.

Das seis CNVs encontradas nos 5 fetos, três eram do tipo duplicação, três do tipo deleção; e em um dos casos houve erro no processo de hibridação. Essa falha na hibridação ocorreu em apenas uma das amostras desse estudo (caso 5), e provavelmente foi decorrente a uma degradação do DNA não sendo possível obter um resultado conclusivo.

Em alguns fetos foram detectados outros achados ultrassonográficos associados à malformação da fossa posterior. Um deles (caso 1) foi diagnosticado veia cava superior persistente além de restrição de crescimento intraútero (CIUR). A alteração encontrada no *array* foi uma duplicação em 14q11.2. Após pesquisa nos bancos de dados (Genome Browser e DECIPHER) foi constatado que nessa região se encontram os genes: *OR4Q3*, *OR4H12P*, *OR4M1*, *OR4N1P*, *OR4N2*, *OR4K6P*, *OR4K3*, *OR4K2*, *OR4K4P*, *OR4K5*, *OR4K16P*, *OR4K5*, *OR4K1* e *LOC100421751*. Todos os genes citados (exceto *LOC100421751* o qual não apresenta nenhuma função descrita na literatura e nem nos bancos de dados) são genes descritos por serem da família dos receptores olfatórios. Ao fazer uma análise, cabe dizer que esses receptores olfatórios são codificados pelo córtex cerebral e que o trato olfatório se encontra na região posterior do cérebro, região onde encontramos as alterações morfológicas neste feto.

O caso 2 recém-nascido evoluiu bem, realizando apenas derivação ventrículo peritoneal, já que apresentava ventriculomegalia associada. A região 1q31.1 duplicou apenas 2 genes, ambos sem relevância para o quadro clínico de nossos pacientes. Já 7q11.23 duplicou 16 genes também ainda com pouca associação com sistema nervoso central na literatura atual.

O caso 3 apresentou MDW isolada e apresentou deleção de 2p11.2 (21 genes) e duplicação de 5q22. 2 (3 genes). Todos os 24 genes afetados não são relevantes para explicar a clínica desse paciente.

Já o caso 4 apresentava concomitantemente à MDW, cardiopatia grave (com comunicação interventricular, estenose de aorta), artéria umbilical única e bolha gástrica pequena. Este último evoluiu para óbito após o nascimento, provavelmente decorrente da cardiopatia. Nesse caso, a região alterada (8q12.1-q12.3) é uma região rica em genes, sendo deletado 30 genes. Dentre eles o gene *PENK* o qual codifica a proteína precursora das encefalinas que se ligam nos receptores opioides e modulando a percepção de dor⁴¹. Ou seja, novamente encontramos um gene correlacionado ao cérebro. Mesmo ainda não dispondo de registro na literatura de alterações dessa região com a malformação Dandy Walker não podemos ignorar que já foi comprovado desequilíbrio genéticos desse ponto de quebra com alterações de sistema nervoso central. Outro gene importante deletado foi o gene *CHD7*. Mutações nesse gene foram encontradas em alguns pacientes com associação CHARGE (coloboma, cardiopatia, atresia de coanas, atraso de crescimento e desenvolvimento, hipoplasia de genitais, anomalias de pavilhão auricular/surdez) (OMIM). A cardiopatia estava presente em nosso paciente e uma suspeita de atresia de esôfago que não foi confirmada após nascimento (segundo relato materno).

A tabela com a caracterização e evolução clínica dos fetos estudados, em anexo (ANEXO F)

É necessário frisar que há uma constante atualização dos bancos de dados, diversos estudos sendo realizados, e assim provavelmente num futuro próximo devemos rever os achados do *array* dessa pesquisa e certamente reclassificaremos as variações no número de cópias encontradas.

6.2 Casos de Ventriculomegalia

Alterações benignas

Nesse grupo se encontram grande parte das CNVs encontradas (57,8% das CNVs). Discutiremos os casos que apresentaram apenas CNV benigna.

O caso 2 detectou-se duplicação em 1p35.2. O feto apresentava ventriculomegalia grave, polidramnio, macrocrania e persistência da veia cava superior. Nasceu de parto cesárea eletiva devido aumento do diâmetro biparietal com 37 semanas e 3 dias. Parto sem intercorrências, RN nascido vivo. Na última ultrassonografia apresentava medida do átrio de 25mm. Realizou derivação ventriculoperitoneal no 5º dia de vida. A região duplicada afeta apenas 6 genes e nenhum deles é descrito com alterações morfológicas cerebrais ou cardíacas (genes *MATN1*, *MIR4420*, *LPTM5*, *LOC400748*, *SDC3*).

No caso número 3, estudamos uma gestante de 23 anos, atendida pela primeira vez no nosso serviço com 33 semanas e 1 dia. Diagnosticado ventriculomegalia fetal grave bilateral com medida do maior átrio de 40 mm. Como outros achados ultrassonográficos foram visibilizados restrição de crescimento fetal (percentil fetal abaixo de p3 de Hadlock); polidrâmio e cerebelo hipoplásico. Realizado *array*, o qual também não detectou nenhuma alteração cromossômica. A última USG foi realizada com 36 semanas e 1 dia, apresentando medida do maior átrio de 43mm. O desfecho da gestação ocorreu com 38 semanas e 4 dias, parto cesárea, RN nascido vivo, sexo feminino. Após o nascimento não realizou derivação ventrículo peritoneal, pois teve parada respiratória no dia da cirurgia. Desde o nascimento usa sonda para alimentação, apresenta pouca força muscular, e movimentação de membros restrita. Uma ventriculomegalia importante associada a alteração cerebelar sem etiologia definida é bastante intrigante. Lembrando que excluimos infecções através da pesquisa em líquido amniótico e sangue materno.

Esse é um caso que poderia ser eleito para realização de exoma para pesquisar alterações menores, ao nível dos éxons.

No caso 4 o feto apresentava ventriculomegalia grave associada à cardiopatia complexa com hipoplasia ventrículo esquerdo, atresia de valva mitral e dupla via saída de ventrículo direito. Na análise por *SNP array* foram detectadas duas CNVs: duplicação em 8p23.2 e em 15q26.3 e identificado o gene *ADAMTS17*.

Após pesquisa no Genome Browser constatou-se que a região 8p23.2 não possui nenhum gene descrito. Contudo, esse desequilíbrio genômico já foi anteriormente correlacionado com defeitos cardíacos conotruncais em um estudo realizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo e Universidade Federal de Mato Grosso, com o uso da técnica de MLPA em pacientes cardiopatas(42). Essa mesma duplicação também já foi encontrada em um estudo realizado em pacientes portadores da síndrome de Kabuki, a qual se caracteriza por ser uma múltipla anomalia congênita e com etiologia desconhecida⁴³. Outro estudo também descreve a duplicação de 8p23.1-8p23.2 em uma criança com atraso na fala e autismo⁴⁴. A mesma duplicação foi encontrada na mãe, que havia dificuldade de aprendizado e epilepsia⁴⁵.

A região 15q26.3, segundo pesquisa nos bancos de dados (DECIPHER e Genome Browser) engloba o gene *ADAMTS17*. É um gene que ainda não possui uma função bem estabelecida até o momento. Contudo, o OMIM correlaciona a homozigose deste gene com Síndrome Weill-Marchesani; uma desordem do tecido conectivo caracterizada pela baixa estatura, braquidactilia e rigidez articular. Além disso, em publicação recente, um estudo correlaciona esta região com casos familiares de atraso intelectual(44). Também já foi descrito um caso de neonato o qual apresentava achados ultrassonográficos pré-natal apresentando defeito cardíaco, derrame pleural, pé torto congênito e ausência de rim direito. Após análise com o método *SNP array*, detectou-se duplicação 15q26.3(45).

No caso 5 ocorreu duplicação em 12p11.21 afetando 12 genes: *OVOS2*, *LOC107987168*, *MTND6P26*, *MTCYBP26*, *RPL13AP22*, *MREGP1*, *LOC100419525*, *SINHCAF*, *FLJ13224*, *LINC02387*, *RNU6-618P*, *DENND5B*. A maioria desses são pseudogenes, ou seja, uma sequência de nucleotídeos que se assemelham ao genes conhecidos, mas que não expressa nenhuma proteína funcional. O restante dos genes encontrados, não se correlacionam com a clínica encontrada.

O caso 13 houve deleção em 11p11.12e duplicação 22q11.21. Esse caso apresentava VM grave (última medida do átrio de 31mm). Nasceu de parto cesárea, RN vivo, evoluindo bem após o nascimento realizando uma derivação ventrículo peritoneal pós-natal. A região 11p11.12 inclui apenas pseudogenes (*LOC105369150* e *LOC646813*). Em 22q11.21 há 5 genes. Dentre eles destaca-se o gene *DGCR6*, correlacionado com Síndrome de DiGeorge. Todavia, na síndrome de DiGeorge esse gene está habitualmente deletado e não duplicado como ocorrido em nosso resultado. A literatura também correlaciona mutações desse gene com esquizofrenia(46).

No caso número 14 foi o caso em que encontramos o maior número de alterações cromossômicas, e portando maior número de genes envolvidos. Porém, apenas uma alteração foi considerada CNV e o restante foi descrito como LOH. Essa paciente era uma gestante de 26 anos, hígida, sem antecedente de malformação fetal e marido não consanguíneo. Atendida em nosso serviço com 31 semanas e 3 dias, quando foi diagnosticado ventriculomegalia leve à direita, fenda lábio palatina à direita, cavum do septo pelúcido alargado e polidrâmnio. Ecocardiografia fetal sem alteração. A medida do átrio direito no primeiro momento era de 10,5 mm, e se manteve assim até o final da gestação. O parto foi realizado com 39 semanas e 4 dias por via alta, cesariana. O recém-nascido nasceu vivo, sexo masculino. Evoluiu bem, com adequado desenvolvimento neuropsicomotor, ventriculomegalia regredindo espontaneamente sem necessidade de

derivação ventrículo peritoneal. Foi realizada correção cirúrgica da fenda lábio palatina. Contudo, o RN apresenta micropênis e criptorquidia e está em investigação de hipogonadismo hipogonadotrófico. Além disso, foi detectado coloboma em nervo óptico bilateralmente em tomografia pós-natal.

Este caso é intrigante pelo rico quadro clínico e a única CNV encontra não ter intersecção entre o fenótipo encontrado e achados da literatura. Este pode ser um exemplo de que o acúmulo de conhecimento e ampliação dos estudos genéticos poderão no futuro trazer melhor elucidação diagnóstica.

Alterações de significado clínico incerto (VUS)

Neste grupo incluímos os casos em que as alterações genômicas encontradas envolviam genes que não explicavam a clínica, o fenótipo encontrado; contudo, houve repetição dessa alteração em mais de um caso. Mas, comparando os achados com o banco de dados, ainda não parece ser possível explicar a clínica encontrada em nossos pacientes. Isso ocorre, pois a literatura e os bancos de dados ainda estão sendo produzidos e em constante atualização. Os achados obtidos hoje provavelmente terão que ser revisados num futuro próximo, com mais informações, e posteriormente realizar uma revisão do laudo.

Encontramos 16 CNVs (42% das CNVs) e destas, quatro se repetiram mais de uma vez: região 2p16.3 (2 vezes), região Xp11.23 (6 vezes), região 7q 11.3 (2 vezes), região Xq28 (6 vezes). Todas as repetições ocorreram no mesmo tamanho e mesma localização da deleção, ou seja, afetando exatamente os mesmos genes.

A região 2p16.3 foi deletada em 2 casos (tabela 3). Contudo, os genes descritos nessa região são considerados pseudogenes: LOC730100 e LOC100528062.

Todavia, a literatura correlaciona essa alteração estrutural cromossômica com desordens de comportamento. Um artigo realizado na Dinamarca encontrou essa deleção de 2p16.3 após estudar e analisar com *array* uma família afetada por graves desordens psiquiátricas como esquizofrenia e desordens afetivas(47). Também publicado em outro estudo, uma correlação da perda na região 2p16.3 em uma criança de 7 anos de idade, portador de autismo e epilepsia⁴⁸.

Portanto, após cruzar as informações encontradas no nosso estudo com os achados literários e banco de dados, é possível correlacionamos a perda na região 2p16.3 como uma importante causa para desordens cerebrais e neurológicas. Além disso, vale ressaltar que o cromossomo 2 é um cromossomo que possui centenas de genes, e muitos desses são responsáveis pela formação, ou seja, um desequilíbrio na arquitetura genômica desse gene muito provavelmente vai resultar em erros graves.

A região 7q11.3 que se repetiu em 2 vezes, ambos como duplicação. Os genes e pseudogenes envolvidos são: *LOC100996476*, *GTF2IP7*, *LOC100420548*, *SRRM3*, *HSPB1*, *YWHAG*, *SSC4D*, *ZP3*, *FDPSP2*, *DTX2*, *LOC105375355*, *LOC105375354*, *SPDYE16*, *LOC105375357*, *LOC100133091*, *POMZP3*.

Dentre esses, destaca-se o gene *DTX* que possui grande expressão em todos os tecidos, mas principalmente no cérebro e tálamo⁴⁹.

A região Xp11.23 foi duplicada em 6 casos. Essa região engloba 30 genes. Dentre eles o gene *FTSJ1* e *SLC38A5*, pelo OMIM, foram correlacionados com severa deficiência intelectual⁵⁰ assim como o gene *PQBP1*(51). Todavia, esses genes também não se correlacionam na literatura atual diretamente com o fenótipo encontrado em nossos pacientes.

A região Xq28 duplicou a região que engloba 14 genes: *MAGEA5*, *MAGEA10*, *GABRA3*, *GABRQ*, *MAGEA3*, *CSAG2*, *MAGEA12*, *MAGEA2*, *CSAG3*, *MAGEA6*,

CETN2, *NSDHL*, *MAGEA1*, *ZFP92*. Nenhum desses genes possui correlação descrita com ventriculomegalia.

Consideramos essas CNVs repetidas com VUS potencialmente patogênicas pois acreditamos que o fato delas estarem alteradas com tamanho e localização exatamente iguais, ou seja, englobando exatamente os mesmo genes, muito nos leva a acreditar que essas alterações são potencialmente patogênicas, porém ainda falta embasamento científico, banco de dados e comprovação laboratorial que esses genes expressados além do esperado (no casos das duplicações) ou, não se expressando (deleções) irão resultar em manifestações clínicas.

Provar que esses genes afetados realmente causam os fenótipos alterados não é tão simples como parece, já que é necessário um amplo estudo laboratorial comprovando e corroborando com a hipótese do gene transcrever uma proteína a qual impactará em alteração fenotípica.

Os resultados desse estudo se assemelham com recente pesquisa em fetos com ventriculomegalia (já citado anteriormente), contudo, eles deram ênfase ao desenvolvimento neurológico pós-natal. Trata-se de um estudo caso controle com 154 fetos com VM foram submetidos ao SNP array e acompanhados até o período pós-natal para análise do neurodesenvolvimento. O autor identifica CNV em 13 fetos (8,4%) com VM leve isolada e em apenas 3 fetos (1,6%) em um grupo controle. Dentre os fetos portadores de VM, 13 CNVs patogênicas foram encontradas e neurodesenvolvimento anormal foi identificado³⁹.

Dessas CNVs, quatro foram similares às encontradas no presente estudo: 17p13.3, 6q27, 2p25.3 e 10q11.22³⁹. O feto que detectamos CNV 17p13.3 mostrou, após o nascimento, incapacidade mental leve semelhante ao estudo citado.

O feto que possuía alteração em 6q27 no caso no presente estudo mostrou desenvolvimento normal o que também corresponde ao estudo citado nesse parágrafo.

Em relação a região 2p25.3, o estudo citado relata uma perda de *follow up*, e no nosso caso progrediu com hipotonia no membro superior direito e neurodesenvolvimento normal. Finalmente, 10q11.22, o estudo citado descreve um caso de retardo mental severo e em nosso estudo o feto apresentou dupla via saída de coração direito associado a VM grave, contudo o recém-nascido foi a óbito no primeiro mês de vida.

LOH

Como citado anteriormente, esse evento genético pode resultar em uma dosagem reduzida do gene podendo acarretar em alteração clínica. A gravidade de LOH é variável, mas a sua gravidade irá depender da região cromossômica afetada e quais genes foram alterados.

A maioria se centralizou no caso 14. Essa paciente era uma gestante de 26 anos, hígida, sem antecedente de malformação fetal e marido não consanguíneo. Atendida em nosso serviço com 31 semanas e 3 dias, quando foi diagnosticada ventriculomegalia leve à direita, fenda lábio palatina à direita, cavum do septo pelúcido alargado e polidrâmnio. Ecocardiografia fetal sem alteração. A medida do átrio direito no primeiro momento era de 10,5 mm, e se manteve assim até o final da gestação. O parto foi realizado com 39 semanas e 4 dias por via alta, cesariana. O recém-nascido nasceu vivo, sexo masculino. Evoluiu bem, com adequado desenvolvimento neuropsicomotor, ventriculomegalia regredindo espontaneamente sem necessidade de derivação ventrículo peritoneal. Foi realizada correção cirúrgica da fenda lábio palatina. Contudo, o RN apresenta micropênis e criptorquidia e está em investigação para hipogonadismo hipogonadotrófico. Também detectado coloboma em nervo óptico bilateralmente em tomografia pós-natal.

Uma das regiões cromossômicas afetadas foi a região 3p24.2-p24.1. Nessa região é descrito por volta de 30 genes na literatura. Um deles é o gene *EOMES*, também conhecido como *TBR2*. Esse gene transcreve uma proteína crucial para o desenvolvimento do mesoderma e do sistema nervoso central em vertebrados. Foi descrito na literatura casos de microcefalia e polimicrogiria⁵², porém não há registro de correlação com ventriculomegalia até o momento. É um caso com potencial patogênico, contudo ainda necessita de mais investigação e estudos⁵².

A tabela com a caracterização e evolução clínica dos fetos portadores de VM segue em anexo (ANEXO G).

7 CONCLUSÃO

- Com o estudo citogenômico por *array* foi possível detectar presença de CNVs utilizando cariotipagem por *array* em 22, dos 24 casos selecionados os quais apresentavam resultado de cariótipo normal;
- Investigamos a presença de CNVs em 24 casos sendo 5 deles fetos portadores de MDW e 19 fetos portadores de VM;
- Foi possível determinar qual a região cromossômica estava alterada, além de associar essas regiões com genes envolvidos;
- Foram encontrados 9 deleções e 30 duplicações e 15 LOH;
- Os genes envolvidos foram estudados e comparados com o banco de dados. Contudo para melhor correlação entre achados ultrassonográficos e citogenômicos ainda necessitamos de mais estudos acumulativos para enriquecer os bancos de dados existentes e melhorar a assistência pré-natal, diagnóstico e prognósticos dos pacientes portadores de ventriculomegalia e malformação Dandy Walker.

8 ANEXOS

8.1 Aprovação Projeto de Pesquisa

Anexo A

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Cir? 2, 365/13

PROJETO DE PESQUISA

Título: INVESTIGAÇÃO CITOGENÔMICA EM FETOS PORTADORES DE HIDROCEFALIA E MALFORMAÇÃO DANDY-WALKER

Pesquisador Responsável: Mario Henrique Burlacchini de Carvalho **Versão:** 3

Pesquisador Executante: Cibelediedrichs **CAAE:** 14546413.1.0000.0068

Co-autores: Leslie Kulikowski, Evelin Aline Zanaro, Rossana Pulcineli Vieira Francisco, Marcelo Zugaib

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10652

Número do Parecer: 448.660

Data da Relatoria: 06/11/2013

Apresentação do Projeto: O projeto é bastante interessante e está apresentado de maneira simples e direta, e servirá como projeto de Mestrado. O estudo será realizado com 30 fetos que apresentarem diagnóstico de malformação Dandy Walker e ventriculomegalia que forem submetidos a punção por cordocentese (entre 20 e 24 semanas de gestação) para análise de cariótipo fetal convencional (bandamento G). Caso a análise do cariótipo apresente resultado normal, esse material será avaliado por array para investigação de CNV na tentativa de um diagnóstico molecular para os fetos. Esses pacientes são acompanhados no Ambulatório de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica HCFMUSP.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo geral da pesquisa é investigar a presença de CNVs (variação no número de cópias) utilizando cariotipagem por array em amostras obtidas de fetos portadores de ventriculomegalia ou Malformação de Dandy Walker, com resultado de cariótipo clássico normal. Os objetivos específicos são:

- Realizar a correlação genótipo-fenótipo
- Correlacionar a presença de variações nos números de cópias com a idade materna.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Segundo o pesquisador, existe o risco apenas relacionado com o método de coleta das amostras por cordocentese, que é de 1% para abortamento. No entanto, a coleta seria realizada de qualquer maneira, para o exame cariotípico. Benefícios: A proposta deste trabalho contribuirá para o conhecimento de fatores genéticos relacionados a malformações fetais. A partir deste conhecimento gerado, muitas pacientes poderão se beneficiar no sentido de práticas que possam ajudar na identificação da etiologia e possível aconselhamento da evolução pós natal.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto apresentado é extremamente interessante e de relevância clínica e diagnóstica, apresentando uma solução técnica inovadora na tentativa de diagnosticar os casos que não apresentam etiologia definida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O pesquisador apresentou as novas versões dos TCLEs com as correções e modificações sugeridas.

Recomendações: Não há mais recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto não apresenta pendências.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 12 de Novembro de 2013

Prof. Dr. Alfredo José Mansueto
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8.2 Consentimento Livre e Esclarecido

8.2.1 Consentimento livre e esclarecido para Malformação de Dandy-Walker

Anexo B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
.....
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA:

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Investigação citogenômica em fetos portadores de hidrocefalia e malformação Dandy-Walker”

PESQUISADOR: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado da Disciplina de Obstetrícia FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 80872

PESQUISADORES e COLABORADORES: Cibele Dierdichs; Evelin Zanardo; Leslie D. Kulikowski; Marcelo Zugaib; Rossana P. V. Francisco.

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Obstétrica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO (x)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. Estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo investigar a presença de alterações genéticas no seu bebê. Você está sendo convidada pelo fato do seu bebê estar com alteração no cérebro (“falha na formação de uma parte do cérebro”) detectada no exame de ultrassom. A alteração que o seu bebê tem é chamada de Malformação de Dandy-Walker, que é uma malformação que afeta a formação do cerebelo, cisterna magna e do 4º ventrículo. Estas estruturas cerebrais dentre outras funções são responsáveis pelo equilíbrio, motricidade e mesmo a inteligência da pessoa. Essa alteração pode ser decorrente de problemas genéticos semelhantes ao mongolismo, mas na maioria das vezes a causa da malformação não é identificada.

2. Como parte da investigação da causa da malformação de Dandy-Walker, a pesquisa genética do bebê é feita mediante coleta de uma pequena amostra de sangue do bebê por meio da punção do cordão umbilical. Nesta punção em geral, são retirados 2 ml de sangue, que não faz falta ao bebê. Este procedimento tem um risco de 1% de apresentar alguma complicação que pode ser rotura da bolsa (bolsa rota), parto prematuro e mesmo morte do bebê no útero. Mas, este exame é oferecido rotineiramente quando o bebê tem esta alteração.
3. Para pesquisa iremos precisar de mais 1 ml do sangue do bebê, que será coletado junto, sendo retirado um total de 3ml. Deste 1 ml adicional, será extraído o material genético e congelado. Os primeiros exames realizados serão a pesquisa genética para afastar algumas doenças no bebê. Se os exames forem negativos (normais), então iremos estudar no material congelado se existem alterações no código genético do bebê.
4. Para tentar detectar essas alterações no código genético, usaremos um método avançado chamado *ARRAY*, que é feito no laboratório sem a necessidade de retirada de mais sangue do bebê. A realização deste exame chamado de “*array*” visa olhar de forma mais detalhada se há algum problema genético no sangue do bebê. Portanto, só iremos precisar coletar o sangue uma vez, e a participação nesta pesquisa não aumenta o risco para você ou seu bebê.
5. Como consequência da punção, você poderá sentir desconforto na barriga, como cólica e dor no lugar da introdução da agulha. Às vezes, no local, também pode ficar vermelho ou até roxo com um pequeno inchaço temporário, mas que não necessita de nenhum cuidado especial. Em 1% poderá ocorrer risco de perda fetal (o mesmo risco se você fizesse apenas o exame necessário pela alteração no cérebro do bebê).
6. Com este estudo tentaremos: identificar alterações genéticas específicas para que possamos ajudar outras pacientes com fetos com a mesma doença, conseguir dizer se há ou não chance de acontecer em outra gestação além de uma melhor assistência dessas crianças antes e após o nascimento.
7. Faz parte desta pesquisa uma entrevista detalhada sobre o histórico obstétrico que deve ter duração de aproximadamente 15 minutos e será realizada por pesquisadores envolvidos no projeto.
8. Ao participar desta pesquisa, você não terá nenhum benefício direto. No entanto, esperamos que este estudo trouxesse informações importantes e mais conhecimento sobre este tema.
9. Você pode optar em não participar da pesquisa, e faremos mesmo assim todos os exames que são necessários para o acompanhamento do seu caso.
10. A qualquer momento você tem acesso garantido aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas com o pesquisador **Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**, que pode ser encontrado na Clínica Obstétrica do HCFMUSP, 10º andar do Instituto Central do Hospital das Clínicas, na Av. Enéas de Carvalho Aguiar N 255, Telefone 2661 6380 ou com a colaboradora **Cibele Diedrichs** (tel: 982089995).
11. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br
12. Você pode retirar este consentimento e desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição.
14. Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo, seu nome e das demais pacientes não será divulgado em nenhuma publicação, e os dados serão utilizados exclusivamente para fins científicos.
15. Você poderá se manter atualizada sobre os resultados parciais desta pesquisa, podendo questionar a qualquer momento sobre as informações obtidas ou dos resultados que sejam do conhecimento do pesquisador.
15. Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há compensação financeira.
16. Entendi que as informações assim como o sangue coletado e armazenado poderão ser usados no futuro para esclarecimento das causas da hidrocefalia.
17. Em relação ao armazenamento e guarda do material mesmo após fim da pesquisa, eu:
☐ Autorizo o armazenamento após fim da pesquisa
☐ Não autorizo armazenamento após fim da pesquisa
18. Em relação ao uso das informações e material coletado para pesquisas futuras fui questionado se gostaria de ser consultado para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas e minha resposta foi SIM (caso tenha respondido NÃO ao item 17 não precisa responder a essa pergunta)
☐ SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.
☐ NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado (a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.
19. Fui também informada que o tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

20. Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

21. Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Em casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura da testemunha

Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

8.2.2 Consentimento livre e esclarecido para ventriculomegalia

Anexo C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA:

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Investigação citogenômica em fetos portadores de hidrocefalia e malformação Dandy-Walker”

PESQUISADOR: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado da Disciplina de Obstetrícia FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 80872

PESQUISADORES e COLABORADORES: Cibele Dierdichs; Evelin Zanardo; Leslie D. Kulikowski; Marcelo Zugaib; Rossana P. V. Francisco.

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Obstétrica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO() RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO (x)

4 DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. Estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo investigar a presença de alterações genéticas no seu bebê. Você está sendo convidada pelo fato do seu bebê estar com alteração (“líquido no cérebro”) detectada no exame de ultrassom. A alteração que o seu bebê tem é chamada hidrocefalia que é o acúmulo de líquido no cérebro. Essa alteração pode ser decorrente de problemas genéticos por infecção ou mesmo por alguma outra malformação do cérebro.
2. Como parte da investigação dos bebês com aumento no líquido do cérebro, oferecemos às gestantes a pesquisa genética e infecciosa do bebê por meio da coleta de uma pequena amostra de sangue do bebê por meio da punção do cordão umbilical. Nesta punção em geral, são retirados 2 ml de sangue, que não faz falta ao bebê, mas a punção tem risco de 1% de apresentar alguma complicação, que pode ser rotura da bolsa (bolsa rota), parto prematuro e mesmo morte do bebê no útero. Mas, este exame é oferecido rotineiramente quando o bebê tem esta alteração.
3. Para pesquisa iremos precisar de mais 1 ml do sangue do bebê, que será coletado junto, sendo retirado um total de 3ml. Deste 1 ml adicional, será extraído o material genético e congelado. Os primeiros exames realizados serão a pesquisa genética para afastar algumas doenças no bebê. Se os exames forem negativos (normais), então iremos estudar no material congelado se existem alterações no código genético do bebê. Se os exames forem anormais, manteremos seu material guardado para uso se houver necessidade de alguma investigação a mais. Porém, sempre com o seu consentimento.
4. Para tentar detectar essas alterações no código genético, usaremos um método avançado chamado *ARRAY*, que é feito no laboratório sem a necessidade de retirada de mais sangue do bebê. A realização deste exame chamado de “*array*” visa olhar de forma mais detalhada se há algum problema genético no sangue do bebê. Portanto, só iremos precisar coletar o sangue uma vez, e a participação nesta pesquisa não aumenta o risco para você ou seu bebê.
5. Como consequência da punção, você poderá sentir desconforto na barriga, como cólica e dor no lugar da introdução da agulha. Às vezes, no local, também pode ficar vermelho ou até roxo com um pequeno inchaço temporário, mas que não necessita de nenhum cuidado especial. Em 1% poderá ocorrer risco de perda fetal (o mesmo risco se você fizesse apenas o exame necessário pela alteração no cérebro do bebê).
6. Com este estudo tentaremos: identificar alterações genéticas específicas para que possamos ajudar outras pacientes com fetos com a mesma doença, conseguir dizer se há ou não chance de acontecer em outra gestação além de uma melhor assistência dessas crianças antes e após o nascimento. Você também terá direito a uma consulta de aconselhamento genético para explicar os resultados dos seus exames.
7. Faz parte desta pesquisa uma entrevista detalhada sobre o histórico obstétrico que deve ter duração de aproximadamente 15 minutos e será realizada por pesquisadores envolvidos no projeto.
8. Ao participar desta pesquisa, você não terá nenhum benefício direto. No entanto, esperamos que este estudo traga informações importantes e mais conhecimento sobre este assunto.
9. Você pode optar em não participar da pesquisa, e faremos mesmo assim todos os exames que são necessários para o acompanhamento do seu caso.
10. A qualquer momento você tem acesso garantido aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas com o pesquisador **Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**, que pode ser encontrado na Clínica Obstétrica do HCFMUSP, 10º andar do Instituto Central do Hospital das Clínicas, na Av. Enéas de Carvalho Aguiar N 255, Telefone 2661 6380 ou com a colaboradora **Cibele Diedrichs** (tel: 982089995).
11. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br
12. Você pode retirar este consentimento e desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição.
13. Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo, seu nome e das demais pacientes não será divulgado em nenhuma publicação, e os dados serão utilizados exclusivamente para os fins científicos.
14. Você poderá se manter atualizada sobre os resultados parciais desta pesquisa, podendo questionar a qualquer momento sobre as informações obtidas ou dos resultados que sejam do conhecimento do pesquisador.
15. Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há compensação financeira.
16. Entendi que as informações assim como o sangue coletado e armazenado poderá ser usado no futuro para esclarecimento das causas da hidrocefalia.
17. (Se você respondeu Não autorizo no item 17, não precisa responder esta pergunta):

18. Em relação ao uso das informações e material coletado para pesquisas futuras fui questionado se gostaria de ser consultado para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas e minha resposta foi (Se você respondeu Não autorizo no item 17, não precisa responder esta pergunta):

() SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

() NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado (a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

19. Fui também informada que o tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

20. Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

21. Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Em casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura da testemunha

Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

8.3 Dados referentes aos resultados obtidos através do estudo de SNP array

Anexo D. Resultado dos casos de MDW discriminado região de início e término da alteração cromossômica

Caso	Alteração	Região Cromossômica	Começo	Término	Caso
1	dup (x3)	14q11.2	20,213,937	20,425,051	211,114
2	dup (x3)	1q31.1	187,672,247	187,946,548	274,301
	dup (x3)	7q11.23	76,143,705	76,615,349	471,644
3	del (x1)	2p11.2	90,015,508	90,247,720	232,212
	del (x1)	5q22.2	112,674,497	112,815,689	141,192
4	del (x1)	8q12.1-q12.3	55,804,723	65,140,096	9,335,373
5	Provável Erro de Hibridação				

Anexo E. Casos de VM discriminando o local de início e término da alteração cromossômica encontrada através do SNP array.

CASO	ALTERAÇÃO	REGIÃO CROMOSSOMICA	COMEÇO	TÉRMINO
1	del (x1)	2p16.3	52,479,251	52,730,021
2	dup (x3)	1p35.2	31,095,443	31,402,148
3	SEM ALTERAÇÃO			
4	dup (x3)	8p23.2	5,981,709	6,108,423
	dup (x3)	15q26.3	100,351,154	100,593,589
5	dup (x3)	12p11.21	31,195,272	31,420,306
6	dup (x2)	Xp11.23	48,098,473	49,115,886
	dup (x2)	Xq28	152,036,631	153,886,394
7	dup (x3)	10q11.22	47,593,133	48,338,944
	dup (x2)	Xq28	152,040,308	153,886,394
8	del (x1)	2p25.3	72,184	245,257
	dup (x3)	7q11.23	76,143,705	76,637,474
9	dup (x3)	1p36.33	873,558	1,415,099
	dup (x3)	9p13.1-p12	40,294,324	42,374,011
	dup (x2)	Xp11.23	48,074,408	49,158,746
	dup (x2)	Xq28	152,652,334	153,886,394
10	del (x1)	2p16.3	52,479,251	52,730,021
	del (x1)	2q37.3	242,515,197	243,029,573
	del (x1)	4q13.1	64,360,700	64,976,578
	del (x1)	8q24.23	137,730,280	137,847,061
11	dup (x3)	5p13.1	39,562,234	39,821,317
	dup (x2)	Xp11.23	48,098,473	49,126,826
12	dup (x3)	1q43	239,606,858	239,798,412
	dup (x3)	17p11.2	21,368,364	21,729,039
	dup (x2)	Xp11.23	48,050,842	49,126,826
	dup (x2)	Xq28	152,052,151	153,886,394
13	del (x1)	11p11.12	50,332,064	51,359,210
	dup (x3)	22q11.21	18,877,787	19,008,108
14	del (x1)	8q21.3	89,685,209	89,800,500
	LOH (x2)	1q25.2-q32.1	179,245,108	206,986,926
	LOH (x2)	1q32.1-q32.3	207,005,321	214,420,735
	LOH (x2)	3p24.2-p24.1	24,191,961	30,644,215
	LOH (x2)	5q31.1-q31.3	132,735,155	141,355,948
	LOH (x2)	6p24.2-p22.3	11,217,843	21,074,193
	LOH (x2)	6q11.1-q13	63,270,405	72,518,644
	LOH (x2)	7p14.1-p12.2	43,229,414	49,841,119
	LOH (x2)	7q34-q36.1	140,415,661	150,646,655
	LOH (x2)	9q21.33-q31.1	90,125,146	102,635,520
	LOH (x2)	12q13.13-q21.1	53,354,622	72,602,045
	LOH (x2)	14q11.2-q13.3	23,866,713	37,564,413
	LOH (x2)	14q23.1-q23.3	61,346,407	65,794,692
	LOH (x2)	17q25.1-q25.3	72,949,146	77,767,625
15	dup (x2)	Xp11.23	48,115,095	49,115,886
	dup (x2)	Xq28	152,726,118	153,903,203
	LOH (x2)	Xq28	152,726,279	153,903,203
	LOH (x2)	7q11.21-q11.22	64,180,110	67,489,787
16	dup (x3)	14q32.33	106,603,101	106,829,822
17	dup (x3)	6q27	168,329,404	168,597,552
	del (x1)	15q11.2	23,667,412	23,792,773
	dup (x3)	15q13.3	32,509,892	32,833,659
18	dup (x3)	17p13.3	1,428,218	1,549,986
19	dup (x3)	7q11.23	76,759,712	77,171,954
	dup (x3)	17q21.31	44,165,803	44,295,695
	dup (x2)	Xp11.23	48,117,763	49,121,178
	dup (x2)	Xq28	152,726,704	153,888,797
	LOH (x2)	Xq28	152,729,257	153,888,797

8.4 Descrição dos casos estudados

Anexo F: Descrição dos casos de MDW submetidos ao SNP array descrevendo idade materna, paridade, idade gestacional no momento do diagnóstico, idade gestacional no momento da punção, evolução do recém-nascido e achados ultrassonográfico somados à MDW.

Caso	Idade	Diagnóstico (semanas)	Punção (semanas)	Parto (semanas)	Evolução	Outros achados
1	43	25	25	37,3	Nascido vivo. Evoluiu bem, porém olhos não acompanham objetos.	Veia cava superior persistente CIUR
2	29	28,1	28,1	36,5	Nascido vivo, realizado derivação ventrículo peritoneal.	VM associado
3	27	27	27	38	Nascido vivo, pequeno atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	ndn
4	37	25,2	25,2	38,3	Óbito com 1 mês de vida decorrente da cardiopatia.	CIV e estenose de aorta; artéria umbilical única
5	26	29,1	29,1	38	Nascido vivo, evoluindo bem.	ndn

*** ndn: nada digno de nota

*** CIV: comunicação interventricular

Anexo G. Tabela descrevendo os casos de fetos com ventriculomegalia submetidos a SNP *array* quanto a idade materna, paridade, idade gestacional no momento do diagnóstico, idade gestacional no momento da punção, medida do átrio no 3º trimestre, evolução do recém-nascido e achados ultrassonográfico somados à ventriculomegalia

Caso	Idade (anos)	Paridade (semanas)	Diagnósticos (semanas)	Punção (semanas)	Átrio (mm)	Evolução RN	USG
1	30	5G 4P	30,6	30,6	30	Nascido vivo,	Ndn
2	20	2G 1P	25	25	40	Nascido vivo,	Ndn
3	23	2G 1P	33,2	34,2	43	Nascido vivo.	Ndn
4	18	1G	28,1	28,1	70	Evoluiu para óbito com 12 dias de vida.	Cardiopatia.
5	36	3G 2	26	26	Não retornou ao serviço	Óbito no 6º dia de vida.	Ndn
6	31	2G 1P	22,3	22,3	33	Nascido vivo	Corpo caloso ausente.
7	34	2G 1P	26,8	26,8	38	Óbito com 30 dias	Cardiopatia.
8	24	1G	27,	27,7	19	Nascido vivo.	Ndn
9	28	1G	26,2	26,2	42	Nascido vivo	Ndn
10	38	3G 2P	31,8	31,8	18	Nascido vivo	Perfil plano, não habitual
11	29	1G	24,2	24,2	8,2	Nascido vivo.	Ndn
12	36	1G	25,1	25,1	45	Nascido vivo	Artéria umbilical única.
13	21	1G	21,3	21,3	29	Nascido vivo.	Ndn
14	26	2G 1P	31,4	31,4	10,5	Nascido vivo.	Fenda labial à direita e cavum do septo pelúcido alargado.
15	19	2G 1	29,7	29,7	24	Perda de segmento	Corpo caloso ausente. Polidrâmnio.
16	38	5G 4P	26,1	28,1	28	Nascido vivo.	Inicialmente era gestação gemelar.
17	36	2G 1P	30,7	30,7	10,4	Nascido vivo.	Ndn
18	25	1G	26,1	26,1	30	Nascido vivo	CIUR
19	20	1G	22,4	22,4	21	Nascido vivo.	Artéria umbilical única. Agenesia renal à esquerda.

* Ndn = nada digno de nota

* CIUR = crescimento fetal intraútero restrito

* Del = deleção

*Dup = duplicação

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- 1 Tonni G, Vito I, Palmisano M, Martins WP, Araujo Júnior E. Neurological Outcome in Fetuses with Mild and Moderate Ventriculomegaly. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2016 Sept;38(9):436-42.
- 2 Achiron R, Schimmel M, Achiron A, Mashiach S. Fetal mild idiopathic lateral ventriculomegaly: is there a correlation with fetal trisomy? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1993 Mar 1;3(2):89-92.
- 3 Zugaib M. *Medicina Fetal*. 3ª ed. Carvalho M, Amorim A, editores. São Paulo: Atheneu; 2012. 733 p.
- 4 Gaglioti P, Oberto M, Todros T. The significance of fetal ventriculomegaly: etiology, short- and long-term outcomes. *Prenatal Diagn*. 2009 Apr;29(4):381-8.
- 5 Netto GJ, Saad RD, Dysert PA 2nd. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2003 Oct;16(4):379-83.
- 6 Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010 May 14;86(5):749-64.
- 7 Kulikowski LD. *Citogenômica aplicada à prática médica*. São Paulo: Atheneu; 2013. 112 p.
- 8 Hillman SC, McMullan DJ, Williams D, Maher ER, Kilby MD. Microarray comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: a review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2012 Oct;40(4):385-91.
- 9 Langlois S, Duncan A. Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2011 Sep;33(9):955-60.
- 10 Lobenhofer EK, Bushel PR, Afshari CA, Hamadeh HK. Progress in the application of DNA microarrays. *Environmental Health Perspectives*. 2001 Sep;109(9):881-91.
- 11 Southern EM, Maskos U, Elder JK. Analyzing and comparing nucleic-acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides - evaluation using experimental-models. *Genomics*. 1992 Aug;13(4):1008-17.
- 12 Sun L, Wu Q, Jiang SW, Yan Y, Wang X, Zhang J, et al. Prenatal Diagnosis of Central Nervous System Anomalies by High-Resolution Chromosomal Microarray Analysis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:426379.
- 13 ACOG. The Use of Chromosomal Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. *Obstetrics & Gynecology*. 2013;122(6):1374-7.

- 14 Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006 Nov 23;444(7118):444-54.
- 15 Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with > 1000 cases and review of the literature. *Prenatal Diagnosis*. 2012 Apr;32(4):351-61.
- 16 Wapner RJ, Driscoll DA, Simpson JL. Integration of microarray technology into prenatal diagnosis: counselling issues generated during the NICHD clinical trial. *Prenatal Diagnosis*. 2012 Apr;32(4):396-400.
- 17 Machado IN, Heinrich JK, Barini R. Genomic imbalances detected through array CGH in fetuses with holoprosencephaly. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 2011 Feb;69(1):3-8.
- 18 Leung TY, Vogel I, Lau TK, Chong W, Hyett JA, Petersen OB, et al. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2011 Sep;38(3):314-9.
- 19 Becvářová V, Hynek M, Putzová M, Soldátová I, Horáček J, Smetanová D, et al. [Application of SNP array method in prenatal diagnosis]. *Ceska Gynekol*. 2011 Sep;76(4):261-7.
- 20 Trková M, Putzová M, Bečvářová V, Horáček J, Soldátová I, Krautová L, et al. [Implementation of arrays in first trimester prenatal diagnosis]. *Ceska Gynekol*. 2015 Jun;80(3):176-80.
- 21 Zhang Y, Fu F, Li R, Xie G, Han J, Pan M, et al. [Application of whole-genome and high-resolution chromosome microarray analysis for the investigation of fetuses with ultrasound abnormalities]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2015 Apr;32(2):169-74.
- 22 Ganesamoorthy D, Bruno DL, McGillivray G, Norris F, White SM, Adroub S, et al. Meeting the challenge of interpreting high-resolution single nucleotide polymorphism array data in prenatal diagnosis: does increased diagnostic power outweigh the dilemma of rare variants? *BJOG*. 2013 Apr;120(5):594-606.
- 23 Liao C, Li R, Fu F, Xie G, Zhang Y, Pan M, et al. Prenatal diagnosis of congenital heart defect by genome-wide high-resolution SNP array. *Prenat Diagn*. 2014 Sep;34(9):858-63.
- 24 Srebniak M, Boter M, Oudesluijs G, Joosten M, Govaerts L, Van Opstal D, et al. Application of SNP array for rapid prenatal diagnosis: implementation, genetic counselling and diagnostic flow. *Eur J Hum Genet*. 2011 Dec;19(12):1230-7.

- 25 Tang S, Lv J, Chen X, Bai L, Li H, Chen C, et al. Prenatal Diagnosis of DNA Copy Number Variations by Genomic Single-Nucleotide Polymorphism Array in Fetuses with Congenital Heart Defects. *Fetal Diagn Ther*. 2016;39(1):64-73.
- 26 D'Antonio F, Khalil A, Garel C, Pilu G, Rizzo G, Lerman-Sagie T, et al. Systematic review and meta-analysis of isolated posterior fossa malformations on prenatal ultrasound: nomenclature, diagnostic accuracy and associated anomalies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016 Jun;47(6):690-7.
- 27 Osenbach RK, Menezes AH. Diagnosis and management of the dandy-walker malformation - 30 years of experience. *Pediatric Neurosurgery*. 1992;18(4):179-89.
- 28 Klein O, Pierre-Kahn A. Focus on Dandy-Walker malformation. *Neurochirurgie*. 2006 Sep;52(4):347-56.
- 29 Cueva-Núñez JE, Lozano-Bustillo A, Irias-Álvarez MS, Vásquez-Montes RF, Varela-González DM. [Dandy-Walker variant: Case report]. *Rev Chil Pediatr*. 2016 Sep-Oct; 57(5):406-10.
- 30 Guibaud L, Larroque A, Ville D, Sanlaville D, Till M, Gaucherand P, et al. Prenatal diagnosis of 'isolated' Dandy-Walker malformation: imaging findings and prenatal counseling (vol 32, pg 185, 2012). *Prenatal Diagnosis*. 2012 Feb;32(5): 185-93.
- 31 Ferraris A, Bernardini L, Sabolic Avramovska V, Zanni G, Loddo S, Sukarova-Angelovska E, et al. Dandy-Walker malformation and Wisconsin syndrome: novel cases add further insight into the genotype-phenotype correlations of 3q23q25 deletions. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 May 16;8:75.
- 32 Liao C, Fu F, Li R, Pan M, Yang X, Yi CX, et al. [Dandy-walker syndrome and microdeletions on chromosome 7]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012 Feb;29(1):48-51.
- 33 Kirchhoff M, Bisgaard A-M, Stoeva R, Dimitrov B, Gillessen-Kaesbach G, Fryns J-P, et al. Phenotype and 244k Array-CGH Characterization of Chromosome 13q Deletions: An Update of the Phenotypic Map of 13q21.1-qter. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009 May;149A(5):894-905.
- 34 Libotte F, Bizzoco D, Gabrielli I, Tamburrino C, Hernandez C, Carpineto L, et al. A new case of interstitial 1q 25.3-32.1 deletion: cytogenetic analysis molecular characterization and ultrasound findings. *J Prenat Med*. 2015 Jan-Jun;9(1-2):8-11.
- 35 Nicolaides KH, Berry S, Snijders RJ, Thorpe-Beeston JG, Gosden C. Fetal lateral cerebral ventriculomegaly: associated malformations and chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther*. 1990;5(1):5-14.
- 36 Abumansour IS, Al Sulmi E, Chodirker BN, Hunt JC. Prenatal Diagnosis of Walker-Warburg Syndrome Using Single Nucleotide Polymorphism Array: A Clinical Experience from Three Related Palestinian Families with Congenital Hydrocephalus. *AJP Rep*. 2015 Oct;5(2):e116-20.

- 37 Meyer E, Ricketts C, Morgan NV, Morris MR, Pasha S, Tee LJ, et al. Mutations in FLVCR2 are associated with proliferative vasculopathy and hydranencephaly-hydrocephaly syndrome (Fowler syndrome). *Am J Hum Genet.* 2010 Mars;86(3):471-8.
- 38 Schumann M, Hofmann A, Krutzke SK, Hilger AC, Marsch F, Stienen D, et al. Array-based molecular karyotyping in fetuses with isolated brain malformations identifies disease-causing CNVs. *J Neurodev Disord.* 2016 Apr 15;8:11.
- 39 Hu P, Wang Y, Sun R, Cao L, Chen X, Liu C, et al. Copy number variations with isolated fetal ventriculomegaly. *Curr Mol Med.* 2017;17(2):133-139.
- 40 Vasconcelos B. Estudo da frequência de aberrações cromossômicas nos pacientes atendidos na Unidade de Genética do instituto da Criança entre 1992 e 2002. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2007.
- 41 Moeller SJ, Beebe-Wang N, Schneider KE, Konova AB, Parvaz MA, Alia-Klein N, et al. Effects of an opioid (proenkephalin) polymorphism on neural response to errors in health and cocaine use disorder. *Behav Brain Res.* 2015 Oct;293:18-26.
- 42 Campos CM, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigation of copy number variation in children with conotruncal heart defects. *Arq Bras Cardiol.* 2015 Jan;104(1):24-31.
- 43 Milunsky JM, Huang XL. Unmasking Kabuki syndrome: chromosome 8p22-8p23.1 duplication revealed by comparative genomic hybridization and BAC-FISH. *Clin Genet.* 2003 Dec;64(6):509-16.
- 44 Leffler M, Puusepp S, Žilina O, Zhu Y, Kuuse K, Bain N, et al. Two familial microduplications of 15q26.3 causing overgrowth and variable intellectual disability with normal copy number of IGF1R. *Eur J Med Genet.* 2016 Apr;59(4):257-62.
- 45 George-Abraham JK, Zimmerman SL, Hinton RB, Marino BS, Witte DP, Hopkin RJ. Tetrasomy 15q25.2→qter identified with SNP microarray in a patient with multiple anomalies including complex cardiovascular malformation. *Am J Med Genet A.* 2012 Aug;158A(8):1971-6.
- 46 Chakravarti A. A compelling genetic hypothesis for a complex disease: PRODH2/DGCR6 variation leads to schizophrenia susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 16;99(8):4755-6.
- 47 Duong LT, Hoeffding LK, Petersen KB, Knudsen CD, Thygesen JH, Klitten LL, et al. Two rare deletions upstream of the NRXN1 gene (2p16.3) affecting the non-coding mRNA AK127244 segregate with diverse psychopathological phenotypes in a family. *Eur J Med Genet.* 2015 Dec;58(12):650-3.
- 48 Imitola J, Walleigh D, Anderson CE, Jethva R, Carvalho KS, Legido A, et al. Fraternal twins with autism, severe cognitive deficit, and epilepsy: diagnostic role of chromosomal microarray analysis. *Semin Pediatr Neurol.* 2014 Jun;21(2):167-71.

- 49 Nagase T, Kikuno R, Ishikawa K, Hirosawa M, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 2000 Apr 28;7(2):143-50.
- 50 Froyen G, Bauters M, Boyle J, Van Esch H, Govaerts K, van Bokhoven H, et al. Loss of SLC38A5 and FTSJ1 at Xp11.23 in three brothers with non-syndromic mental retardation due to a microdeletion in an unstable genomic region. *Hum Genet.* 2007 Jun;121(5):539-47.
- 51 Rejeb I, Ben Jemaa L, Abaied L, Kraoua L, Saillour Y, Maazoul F, et al. A novel frame shift mutation in the PQBP1 gene identified in a Tunisian family with X-linked mental retardation. *Eur J Med Genet.* 2011 May-Jun;54(3):241-6.
- 52 Baala L, Briault S, Etchevers HC, Laumonnier F, Natiq A, Amiel J, et al. Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. *Nat Genet.* 2007 Apr;39(4):454-6.