Fabricia Andréia Rosa Madia

**Estudo da variação do número de cópias gênicas (CNVs) em
amostras *post-mortem* de malformados cardíacos congênitos
(MCCs) sindrômicos**

São Paulo

2018

Fabírcia Andréia Rosa Madia

**Estudo da variação do número de cópias gênicas (CNVs) em
amostras *post-mortem* de malformados cardíacos congênitos
(MCCs) sindrômicos**

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

Programa de Pediatria
Orientadora: Dra. Leslie Domenici Kulikowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Madia, Fabrícia Andréia Rosa

Estudo da variação do número de cópias gênicas
(CNVs) em amostras post-mortem de malformados
cardíacos congênitos (MCCs) sindrômicos / Fabrícia
Andréia Rosa Madia. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1. Cardiopatias congênitas
2. Variações do número de cópias de DNA 3. Repetições de
microsatélite 4. Biologia molecular 5. Técnicas de
sonda molecular

USP/FM/DBD-132/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Francisco (“*in memoriam*”) e Marina,
minhas inspirações e referenciais.**

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas oportunidades concedidas e, principalmente, pela força dada para persistir nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Marina e Francisco (*in memoriam*) pelos seus ensinamentos, pela batalha para que eu pudesse concluir a Graduação e todo apoio e paciência durante a Pós-Graduação.

Aos meus irmãos Francine e Fernando por todos os conselhos, torcidas e paciência.

Ao meu avô Paulo (*in memoriam*) por sua maravilhosa companhia, pelo auxílio nas tarefas escolares e por me ensinar a enxergar a beleza na simplicidade das coisas.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Leslie D. Kulikowski pela oportunidade da realização do Mestrado, acolhimento, orientação, carinho e paciência.

Aos amigos citogenômicos, Thaís Virgínia, Évelin Zanardo, Samar Nasser, Alexandre Dias, Jullian Gabriel, Marília Montenegro, Amanda Brasil, Amom Nascimento, Gil Monteiro, Yanca Gasparini, Lucas Liro e Omar Akl; e os ex-citogenômicos Roberta Dutra, Juliana Mussolini e Andreza Fonseca; por todo apoio, troca de conhecimento e risadas. Agradeço também a Fernanda Macaferri por toda ajuda e amizade.

À Dra. Regina Schultz, da Anatomia Patológica da FMUSP, pelos ensinamentos, disponibilidade das amostras e colaboração com o desenvolvimento do projeto.

Aos residentes e preceptores do curso de Residência em Anatomia Patológica da FMUSP pela coleta do material. Aos funcionários do Serviço de Verificação de Óbito e da Patologia, em especial, à Zilá, Reginaldo e Rosangela, por toda disponibilidade e auxílio.

À Dr^ª. Cintia Fridman e Dr^ª. Fernanda Toledo, do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da FMUSP, pelo auxílio na realização e interpretação dos resultados de marcadores microssatélites.

À Dr^ª. Chong Ae Kim, Dr^ª. Rachel Honjo e os preceptores e residentes do curso de Genética Médica, do Instituto da Criança - FMUSP, por todo conhecimento proporcionando durante estes anos.

À Liã Bárbara Arruda, a quem considero como madrinha científica, por ter acreditado em mim e ter me feito enxergar Cientista.

Aos meus amigos, em especial à Heidi Utsonomia, Isabel Bonatelli, Cintia Milani, Lilian Damasceno, Ana Carolina Soares, Giovana Caleiro, Ana Caroline Martins, Bárbara Brito, Beatriz Ochandio, Carolina Santa Isabel, Danilo Amaral, por todo apoio, companhia e risadas.

Aos meus amigos do LIM-56, em especial ao Eduardo, Tati Mitiko e Juliana Ruiz, que tanto torceram por mim desde a época do aprimoramento.

Ao Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes e Dr. Jorge Casseb pela rica experiência e oportunidade de integrar seus grupos de pesquisa na UFSCar e LIM-56, respectivamente.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Grandes realizações são possíveis quando se
dá importância aos pequenos começos”.*

(LaoTze)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação 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 Júlia 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.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE SIGLAS.....	iv
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Malformações cardíacas congênitas.....	2
2.1.1. O mecanismo de desenvolvimento cardíaco.....	2
2.1.2. Bases genéticas das malformações cardíacas congênitas sindrômicas.....	7
2.2. Técnicas de detecção de CNVs.....	9
2.3. Busca por marcadores relevantes.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MÉTODOS.....	14
4.1. Casuística.....	14
4.2. Critérios de inclusão.....	14
4.3. Critérios de exclusão.....	14
4.4. Coleta e processamento das amostras.....	14
4.4.1. Extração de DNA.....	15
4.4.2. Quantificação e checagem da qualidade do DNA.....	15
4.4.3. <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i> (MLPA).....	15
4.4.4. Marcador Microsatélite.....	16
4.4.5. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH).....	16

4.5. Análise estatística	17
5. RESULTADOS	18
5.1. Aneuploidias.....	32
5.1.1. Trissomia do cromossomo 21	32
5.1.2. Trissomia do cromossomo 18	35
5.1.3. Trissomia do 16.....	38
5.1.4. Trissomia do 13.....	40
5.1.5. Monossomia do X em mosaico	42
5.2. Aneusomias.....	43
5.2.1. Deleção de 4p16.....	43
5.2.2. Deleção do éxon 6 do gene <i>GATA4</i>	44
5.2.3. Duplicação de 11q25.....	46
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	54
8. ANEXOS	55
9. REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do desenvolvimento cardíaco.....	3
Figura 2 - Vias de sinalizações gênicas associadas ao desenvolvimento cardíaco.	5
Figura 3 - Diagrama de Venn demonstrando os tipos de defeitos cardíacos encontrados nos 52 casos estudados.....	19
Figura 4 - Diagrama de Venn demonstrando a os tipos de malformações extracardíacas importantes frequentemente associadas às malformações cardíacas.	20
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das amostras de DNA extraídas de tecido <i>post-mortem</i>	21
Figura 6 - <i>Circus plot</i> das sondas e marcadores alterados detectados pelas técnicas de MLPA (<i>kits</i> P036, P064, P070, P095, P0250 e P311) e marcadores microssatélites.....	23
Figura 7 - Anomalias encontradas nos 52 casos estudados.	30
Figura 8 - Gráfico representando a conexão entre as alterações cromossômicas e os cinco grupos de defeitos cardíacos.	31
Figura 9 - Casos identificados como portadores da trissomia do cromossomo 21.	32
Figura 10 - Resultados obtidos pelas técnicas de MLPA (<i>kit</i> P095) e de marcador microssatélite indicando a trissomia do cromossomo 21.....	34
Figura 11 - Casos identificados como portadores da trissomia do cromossomo 18.....	35
Figura 12 - Resultados obtidos pelas técnicas de MLPA (<i>kit</i> P070 e P095) e de marcador microssatélite indicando a trissomia do cromossomo 18.....	38
Figura 13 - Caso identificado como portador da trissomia do cromossomo 16.....	39
Figura 14 - Eletroferograma com os resultados do coração obtidos para o marcador D16S539 pela técnica microssatélite.	40
Figura 15 - Casos identificados como portadores da trissomia do cromossomo 13.....	40
Figura 16 - Resultados obtidos pela técnica de MLPA (<i>kit</i> P095) indicando a trissomia do cromossomo 18.....	41

Figura 17 – Caso identificado como portador da monossomia de X em mosaico.	42
Figura 18 - Resultados obtidos pelas técnicas de marcador microssatélite e FISH.	43
Figura 19 - Caso identificado como portador da deleção de 4p.	43
Figura 20 - Resultados obtidos pela técnica de MLPA (<i>kit</i> P064) indicando deleção das quatro sondas localizadas no cromossomo 4.	44
Figura 21 - Caso identificado como portador da deleção do éxon 6 do gene <i>GATA4</i>	45
Figura 22 - Resultados obtidos pela técnica de MLPA (<i>kit</i> P311) indicando a deleção da sonda referente ao éxon 6 do gene <i>GATA4</i>	45
Figura 23 - Caso identificado como portador da duplicação de duas sondas no cromossomo 11.	46
Figura 24 - Resultados obtidos pelas técnicas de bandamento G e MLPA.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações cromossômicas frequentemente associadas à malformações cardíacas sindrômica.....	7
Tabela 2 – Caracterização amostral dos 52 casos analisados.....	18
Tabela 3 - Quantidade de amostras e médias de concentração e pureza (razão A260/A280) das amostras frescas e conservadas em RNA later®.....	21
Tabela 4 - Viabilidade da obtenção dos resultados de amostras formalizadas e frescas de acordo com os seis tipos de <i>kits</i> utilizados.....	22
Tabela 5 - Resultados obtidos nos 52 casos estudados.....	24
Tabela 6 - Relação entre as alterações genômicas e as malformações cardíacas associadas.....	31

LISTA DE SIGLAS

AC	anomalias cromossômicas.
AD	átrio direito.
AP	artéria pulmonar.
AS	saco aórtico.
AVV	valvas atrioventriculares.
CAV	comunicação atrioventricular.
CGH	comparative genomic hybridization.
CIA	comunicação interatrial.
CIV	comunicação interventricular.
CNC	células da crista neural cardíaca.
CNVs	<i>copy number variation</i> ou variações do número de cópias.
CoA	coarctação da aorta.
CT	conotruncais.
DA	ductos arterioso.
DC	defeito de câmaras.
DGV	defeito de grandes vasos.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DP	defeito de posição.
DS	defeito de septo.
DV	defeito de válvula.
FHF	primeiro campo cardíaco.
FISH	<i>Fluorescent “in situ” hybridization.</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
LA	<i>left atrium.</i>
LCA	artéria carótida esquerda.
LSCA	artéria subclávia esquerda.
LV	ventrículo esquerdo.
MCC	malformação cardíaca congênita.
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.</i>
MM	malformações de membros.

MMETC	malformações musculoesqueléticas e do tecido conjuntivo.
MOI	malformações dos olhos.
MO	malformações de orelhas.
MP	malformações do palato.
MSD	malformações do sistema digestivo.
MSGU	malformações do sistema geniturinário.
MSN	malformações do sistema nervoso.
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man.</i>
PA	artéria pulmonar.
PCR	<i>polymerase chain reaction.</i>
RA	<i>right atrium</i>
RCA	artéria carótida direita.
RNA	ácido ribonucleico.
RPM	rotação por minuto.
<i>rsa</i>	<i>Region-Specific Assay.</i>
RSCA	artéria subclávia direita.
RV	ventrículo direito.
SHF	segundo campo cardíaco.
STR	<i>short tandem repeat.</i>
SVO	Serviço de Verificação de Óbitos.
T4F	tetralogia de Fallot.
USA	United State of America.
VD	ventrículo direito.
VE	ventrículo esquerdo.
VP	veias pulmonares.

RESUMO

Madia FAR. *Estudo da variação do número de cópias gênicas (CNVs) em amostras post-mortem de malformados cardíacos congênitos (MCCs) sindrômicos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

As malformações cardíacas congênitas (MCCs) são as malformações mais comuns ao nascimento, representando uma importante causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos. Nos últimos anos, estudos utilizando testes citogenômicos têm permitido elucidar e compreender melhor as causas das MCCs. O objetivo geral desse estudo foi investigar a presença de CNVs em amostras de tecido obtidas *post-mortem* de portadores de malformações cardíacas congênitas sindrômicas; e os objetivos específicos consistiram em avaliar a frequência das CNVs, destacando as mais relevantes, comparar a presença de CNVs nos diferentes tecidos e realizar a correlação genótipo-fenótipo. Para isso, foram estudados um total de 52 casos de natimortos e recém-nascidos provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos – FMUSP. Amostras de DNA extraídas da pele, diafragma e do coração foram avaliadas utilizando o kit AmpF ℓ STR® MiniFiler™ PCR Amplification (Life Technologies™, USA) e a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) com diferentes kits (MCR-Holland, Holanda). A técnica de FISH foi utilizada para a confirmação dos resultados obtidos em um dos casos estudados. Foram encontradas CNVs relevantes em 21 casos, incluindo trissomia do 18 (10 casos), trissomia do 21 (4 casos), trissomia do 13 (2 casos), trissomia do 16 (1 caso), monossomia do X em mosaico (1 caso), deleção de 4p16 (1 caso), duplicação de 11q25 (1 caso) e deleção do éxon 6 no *GATA4* (1 caso). A análise genômica se mostrou eficiente na investigação das bases genômicas e na caracterização das diferentes malformações em amostras *post-mortem* de portadores de MCC sindrômicas.

Descritores: cardiopatias congênitas; variações do número de cópias de DNA; repetições de microsatélite; biologia molecular; técnicas de sonda molecular.

ABSTRACT

Madia FAR. *Identification of copy number variations (CNVs) in post-mortem samples with syndromic congenital heart disease (CHD)* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Congenital heart defects (CHDs) are the most common birth defect and represent an important cause of morbidity and mortality in newborns. In recent years, studies using cytogenomic tests have enabled an improved understanding of the causes of CHD. The general objective of this study was to investigate the presence of CNVs in post-mortem tissue samples from patients with congenital syndromic cardiac malformations; and the specific objectives were to evaluate the frequency of CNVs, highlighting the most relevant ones, to compare the presence of CNVs in the different tissues and to perform the genotype-phenotype correlation. For this, a total of 52 stillbirth and newborn cases from the Death Verification Service (SVO), FMUSP were investigated. DNA samples from skin, diaphragm and heart tissues were evaluated using an AmpF ℓ STR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Life Technologies™, California, USA) and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) with different kits (MCR-Holland, Amsterdam, The Netherlands). FISH was used to confirm the results of one of the studied cases. The results showed relevant copy number variations (CNVs) in 21 cases, including trisomy 18 (10 cases), trisomy 21 (4 cases), trisomy 13 (2 cases), trisomy 16 (1 case), mosaic monosomy X (1 case), 4p16 deletion (1 case), 11q25 duplication (1 case) and deletion in exon 6 of the *GATA4* (1 case). Genomic analysis was found to efficiently identify the genomic basis of, and characterize, various malformations found in postmortem samples from syndromic CHD carriers.

Descriptors: heart defects, congenital; DNA copy number variation; microsatellite repeats; molecular biology; molecular probe techniques.

1. INTRODUÇÃO

As malformações cardíacas congênitas (MCCs) são as malformações mais comuns ao nascimento, representando uma causa importante de morbidade e mortalidade na infância (Glessner et al, 2014). No entanto, sua incidência é ainda maior em fetos, de modo que mais de 40% dos portadores de cardiopatias congênitas sofrem mortes pré-natais (Hunter; Simpson, 2014; Smith et al., 2015).

Essa doença apresenta uma etiologia multifatorial complexa, sendo em 80% dos casos sua origem desconhecida (He et al, 2011; Glessner et al, 2013). Entretanto, a aplicação das novas tecnologias genômicas de detecção das variações estruturais tem revelado que as variações no número de cópias (CNVs) possuem um papel importante na patogênese das MCC isoladas e sindrômicas (Probst et al., 2015). A *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) é um exemplo de uma dessas técnicas, a qual tem possibilitado a investigação mais detalhada das bases moleculares das malformações cardíacas resultantes de microduplicações, microdeleções e outras alterações estruturais do DNA (Azeka et al., 2014; Campos et al., 2015).

Embora a utilização de novas metodologias proporcionasse uma explosão de relatos associando a presença de CNVs específicas com o desenvolvimento das MCCs, são raras as publicações que retratam essa associação em amostras de pacientes que evoluíram a óbito antes do primeiro ano de vida.

Sendo assim, investigar as CNVs *post-mortem* relacionadas ao aparecimento de malformações cardíacas sindrômicas permitirá um conhecimento mais detalhado da patogênese dessas anormalidades e ainda poderá contribuir para identificar CNVs relevantes para o diagnóstico precoce e para respostas a tratamentos (He et al, 2011).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Malformações cardíacas congênitas

As malformações cardíacas congênitas correspondem à malformação humana mais comum, sendo responsável por quase 40% dos casos de malformações detectadas logo após o nascimento (Acharya et al., 2004). Sua prevalência mundial média é de 8:1.000 nascidos vivos, podendo variar de acordo com os países e continentes (Reller et al., 2008; van der Linde, et al., 2011). No Brasil, um estudo realizado por Amorin e cols. (2008) demonstrou uma prevalência da doença de 9,58:1.000 nascidos vivos.

Além disso, a alta incidência de malformações cardíacas maiores, ou seja, malformações que resultam em graves defeitos anatômicos, funcionais ou estéticos, fazem com que a MCC seja uma das principais causas de morte neonatal (Tennant et al., 2010; Mendes et al., 2015). Estima-se que aproximadamente 25% das crianças com malformações cardíacas não sobrevivam ao primeiro ano de vida (Gilboa et al., 2006; Pierpont et al., 2007).

Segundo Fahed e cols. (2013) as malformações cardíacas congênitas consistem em um conjunto de alterações estruturais e funcionais que surgem durante o processo de embriogênese cardíaca. A embriogênese cardíaca e as alterações resultantes nesse processo são descritas brevemente no tópico a seguir.

2.1.1. O mecanismo de desenvolvimento cardíaco

O coração é o primeiro órgão a ser formado, sendo seu desenvolvimento iniciado entre a metade da terceira semana de gestação e finalizado na sétima semana. Devido à complexidade da embriogênese cardíaca, este processo foi didaticamente dividido em quatro etapas (Figura 1).

Figura 1 - Etapas do desenvolvimento cardíaco.

Legenda: A. estabelecimento da área cardiogênica, B. formação do tubo primitivo cardíaco, C. “looping” cardíaco e D. morfogênese valvuloseptal. FHF - primeiro campo cardíaco, SHF - segundo campo cardíaco, CNC - células da crista neural cardíaca, V - ventrículo, A- átrio, RA- átrio direito, LA - átrio esquerdo, CT - conotruncais, RV - ventrículo direito, LV - ventrículo esquerdo, AVV - valvas atrioventriculares, AS - saco aórtico, III, IV e VI artérias do arco aórtico, Ao - Aorta, PA - artéria pulmonar, RSCA - artéria subclávia direita, LSCA - artéria subclávia esquerda, RCA - artéria carótida direita, LCA - artéria carótida esquerda, DA - ductos arterioso.

Fonte: (Srivastava, 2006).

Cada uma dessas fases embriológicas é caracterizada por modificações morfológicas orquestradas por sinalizações moleculares, as quais são descritas brevemente abaixo:

- ***Estabelecimento da área cardiogênica***

Na gastrulação, durante o 18º dia de desenvolvimento, a troca de nutrientes e de gases por difusão é insuficiente para manter o desenvolvimento rápido do embrião. Nesse período o endoderma secreta várias moléculas sinalizadoras, incluindo a molécula Bmp2, a qual estimula a expressão do gene *NKX2.5* nos progenitores cardíacos de origem mesodérmica e epiblastica. Logo após, a migração dessas células da linha primitiva para a região dorso cefálica é regulada por *Mesp1*, *Mesp2*, *Mef2c*, miosina ventricular, *Hand1*, *GATA4*, *GATA5* e *Wnt*. Essa primeira população de cardioblastos recebe o nome de primeiro campo cardiogênico. Um segundo campo cardiogênico é formado mediante as células precursoras, recrutadas do mesoderma, cuja proliferação é mediada pelas moléculas *Shh*, *Wnts* canônicos, *Pdgf*, ácido retinóico, receptores de ácido retinóico, *Mefc2*, *Msx1*, *Msx2*, *Hand2*, *TBX18*, *Shox2*, *Foxa2* e

Foxc2. Os cardioblastos de ambos os campos são diferenciados em cardiomiócitos por meio da expressão de fatores de *GATA* e *Mef2*, formando uma estrutura em forma de arco denominada de área cardiogênica (Srivastava; Olson, 2000; Pompa; Epstein, 2012; Satpathy; Mishra, 2015; Schoenwolf et al, 2016).

- ***Formação do tubo primitivo cardíaco***

Na quarta semana de gestação é iniciada uma cascata de sinalização molecular, a qual promove o dobramento cefálico e lateral do embrião. Durante este processo, os cardiomiócitos localizados no primeiro campo cardíaco expressam o gene *GATA4*, ocasionando a fusão de seus dois braços na linha mediana e originando o tubo primitivo cardíaco. Simultaneamente a este processo, ocorre o desenvolvimento dos tubos endocárdicos no interior de cada braço e a adição de células do segundo campo cardíaco às extremidades cefálicas e inferior do tubo primitivo (Culley; Black, 2012; Schoenwolf et al., 2016). Segundo Pompa e Epstein (2012), a diferenciação dos cardiomiócitos em células endocárdicas primitivas constituintes do tubo endocárdico ocorre devido à expressão dos genes *JAG1*, *DII4* e *NIICD*. A especificação endocardial é ocasionada pela ativação da sinalização de *NOTCH*, de modo que os genes *DII4*, *NIICD*, *NOTCH2* e *NOTCH4* passam a ser expressos no endocárdio e o gene *JAG1* expresso no miocárdio (Srivastava, 2006). Ao final deste período, o tubo primitivo assume um aspecto de “Y” invertido, bilateralmente simétrico, revestido internamente pelo endocárdio e externamente pelo miocárdio; sendo iniciado o bombeamento sanguíneo (Moorman et al., 2003; Srivastava, 2006).

- ***“Lopping” ou dobramento do tubo cardíaco***

Fatores de transcrição de *Pitx2*, regulados por *TBX1*, são expressos de forma irregular no tubo linear primitivo induzindo a proliferação celular desproporcional e resultando em seu dobramento à direita (Culley; Black, 2012). Em conjunto com a transcrição de *Pitx2*, cascatas de sinais distintas acontecem em regiões específicas do tubo primitivo possibilitando o desenvolvimento das diferentes estruturas e a remodelação cardíaca (Figura 2). Nesse momento, a maioria das células do segundo campo cardíaco será diferenciada no fluxo de saída - que compreende o trato de fluxo, arco aórtico, ducto arterioso e artéria pulmonar - e no ventrículo direito. Já a porção tubular das células do primeiro campo cardíaco irão se transformar no ventrículo

diferenciam em tecido conjuntivo, formando protuberâncias preenchidas com mesênquima e cristais, denominada de coxins. Assim, os coxins endocárdicos se estendem em lados opostos da abertura atrioventricular e promovem a formação de uma coluna que separa o átrio dos ventrículos (Srivastava, 2006; Schoenwolf et al, 2016). Feito isso, células mesenquimatosas presentes nos coxins se proliferam e se diferenciam em tecido fibroso nas regiões interatriais, interventriculares e atrioventriculares, resultando, respectivamente, na septação cardíaca e na formação de válvulas. Provavelmente, ambos os processos de septação estão relacionados com a expressão dos genes *TBX5*, de modo que na septação interatrial também é necessária a expressão de *NKX2.5*. Já os processos de formação das válvulas dependem da expressão de *NF-ATc*, *Smad6*, *TGF-β*, *NOTCH*, *Bmp2* e *TBX2* (Srivastava, 2006). Nesse mesmo período ocorre a formação das trabéculas miocárdicas de ambos os ventrículos, induzidos por *Egf*, *ErbB2* e *EnbB3*. Enquanto isso, o coração passa por uma fase de remodelação, alinhando corretamente os átrios com ventrículos e ambos com seus respectivos vasos de saída (Schoenwolf et al, 2016).

De acordo com o mecanismo de alteração do tecido cardíaco, Clark (1996) propôs a classificação das cardiopatias congênitas da seguinte forma: 1. defeito de migração do tecido ectomesenquimal ou da crista neural; 2. defeito do fluxo sanguíneo intracardíaco; 3. defeito da morte celular; 4. defeito da matriz extracelular; 5. defeito de crescimento do tecido alvo; e 6. defeito de dobramento e posição (Keane et al., 2006).

A maioria dos cardiopatas congênitos (75%) apresenta apenas a cardiopatia, ou seja, a forma isolada da doença, podendo esta ser caracterizada por uma ou mais alterações cardíacas. Embora a frequência da forma sindrômica seja de apenas 25%, a associação dos defeitos cardíacos com as alterações extracardíacas fazem com que essa forma da doença apresente uma alta relevância em Saúde Pública (Geng et al, 2014; Landis; Ware, 2016).

O surgimento das cardiopatias congênitas, tanto sindrômicas como isoladas, pode ser ocasionada por fatores ambientais, genéticos ou mistos. Entretanto, mais de 80% das causas das MCC permanecem não compreendidas (Glessner et al., 2014).

Desta forma, as técnicas genômicas têm atuado como uma ferramenta crucial na descoberta de muitas alterações na molécula de DNA e para a compreensão da patogênese de muitos defeitos cardíacos congênitos.

2.1.2. Bases genéticas das malformações cardíacas congênitas sindrômicas

Já é conhecido que alterações no DNA podem gerar um desequilíbrio genômico, resultando em uma desregulação entre a complexa embriologia do desenvolvimento cardíaco e a interação de reguladores de cromatina, fatores de transcrição e as sinalizações moleculares específicas, afetando assim as regiões dosagem-sensível (Azamian; Lalani, 2016).

As anomalias cromossômicas, como as aneuploidias completas ou parciais, alterações cromossômicas estruturais e mutações de ponto são causas comuns de malformação cardíaca sindrômica (van Karnebeek; Hennekam, 1999; Goldmuntz et al., 2001; Yang et al., 2012; Chung; Rajakumar, 2016). Embora existam regiões críticas para o desenvolvimento dessa alteração, atualmente já é reconhecido que todos os cromossomos humanos, autossômicos e sexuais, estão relacionados ao desenvolvimento de defeitos cardíacos (Kasparis; Loffeld, 2013; Chen et al, 2014; Bose et al., 2015; Lei et al, 2015; Tang et al, 2015; Chaix et al, 2016; Chung; Rajakumar, 2016; Dordoni et al, 2016; Eggert et al, 2016; Pavone et al, 2016; Peng et al. 2017). Além disso, segundo o catálogo *online* de genes humanos e das alterações genéticas OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) existem mais de 1.300 síndromes genéticas com envolvimento cardíaco.

Na tabela abaixo estão representadas algumas das alterações cromossômicas mais comumente associadas às cardiopatias congênitas do tipo sindrômica (Probst et al, 2015; Azamian; Lalani, 2016; Chung; Rajakumar, 2016; Diogenes et al, 2017).

Tabela 1 - Alterações cromossômicas frequentemente associadas à malformações cardíacas sindrômica (Continua).

Categoria	Alteração	Frequência das MCCs (%)	Tipo de defeito cardíaco	Alterações extracardíacas associadas
Aneuploidia	Trissomia do 21 (Síndrome de Down)	40 - 60	Defeito de septo ventricular, coarctação da aorta, defeito de septo atrial, defeito de septo atrioventricular, estenose pulmonar valvar, anel vascular e defeito de ventrículo único.	Dismorfismos faciais, hipotonia, atraso intelectual, atresia duodenal e hipotiriodismo.

Tabela 1 - Alterações cromossômicas frequentemente associadas à malformações cardíacas sindrômica (Continuação).

Categoria	Alteração	Frequência das MCCs (%)	Tipo de defeito cardíaco	Alterações extracardíacas associadas
Aneuploidia	Trissomia do 18 (Síndrome de Edwards)	80 - 100	Doença polivalvular, saída dupla do ventrículo esquerdo, defeito de septo ventricular, lesão do lado esquerdo, ducto arterioso patente e defeito de conxins.	Atraso do crescimento e intelectual, pés com calcâneo proeminente, alterações no formato do crânio, onfalocele, sobreposição do 2º e 5º dedos.
	Trissomia do 13 (Síndrome de Patau)	80	Defeito de septo atrial, ducto arterioso patente, defeito de septo ventricular, tetralogia de Fallot, saída dupla do ventrículo esquerdo, coarctação da aorta e defeito de alinhamento.	Dismorfismos faciais, microftalmia, atraso intelectual grave, palato ou lábio fendidos.
	Monossomia do X (Síndrome de Turner)	30 - 32	Hipoplasia do coração esquerdo, valva aórtica bicúspide, coarctação da aorta e prolapso de válvula mitral.	Baixa estatura, ovários em fita, amenorréia e pescoço alado.
Aneussomia	Deleção de 1p36	70	Defeito de septo, coarctação da aorta, cardiomiopatia, tetralogia de Fallot e ducto arterioso patente.	Dismorfismos faciais, convulsões, alterações cerebrais, perda da audição e atraso intelectual.
	Deleção de 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren)	75	Estenose aórtica supravalvar,estenose arterial múltiplas e estenose pulmonar periférica.	Hiperacusia, comportamento afável e dismorfismos faciais.
	Deleção de 8p23.1	70	Defeito de septo atrial, estenose pulmonar valvar, defeito de septo atrioventricular e tetralogia de Fallot.	Hérnia diafragmática congênita.
	Deleção de 9q34 (Síndrome de Kleeftstra)	40	Estenose pulmonar valvar, valva aórtica bicúspide, defeito de septo e ducto arterioso patente.	Sinófrisis, braquicefalia, epilepsia, hipotonia, atraso intelectual e alterações comportamentais.

Tabela 1 – Alterações cromossômicas frequentemente associadas à malformações cardíacas sindrômica (Conclusão).

Categoria	Alteração	Frequência das MCCs (%)	Tipo de defeito cardíaco	Alterações extracardíacas associadas
Aneussomia	Deletion17q21.31	39	Estenose pulmonar valvar, valva aórtica bicúspide, defeito de septo e ducto arterioso patente.	Dismorfismos faciais, atraso intelectual.
	Deleção de 22q11.2 (Síndrome de DiGeorge)	75 - 100	Anomalias do arco aórtico, defeito de septo ventricular e tetralogia de Fallot.	Hipoplasia de timo ou paratireóide, dismorfismos e imunodeficiência.
Mutações de ponto	Mutações de <i>JAG1</i> e <i>NOTCH</i> (Síndrome de Alagille1)	90	Hipoplasia pulmonar periférica, estenose pulmonar e tetralogia de Fallot.	Dismorfismos faciais, hepatopatia crônica, surdez e efeito embriotóxico tardio.

Estudos recentes têm demonstrado que mutações *de novo* raras e variações do número de cópias (do inglês “*copy number variations*” – CNVs) herdadas ocorrem em cerca de 5 a 10 % dos probandos com malformações cardíacas do tipo sindrômica, as quais são classificadas de acordo com a variedade da origem da alteração (Warbuton et al, 2014).

Segundo Connolly e cols. (2014), as CNVs consistem em deleções e duplicações do genoma cujo comprimento pode variar entre ~ 50 pb a muitos megabases. No entanto, a análise das CNVs só se tornou possível após a introdução dos métodos citogenômicos como a MLPA (Shouten et al., 2002).

2.2. Técnicas de detecção de CNVs

2.2.1. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

A técnica de MLPA é um método de triagem genômica comparativo, o qual possibilita a investigação de até 45 regiões diferentes do DNA em uma única reação. Para isso, sondas complementares a região de interesse, que podem compreender regiões exônicas e intrônicas, ligam-se a região-alvo e são amplificadas por PCR. De acordo com a comparação do número de produto obtido pós - amplificação entre o

controle normal e o paciente é possível determinar se houve perda ou ganho do segmento gênico estudado (Shouten et al., 2002). Embora seja um método de “*screening*” diagnóstico de alta sensibilidade, rápido e de baixo custo quando comparado à FISH e CGH-array, esse possui algumas desvantagens. Uma delas consiste na delimitação da região estudada, ou seja, só é possível analisar as regiões envolvidas na construção da sonda, o que equivale a um percentual muito pequeno do genoma (Vorstman et al., 2006; Willis et al, 2012). Deste modo é necessário ter uma hipótese diagnóstica bem estabelecida para a realização da técnica. Atualmente, são comercializados pela empresa MCR Holland mais de 300 *kits* de MLPA, sendo dois destes específicos para malformações cardíacas congênitas (MCR Holland, 2014).

2.2.2. Marcadores Microssatélites

Outro método que pode ser empregado no estudo de CNVs é a PCR de marcador microssatélite ou “*short tandem repeat*” (STR). Os marcadores microssatélites são constituídos por 2 a 6 nucleotídeos, os quais se repetem em tandem, podendo ser encontrados em todo genoma (Ellegren, 2004). Cada um dos dois alelos tem um número específico de repetições, sendo este número herdado de seus genitores. Assim, este método é amplamente utilizado na identificação de pessoas e em testes de paternidade. No entanto, esta técnica também possibilita a identificação de trissomias e triploidias cromossômicas (Mansuet-Lupo et al, 2008).

2.2.3. Fluorescence in-situ hybridization (FISH)

A técnica de FISH baseia-se na ligação de uma sonda fluorescente complementar a região de interesse. O tamanho da sonda utilizada na técnica pode variar desde um pequeno segmento cromossômico até o cromossomo inteiro. Para uma amostra sem alteração é esperado a emissão de dois sinais fluorescentes, sendo um de cada cromossomo. Essa técnica pode ser empregada na determinação de trissomias, monossomias, inversões, mosaicismo e CNVs. Diferentemente dos métodos citados acima, a FISH também possibilita a identificação da localização exata da alteração (Chen et al., 2017; Ratan et al, 2017).

2.2.4. Outras técnicas de triagem do genoma completo

Outras técnicas também muito utilizadas para a realização do *screening* de CNVs no genoma são o array e o Exoma (Harel; Lupski, 2017; Kadalayil et al., 2014). A técnica de array consiste na hibridação por complementariedade do DNA e permite a identificação de alterações genéticas ao longo de todo genoma de um paciente com um alto nível de resolução (cerca de 0,7 kb) dependendo da plataforma, tipos de sondas e como elas são distribuídas no genoma, enquanto que o Exoma consiste primeiramente na seleção ou captura das regiões correspondentes aos éxons de todos os genes e posterior leitura e identificação (sequenciamento) de todos os nucleotídeos presentes nestas regiões (Harel; Lupski, 2017; Carter, 2007).

2.3. Busca por marcadores relevantes

Tendo em vista a alta taxa de mortalidade e morbidade de portadores de malformações cardíacas congênitas sindrômica e o pouco conhecimento da patogênese dessas doenças, é importante o emprego de métodos citogenômicas na tentativa de localizar biomarcadores relevantes.

Embora muitos estudos correlacionem a MCC sindrômicas com as CNVs, são raríssimos os trabalhos que caracterizam essa associação em amostras obtidas *post-mortem* ou mesmo que façam essa análise comparando tecidos de origem embrionária diferentes.

Essa comparação é de grande valia tendo em vista que no estudo de alterações genômicas em malformações congênitas realizado anteriormente por nosso grupo foi detectada a presença de mosaicismos intertecidual.

Concomitantemente, a compreensão da patogênese da MCC sindrômica é crucial para o atendimento clínico das famílias envolvidas bem como para o planejamento de políticas públicas da saúde, sendo de igual relevância a obtenção de subsídios que permitam a futura prevenção do nascimento de crianças com malformações cardíacas.

Assim, o aprimoramento da utilização de técnicas citogenômicas pode auxiliar diretamente na detecção precoce dessas anormalidades podendo melhorar o

reconhecimento clínico, a condução do tratamento, bem como, o controle e a vigilância das cardiopatias congênitas.

Dessa forma, este trabalho verificou a presença de alterações do DNA utilizando uma combinação das técnicas, cito: MLPA, genotipagem de marcadores por microssatélite e FISH, em dois tecidos do mesmo indivíduo, na busca de uma conclusão diagnóstica *post-mortem*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Investigar a presença de CNVs em amostras de tecido obtidas *post-mortem* de portadores de malformações cardíacas congênitas sindrômicas utilizando MLPA, genotipagem de marcadores microssatélite e FISH.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a frequência das CNVs encontradas.
- Destacar as CNVs mais relevantes.
- Realizar a correlação genótipo-fenótipo.
- Comparar a presença de CNVs em diferentes tecidos *post-mortem*.

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

Para este estudo foram utilizadas amostras de pele, coração e diafragma de 52 casos de malformados cardíacos congênitos sindrômicos, os quais foram a óbito no Complexo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo nos anos de 2015 e 2016. Embora o projeto inicial previsse a coleta apenas de pele e coração, amostras de diafragma foram coletadas devido ao não armazenamento de amostra de pele. Estas foram obtidas pela do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este projeto é um estudo prospectivo, o qual foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa e Ética (nº 1211/01/2015) da FMUSP (Apêndice A).

4.2. Critérios de inclusão

Foram incluídos no projeto casos *post-mortem* de pacientes que apresentaram malformações cardíacas congênitas associadas a outras alterações extracardíacas, de ambos os sexos e que sofreram óbito precoce (intra-útero até 2 anos de vida).

4.3. Critérios de exclusão

Casos *post-mortem* de malformados cardíacos congênitos isolados, de filhos de casais consanguíneos, portadores de triploidias e cuja coleta tenha sido realizada de forma inadequada foram excluídos do projeto.

4.4. Coleta e processamento das amostras

As amostras de tecido fresco e formolizado foram coletadas, respectivamente, durante a autópsia e a dissecação e armazenadas em microtubos de 1,5 mL, previamente identificados, contendo RNA *later*® (Ambion, Califórnia, USA). Logo após a coleta, as amostras foram colocadas a -20°C, onde permaneceram até a sua utilização.

4.4.1. Extração de DNA

Um pequeno fragmento do tecido estudado foi retirado e fragmentado mecanicamente para promover a disjunção celular. Concluído esse processo, foi realizada a extração de DNA utilizando o kit de coluna DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN®, Valencia, Califórnia) de acordo com a instrução do fabricante.

Cabe ressaltar que para as amostras conservadas em formol foi adicionado entre os processos de fragmentação mecânica e extração de DNA uma etapa de lavagem para garantir a retirada total do formoldeído (10%). Essa etapa consistia na adição de 1 mL de etanol absoluto no material fragmentado, seguida por uma centrifugação a 13.000 RPM por 3 min, a qual foi realizada duas vezes consecutivas.

4.4.2. Quantificação e checagem da qualidade do DNA

Uma das desvantagens da utilização de amostras *post-mortem* consiste na degradação sofrida pelo DNA devido ao processo de autólise. Além disso, já é bem caracterizado na literatura que o uso de formoldeído tamponado a 10% é responsável pela degradação de ácidos nucleicos.

Desta forma, para a mensuração da concentração e qualidade do DNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue (GE®, EUA), sendo a qualidade da amostra considerada boa quando os valores da razão de pureza (A260/A280) obtidos eram próximos a 1,8. A confirmação da pureza e, também, a verificação da integridade do produto da extração foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de agarose (1,5%).

4.4.3. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

De acordo com a hipótese diagnóstica, foram utilizados os seguintes *kits* comerciais: P095 para a detecção das principais síndromes de aneuploidias; P064 para a detecção das principais síndromes de microdeleção e microduplicação genômica; P036 e P070 para a detecção de alterações subteloméricas; P250 para suspeita da síndrome de deleção de 22q11 e P311 para a detecção de CNVs em genes associados a cardiopatias congênitas (Anexo A).

As reações de MLPA foram realizadas de acordo com o tecido e conservante utilizado, segundo as orientações do fabricante (MCR-Holland, Amsterdam, Holanda).

Além das amostras dos pacientes, foram adicionadas em cada reação pelo menos três amostras controle negativo, ou seja, sabidamente sem alteração nas regiões estudadas. Os tamanhos dos produtos amplificados foram capturados por meio do sequenciador automático ABI 3500 (ThermoFisherScientific, USA), pertencente à Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMIUM) do parque de equipamentos do HC-FMUSP.

A análise dos resultados obtidos foi realizada por meio do *software* GeneMarker® - versão 1.95 (Softgenetics, LLC, StateCollege, PA).

4.4.4. Marcador Microsatélite

As amostras com suspeita de aneuploidias envolvendo os cromossomos sexuais e os cromossomos autossomos 2, 4, 5, 7, 13, 16, 18 e 21 tiveram seu DNA submetido à técnica de genotipagem de marcadores microsatélites. Para essa técnica, foi utilizado o *kit* comercial AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification *kit* (ThermoFisherScientific, USA), o qual é constituído por nove marcadores do tipo “*short tandem repeat*” (STR) (Amelogenin, CSF1PO, FGA, D2S1338, D7S820, D13S317, D16S539, D18S51e D21S11)(Anexo B).

A amplificação dessas regiões foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os tamanhos dos diferentes produtos da amplificação foram capturados pelo sequenciador automático ABI 3130 (ThermoFisherScientific, USA), pertencente ao Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o *software* GeneMapper™ ID - versão 3.2 (ThermoFisherScientific, EUA).

4.4.5. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

A técnica de FISH foi empregada em nosso estudo para a confirmação de um dos resultados obtidos pela técnica genotipagem de marcador microsatélite. Para isso, foi utilizada a sonda Chromosome X Alpha and Y Alpha Satellite Probes (Cytocell Aquarius, Reino Unido), segundo as instruções do fabricante. A análise foi realizada utilizando o microscópio de epi-fluorescência AxioImager.A2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA), sendo a captura das imagens realizadas pelo *software* Isis.

Os resultados obtidos pelas três técnicas foram interpretados com o auxílio do catálogo *online* de genes humanos e das alterações genéticas OMIM e dos bancos de dados Ensembl e Genome Browser.

4.5. Análise estatística

Para a caracterização dos casos e amostras utilizadas nesse estudo foram realizados os cálculos de frequência absoluta, frequência relativa, média e desvio padrão.

5. RESULTADOS

Ao longo desse projeto foram analisadas amostras *post-mortem* de tecidos cardíaco, diafragma e pele de 52 portadores de malformações cardíacas congênitas sindrômicas. A maioria das amostras era proveniente de recém-nascidos (61,5%), do sexo masculino e com idade média de 31,43 dias e desvio padrão de 68,9 (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização amostral dos 52 casos analisados.

Característica	Quantidade
Total de casos viáveis	52
Nº de natimortos	9
Nº de nascido vivos	
<i>Recém-nascidos</i>	32
<i>> 28 dias</i>	11
Idade média do óbito (dias)	31,43
<i>Desvio Padrão</i>	68,9
Gênero	
<i>Masculino</i>	27
<i>Feminino</i>	25

Ao analisar as malformações cardíacas presentes em todos os casos estudados, foi possível observar um predomínio das malformações de septo (31 casos), seguidos pelos casos de defeitos de grandes vasos e defeitos de câmaras (28 casos cada), defeitos de valva (21 casos), defeitos de posição (2 casos) e outros (2 casos). Na maioria dos casos analisados esses defeitos eram apresentados em conjunto, sendo os mais comuns a associação de defeitos de septo com o defeito de câmaras e grandes vasos (6 casos) e defeitos de válvula, grandes vasos e câmaras (6 casos) (Figura 3).

palato, sistema digestivo e de orelhas (3 casos cada); e malformação dos olhos (1 caso). Durante este processo, foi notado que a maioria dos casos apresentava duas ou mais malformações em conjunto com as alterações cardíacas, sendo a mais comum a alteração cardíacas associadas às anomalias cromossômicas e malformações musculoesqueléticas e de tecido conjuntivo (3 casos) (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama de Venn demonstrando a os tipos de malformações extracardíacas importantes frequentemente associadas às malformações cardíacas.

Legenda: AC - anomalias cromossômicas; MSN - malformações do sistema nervoso; MMEC - malformações musculoesqueléticas e do tecido conjuntivo; MM - malformações de membros; MSGU - malformações do sistema geniturinário; MP - malformações do palato; MSD – malformações do sistema digestivo; MO – malformações de orelhas; MOI - malformação dos olhos.

Quanto às amostras utilizadas nesse estudo, grande parte delas foi obtida a fresco (67,7%), o que é uma grande vantagem tendo em vista que formoldeído tamponado (10%) é caracterizado por degradar ácidos nucleicos. No entanto, quando comparados os valores de concentração e pureza do DNA obtidos na extração foi observado que a concentração média das amostras formolizadas era o dobro que a das amostras frescas. Além disso, as amostras formolizadas apresentaram valores médios de pureza do DNA, medidos pela razão A260/A280, mais próximo ao valor considerado ideal de 1,8 (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantidade de amostras e médias de concentração e pureza (razão A260/A280) das amostras frescas e conservadas em RNA later®.

Tipo de conservante	Nº de amostras coletadas	[] de DNA (ng/µL)		Razão A260/A280	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Frescas	67	561,4	307,4	1,928	0,149
Formolizadas	33	1.158,00	569,3	1,89	0,049

Já os resultados da eletroforese em gel de agarose (1,5%) revelaram existir na maioria das amostras formolizadas uma grande quantidade de DNA com um baixo peso molecular, ou seja, um material altamente degradado. No entanto, amostras frescas obtidas de pacientes nascidos vivos apresentaram, além de DNA degradado, uma banda de DNA de alto peso molecular, indicando a presença da molécula íntegra. Além disso, fatores como o tempo de espera para a realização da autópsia, tipo de tecido investigado e o período entre a constatação do óbito fetal e a realização do parto foram determinantes na qualidade do DNA obtido após o processo extração. Amostras de pele, por exemplo, apresentaram DNA com maior integridade quando comparadas as amostras de coração (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) das amostras de DNA extraídas de tecido *post-mortem*.

Legenda: P - amostra padrão de DNA extraída de sangue periférico; 1 e 4 - amostra de DNA de pele armazenada em formol, 2 e 5 - amostra de DNA de coração armazenada em formol, 3 e 6 - amostra de DNA de pele coletada a fresco e 7 - amostra de coração coletada a fresco.

Uma maior susceptibilidade à degradação do DNA em amostras cardíacas também foi evidenciada após a realização das técnicas de MLPA, sendo para 6 amostras de coração fresco impossíveis de analisar os resultados obtidos. Essas amostras

pertencentes aos casos 114, 129, 137, 144, 145 e 154 foram excluídas do projeto. Uma amostra de pele formolizada, a C163p, também foi excluída pelo mesmo motivo.

Devido a MLPA ser uma técnica bastante sensível, principalmente no que diz respeito à qualidade do DNA, foi calculada a sua taxa de sucesso, ou seja, a quantidade de amostras que apresentaram resultados viáveis de serem analisados de acordo com o tipo de conservante e *kit* utilizado. Embora a degradação do DNA sofrida nas amostras formolizadas, foi demonstrado que a maioria delas ($\geq 54\%$) tiveram seus resultados possíveis de serem interpretados. Quanto aos resultados de viabilidade nas amostras frescas, foi observado que esta apresentou maior variação (53% a 82%) quando comparada à amostra formolizada. Apesar do *kit* P095 ser o de mais fácil interpretação devido ao grande número de sondas por região, o *kit* P311 foi o que conseguiu responder a maioria dos casos investigados (82%)(Tabela 4).

Tabela 4 - Viabilidade da obtenção dos resultados de amostras formalizadas e frescas de acordo com os seis tipos de *kits* utilizados.

Tipo de conservante	Resultados	Quantidade de amostras analisadas/ <i>kits</i> de MLPA					
		P036-E2	P070-B2	P064-C1	P095-A3	P250-B2	P311-B1
Formol	Viáveis	6 54%	8 67%	13 54%	11 58%	2 67%	14 54%
	Inviáveis	5 46%	4 33%	11 46%	8 42%	1 33%	12 46%
	<i>Total</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>14</i>	<i>19</i>	<i>3</i>	<i>26</i>
Fresca	Viáveis	9 64%	8 57%	27 53%	51 76%	3 60%	55 82%
	Inviáveis	5 36%	6 43%	24 47%	16 24%	2 40%	12 18%
	<i>Total</i>	<i>14</i>	<i>16</i>	<i>51</i>	<i>67</i>	<i>5</i>	<i>67</i>

Quando analisada a taxa de viabilidade dos marcadores microssatélite foi observado que das 31 amostras testadas apenas três amostras (9,67%), C153 pele, C156 pele e C156 coração, apresentaram resultados inconclusivos.

Após análise dos resultados obtidos para os seis *kits* de MLPA e para os marcadores microssatélites, foi observado que dos 52 casos estudados, 21 apresentaram variações no número de cópias de seus marcadores ou sondas. Essas alterações consistiam em duplicações das sondas e/ou trialelias nos cromossomos 11, 13, 16, 18 e 21; e deleções nos cromossomos 4 e 8 (Figura 6). Além disso, também foram identificados dois alelos do cromossomo X e um alelo do cromossomo Y em amostra de paciente diagnosticado citogeneticamente como portador da Síndrome de Turner.

Figura 6 - *Circus plot* das sondas e marcadores alterados detectados pelas técnicas de MLPA (*kits* P036, P064, P070, P095, P0250 e P311) e marcadores microssatélites.

Legenda: O círculo mais externo consiste do ideograma são destacados os 7 cromossomos autossomos e o cromossomos sexuais X e Y que apresentaram CNVs. Na parte interna do circus são observados os nomes e as posições das sondas patogênicas e marcadores alterados, sendo as duplicações representadas em azul e as deleções em .

A presença de duplicações de todo o conjunto de sondas pertencentes ao mesmo cromossomo e a trialelia de marcadores são indicativos de trissomias, da mesma forma que a deleção de um conjunto de sondas do mesmo cromossomo e a presença de um único alelo são interpretados como monossomias. Sabendo-se disso, foram representados na tabela abaixo os resultados encontrados nas amostras dos 52 casos estudados.

Tabela 5 - Resultados obtidos nos 52 casos estudados (Continua).

Caso	Gênero	Tipo de malformação importante associada*	Cariótipo	Conservante	Tecido	Técnica	Resultado
100	M	MCC	46,XY	Formol	Diafragma Coração	Minifiler e MLPA (P095-A3) MLPA (P036 - E2, P064-C1, P070-B2, P311 - B1).	Sem alterações Sem alterações
102	F	MCC + AC	47,XX,+18	Formol	Diafragma Coração	MiniFiler MiniFiler	rsa(D18S51)x3 rsa(D18S51)x3
103	F	MCC	NR	Formol	Pele Coração	Minifiler MiniFiler e MLPA (P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
104	F	MCC + MMETC+ AC	45,X	Formol	Pele	MLPA (P311-B1) MiniFiler	Sem alterações rsa(X)x2,(Y)x1
107	M	MCC + MM + MSD	NI	Formol	Coração	MiniFiler	mos 45,X/46,XY,ish X(DXZ1x1,DYZ3x0)/ X(DXZ1x1,DYZ3x1), Sem alterações
108	F	MCC	NR	Formol	Pele Coração	Minifiler e MLPA (P036-E2, P064-C1) Minifiler e MLPA (P064-C1)	Sem alterações Sem alterações
109	M	MCC + MSGU + MSN + MM + AC	47,XY,+13	Fresca	Pele	MLPA (P095-A3) MLPA (P311-B1) MLPA (P311-B1)	rsa(13)x3 Sem alterações Sem alterações
110	M	MCC + MM	NR	Formol	Pele Coração	MiniFiler e MLPA (P064-C1) MiniFiler e MLPA (P064-C1)	Sem alterações Sem alterações
112	M	MCC + MO + MM + AC	47,XY,+21	Fresca	Pele	MLPA (P095-A3) MLPA (P311-B1) MiniFiler MLPA (P311-B1)	rsa(21)x3 Sem alterações rsa(D21S11)x3 Sem alterações
113	F	MCC + MO + MOI + MSN	46,XX	Formol	Pele Coração	MiniFiler e MLPA (P311-B1) MiniFiler	Sem alterações Sem alterações
114	M	MCC + MSN	NI	Fresca	Pele	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1)	Sem alterações

Tabela 5 – Resultados obtidos nos 52 casos estudados (Continuação).

Caso	Gênero	Tipo de malformação importante associada*	Cariótipo	Conservante	Tecido	Técnica	Resultado
116	F	MCC + MSD	NR	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P95-A3, P064-C1, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
118	F	MCC	NR	Fresca	Pele Coração	MLPA (P036-E2, P064-C1, P095-A3, P250-B2, P311-B1) MLPA (P036-E2, P064-C1, P095-A3, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
119	M	MCC + AC	46,XY,der(14)t(11,14)(q12;p11.1)mat	Formol	Pele Coração	MLPA (P070-B2) MLPA (P036-E2) MLPA (P311-B1) MLPA (P070-B2)	rsa11q25(IGSF9B)x3 Rsa11q25(NCAPD3)x3 Sem alterações rsa11q25(IGSF9B)x3
120	M	MCC + MSN	NR	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
122	M	MCC + MSGU + MSN	NR	Formol	Pele Coração	MiniFiler e MLPA (P064-C1, P311-B1) MiniFiler e MLPA (P036-E2, P064-C1, P070-B2, P095-A3)	Sem alterações Sem alterações
124	F	MCC + MMETC	NR	Formol	Pele Coração	MiniFiler e MLPA (P064-C1, P311-B1) MiniFiler e MLPA (P095-A3, P250-B2, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
125	F	MCC + AC	47,XX,+18	Fresca	Pele Coração	MiniFiler MLPA (P064-C1) MLPA (P095-A3, P311-B1)	rsa(D18S51)x3 Sem alterações rsa(18)x3
126	M	MCC + MM + MSN + AC	47,XY,+13	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3) MLPA (P064-C1, P311-B1) MLPA (P095-A3) MLPA (P064-C1, P311-B1)	rsa(13)x3 Sem alterações rsa(13)x3 Sem alterações

Tabela 5 – Resultados obtidos nos 52 casos estudados (Continuação).

Caso	Gênero	Tipo de malformação importante associada*	Cariótipo	Conservante	Tecido	Técnica	Resultado
127	F	MCC	NI	Formol	Pele Coração	MiniFiler e MLPA (P064-C1, P311-B1) MiniFiler	Sem alterações Sem alterações
128	M	MCC	NR	Fresca	Pele	MLPA (P036-E2, P064-C1, P070-B2, P095-A3, P250-B2, P311-B1)	Sem alterações
129	M	MCC + MP	46,XY	Fresca	Coração	MLPA (P036-E2, P064-C1, P070-B2, P095-A3, P311-B1)	Sem alterações
131	M	MCC + MMETC	46,XY	Formol	Pele	MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3) MLPA (P311-B1)	Sem alterações Sem alterações rsa(GATA4_ex06)x1
132	F	MCC + MMETC + MSN	46,XX	Formol	Pele Coração	MLPA (P036-E2, P070-B2, P095-A3) MLPA (P311-B1) MLPA (P311-B1)	Sem alterações Sem alterações rsa(GATA4_ex06)x1
135	M	MCC + MSN + MO	46,XY	Fresca	Pele	MLPA (P064-C1, P070-B2, P095-A3, P311-B1)	Sem alterações
136	M	MCC + AC	47,XY,+21	Fresca	Coração Pele	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3) MLPA (P311-B1) MLPA (P095-A3)	Sem alterações rsa(21)x3 Sem alterações rsa(21)x3
137	F	MCC	NR	Fresca	Pele	MiniFiler MLPA (P064-C1, P311-B1)	rsa(D21S11)x3 Sem alterações
138	M	MCC + MSGU + MMETC	46,XY	Fresca	Coração	MLPA (P311-B1) MLPA (P095-A3) MLPA (P095-A3)	Sem alterações Sem alterações Sem alterações
139	M	MCC + MSN	46,XY	Fresca	Pele Coração	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações

Tabela 5 - Resultados obtidos nos 52 casos estudados (Continuação).

Caso	Gênero	Tipo de malformação importante associada*	Cariótipo	Conservante	Tecido	Técnica	Resultado
140	M	MCC + MSD	46,XY	Fresca	Pele Coração	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
142	F	MCC	NR	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3) MiniFiler MLPA (P311-B1) MiniFiler	rsa(21)x3 rsa(D21S11)x3 Sem alterações rsa(D21S11)x3
144	M	MCC + MMETC	46,XY	Fresca	Pele	MLPA (P095-A3)	Sem alterações
145	F	MCC	NR	Fresca	Pele	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1)	Sem alterações
149	M	MCC + MM	47,XY,+21	Fresca	Pele	MLPA (P095-A3) MLPA (P064-C1, P311-B1) MiniFiler	rsa(21)x3 Sem alterações rsa(D21S11)x3
150	F	MCC + MMETC	46,XX	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3) MLPA (P064-C1, P311-B1) MiniFiler	rsa(21)x3 Sem alterações rsa(D21S11)x3
152	F	MCC + MMETC + AC	NR	Fresca	Pele Coração	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1) MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1) MiniFiler	Sem alterações Sem alterações Sem alterações
153	M	MCC + MMETC + AC	NR	Formol	Pele Coração	MLPA (P070-B2, P095-A3) MiniFiler	rsa(D18S51)x3 Sem alterações rsa(D16S539)x3
154	M	MCC + MM	46,XY	Fresca	Pele	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1)	Sem alterações
156	F	MCC + MSGU + AC	47,XX,+18	Fresca	Pele Coração	MLPA (P036-E2, P070-B2, P095-A3, P311-B1) MLPA (MLPA (P036-E2, P095-A3, P311-B1)	rsa(18)x3 rsa(18)x3

Tabela 5 - Resultados obtidos nos 52 casos estudados (Continuação).

Caso	Gênero	Tipo de malformação importante associada*	Cariótipo	Conservante	Tecido	Técnica	Resultado
157	M	MCC + MSN	46,XY	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
159	F	MCC	46,XX	Fresca	Pele	MLPA (P095-A3, P311-B1)	Sem alterações
160	F	MCC + MM + MSGU + MP + AC	47,XX,inv(9)(p12q13),+18	Fresca	Pele	MLPA (P036-E2, P070-B2, P095-A3, P311-B1)	rsa(18)x3
161	F	MCC	NR	Formol	Coração	MLPA (P036-E2, P311-B1)	rsa(18)x3
162	F	MCC + MSN + MM	46,XX	Fresca	Coração Pele	MLPA (P064-C1, P095-A3, P250-B2) MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
163	M	MCC	47,XY,+18	Formol	Coração Coração	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1) MLPA (P064-C1)	Sem alterações Sem alterações
164	F	MCC + MM + AC	47,XX,+18	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P064-C1)	rsa(18)x3 rsa(18)x3 Sem alterações
165	F	MCC	47,XY,+18	Formol	Pele	MLPA (P095-A3, P311-B1)	rsa(18)x3
166	F	MCC + AC	47,XX,+18	Fresca	Pele	MLPA (P036-E2, P070-B2, P095-A3) MLPA (P064-C1) MLPA (P070-B2, P095-A3, P311-B1)	rsa(18)x3 Sem alterações rsa(18)x3
167	M	MCC + AC	47,XY,+18	Fresca	Coração Pele Coração	MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P036-E2, P070-B2, P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3, P311-B1)	rsa(18)x3 rsa(18)x3 rsa(18)x3 rsa(18)x3

Tabela 5 - Resultados obtidos nos 52 casos estudados (Conclusão).

Caso	Gênero	Tipo de malformação importante associada*	Cariótipo	Conservante	Tecido	Técnica	Resultado
168	M	MCC + MMETC	NR	Fresca	Pele Coração	MLPA (P095-A3, P311-B1) MLPA (P095-A3, P311-B1)	Sem alterações Sem alterações
173	F	MCC + MSN	46,XX	Fresca	Pele	MLPA (P064-C1, P095-A3, P250-B2, P311-B1)	Sem alterações
174	M	MCC + MP	46,XY,del(4p14.1) /46,XY	Fresca	Coração Pele Coração	MLPA (P064-C1, P095-A3, P311-B1) MLPA (P064-C1) MLPA (P311-B1) MLPA (P064-C1) MLPA (P095-A3, P311-B1)	Sem alterações rsa(4p16)x1 Sem alterações rsa(4p16)x1 Sem alterações

Legenda: F – feminino; M – Masculino; AC - anomalias cromossômicas; MSN - malformações do sistema nervoso; MMETC - malformações musculoesqueléticas e do tecido conjuntivo; MM - malformações de membros; MSGU - malformações do sistema geniturinário; MP - malformações do palato; MSD – malformações do sistema digestivo; MO – malformações de orelhas; MOI - malformação dos olhos; NI – não informado; NR – não realizado; rsa - “Region-Specific Assay”.

* Embora os casos estudados apresentassem malformações menores, como dismorfismos faciais, essas foram desconsideradas na tabela acima, sendo representadas apenas as malformações classificadas como “malformações maiores” pela Eurocat.

Como demonstrado na tabela acima, 21 casos tiveram CNVs detectadas de modo que a maioria das alterações encontradas correspondiam a aneuploidias, sendo 10 casos portadores de trissomia do cromossomo 18, quatro casos portadores da trissomia do 21, dois casos portadores da trissomia de 13, um caso portador da trissomia de 16 e um caso portador da monossomia de X em mosaico com células 46,XY. Também foram encontradas aneussomias, sendo um caso de monossomia de 4p16, um caso de duplicação de 11q25 e um caso de deleção do éxon 6 do gene *GATA4* (Figura 7).

Figura 7 - Anomalias encontradas nos 52 casos estudados.

Descobertas as alterações genômicas, essas foram associadas aos defeitos cardíacos encontrados (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação entre as alterações genômicas e as malformações cardíacas associadas.

Alterações cromossômicas	Malformação cardíaca associada
Trissomia do 13	CIV, CIA, T4F, cavalgamento da aorta e hipertrofia do VD.
Trissomia do 16	CIA, persistência do canal arterial e canal arterial amplo.
Trissomia do 18	CIV, CIA, valva aórtica bicúspide, valva pulmonar bicúspide, displasia de valvas, dilatação do AD, atresia mitral, CAV, hipoplasia de VE, AP anterior, aorta posterior, valva aórtica imperfurada, T4F e persistência do canal arterial.
Trissomia do 21	CIA, CIV, prolapso cardíaco, CoA, duplo arco aórtico, hipertrofia de VD, displasia de câmaras e valvas, insuficiência de valvas, persistência do canal arterial e CAV.
Monossomia de X em mosaico	CoA, drenagem anômala parcial das VP, CIV e persistência do canal arterial.
Monossomia de 4p16	Insuficiência de valvas, displasia de câmaras e valvas, valva aórtica bicúspide, CIV e ectasia da aorta ascendente.
Duplicação de 11q25	CIV e displasia de câmaras.
Deleção de GATA4_ex06	Hipoplasia do arco aórtico, CoA e displasia de câmaras e valvas.

Legenda: CIV – comunicação interventricular, CIA – comunicação interatrial, T4F – tetralogia de Fallot, VD- ventrículo direito, AD – átrio direito, CAV – comunicação atrioventricular, VE – ventrículo esquerdo, AP – artéria pulmonar, CoA – Coarctação da aorta e VP – veias pulmonares.

Quando relacionados os tipos de defeitos cardíacos (Anexo C) com o tipo de anomalia cromossômica, foi observada uma correlação bastante heterogênea, sendo a trissomia do cromossomo 21 a única anomalia cromossômica a apresentar os cinco tipos de defeitos cardíacos (Figura 8).

Figura 8 - Gráfico representando a conexão entre as alterações cromossômicas e os cinco grupos de defeitos cardíacos.

O óbito precoce em malformados faz com que muitas vezes o feto ou o recém-nascido afetado não consiga passar por uma avaliação clínica especializada, ou seja, ser submetido a exames genéticos. Ao longo de nosso estudo, um total de seis casos que não possuíam hipótese diagnóstica e cariótipo tiveram suas alterações no genoma identificadas. Ademais, 9 casos que não tiveram seu cariótipo realizado puderam ser testados para as principais síndromes de aneuploidias e microdeleção, não sendo encontradas alterações.

Abaixo são reportados os 21 casos que apresentaram alteração no genoma. Para facilitar a comparação entre os casos, esses foram divididos em grupos de acordo com a alteração apresentada.

5.1. Aneuploidias

5.1.1. Trissomia do cromossomo 21

Embora a trissomia do cromossomo 21 seja a anomalia mais comum na população mundial, em nosso estudo essa foi a segunda anomalia mais prevalente, estando presente em quatro dos casos (Figura 9).

Figura 9 - Casos identificados como portadores da trissomia do cromossomo 21.

• *Caso 112*

Recém-nascido do sexo masculino, filho da primeira gestação, pré-termo, apresentou ao nascimento tamanho reduzido para a idade gestacional e baixo peso. O

resultado do exame de cariótipo foi 47,XY,+21, evoluindo a óbito com 13 dias de vida. Após exame necrológico, foi constatada hemorragia pulmonar, implantação baixa das orelhas, filtro longo, orelhas pequenas e malformadas, olhos levemente oblíquos, hipertelorismo, aparente retrognatia, alterações de contorno de face, raiz nasal alongada, língua protusa, braquicefalia, dedos curtos e afastados, CIA, CIV, prolapso cardíaco, coarctação da aorta, duplo arco aórtico, ventrículo direito bastante espesso e displasia cardíaca.

• **Caso 136**

Recém-nascido do sexo masculino, pré-termo, com baixo peso ao nascimento, portador de trissomia de 21 identificada por cariotipagem e que evoluiu a óbito com dois dias de vida. Ao exame necrológico foi identificada atresia pulmonar, insuficiência tricúspide, displasia não Ebstein da valva tricúspide, dilatação importante do átrio e ventrículo direito, tronco e ramos de artéria pulmonar hipoplásico, canal arterial patente, hidropsia grave, cardiopatia congênita de alta morbidade e mortalidade, hipertelorismo, baixa implantação de orelhas, língua protusa, sobra de pele no pescoço e hidrocele em testículo esquerdo.

• **Caso 142**

Criança do sexo feminino, portadora da Síndrome de Down, deu entrada no hospital com um quadro de bronquite que complicou em pneumonia, evoluindo a óbito com 379 dias de vida. Segundo o laudo preliminar da autópsia, esta apresentava defeito no septo atrio-ventricular tipo A de Rastelli, forame oval patente fenestrado, dilatação de câmaras direitas, hipertensão pulmonar, infecção de cateter venoso central, braquicefalia discreta, nariz pequenos com passagens nasais estreitadas, pescoço curto e macroglosia.

• **Caso 149**

Recém-nascido do sexo masculino, filho da terceira gestação, com baixo peso ao nascimento e trissomia do cromossomo 21 detectada por cariotipagem. Evoluiu a óbito com oito dias de vida. Durante a análise necrológica prévia foi observada discreta dilatação do átrio esquerdo, icterícia, hipertensão pulmonar, hemorragia intra-craniana, ectasia pelve renal, insuficiência tricúspide holossistólica, ossos longos com tamanho

reduzido, face plana, pregas epicânticas, hipertelorismo, ponte nasal baixa, macroglossia, higroma cervical e prega nugal. Também foi levantada a hipótese da presença de coarctação da aorta.

Nos quatro casos foram coletadas amostras de pele e coração frescos, sendo o DNA extraído e submetido às técnicas de MLPA, utilizando o *kit* P095 e P311, e marcador microsatélite. Além disso, os casos 136 e 149 também foram submetidos à investigação pelo *kit* de MLPA P064.

Em todos os casos investigados pelo *kit* de MLPA P095 foram encontradas duplicações das sondas de MLPA: SIM2_11, NCAM2_12, USP25_24, HSPA13_2, SOD1_4, APP_18, TFF1_1 e T1AM1_25, localizadas na região 21q. Além disso, estes apresentaram também, quando investigados pela técnica de marcador microsatélite, a presença de três alelos para o marcador D21S11 (Figura 10).

Figura 10 - Resultados obtidos pelas técnicas de MLPA (*kit* P095) e de marcador microsatélite indicando a trissomia do cromossomo 21.

Legenda: (A) Dotplot do caso 149 demonstrando a duplicação de oito sondas do cromossomo 21, localizadas acima do limiar de normalidade (0,75 a 1,35). (B) Eletroferograma do caso 142 obtido pela técnica de marcador microsatélite, o qual demonstra a presença de três alelos (29, 30 e 32,2) para o marcador D21S11.

Não foram encontradas alterações em nenhum dos quatro casos investigados utilizando o *kit* de MLPA P311, destinado à investigação de malformações cardíacas congênitas. Da mesma forma, também não foram encontradas alterações nos casos investigados com o *kit* de MLPA P064.

5.1.2. Trissomia do cromossomo 18

A trissomia do cromossomo 18, como já demonstrado anteriormente, consistiu na alteração mais prevalente em nosso estudo, sendo encontrada em dez casos (Figura 11).

Figura 11 - Casos identificados como portadores da trissomia do cromossomo 18.

• *Caso 102*

Natimorto do sexo feminino, sendo a morte detectada na 36^a semana de gestação e resultado de cariótipo 47,XX,+18. Apresentava como características fenotípicas alargamento da base do nariz, retrognatia, primeiro dátilo dos pés hipoplásicos, mãos cerradas, pés em “mata-borrão”, hipertelorismo, CIV membranosa, diafragma capsular (fino), fígado hipoplásico, dois folhetos da valva pulmonar e três folhetos na aórtica.

• *Caso 125*

Recém-nascido do sexo feminino, a termo, apresentando trissomia do cromossomo 18 detectada por cariótipo, evoluindo a óbito aos 11 dias de vida. Ao exame necrológico foi encontrada CIA tipo fossa oval, CIV, provável agnesia de vermis cerebral, sobreposição de dátilos das mãos, orelhas malformadas, suspeita de agnesia do esôfago, displasia multivalvar e canal arterial pérvio.

• Caso 152

Natimorto do sexo feminino, com parto induzido na 37ª semana de gestação e suspeita de Síndrome de Edwards. Durante a autópsia foi observado anomalias crânio-faciais, com nariz hipoplásico, implantação baixa e orelhas malformadas, retrognatia, pescoço curto, mãos cerradas com segundo e quarto dedos sobrepostos ao terceiro dedo, unhas hipoplásicas, hérnia diafragmática à direita, CIV na porção membranosa do septo interventricular, valva aórtica e pulmonar bicúspide, displasia de valva tricúspide, hipoplasia do timo e defeito de rotação renal bilateral.

• Caso 156

Recém-nascido do sexo feminino, a termo, apresentou-se pequeno para a idade gestacional. No cariótipo foi identificada a trissomia do cromossomo 18, sendo o óbito constatado com 15 dias de vida. Durante a autópsia foi relatado dismorfismos faciais, estenose de conduto auditivo externo, pés com calcâneo proeminente, CIA, CIV, dilatação do átrio direito, hipoplasia de timo e adrenal rim esquerdo com múltiplos cistos.

• Caso 160

Recém-nascido do sexo feminino, a termo, hipotônico, com resultado do cariótipo 47,XX,inv(9)(p12q13),+18 e que evoluiu a óbito com seis dias de vida. Durante a autópsia foi relatada atresia mitral, hipoplasia de ventrículo esquerdo, defeito de septo átrio-ventricular com predominância em ventrículo direito, artéria pulmonar anterior e com aorta posterior, valva aórtica imperfurada, hipoplasia de timo importante, PCA 5,5 cm, malformação dos membros superiores, agenesia de polegar bilateral, unhas hipoplásicas, genitália ambígua, fenda palatina, implantação baixa das orelhas e hipoplasia de vermis cerebelar.

• Caso 163

Bebê do sexo masculino, pré-termo, filho da terceira gestação, com resultado de cariótipo 47,XY,+18 e morte aos 80 dias de vida. No momento da autópsia foram relatados CIA, CIV, insuficiência cardíaca congestiva, sepse relacionada ao cateter, hipoplasia de vermis cerebelar, aumento de câmara cardíaca direita e cisterna magna aumentada.

• **Caso 164**

Bebê do sexo feminino, com cariótipo 47,XX,+18, apresentou baixo peso e pequena para a idade gestacional. Teve o óbito constatado no 83º dia de vida, apresentando na autópsia dismorfismos faciais, CIV, osso nasal ausente, valvas cardíacas displásicas, dedos curtos no pé, com sindactilia, tetralogia de Fallot e canal amplo.

• **Caso 165**

Recém-nascido do sexo masculino, a termo, primogênito, com suspeita de trissomia de 18, evoluiu a óbito com dois dias de vida. Durante a autópsia foi encontrada displasia valvar, CIA, CIV bem ampla, derrame pleural bilateral, displasia valva global, pilificação aumentada em fronte e dorso, pés em “mata-borrão”, baixa implantação da orelha e pregas epicânticas.

• **Caso 166**

Bebê do sexo feminino, portadora da Síndrome de Edwards, apresentou óbito prematuro aos 204 dias de vida após desconforto respiratório. Na autópsia foram contatadas CIV, persistência do canal arterial, CIA, dismorfismos faciais e sobreposição do segundo quirodáctilo sobre o terceiro.

• **Caso 167**

Recém-nascido do sexo masculino, apresentou resultado de cariótipo alterado 47,XY,+18, evoluindo a óbito com quatro dias de vida. Além da alteração genômica, foi detectado na autópsia mielomeningocele, dolicocefalia com occipício proeminente, orelha com baixa implantação e malformada, retrognatia, agnesia radial, luxação de joelho e tornozelo, com pé torto à esquerda, Arnold Chiari tipo II, CIA, CIV, hipoplasia ístmica e agnesia de dáktilos dos membros superiores e membro inferior direito.

Fragmentos de pele e coração frescos foram coletados de todos os casos, com exceção dos casos 102, 163 e 165 que estavam armazenadas em formol tamponado (10%) e, também, no caso 102 foi coletada amostra de diafragma ao invés da pele.

Após a extração do DNA dessas amostras, elas foram submetidas a diferentes técnicas citogenômicas, sendo a técnica de microssatélite empregada nos casos 102,

125, 152 e 156 e a de MLPA empregada em todos os casos. Embora todas as amostras tenham sido submetidas à análise pelos *kits* de MLPA P095 e P311, nos casos 102 e 152 os resultados não puderam ser analisados devido à má qualidade da amostra. Além disso, também não foi possível analisar o resultado do kit P311 do caso 165. Ademais a esses *kits*, também foram empregados os *kits* de MLPA para a investigação de alterações subteloméricas (P036 e P070) nos casos 156, 160, 165 e 167; e o *kit* de microdeleções e microduplicações (P064) nos casos 125, 163, 164 e 165.

Após análise dos resultados, foi observado que todas as amostras investigadas pelas técnicas de marcador microssatélite e MLPA (*kits* P036, P070, P095 e P311) apresentaram, respectivamente, três alelos e duplicação das sondas referentes ao cromossomo 18 (Anexo A) (Figura 12).

Figura 12 - Resultados obtidos pelas técnicas de MLPA (*kit* P070 e P095) e de marcador microssatélite indicando a trissomia do cromossomo 18.

Legenda: (A) Dotplot do caso 160 demonstrando a duplicação de sete sondas do cromossomo 18 do *kit* P095, localizadas acima do limiar de normalidade (0,75 a 1,35). (B) Dotplot do caso 165 demonstrando a duplicação das duas sondas do cromossomo 1 do *kit* P070, localizadas acima do limiar de normalidade (0,75 a 1,35). (C) Eletroferograma do caso 102 obtido pela técnica de marcador microssatélite, o qual demonstra a presença de três alelos (14, 16 e 16) para o marcador D18S51.

5.1.3. Trissomia do 16

Um dos casos estudados apresentou uma trissomia rara, pouco descrita na literatura, a trissomia do cromossomo 16 (Figura 13).

Figura 13 - Caso identificado como portador da trissomia do cromossomo 16.

Legenda: (A) Vista frontal. (B) Vista dorsal.

• **Caso 153**

Recém-nascido do sexo masculino, pré-termo, cujo cariótipo não havia sido realizado, apresentava como suspeita clínica as trissomias dos cromossomos 16 ou 18. No laudo preliminar da autópsia foram relatadas as seguintes alterações: pescoço alado, mancha mongólica, hérnia diafragmática, hipoplasia pulmonar bilateral, CIA, canal arterial amplo e patente, hipertelorismo, retrognatia, filtro longo, cianose, pé com hálux afastado, nariz achatado, criptorquidia e asplenia.

Com o intuito de identificação da presença das alterações cromossômicas, foram coletadas amostras de pele e coração formolizadas, as quais foram armazenadas em RNA *later*. Após a extração de DNA, de acordo com as hipóteses diagnósticas estabelecidas, as amostras foram submetidas à investigação pelas técnicas de MLPA utilizando os *kits* subteloméricos P036 e P070, e de marcador microsatélite.

De todos os testes de MLPA realizados, apenas foi possível obter resultado do kit P070 de amostra de pele. Nessa não foram encontradas alterações cromossômicas. Porém, diferentemente do caso anterior, tanto a pele e o coração tiveram seus resultados revelados pela técnica de microsatélite, sendo estes, respectivamente, não conclusivo e a presença de três alelos para o marcador D16S539 - dois alelos 8 e um alelo 11 (Figura 14).

Figura 14 - Eletoferograma com os resultados do coração obtidos para o marcador D16S539 pela técnica microsatélite.

Legenda: Nesse gráfico é possível visualizar que o pico do alelo 8 apresenta quase o dobro tamanho que o 11, sendo sua razão 2:1, o que sugere a presença de uma trissomia de 16.

5.1.4. Trissomia do 13

Assim como descrito na literatura, a trissomia do cromossomo 13 consistiu na terceira alteração mais prevalente, estando presente em dois casos (Figura 15).

Figura 15 - Casos identificados como portadores da trissomia do cromossomo 13.

• *Caso 109*

Recém-nascido do sexo masculino, pré-termo, com resultado de cariótipo prévio 47,XY,+13 e morte neonatal a 52 minutos de vida. Durante o exame necrológico foram constatadas múltiplas malformações, cabeça tipo limão, genitália ambígua, hidropsia, derrame de pericárdio, onfalocele rota, polidactilia de pododáctilo pós-axial, aparente microretrognatia, implantação baixa das orelhas, orelhas malformadas, CIV membranosa subvalvar e CIA.

•Caso 126

Recém-nascido do sexo masculino, primogênito, a termo, apresentou ao nascimento hipotonia e apnéia. O exame de cariótipo revelou a presença da trissomia do cromossomo 13, tendo evoluído a óbito com 35 dias. Durante a autópsia foi constata a presença de tetralogia de Fallot, CIA, hipertelorismo, polidactilia pós – axial em ambas as mãos, retrognatia, implantação baixa das orelhas, filtro longo e pouco marcado, lábio superior fino, malformação de Dandy-Walker, icterícia, hipoplasia do timo, CIV, ventrículo direito aumentado, aorta de calibre aumentado, cavalgamento da aorta, hipertrofia do ventrículo direito e petéquias no pulmão.

Amostras frescas de pele e coração foram coletadas em ambos os casos, sendo os DNAs extraídos e submetidos à técnica de MLPA utilizando os *kits* P095 e P311. Para o caso 126 também foi realizada investigação citogenômica utilizando o *kit* de MLPA P064.

Nesses dois casos testados com o *kit* de MLPA P095 foi possível identificar três cópias das oito sondas encontradas no braço longo do cromossomo 13. Em contrapartida, não foram encontradas alterações dos resultados investigados pelos *kits* P064 e P311 (Figura 16).

Figura 16 - Resultados obtidos pela técnica de MLPA (*kit* P095) indicando a trissomia do cromossomo 13.

Legenda: (A) Dotplot do caso 109 demonstrando a duplicação de sete sondas do cromossomo 13, localizadas acima do limiar de normalidade (0,75 a 1,35). (B)Tabela indicativa das sete sondas encontradas em triplicata.

5.1.5. Monossomia do X em mosaico

Além dos casos de trissomias, também foi detectado neste trabalho um caso portador de monossomia do X em mosaico (Figura 17).

Figura 17 – Caso identificado como portador da monossomia de X em mosaico.

Legenda: (A) Vista frontal. (B) Vista dorsal.

• **Caso 104**

Recém-nascido do sexo feminino, a termo, com resultado do cariótipo prévio 45,X, evoluiu a óbito aos 86 dias de vida. Durante a autópsia foram relatadas as seguintes características fenotípicas: hérnia diafragmática, coarctação da aorta, drenagem anômala parcial das veias pulmonares superiores, forame oval patente, CIV e persistência do canal arterial.

Foram encaminhados ao laboratório dois fragmentos de tecido formolizados, um de pele e outro de coração, os quais foram armazenados em RNA *later*. O DNA de ambos os tecidos foi extraído e, logo após, submetido às técnicas de MLPA (*kits* P095 e P311) e de marcador microssatélite.

Os resultados do *kit* de MLPA P095 e de microssatélite evidenciaram a presença de material do cromossomo Y, sugestivo de mosaicismo. Assim, foi realizada a FISH utilizando sondas alpha satélites de X e Y, na qual foram evidenciadas células 45,X e 46,XY (Figura 18).

Figura 18 - Resultados obtidos pelas técnicas de marcador microssatélite e FISH.

Legenda: (A) Resultados de marcador microssatélite indicando a presença de material genético dos cromossomos X e Y. (B) Resultado da FISH em pele indicando a presença dos cromossomos X e Y.

5.2. Aneussomias

Apesar da grande maioria dos casos estudados apresentarem CNVs relacionadas com a presença de alterações cromossômicas numéricas (87,5%), foram encontrados quatro casos resultantes de perdas de segmentos cromossômicos, os quais são descritos abaixo.

5.2.1. Deleção de 4p16

De todos os casos estudados, apenas um deles apresentou deleções das sondas localizadas na região do braço curto do cromossomo quatro (Figura 19).

Figura 19 - Caso identificado como portador da deleção de 4p.

Legenda: (A) Foto de vista frontal e (B) vista lateral do caso estudado demonstrando as alterações de face encontradas, típicas da síndrome de deleção de 4p.

• Caso 174

Recém-nascido do sexo masculino, pré-termo, apresentou baixo peso e pequeno para a idade gestacional. No exame de cariótipo foi demonstrado a presença de células em mosaico 46,XY,del4(p14.1)/46,XY, evoluindo a óbito com 9 dias de vida. No momento da necropsia foi constatada cardiopatia congênita com insuficiência mitral e tricúspide, dismorfismos faciais, CIV grave, dilatação discreta e moderada do átrio esquerdo, micrognatia, fenda palatina, osso nasal hipoplásico, rim direito rudimentar, valva aórtica bivalvularizada, ectasia da aorta ascendente e hipertrofia de ventrículo direito.

Devido à difícil identificação de microdeleções por meio do cariótipo, amostras de pele e coração foram coletadas a fresco e submetidas à técnica de MLPA, por meio dos *kits* P064, P095 e P311.

Não foram encontradas alterações para os *kits* P095 e P311; no entanto, o kit P064 evidenciou a deleção de sondas WHSC1_ex5, WHSC1_ex9, WHSC1_ex25 e TACC3, encontradas no braço curto do cromossomo 4 (Figura 20).

Figura 20 - Resultados obtidos pela técnica de MLPA (*kit* P064) indicando deleção das quatro sondas localizadas no cromossomo 4.

Legenda: (A) Dotplot demonstrando a deleção das quatro sondas do cromossomo 4, localizadas abaixo do limiar de normalidade (0,75 a 1,35). (B) Tabela indicativa dos nomes e da quantidade de cópias das quatro sondas deletadas.

5.2.2. Deleção do éxon 6 do gene *GATA4*

Além dos casos com deleção de segmentos envolvendo vários genes, em um dos casos estudados foi encontrada alteração de um único éxon (éxon 6) presente no gene *GATA4* (Figura 21).

Figura 21 - Caso identificado como portador da deleção do éxon 6 do gene *GATA4*.

Legenda: (A) Vista frontal do caso, sendo a onfalocele bem evidente. (B) Foto destacando as alterações de fâcies encontradas.

• Caso 131

Recém-nascido do sexo masculino, filho da terceira gestação, a termo, apresentou hipotonia e apnéia ao nascimento. Não foi identificada alteração no cariótipo, sendo a morte ocorrida no 4º dia de vida. Na autópsia foi encontrada onfalocele, dismorfismos, hipoplasia de coração esquerdo, coarctação da aorta, criptorquidia bilateral, hipoplasia de arco aórtico, válvula bicúspide, nodular e malformada, tricúspide espessa, dilatação do átrio e ventrículo direito, ventrículo esquerdo de tamanho diminuído.

Fragmento de pele e coração formolizados foram coletados e testados para MLPA utilizando os kits P036, P070, P095 e P311. Apenas o *kit* P311 apresentou alteração, a qual consistia na deleção da sonda *GATA4_ex6* (Figura 22).

Figura 22 - Resultados obtidos pela técnica de MLPA (*kit* P311) indicando a deleção da sonda referente ao éxon 6 do gene *GATA4*.

*Legenda: (A) Dotplot demonstrando a deleção da única sonda do éxon 6 do gene *GATA4*, localizada abaixo do limiar de normalidade (0,75 a 1,35). (B) Tabela indicando a deleção de apenas um éxon (6) do gene *GATA*.*

5.2.3. Duplicação de 11q25

O último caso descrito consiste em um malformado, portador de uma translocação entre os cromossomos 11 e 14, sendo detectada após o teste citogenômico uma duplicação de duas sondas do cromossomo 11 (Figura 23).

Figura 23 - Caso identificado como portador da duplicação de duas sondas no cromossomo 11.

Legenda: (A) Vista frontal do caso. (B) Foto destacando as alterações de fâcies encontradas.

• Caso 119

Recém-nascido do sexo masculino, filho da quinta gestação, pré-termo e portador de cariótipo com uma translocação entre o braço longo do cromossomo 11 e o braço curto do cromossomo 14 (46,XY,der(14)t(11,14)(q12;p11.1)mat). Evoluiu a óbito após quatro minutos de vida. Além da alteração cromossômica, foram encontradas na autópsia CIV, higroma cístico, alteração no contorno da face, hidropsia, ascite, agnesia renal esquerdo, agnesia de brônquio fonte esquerdo, criptorquidia bilateral, hipoplasia do pulmão direito e micropênis.

Foram coletados fragmentos de pele e tecido cardíaco formolizados, os quais foram armazenados em RNA *later* e, posteriormente, submetidos à técnica de MLPA. Devido uma das regiões translocadas pertencem à porção terminal do cromossomo 14, optou-se pela utilização dos *kits* subteloméricos P036 e P070 para verificação da presença de alterações nessa região.

No entanto, quando analisados os resultados da MLPA utilizando os *kits* P036 e P070 foram detectadas a duplicação das sondas NCAPD3 e IGSF9B, respectivamente, ambas situadas na região 11q25 (Figura 24).

Figura 24 - Resultados obtidos pelas técnicas de bandamento G e MLPA.

Legenda: (A) Cariótipo demonstrando o cromossomo 14 alterado (seta vermelha). (B) Ideograma dos cromossomos 11 e 14 normais e do cromossomo derivado de 14. (C) e (D) Histogramas das reação de dos kits de MLPA P036 e P070, respectivamente, demonstrando que o pico referente as sondas NCAPP3 e IGSF9B do caso estudado (azul) apresenta-se aumentado quando comparado ao pico controle (vermelho), indicando uma duplicação.

6. DISCUSSÃO

A investigação das alterações genômicas associadas às MCC sindrômicas, realizada nesse estudo, contribuiu diretamente para reconhecer e identificar as características como a prevalência de acordo com o gênero, tempo de vida e tipos de malformações cardíacas e extracardíacas dos malformados cardíacos congênitos sindrômicos que foram a óbito no complexo HC-FMUSP.

Na literatura, há uma grande discordância quanto ao gênero mais acometido pelas malformações cardíacas congênitas. Em nosso estudo foi observada que a prevalência de MCC sindrômicas entre os gêneros era muito similar, sendo a proporção de afetados de 1 mulher para cada 1,08 homens. Uma proporção semelhante, 1 mulher para cada 1,008 homens afetados, foi encontrada em estudo realizado por Verheugt e cols. (2008). Conquanto a maioria dos casos estudados fossem recém-nascidos (61,5%) com poucas horas de vida, quando calculada a idade média foi obtido um valor de 31,4 dias. Esse alto valor de média se deve ao fato de dois casos apresentarem idades muito superiores aos demais, o que também pode ser constatado pelo alto valor do desvio padrão (68,9).

Quando analisadas os tipos de alterações cardíacas mais prevalentes nos 52 casos estudados, foi observado que sua grande maioria consistia em alterações de defeitos de septo atrioventricular, seguidos pelos defeitos de grandes vasos e câmaras. Estes resultados corroboram com os divulgados por Alabdulgader (2012), o qual encontrou uma maior prevalência de defeitos de septo, seguido pelos defeitos de grandes vasos. Ademais, também foi constatado que 86,5% dos casos investigados apresentaram mais de uma alteração cardíaca, sendo a mais comum associação de defeitos de septo com o defeito de câmaras e grandes vasos; e defeitos de válvula, grandes vasos e câmaras.

Como já descrito anteriormente, as malformações cardíacas sindrômicas são muito menos frequentes que as malformações cardíacas isoladas. Porém, indivíduos acometidos por cardiopatias associadas a outras anormalidades extracardíacas acabam se tornando mais suscetíveis a apresentar uma alta taxa de morbidade e mortalidade (Rosa et al., 2013).

Dentre os quadros malformativos frequentemente associados às malformações cardíacas sindrômicas encontrados em nosso estudo destacam-se as malformações do

sistema nervoso e malformações musculoesqueléticas e de tecido conjuntivo, observadas principalmente nos casos com anomalias cromossômicas.

No estudo realizado por Alabdulgader (2012) com nascidos vivos foi revelado que as malformações frequentemente associadas às alterações cardíacas foram as alterações associadas a síndromes (37,15%), seguidas pela malformação do sistema nervoso (15,27%) e malformações do sistema digestivo (9,02%).

Porém, em estudo realizado utilizando amostras *post-mortem* de pacientes malformados foi encontrada uma maior associação de MCCs com malformação do sistema geniturinário e malformação do sistema digestivo, ambos com oito casos, seguindo pela malformação do sistema nervoso e malformações musculoesqueléticas e de tecido conjuntivo, com cinco casos cada (Dias et al, 2016).

Em estudo realizado por Hume e Chansen (2015) foi revelado que as aneuploidias mais comumente detectadas no pré-natal foram a trissomia do cromossomo 21 (66,7%), seguida, respectivamente, pela trissomia do cromossomo 18 (22,1%) e trissomia do cromossomo 13 (11,3%). No entanto, a frequência da malformação cardíaca é muito divergente nessas anomalias, sendo de 40 a 60% na trissomia do 21, de 90% na trissomia do 18 e 80% na trissomia do 13 (Kosiv et al., 2017; Plaiasu, 2017). Além disso, até um passado recente, os portadores das trissomias dos cromossomos 13 e 18 não eram considerados candidatos para a realização de cirurgia corretiva da MCC, devido à complexidade das malformações apresentadas e pela sobrevida ser muito reduzida quando comparada aos portadores da trissomia de 21 (Costello et al., 2015). Estes dados justificariam o motivo de termos encontrado em nosso estudo uma maior prevalência de portadores da trissomia do cromossomo 18 (10 casos), quando comparada a trissomia do cromossomo 21 (4 casos). Já a incidência da trissomia do cromossomo 13 manteve-se como sendo a terceira mais frequente, o qual está em concordância com os dados de incidência mundial.

Também foi encontrado um caso de trissomia do cromossomo 16, a qual consiste em uma trissomia rara em nascidos vivos, existindo poucos relatos na literatura. Em nosso trabalho, a trissomia do 16 pode ser confirmada apenas no tecido cardíaco do caso 153. Segundo trabalho publicado por Mishra e cols (2018), a trissomia total do 16 geralmente está associado ao aborto espontâneo, de modo a maioria dos nascidos vivos são portadores da trissomia parcial apresentando malformações congênitas com sobrevida pós-natal limitada. Desta forma, a ocorrência dessa alteração

em mosaico no caso estudado explicaria a presença de um quadro mais brando e compatível com a vida. Em estudo publicado por Chareonsirisuthigul e cols. (2014) também foi observada a presença de trissomia de 16 apenas no tecido cardíaco, no entanto este se tratava de um mosaico intratecidual, estando presente em apenas 16% das células e não sendo observada alteração cardíaca. Embora fosse adotada em nosso estudo a técnica de microssatélite, a qual não permite observar a posição da duplicação, o tamanho dobrado de um dos picos de intensidade de fragmentos encontrados para um dos alelos e a própria presença da CIA sugerem que este indivíduo apresentava trissomia de 16 em todas as células cardíacas. Entretanto, futuramente, pretendemos realizar a técnica de FISH em tecido cardíaco e pele parafinada para confirmar a presença dessa trissomia.

Além das trissomias cromossômicas, também foi encontrado em nosso estudo um caso de monossomia do cromossomo X em mosaico. Aspecto relevante neste caso, é que essa alteração não foi observada na cariotipagem. Porém, as técnicas de marcadores e FISH realizadas em nosso estudo evidenciaram a presença de cromossomo Y, indicando se tratar de um mosaico (45,X/46,XY). A detecção dessa alteração é de grande importância clínica, pois está associada à presença de disgenesia gonadal, a qual tem risco elevado de desenvolver tumores gonadais (Marqui et al, 2016). Além disso, esse resultado é crucial para realização do aconselhamento genético.

Ainda levando em consideração a perda de segmento de material genético, esta alteração estava presente em mais dois casos, o 131 e 174. O primeiro caso consistiu em uma deleção de uma única sonda pertencente ao éxon 6 do gene *GATA4*. O fato de apenas uma única sonda do éxon 6 apresentar-se deletada sugere que, provavelmente, esta não seja uma deleção real, e sim um erro de hibridação ocasionado por um polimorfismo presente na região da sonda. Após análise no Ensembl foi constatado que na região complementar a sonda *GATA4_exon6* são descritas 23 variantes, de modo que 15 são do tipo “*missense*”, 7 sinônimas e uma “*coding sequence*”. Embora as variantes mais comuns desse gene sejam associadas ao desenvolvimento de defeito de septo atrioventricular, este tipo de anomalia não foi encontrada no caso estudado.

No segundo caso (174) foi encontrada a deleção de quatro sondas localizadas na região 4p16, compatíveis com a síndrome de Wolf-Hirschhorn típica. Apesar de essa síndrome rara ser reconhecida pelas fácies típicas de “capacete grego”, microcefalia, deficiência intelectual e pelo atraso do desenvolvimento, várias são as malformações

associadas a ela. As malformações cardíacas mais frequentes descritas são defeitos de septo átrio e ventricular, de modo que são menos frequentes os defeitos de ducto arterioso patente e as cardiopatias complexas (von Elten et al., 2012; Martínez-Quintana; Rodríguez-González, 2014; Monteiro et al, 2017). Em nosso caso, corroborando com o descrito na literatura, também foram encontradas alterações de septo a qual constituía em uma CIV grave, além de uma dilatação discreta e moderada do átrio esquerdo e displasia de valvas.

Achamos importante ressaltar que a identificação de síndromes de microdeleções e microduplicação pela técnica de bandamento G é de difícil execução, tendo em vista o limite de resolução dessa técnica (<5Mb).

Apenas no caso 119 foi constatada a duplicação de um segmento cromossômico, a qual foi detectada por duas sondas presentes na região 11q25. Levando em consideração que o *kit* de MLPA P036 e P070 contempla apenas os genes localizados na região subtelomérica e comparando este resultado com o obtido no cariótipo 46,XY,der(14)t(11,14)(q12;p11.1)mat., pode-se concluir que este caso era portador da trissomia parcial do cromossomo 11. Tanto a translocação dos cromossomos 11 e 14, como a trissomia total do cromossomo 11 são frequentemente relacionadas com leucemias (Matsuo et al, 2000; Finsterer; Panny, 2017). A maioria dos casos dessa trissomia ocorre de forma parcial, estando sua formação associada a um erro de segregação na meiose de uma translocação parental recíproca envolvendo o cromossomo 11 e outro cromossomo (Yelavarthi; Zunich, 2004). Até o momento, não existe nenhum relato na literatura que descreva indivíduos acometidos pela translocação entre 11q e 14p não portador de leucemia. Entretanto, trabalho publicado por Chen e cols. (2014) em irmãos portadores da trissomia pura de 11q23.3 demonstrou que estes apresentavam fenótipo variável, sendo dos três irmãos afetados, apenas um portador de alteração cardíaca, a qual consistia em uma ventriculomegalia. Resultado este divergente do encontrado em nosso estudo.

Cabe ressaltar que possivelmente não foi identificada alteração no número de sondas do cromossomo 14 devido à quebra ter ocorrido no braço curto.

Ao comparar os defeitos cardíacos apresentados pelos casos com alteração genômica, foi observado que os defeitos de septo do tipo CIA e CIV foi o mais comum, estando presente em portadores das trissomias dos cromossomos 13, 16, 18 e 21, além do caso de duplicação de 11q25 e na monossomia de X em mosaico. Dados publicados

por Chung e Rajakumar (2016) demonstraram que as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21 são comumente relacionadas às alterações de septo atrioventricular e as monossomias do cromossomo X ao desenvolvimento de coarctação da aorta, também revelado em nosso estudo.

No entanto, quando analisadas as alterações genômicas encontradas em cada um dos cinco grupos de tipos de defeitos cardíacos foi constatado que os defeitos de câmaras, grandes vasos e valvas apresentaram igual frequência, ou seja, cada um dos grupos apresentou seis alterações associadas. Além disso, embora a trissomia do cromossomo 21 seja caracterizada pela presença de defeitos de septo, essa foi a única alteração genômica a apresentar defeito de posição (Plaiasu, 2017).

6.1. Influência da qualidade do DNA na execução das técnicas citogenômicas

Outro ponto importante analisado foi a qualidade do DNA obtido dessas amostras tendo em vista que já é bem descrito na literatura que tanto o processo natural da morte celular como o uso de fixadores é responsável pela degradação dos ácidos nucleicos (Specht et al., 2001). Neste aspecto, nosso estudo revelou que apesar das médias dos valores de concentração das amostras formolizadas serem o dobro das amostras frescas e seus valores de pureza serem mais próximos ao valor considerado ideal, essas amostras apresentaram alto grau de degradação na eletroforese em gel de agarose. Isso ocorreu devido ao fato da quantificação por espectrofotometria ser incapaz de diferenciar, durante a mensuração da concentração, a amostra íntegra da amostra degradada. Além disso, também foi observado que todas as amostras de natimortos apresentavam um alto grau de degradação e que as amostras de tecido cardíaco foram mais suscetíveis a degradação, quando comparado as amostras de pele.

Tendo em vista os fatores acima apontados e a alta sensibilidade da técnica de MLPA (Willis et al, 2012), foi mensurada a taxa de sucesso da obtenção de resultados nas amostras submetidas as técnicas de MLPA e marcador microssatélite. A maioria das amostras investigadas pelos seis *kits* de MLPA, formolizadas e frescas, apresentaram média de resultados viáveis para análise ($\geq 53\%$). No entanto, a maior taxa de sucesso de análise foi encontrada em amostras frescas submetidas aos *kits* P095 e P311, sendo a viabilidade média de 76% e 82%, respectivamente. Provavelmente, esse resultado se deva ao fato desses *kits* contemplarem um maior número de sondas localizadas no

mesmo gene e pela maior estabilidade das regiões estudadas. Já para a técnica de marcador microssatélite o valor médio de eficiência foi de 90,33%, de modo que esta alta taxa provavelmente esteja associada ao fato desses marcadores consistirem em pequenas sequências repetitivas presentes em regiões mais estáveis do cromossomo. A única desvantagem da técnica de marcador utilizada, quando comparada a MLPA, se refere ao custo da reação.

É importante salientar que a realização da MLPA utilizando o *kit* P095 e de microssatélite utilizando os oito marcadores autossômicos e um sexual é de grande valia para a realização de um “*screening*” inicial de aneuploidias em amostras que não apresentam hipótese clínica, a qual se faz importante dado que essas alterações estão frequentemente associadas às MCC sindrômicas (Landis; Ware, 2016). Isso se dá devido a grande dificuldade da realização do cariótipo convencional a partir de amostras *post-mortem* e pelo fato dessas técnicas apresentarem uma maior viabilidade de interpretação dos resultados, quando comparadas ao *array*, ocasionada pelo alto grau de degradação dessas amostras.

Em suma, a investigação citogenômica em amostras *post-mortem* é de difícil execução devido a qualidade do DNA obtido nesse tipo de amostra. Porém, nesse estudo foi demonstrado que as técnicas de marcador microssatélite e de MLPA, principalmente utilizando os *kits* de aneuploidias e malformações cardíacas, são eficientes na identificação de CNVs nesse tipo de amostra. Além disso, estas técnicas são importantes para a realização do “*screening*” de aneuploidias em malformados cardíacos. Ainda que muitas variantes gênicas patológicas sejam descritas como responsável pelo desenvolvimento de cardiopatias, em muitos casos essa alteração se dá não pela alteração de um único gene, mas pela alteração de um conjunto gênico. Assim, acredita-se que o processo de desenvolvimento cardíaco seja controlado pelo sistema de modificadores genéticos e genes “dose-sensível”, localizados no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes, que quando em desequilíbrio acabam resultando na malformação cardíaca (Azhar; Ware, 2016).

7. CONCLUSÕES

- Embora a utilização de conservantes de amostra como formoldeído e o tempo prolongado entre o óbito e a coleta de tecido estejam associados à obtenção de DNA altamente degradado, as técnicas de MLPA e microssatélite comprovaram ser eficientes na detecção de CNVs em amostras *post-mortem*.
- Dos 52 casos estudados, 21 (40,4%) apresentaram CNVs associadas à malformação cardíaca.
- As aneuploidias: trissomia parcial de 11, trissomia do cromossomo 13, trissomia do 16, trissomia do 18, trissomia do 21 e monossomia do X em mosaico (células com Y); assim como a deleção de 4p16 está fortemente associadas ao desenvolvimento de malformações cardíacas.
- A trissomia do cromossomo 21 foi a única alteração cromossômica a apresentar cardiopatias classificadas nos cinco grupos de tipos de defeitos cardíacos.
- Os defeitos de septo consistem nos defeitos cardíacos mais frequentes, independente da presença de alteração gênica.
- Além disso, os resultados encontrados sugerem a presença de mosaico intratecidual em apenas um caso estudado, sendo encontradas as mesmas CNVs nos diferentes tecidos investigados.

8. ANEXOS

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos *kits* P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continua).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	Comparação entre os kits					Síndrome / alteração associada		
						P036-E2	P064 - C1	P070-B2	P095 - A3	P250-B2		P311-B1	
1	1p13.1	TRIM45	445	117465104	117465191						X	ND	
	1p36	PEX10	315	2331696	2331754		X					Sd. de del de 1p36.	
	1p36.33	ACTRT2	136	2928350	2928410		X					Sd. de Del de 1p36. Imunodeficiência.	
		TNFRSF4 exon 3	404	1138225	1138276		X						
		TNFRSF4	130	1137299	1137363	X							
2	1q44	TNFRSF18	306	1129416	1129488			X				Sd. de del de 1p36.	
		GABRD	148	1949449	1949511		X					ND	
		SH3BP5L	307	247075309	247075380	X							
		SH3BP5L exon 5	132	247077648	247077710			X					
		2p24.1	APOB exon 6	292	21113531	21113588						X	Isquemia cardíaca e cerebrovascular.
	2p25.3	ACP1 up	136	252450	252520	X						ND	
	2q37.3	ACP1	315	267097	267173			X					Hiperoxalúria primária tipo 1. Diabetes. ND
		AGXT	369	241463109	241463169							X	
		CAPN10	313	241178951	241179022	X							
		ATG4B	139	242247199	242247270			X					
3p25.3		CRELD1	136	9954272	9954333						X	Sd. de heterotaxia, defeito de septo AV.	
3p26.3	CRELD1 exon 10	400	9960577	9960640							X	Sd. de del de 3p-	
	CHL1 exon 5	142	344888	344961	X								
	CHL1	323	336381	336454			X						
	BDH1	322	198757687	198757752	X								ND
	KIAA0226	145	198883877	198883950			X						Ataxia espinocerebelar.
4	4p16.3	PIGG exon 7	151	504891	504969	X						Deficiência intelectual.	
		PIGG	329	505735	505807			X					Sd. de Wolf-Hirschhorn.
		TACC3	453	1700130	1700202		X						
		WHSC1 exon 5	199	1872456	1872525		X						
		WHSC1 exon 9	445	1902200	1902274		X						
	WHSC1 exon 25	238	1950156	1950230		X						Rins policísticos. Sd. Velocardiofacial like.	
	4q22.1	PKD2	418	89215716	89215767								X
	4q35.1	SLC25A4	326	186303263	186303335								X

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos *kits* P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continuação).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	Comparação entre os kits					Síndrome / alteração associada		
						P036-E2	P064 - C1	P070-B2	P095 - A3	P250-B2		P311-B1	
4	4q35.2	TRIML2	330	189262981	189263053	X						ND	
		FRG1	152	191099071	191099141			X					
5	5p15	TERT exon 13	364	1311706	1311769		X					Sd. de Cri Du Chat.	
		TERT exon 2	268	1346495	1346564		X						
		CLPTM1L	251	1391037	1391097		X						
		IRX4	372	1931281	1931344		X						
		CTNND2	413	11785304	11785369		X						
		PDCD6	158	367567	367640	X							ND
	5p15.33	CCDC127	337	258919	258993			X				MCC e hipotireoidismo	
		IL4	124	132037610	132037671						X		
		NKX2-5 exon 1	190	172594315	172594375						X		
		NKX2-5 exon 2	427	172592674	172592731								
		GNB2L1	337	180597753	180597825	X							ND
		GNB2L1	160	180601812	180601884			X					Sd. de Sotos.
NSD1 exon 2	264	176493894	176493966		X								
	6p25.3	NSD1 exon 15	232	176619619	176619683		X					Pigmentação do olho, pele e cabelo.	
		NSD1 exon 24	181	176654366	176654433		X						
		IRF4	166	338177	338242	X							ND
		IRF4	346	339901	339971			X					
		PSMB1	346	170688255	170688327	X							Ataxia espinocerebelar e Parkinson. Deficiência de GH. Sd. de Saethre-Chotzen.
		TBP	166	170707891	170707964			X					
7	7p14.3	GHRHR	409	30977299	30977367							ND	
		TWIST1	355	19123766	19123828		X						
		TWIST1	256	19125427	19125497		X						
		ADAP1	172	926130	926193	X							
		SUN1	355	844978	845042				X				
		ELN exon 4	388	73090003	73090066		X						
ELN exon 6	339	73094914	73094972		X								
	7q36.3	ELN exon 27	469	73115357	73115423		X					ND	
		VIPR2	172	158627924	158627991				X				

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos *kits* P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continuação).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	Comparação entre os kits					Síndrome / alteração associada	
						P036-E2	P064 - C1	P070-B2	P095 - A3	P250-B2		P311-B1
8	8p23.1	CTSB	130	11742608	11742669						X	MCC.
		GATA4 exon1	148	11599219	11599282						X	
	8p23.1	GATA4 exon 3	337	11643810	11643880						X	
		GATA4 exon 4	355	11645120	11645178							
		GATA4 exon 5	141	11650000	11650073						X	
		GATA4 exon 6	238	11651883	11651942						X	
		GATA4 exon 7	202	11653269	11653337					X		
		GATA4 exon 7	274	11653542	11653609					X		
	8p23.3	GATA4 up	229	11592208	11592281						X	
		GATA4 up	362	11590729	11590793						X	
		MSRA	427	10102752	10102819					X		ND
		PPP1R3B	472	9036240	9036313					X		ND
		FBXO25	362	398391	398466			X				
		FBXO25	179	403076	403141	X						Sd. da Tricorinofalangio. Sd. de Langer-Giedion.
8q24.12	TRPS1	226	116700557	116700630		X						
	EIF3H	130	117837051	117837121		X						
	EXT1	274	118918440	118918506		X						
	8q24.3	ZC3H3	361	144692300	144692367	X						ND
		RECQL4	179	145708631	145708695			X				Sd. de Rothmund-Thompson, Sd. de Baller-Gerold, Sd. de Rapadilino.
	9	9p24.3	DMRT1	186	837054	837117	X					
DOCK8			370	376335	376404			X				Sd. de Hiper IgE.
9q34.3		EHMT1 exon 24	372	139830278	139830335	X						
		EHMT1 exon 17	154	139805146	139805210					X		MC, epilepsia e deficiência intelectual. MC, epilepsia e DI.
		EHMT1 exon 2	136	139731001	139731062					X		
		EHMT1	186	139776962	139777023			X				
10	10p12.31	NEBL	487	21226273	21226342					X		MCC, CMD.
	10p14	GATA3 exon 6	301	8155803	8155870					X		Sd. de HDR.
		GATA3 exon 3	267	8140560	8140624					X		
		região TCFB1P3	350	10588971	10589047					X		ND

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos *kits* P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continuação).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	Comparação entre os kits					Síndrome / alteração associada	
						P036-E2	P064 - C1	P070-B2	P095 - A3	P250-B2		P311-B1
10	10p14	região CELF2	364	11017023	11017090					X		ND
		CELF2 exon 4	382	11247522	11247596					X		
	10p15.3	DIP2C	193	476820	476884	X						ND
		ZMYND11	379	215989	216058			X				Deficiência intelectual.
	10q26.3	PAOX	379	135045088	135045154	X						ND
		ECHS1	193	135026355	135026422			X				Deficiência da cadeia curta de enoil-CoA mitocondrial
11	11p13	FSHB	170	30212266	30212330		X					Sd. de WAGR.
		DCDC1	175	31285887	31285951		X					
		PAX6	159	31789032	31789103		X					
	11p15.5	BET1L	387	195448	195520			X				ND
	11q25	NCAPD3	386	133595730	133595797	X						ND
12		IGSF9B	202	133292680	133292754			X				ND
	12p13.31	VWF	154	5996188	5996260						X	Doença de von Willebrand
	12p13.33	SLC6A12	208	169603	169674	X						ND
		KDM5A	393	286991	287064			X				ND
	12q24.21	TBX5 exon 8	160	113288495	113288559						X	Sd. de Holt-Oram. MCC e MM.
13		TBX5 exon 1	166	113330078	113330148						X	
		TBX5 exon 9	174	113278178	113278248						X	
		TBX5 exon 2	184	113325990	113326051						X	
		TBX5 exon 3	195	113324047	113324108						X	
		TBX5 exon 5	346	113320759	113320822						X	
	12q24.33	ZNF10 exon 5	395	132243516	132243586	X						ND
		ZNF10	211	132242375	132242452			X				
	13q12.11	PSPC1 exon 2	219	19244553	19244622	X						ND
		PSPC1	402	19254548	19254619			X				
	13q13.1	BRCA2	355	31828619	31828685				X			Sd. de Patau. Câncer de pulmão e mama.
		CCNA1	178	35914315	35914385				X			Sd. de Patau.
	13q14.2	DLEU1	400	49576840	49576904				X			
		RB1	220	47952212	47952267				X			
13q21.33	DACH1	265	71153962	71154035				X				

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos kits P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continuação).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	Comparação entre os kits					Síndrome / alteração associada	
						P036-E2	P064 - C1	P070-B2	P095 - A3	P250-B2		P311-B1
13	13q32.1	ABCC4	148	94525703	94525764				X			Sd. de Patau.
	13q34	ARHGEF7	310	110755885	110755955				X			Deficiência do fator VII de coagulação. Sd. de Patau.
		F7	402	112817975	112818043	X						
		ING1	445	110169589	110169650				X			
14	14q11.2	CDC16	218	114027450	114027519			X				ND
		CCNB1IP1	227	19863569	19863642	X						ND
	PARP2	409	19895643	19895709			X				ND	
	14q22.2	BMP4	391	53487305	53487374						X	MCC, malformação de palato orofacial e microftalmia.
		BMP4 exon 2	436	53490885	53490945						X	
	15	14q32.33	BMP4 exon 4	454	53488631	53488700						X
MTA1 exon 8			411	104995681	104995746	X						
MTA1		226	104991619	104991689			X					
15q11.2		SNRPN exon u5	396	22716791	22716857		X					Sd. de Prader-Willi / Angelman.
		SNRPN SRO	219	22750781	22750852		X					
		MKRN3	235	21362818	21362879	X						
	UBE3A exon 14	346	23135402	23135477		X						
16	16p13.3	UBE3A exon 5b	287	23201527	23201599		X					Microftalmia.
		NDN	418	21482490	21482551			X				
	15q26.3	ALDH1A3	418	99264898	99264971	X						ND
		TM2D3	233	100007800	100007870			X				
	16p13.3	POLR3K	242	43278	43345	X						Sd. de Rubinstein-Taybi.
		CREBBP exon 31	141	3717675	3717743		X					
CREBBP exon 3		298	3800566	3800638		X						
DECR2		427	402228	402289			X					
17	16q24.3	GAS8 exon 6	426	88630416	88630484	X						ND
		GAS8	241	88637622	88637685			X				
	17p11.2	RA1 exon 1	244	17525905	17525962		X					Câncer de pulmão e próstata.
		RA1 exon 3	421	17636976	17637039		X					
	17p13.3	RA1 exon 6	165	17654897	17654968		X					Sd. de Smith-Magenis.
		TOM1L2	193	17816505	17816575		X					
		PFAFAH1B1 exon 1	187	2443762	2443818		X					Região de Miller-Dieker.

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos *kits* P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continuação).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	Comparação entre os kits					Síndrome / alteração associada		
						P036-E2	P064 - C1	P070-B2	P095 - A3	P250-B2		P311-B1	
17	17p13.3	PFAFAH1B1 exon 2	323	2488280	2488352		X					Região de Miller-Dieker.	
		PFAFAH1B1 exon 11	292	2531787	2531857		X						
		RPH3AL	250	169259	169330	X							
		RPH3AL exon 2	434	183588	183659					X			
		RPH3AL	436	183588	183659				X				
		RPH3AL exon 6	255	169259	169330				X				
		METTL16	436	2361823	2361890		X						
		YWHAЕ	391	1211255	1211325				X				
		GEMIN4	409	596607	596671								
		BRIP1 exon 4	215	57289231	57289300					X			
18	17q25.3	TBCD	434	78451828	78451896	X						ND	
		SECTM1	250	77874063	77874127			X					ND
		LPIN2	472	2950707	2950770	X							Sd. de Edwards. Lipodistrofia humana.
		USP14	258	186695	186767								Sd de Edwards. Tremores e paralisia MI.
		TYMS	301	662881	662947					X			Sd. de Edwards.
		THOC1	444	204731	204801			X					Sd. de Edwards.
		MC2R	436	13874728	13874796					X			
		SS18	211	21891578	21891641					X			
		SS18	391	21873281	21873344					X			
		SMAD4	142	46827449	46827521					X			
19	18q21.32	PMAIP1	172	55720855	55720902					X			
		SERPINB2	346	59713531	59713594					X			
		NFATC1	255	75328472	75328535					X			
		CTDP1	258	75575783	75575851						X		
		RBFA	441	75899526	75899599	X							
		CDC34	265	492438	492506	X							ND
		PPAP2C	451	232437	232498					X			ND
		CHMP2A exon 6	450	63754814	63754869	X							ND
		CHMP2A	265	63755470	63755537						X		ND
		JAG1 exon 21	281	10571164	10571225						X		Sd. de Alagille-Watson.
20	20p12.2	JAG1 exon 1	483	10602274	10602343								

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos *kits* P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continuação).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	P036-E2	P064 - C1	Comparação entre os kits			P311-B1	Síndrome / alteração associada
20	20p13	SOX12	274	255053	255112	X						ND
		ZCCHC3	459	226979	227046							ND
	20q13.33	OPRL1	458	62194517	62194598	X		X				Neurocomportamental.
		UCKL1	274	62046371	62046438			X				ND
21	21q11.2	HSPA13	247	14675469	14675536				X			Sd. de Down.
		HSPA13	466	14675469	14675536			X				
		RBM11	283	14510394	14510467	X						
	21q21.1	USP25	202	16172591	16172654				X			
		NCAM2	166	21726306	21726376				X			
	21q21.3	APP	337	26191764	26191825				X			
		TIAM1	427	31425072	31425138				X			
	21q22.11	SOD1	291	31961449	31961523				X			
		SIM2	136	37043875	37043945				X			
	21q22.3	PRMT2	466	46887914	46887971	X						
		TFF1	382	42659616	42659687			X				
	22q11.1	S100B	281	46846658	46846729				X			
		IL17RA	479	15959666	15959739				X			Sd. do olho de gato.
		IL17RA exon 4	335	15959666	15959739					X		
22	22q11.21	ZNF74 exon 2	202	19079428	19079495					X		Sd. de del de 22q - LCR - B.
		ZNF74, região BC	211	19079428	19079495		X					Sd. de del de 22q.
		SNAP30	380	19565377	19565455		X					
		SNAP29 exon 5	373	19572014	19572084					X		Sd. de del de 22q - LCR - D.
		CLTCL1, região AB	205	17621597	17621661			X				Sd. de del de 22q.
		CLTCL1 exon 3	191	17621597	17621661					X		Sd. de del de 22q - LCR - A.
		CLDN5	196	17891318	17891378					X		
		CDC45, região AB	476	17847478	17847540		X				X	
		CDC45 exon 1	466	17847478	17847540							
	22q11.21	CDC45 exon 1	466	17847478	17847540							
		GNB1L, região AB	331	18156405	18156463		X					Sd. de del de 22q.
		DGCR8, região AB	154	18453612	18453678		X					Sd. de del de 22q.

ANEXO A – Tabela informativa das sondas de MLPA presentes nos *kits* P036, P064, P070, P095, P250 e P311 (Continuação).

Cromossomo	Localização	Sonda	Tamanho (nt)	Start	End	Comparação entre os kits					Síndrome / alteração associada	
						P036-E2	P064 - C1	P070-B2	P095 - A3	P250-B2		P311-B1
22	22q11.21	MED15, região BC	461	19266745	19266813		X					Sd. de del de 22q.
		MED15 exon 10	316	19266745	19266813					X		Sd. de del de 22q - LCR - C.
		HIRA	160	17699015	17699079					X		Sd. de del de 22q - LCR - A.
		BID	289	16606684	16606759	X						Sd. de del de 22q.
		PPIL2	129	20379682	20379748					X		Sd. de del de 22q - LCR - D.
		SLC25A18	142	16423313	16423380					X		Sd. do olho de gato.
		GPIBB exon 2	208	18091521	18091580					X		Sd. de del de 22q - LCR - A.
		GPIBB exon 2	208	18091521	18091580						X	Sd. de del de 22q - LCR - A.
		DGCR8 exon 2	148	18453612	18453678					X		Sd. de del de 22q - LCR - A.
		USP18	226	17012924	17012985					X		Sd. de Pseudo-TORCH
	22q11.22	DGCR8 exon 14	382	18477850	18477911						X	Sd. de del de 22q.
		TBX1 exon 2	172	18127111	18127178					X		Sd. de del de 22q - LCR - A.
		LZTR1	418	19679191	19679261					X		Sd. de del de 22q - LCR - D.
		KLHL22	283	19173307	19173367					X		Sd. de del de 22q - LCR - C.
		RTDR1	261	21734047	21734115					X		Sd. de del de 22q - LCR - F.
		TXNRD2	238	18266225	18266285					X		Sd. de del de 22q - LCR - A.
		HIC2	308	20129442	20129511					X		Sd. de del de 22q - LCR - E.
		MICAL3	178	16704656	16704728					X		Sd. do olho de gato.
		BID	357	16606684	16606759					X		Sd. do olho de gato.
		TOP3B	292	20652996	20653065					X		Sd. de del de 22q - LCR - E.
	22q11.23	GNAZ	214	21795392	21795456					X		
		RAB36	342	21817561	21817617					X		Sd. de del de 22q - LCR - F.
		RTDR1	454	21812539	21812602					X		
		SNRPD3	166	23283701	23283765					X		
		SMARCB1 exon 9	400	22506362	22506429					X		Sd. de del de 22q - LCR - H.
		SMARCB1	220	22459370	22459434					X		Sd. de del de 22q - LCR - G.
22q13	SHANK3	428	49491410	49491470		X						
	ARSA	306	49413270	49413327		X					Sd. de Phelan-McDermid.	
22q13.33	ARSA	290	49413270	49413327			X					
	ARSA exon 1	445	49413270	49413327					X			
	RABL2B	475	49553070	49553142	X						ND	

ANEXO B – Tabela informativa dos marcadores microsatélites.

Cromossomo	Região cromossômica	Locus	Tamanho do produto (nt)	Alelos incluídos no ladder de alelos	Dye label	Control DNA 007
2	2q35-37.1	D2S1338	-183	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.	VIC®	20, 23
4	4q28	FGA	-87	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	PET®	24, 26
5	5q33.3-34	CSF1PO	-201	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	PET®	11, 12
7	7q11.21-22	D7S820	-129	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15.	6-FAM™	7, 12
13	13q22-31	D13S317	-99	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15.	6-FAM™	11
16	16q24-qter	D16S539	-157	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	NED™	9, 10
18	18q21.3	D18S51	-168	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	NED™	12, 15
21	21q11.2-q21	D21S11	-33	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	VIC®	28, 31
X	Xp22.1-22.3	Amelogenina	0	X	VIC®	X
Y	Yp11.2		0	Y	VIC®	Y

ANEXO C – Classificação do tipo de alteração cardíaca apresentada pelos 52 pacientes estudados de acordo com os grupos de defeitos de septo, grandes vasos, câmaras, posição e outros (Continua).

Defeito de septo	Defeito de valva	Defeito de câmaras	Defeito de grandes vasos	Defeito de posição	Outros
▫ CIA;	▫ Valva aórtica bicúspide;	▫ Hipertrofia de ventrículo direito;	▫ Cavalgamento da aorta;	▫ Prolapso;	▫ Isomerismo;
▫ CIV;	▫ atresia de valva pulmonar;	▫ dilatação do átrio direito;	▫ persistência do canal arterial;	▫ dextrocardia.	▫ endocardiofibrose;
▫ CAV;	▫ atresia mitral;	▫ hipoplasia de ventrículo esquerdo;	▫ canal arterial amplo;		▫ fibroelastose.
▫ forame oval patente	▫ insuficiência de valvas;	▫ displasia de câmaras.	▫ artéria pulmonar anterior;		
	▫ insuficiência de valva tricúspide;	▫ cardiomegalia;	▫ aorta posterior;		
	▫ valva pulmonar bicúspide;	▫ assimetria de câmara;	▫ drenagem anômala das veias pulmonares		
	▫ valva aórtica imperfurada;	▫ dilatação do ventrículo direito;	▫ CoA;		
	▫ valvas aórticas bicúspide;	▫ ventrículo direito espesso;	▫ duplo arco aórtico;		
	▫ atresia da valva aórtica;	▫ dilatação importante do átrio esquerdo	▫ dupla via de saída da veia cava		
	▫ estenose mitral;	▫ dilatação do ventrículo esquerdo;	▫ ectasia da aorta ascendente;		
	▫ tricúspide espessa.	▫ dilatação de câmara direita;	▫ hipoplasia de arco aórtico.		
		▫ dilatação de câmaras;	▫ estenose pulmonar;		
		▫ hipoplasia do coração esquerdo.	▫ arco da aorta bem diminuído;		

ANEXO C – Classificação do tipo de alteração cardíaca apresentada pelos 52 pacientes estudados de acordo com os grupos de defeitos de septo, grandes vasos, câmaras, posição e outros (Conclusão).

Defeito de septo	Defeito de valva	Defeito de câmaras	Defeito de grandes vasos	Defeito de posição	Outros
	<ul style="list-style-type: none"> ▫ dupla via de saída do ventrículo direito; ▫ dilatação do átrio esquerdo. 	<ul style="list-style-type: none"> ▫ dilatação das artérias pulmonares; ▫ hipoplasia de vasos pulmonares; ▫ artéria pulmonar pequena; ▫ dupla via de saída do ventrículo direito ▫ transposição de grandes vasos; ▫ hipoplasia da aorta ascendente; ▫ hipoplasia do arco transverso da aorta. 			

9. REFERÊNCIAS

- Acharya G, Sitras V, Maltau JM, Dahl LB, Kaaresen PI, Hanssen TA, Lunde P. Major congenital heart disease in Northern Norway: shortcomings of pre and postnatal diagnosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*.2004;83(12):1124-9.
- Alabdulgader A. Extra Cardiac Anomalies (ECA) in 2020 subjects with congenital cardiovascular malformation (CCVM) and control: Etiological Perspective. *J. Med Sci*. 2012;12(2):29-36.
- Amorin LF, Pires CA, Lana AM, Campos AS, Aguiar RA, Tibúrcio JD, Siqueira AL, Mota CC, Aguiar MJ. Presentation of congenital heart disease diagnosed at birth: analysis of 29,770 newborn infants. *JPediatr*. 2008;84(1):83-90.
- Azamian M, Lalani SR. Cytogenomic Aberrations in Congenital Cardiovascular Malformations. *Molecular Syndromology*. 2016; 7(2):51-61.
- Azeka E, Jatene MB, Jatene IB, Horowitz ES, Branco KC, Souza Neto JD, Miura N et al. I Diretriz de Insuficiência Cardíaca (IC) e Transplante Cardíaco, no Feto, na Criança e em Adultos com Cardiopatia Congênita, da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2014 dez.;103(6):144p.
- Azhar M, Ware SM. Genetic and Development Basis of Cardiovascular Malformations. *Clin. Perinatol*. 2016;43(1):39-53.
- Bose D, Krishnamurthy V, Venkatesh KS, Aiyaz M, Shetty M, Rao SN, Kutty AV. Molecular Delineation of Partial Trisomy 14q and Partial Trisomy 12p in a Patient with Dysmorphic Features, Heart Defect and Developmental Delay. *Cytogenet Genome Res*. 2015;145(1):14–18.
- Campos CMR, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigação da variação do número de cópias gênicas em crianças com defeito cardíaco conotruncal. *Arq Bras Cardiol*. 2015 Jan;104(1):24-31. doi: 10.5935/abc.20140169.
- Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature Genetics*. 2007;39(7 Suppl):S16-S21.
- Chaix MA, Alderfinger G, Khairy P. Genetic testing in congenital heart disease: A clinical Approach. *World J Cardiol*. 2016 February 26;8(2):180-191.
- Chareonsirisuthigul T. Intrauterine Growth Retardation Fetus with Trisomy 16 Mosaicism. Publishing Corporation Case Reports in Genetics Volume. Hindawi. 2014; Article ID 739513,3 p. doi <http://dx.doi.org/10.1155/2014/739513>.
- Chen C, Chen M, Wu CH, Lin CJ, Chern SR, Wu PS, Chen YN, Chen SW, Chang SP, Chen LF, Wang W. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of mosaicism for a small supernumerary marker chromosome derived from

chromosome 21q11.2-q21.1 and a literature review. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017 Aug;56(4):554-557. doi: 10.1016/j.tjog.2017.06.004.

Chen CP, Chen CY, Chern SR et al. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a denovo 4.858-Mb microdeletion in 15q14 associated with ACTC1 and MEIS2 haploinsufficiency and tetralogy of Fallot. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2016;55(2):270-274.

Chen R, Li C, Xie B, Wang J, Fan X, Luo J, Hu X, Chen S, Shen Y. Clinical and molecular evaluations of siblings with “pure” 11q23.3-qter trisomy or reciprocal monosomy due to a familial translocation t(10;11)(q26;q23.3). *Molecular Cytogenetics*. 2014;7(101):2-7.

Chung M, Rajakumar G. Genetics of Congenital Heart Defects: The NKX2-5 Gene, a Key Player. *Genes*. 2016;7(2):6. doi:10.3390/genes7020006

Clancy S. Copy number variation. *Nature Education*. 2008;1(1):95.

Connolly JJ, Glessner JT, Almoguera B, Crosslin DR, Jarvik GP, Sleiman PM, Hakonarson H. Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts. *Frontiers in Genetics*. 2014 March;5(51):1-8.

Costello JP, Weiderhold A, Louis C, Shaughnessy C, Peer SM, Zurakowski D, Jonas RA, Nath DS. A Contemporary, Single-Institutional Experience of Surgical Versus Expectant Management of Congenital Heart Disease in Trisomy 13 and 18 Patients. *Pediatr. Cardiol*. 2015;36(5):987-992.

Culley M, Black BL. Transcription Factor Pathways and Congenital Heart Disease. *Curr.Top.Dev.Biol*. 2012;100:253-277.

Dias AT, Zanardo ÉA, Dutra RL, Piazzon FB, Novo-Filho GM, Montenegro MM, Nascimento AM, Rocha M, Madia FA, Costa TV, Milani C, Schultz R, Gonçalves FT, Fridman C, Yamamoto GL, Bertola DR, Kim CA, Kulikowski LD. Post-mortem cytogenomic investigations in patients with congenital malformations. *Exp. Mol. Pathology*. 2016 Aug;101(1):116-123.

Diogenes TCP, Mourato FA, de Lima Filho JL, Mattos SDS. Gender differences in the prevalence of congenital heart disease in Down's syndrome: a brief meta-analysis. *BMC Medical Genetics*. 2017;18:111. doi 10.1186/s12881-017-0475-7.

Dordoni C, Ciaccio C, Santoro G, Venturini M, Cavallari U, Ritelli M, Colombi M. Marfan Syndrome: Report of a Complex Phenotype Due to a 15q21.1 Contiguous Gene Deletion Encompassing FBN1, and Literature Review. *American Journal of Medical Genetics*. 2016;173(1):200-206.

Eggert M, Müller S, Heinrich U, Mehraein Y. A new familial case of microdeletion syndrome 10p15.3. *European Journal of Medical Genetics*. 2016;(59):179-182.

EUROCAT (*European Surveillance of Congenital Anomalies*). Instructions for the Registration of Congenital Anomalies Issued: University of Ulster, Northern Ireland, UK. 2002 Jan; 45 p. Disponível em: <http://www.eurocat-network.eu/content/EUROCAT-Guide-1.2.pdf>

Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of Congenital Heart Disease: The glass half empty. *Circulation Research*.2013; 112(4): 707-720.

Finsterer J, Panny M. Facial diplegia as initial manifestation of acute, myelomonocytic leukemia with isolated trisomy 47, XY,+11[14]/46, XY[6]. *Journal of Neuroscience in Rural Practice*.2017;8(3):451-454.

Geng J, Picker J, Zheng Z, Zhang X, Wang J, Hisama F, et al. Chromosome microarray testing for patients with congenital heart defects reveals novel disease causing loci and high diagnostic yield. *BMC Genomics*. 2014;15:1127.

Gilboa SM, Salemi JL, Nembhard W N, Fixler DE, Correa A. Mortality resulting from congenital heart disease among children and adults in the United States, 1999 to 2006. *Circulation*.2010;122:2254–2263.

Glessner JT, Li J, Hakonarson H. ParseCNV integrative copy number variation association software with quality tracking. *Nucleic Acids Res*.2013;41(5):e64.

Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy J, Rodriguez-Murillo L, Fromer M et al. Increased Frequency of “*de novo*” copy number variation in Congenital Heart Disease by integrative analysis of SNP array and exome sequence data. *Circulation Research*. 2014;115(10):884-896.

Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation*. 2001;104(21):2565–2568.

Harel T, Lupski JR. Genomic disorders 20 years on – mechanisms for clinical manifestations. *Clinical Genetics*. 2018;93(3):439-449.

He D, Liu Z, Chen L. Identification of dysfunctional modules and disease genes in congenital heart disease by a network-based approach. *BMC Genomics*. 2011, 12:592.

Hume H, Chansen S. Trends in timing of prenatal diagnosis and abortion for fetal chromosomal abnormalities. *American Journal of Obstetrics & Gynecology Supplement*. 2015 Oct.:(4):545.e1-4. doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.008.

Hunter LE, Simpson JM. Prenatal screening for structural congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(6):323–334.

Kadalayil L, Rafiq S, Rose-Zerilli MJJ, Pengelly RJ, Parker H, Oscier D et al. Exome sequence read depth methods for identifying copy number changes. *Briefings in Bioinformatics* . 2014;16(3):380-392.

Kasparis C, Loffeld A. Childhood acne in a boy with XYY syndrome. *BMJ Case Rep.* 2014. Published online: [10/27/2017]doi:10.1136/bcr-2013-201587.

Keane KF. Nadas's Pediatric Cardiology. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2006.

Kosiv KA, Gosset JM, Bai S, Collins II RT. Congenital Heart Surgery on In-Hospital Mortality in Trisomy 13 and 18. *Pediatrics.* 2017;140(5):e20170772.

Landis B J, Ware SM. The Current Landscape of Genetic Testing in Cardiovascular Malformations: Opportunities and Challenges. *Frontiers in Cardiovascular Medicine.* 2006;3:22.

Lei TY, Li R, Fu F, Wan JH, Zhang YL, Jing XY, Liao C. Prenatal diagnosis of Smith-Magenis syndrome in two fetuses with increased nuchal translucency, mild lateral ventriculomegaly, and congenital heart defects. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2016;55(6):886-890.

Li CJ, Lin CY, Chen CH, Zhou B, Chang CP. Partitioning the heart: mechanisms of cardiac septation and valve development. *Development.* 2012;139(18):3277-3299. doi:10.1242/dev.063495.

Mansuet-Lupo A, Henke J, Henke L, Blank C, Ernsting A, Kozlowski P, Rouger P, Van Huffel V. A paternity case with three genetic incompatibilities between father and child due to maternal uniparental disomy 21 and a mutation at the Y chromosome. *Forensic Science International: Genetics.* 2009;3(2):141–143.

Marqui ABT, da Silva-Grecco RL, Balarin MA. Prevalência de sequências do Y e de gonadoblastoma em síndrome de Turner. *Revista Paulista de Pediatria.* March 2016;34(1):114–121

Martínez-Quintana E, Rodríguez-González F. Clinical features in adult patient with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Morphologie.* 2014;98(321):86-89.

Matsuo Y, Drexler HG, Nishizaki C, Harashima A, Fukuda S, Kozuka T, Sezaki T, Orita K. Human bone marrow stroma – dependent cell line MOLP-5 derived from a patient in leukaemic phase of multiple myeloma. *British Journal of Haematology.* 2000;109(1):54-63.

MCR-Holland. MLPA. Disponível em: www.mlpa.com/webforms. Acessado em: 19/09/2014.

Mendes CQS, Avena MJ, Mandetta MA, Balieiro MMFG. Prevalência de nascidos vivos com anomalias congênitas no município de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Enferm. Ped.* 2015;15(1):7-12.

Mishra R, Paththinige CS, Sirisena ND, Nanayakkara S, Kariyawasam UGIU, Dissanayake VHW. Partial trisomy 16q21→qter due to an unbalanced segregation of a maternally inherited balanced translocation 46,XX,t(15;16)(p13;q21): a case report and review literature. *BMC Pediatrics.* 2018.18(1):2-7.

Monteiro RAC, de Freitas ML, Vianna GS, de Oliveira VT, Pietra RX, Ferreira LCA et al. Major contribution of genomic copy number variation in syndromic congenital heart disease: The use of MLPA as the first genetic test. *Molecular Syndromology*.2017;8(5):227-235.

Moorman A, Webb S, Brown NA. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*. 2003; 89:806 – 814. Adriano Zuza, Alcir Fernandes. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016:267-303.

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim. Acessado em: 22/09/2014.

Pavone P, Praticò AD, Campisi C, Falsaperla R. A mild phenotype associated with a de novo microdeletion 10q23.1-q23.2: a new patient with a novel feature. *BMJ Case Rep*. 2016. Published online: [10/27/2017] doi:10.1136/bcr-2016-214388.

Peng R, Xie HN, Zheng J, Zhou Y, Lin MF. Fetal right aortic arch: associated anomalies, genetic anomalies with chromosomal microarray analysis, and postnatal outcome. *Prenatal Diagnosis*. 2017, 37(4):329–335.

Pierpont ME, Basson CT, Benson DW Jr, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E et al. American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2007;115(23):3015–3038.

Plaiasu V. Down Syndrome: Genetics and Cardiogenetics. *Maedica – a Journal of Clinical Medicine*. 2017;12(3):208-213.

Pompa JL, Epstein JA. Coordinating Tissue Interactions: NOTCH signaling in Cardiac Development and Disease. *Developmental Cell*, 2012 Feb.;22(2):244-54.

Probst FJ, James RA, Burrage LC, Rosenfeld JA, Bohan TP, Ward Melver CH et al. De novo deletions and duplications of 17q25.3 cause susceptibility to cardiovascular malformations. *Orphanet Journal of Rare Disease*.2015:10-75.

Ratan ZA, Zaman SB, Mehta V, Haidere MF, Runa NJ, Akter N. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus*. 2017 Jun; 9(6): e1325.

Reller MD, Strickland MJ, Riehle-Colarusso T, Mahle WT, Correa A. Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta, 1998–2005. *Journal Pediatr*. 2008;153(6):807–813.

Rosa RCM, Rosa RFM, Zen PRG, Paskulin GA. Cardiopatias Congênitas e Malformações Extracardíacas. *Revista Paul. Pediatría*.2013;31(2):243-251.

Satpathy M, Mishra BR. Clinical Diagnosis of Congenital Heart Disease. JP Medical. 2015.

Schoenwolf GC. Larsen Embriologia Humana. Coord. Cristiano Carvalho Coutinho; tradução Adriano Zuza, Alcir Fernandes. 5 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016:267-303.

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

Slavotinek A, Risolino M, Losa M, Cho MT, Monaghan KG, Schneidman-Duhovny D, Parisotto S et al. De novo, deleterious sequence variants that alter the transcriptional activity of the homeoprotein PBX1 are associated with intellectual disability and pleiotropic developmental defects. Hum Mol Genet. 2017 Sep;26(24):4849-4860. doi: 10.1093/hmg/ddx363.

Smith T, Rajakaruna C, Caputo M, Emanueli C. MicroRNAs in congenital heart disease. Ann Transl Med. 2015;3(21):333.

Specht K, Richter T, Müller U, Walch A, Werner M, Höfler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. Am. J. Pathol. 2001; 158(2):419-429.

Srivastava D, Olson EN. A genetic blue print for cardiac development. Nature. 2000;407(6801):221-226.

Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From lineage determination to morphogenesis. Cell. 2006;126(6):1037-1048.

Tang M, Yang YF, Xie L, Chen JL, Zhang WZ, Wang J, Zhao TL, Yang JF, Tan ZP. Duplication of 10q22.3–q23.3 Encompassing BMPRI1 and NGR3 Associated with Congenital Heart Disease, Microcephaly, and Mild Intellectual Disability. Am J Med Genet Part A. 2014;167A(12):3174–3179.

Tennant PW, Pearce MS, Bythell M, Rankin J. 20-year survival of children born with congenital anomalies: A population-based study. Lancet. 2010;375(9715):649-656.

Van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg J, Roos-Hesselink JW. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol. 2011;58(21):2241–2247.

Van Karnebeek CD, Hennekam RC. Associations between chromosomal anomalies and congenital heart defects: a database search. Am J Med Genet. 1999;84(2):158–166.

Verheugt CL, Uiterwaal CS, van der Velde ET, Meijboom FJ, Pieper PG, Vliegen HW, van Dijk AP, Bouma BJ, Grobbee DE, Mulder BJ. Gender and outcome in adult congenital heart disease. Circulation. 2008;118(1):26-32.

von Elten K, Sawyer T, Lentz-Kapua S, Kanis A, Studer M. A Case of Wolf-Hirschhorn Syndrome and Hypoplastic Left Heart Syndrome. *Pediatr Cardiol.* 2013;34(5):1244–1246. doi 10.1007/s00246-012-0367-8.

Vorstman JA, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum. Mutant.* 2006;27(8):814-821.

Warbuton D, Ronemus M, Kline J, Jobanputra V, Williams I, Anyane-Yeboah K, Chung W *et al.* The contribution of de novo and rare inherited copy number changes to congenital heart disease in an unselected sample of children with conotruncal defects or hypoplastic left heart. *Hum Genet.* 2014;133(1):11–27

Willis AS, van der Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 2012; 32(4):315–320.

Yang Y Q, Li L, Wang J, Liu XY, Chen XZ, Zhang W, Wang XZ, Jiang JQ, Liu X, Fang WY. A novel GATA4 loss-of-function mutation associated with congenital ventricular septal defect. *Pediatr Cardiol.* 2012;33(4):539–546. doi:10.1007/s00246-011-0146-y.

Yelavarthi KK, Zunich J. Familial interstitial duplication of 11q; partial trisomy (11)(q13.5q21). *Am. J. Med. Genet. A.* 2004;126A(4):423-426. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20610>.

Yoon JG, Shin S, Jung JW, Lee ST, Choi JR. An 18.3-Mb Duplication on Chromosome 14q With Multiple Cardiac Anomalies and Clubfoot Was Identified by Microarray Analysis. *Ann Lab Med.* 2016;36(2):194-196. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2016.36.2.194>.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Aprovação do Comitê de Pesquisa e Ética.

FACULDADE DE MEDICINA
da Universidade de São Paulo

Departamento de Pediatria

PROJETO DE PESQUISA

Título: "ESTUDOS DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS GÊNICAS (CNVS) EM AMOSTRAS POST-MORTEM OBTIDAS DE PORTADORES DE MALFORMAÇÕES CARDÍACAS CONGÊNITAS SINDRÔMICAS (MCCS)". De autoria: **Leslie Domenici Kulikowski e Fabrícia Andreia Rosa Madia**

PARECER C.P.E. Nº.: 1211/01/2015

Orientações ao Relator da Comissão de Pesquisa

O relator da Comissão de Pesquisa, ao receber o Projeto de Pesquisa, deverá proceder às seguintes análises:

- Analisar o Projeto do ponto de vista metodológico
- Apresentar o Relatório na Reunião da Comissão de Pesquisa e Ética

RELATOR DA COMISSÃO DE PESQUISA:	
▪ Análise Metodológica: <i>O trabalho acima apresenta todos os pontos de um trabalho original. Introdução objetiva, metodologia e resultados da pesquisa. Referências do próprio laboratório e partes de outros autores e citações de outros trabalhos de outros autores.</i>	
☐ DEVOLUÇÃO AO AUTOR	☒ APROVADO
☐ APROVADO COM EXIGÊNCIAS	
Data: ____/____/20____	Data: <u>26</u> / <u>1</u> /20 <u>15</u>
Assinatura e Carimbo do Relator:	Assinatura e carimbo do Relator:
<div style="text-align: center;"> Prof. Uenis Tancredi Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética Departamento de Pediatria - FMUSP</div>	
APROVAÇÃO CPE:	
Data: <u>28</u> / <u>1</u> /20 <u>15</u>	

APROVADO PELO CONSELHO DO
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA FMUSP
EM 06/02/15

Prof.^a Sandra Josefine Ferraz Ellero Grisi
Chefe
Departamento de Pediatria FMUSP

APÊNDICE B – Produção científica durante o curso de Mestrado.

ARTIGOS PUBLICADOS

1. Zanardo EA; Dutra RL; Piazzon FB; Dias AT; Novo-Filho GM ; Nascimento AM ; Montenegro MM ; Damasceno JG ; **Madia FA** ; Costa TV ; Melaragno MI ; Kim CA ; Kulikowski LD . Cytogenomic assessment of the diagnosis of 93 patients with developmental delay and multiple congenital abnormalities: The Brazilian experience. Clinics, v. 72, p. 526-537, 2017.
2. Dias AT; Zanardo EA; Dutra, RL; Piazzon, FB; Novo-Filho, GM; Montenegro, MM; Nascimento, AM; Rocha M; **Madia FAR**; Costa, TTVMM; Milano C; Schultz R; Gonçalves FT; Fridman C; Yamamoto GL; Bertola DR; Kim CA; Kulikowski LD. Post-mortem cytogenomic investigations in patients with congenital malformations. Experimental and Molecular Pathology, v. 101, p. 116-123, 2016.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. Lin L; Fushida K; Hase E; Schultz R; Tenorio L; **Madia F**; Zanardo EA; Kulikowski L; Francisco RPV. Gestational tubal choriocarcinoma presenting as a pregnancy of unknown location following ovarian induction. Obstetrics and Gynecology.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

1. **Madia FAR**; Dias AT; Zanardo EA; Damasceno JG; Rocha M; Nascimento A.M; Costa TVMM; Chehimi SN; Novo-Filho GM; Montenegro MM; Oliveira, YG; Schultz R; Gonçalves FT; Fridman C; Kim CA; Kulikowski LD. Post-mortem cytogenomic study of Brazilian patients reveals the CNVs connection to complex heart defects.. In: American Society of Human Genetics 67th Annual Meeting., 2017, Orlando.. American Society of Human Genetics Annual Meeting.. Bethesda.: The American Society of Human Genetics., 2017. v. 67.
2. **Madia FAR**; Dias AT; Zanardo EA; Costa TVMM; Damasceno JG; Nascimento AM; Goncalves FT; Fridman C; Schultz R; Kulikowski LD.

Genomic basis of congenital heart defects: a prospective study in 44 cases post-mortem.. In: XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica., 2017, Bento Gonçalves.. XXIX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2017. v. 29.

3. **Madia, FAR;** Milani C; Dias AT; Zanardo EA; Damasceno JG; Rocha M; Nascimento AM; Costa TVMM; Novo-Filho GM; Montenegro MM; Amorin A F; Oliveira YG; Chung CH; Goncalves FT; Fridman C; Kim CA; Schultz R; Kulikowski LD . Identification of pathogenics CNVs in congenital heart defects by molecular autopsy.. In: 62° Congresso Brasileiro de Genética, 2016, Caxambu - SP. 62° Congresso Brasileiro de Genética, 2016.
4. **Madia FAR;** Dias AT; Rocha M; Zanardo EA; Costa TVMM; Damasceno JG; Milani C; Amorin AF; Nascimento AM; Novo-Filho GM; Montenegro MM; Oliveira YG; Goncalves FT; Fridman C; Kim CA; Schultz R; Kulikowski LD. Uncovering Copy Number Variants (CNVs) In Degraded Post-Mortem Samples Of Carriers Of Congenital Heart Disease (CHD). In: American Society of Human Genetics 65th Annual Meeting, 2016, Vancouver. American Society of Human Genetics 65th Annual Meeting, 2016. v. 65.
5. **Madia FAR;** Milani C; Dias AT; Zanardo EA; Damasceno JG; Rocha M; Nascimento AM; Costa TVMM; Novo-Filho GM; Montenegro MM; Amorin A F; Oliveira YG; Chung CH; Ceroni JRM; Schultz R; Goncalves FT; Fridman C; Kim CA; Kulikowski LD. Molecular autopsy: a potential tool to identify pathogenic CNVs in cardiac heart defects.. In: ESHG 2016, 2016, Barcelona. European Journal of Human Genetics, 2016. v. 24. p. 121.
6. **Madia FAR;** Dias AT; Toscano MP; Schultz R; Rocha M; Nascimento AM; Zanardo EA; Costa TVMM; Milani C; Amorin AF; Novo-Filho GM; Montenegro MM; Oliveira YG; Soares DCQ; Goncalves FT; Fridman C; Kim CA; Kulikowski LD. Molecular autopsy reveals Y chromosome mosaicism in a case of Turner's syndrome. In: 4ª Reunião Brasileira de Citogenética, 2015, Atibaia-SP.. 4ª Reunião Brasileira de Citogenética, 2015.

APÊNDICE C - Comprovante de submissão do artigo desenvolvido a partir dos dados completos dessa dissertação.

APÊNDICE D – Primeira folha do manuscrito submetido desenvolvido a partir dos dados completos dessa dissertação (Continua).

International Journal of Legal Medicine
Molecular autopsy of syndromic congenital heart disease in stillbirths and infants
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	IJLM-D-18-00148	
Full Title:	Molecular autopsy of syndromic congenital heart disease in stillbirths and infants	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Fabrícia Andréia Rosa Madia, Specialist Universidade de Sao Paulo Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Fabrícia Andréia Rosa Madia, Master's degree student	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Fabrícia Andréia Rosa Madia, Master's degree student Alexandre Torchio Dias, Philosophiae doctor Évelin Aline Zanardo, PhD. student Julian Gabriel Damasceno, PhD. student Mariana Rocha, Master science Thaís Virginia Moura Machado Costa, PhD. student Samar Nasser Chehimi, Master's degree student Amom Mendes Nascimento, Master's degree student Gil Monteiro Novo-Filho, PhD. student Marília Moreira Montenegro, Philosophiae doctor Yanca Gasparini Oliveira, Bacharel Fernanda Toledo Gonçalves, Philosophiae doctor Cintia Fridman, Philosophiae doctor Regina Schultz, Philosophiae doctor Chong Ae Kim, Professor Leslie Domenici Kulikowski, Principal investigator	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	São Paulo Research Foundation (FAPESP) (09/53105-9) MCT/FINEP-CT-INFRA (01/2011-SP08)	Ph.D. Leslie Domenici Kulikowski Ph.D. Leslie Domenici Kulikowski
Abstract:	Congenital heart defects (CHD) are the most common birth defects and represent an important cause of morbidity and mortality in stillbirth and infants. Recently, studies using cytogenomic tests have enabled an improved understanding of the causes of syndromic CHD, can be able to a important tool in molecular autopsy. The aims of this study were to analyze relevant copy number variations (CNVs) in postmortem samples and to study the role of these genomic alterations in the pathogenesis of CHD. A total of 49 stillbirth and infant cases from the Death Verification Service - FMUSP, were	

APÊNDICE D – Primeira folha do manuscrito submetido desenvolvido a partir dos dados completos dessa dissertação (Conclusão).

	<p>investigated. DNA samples from skin, diaphragma and heart tissues were evaluated using cytogenomic techniques, including microsatellite marker analyses, MLPA and FISH. The results showed relevant CNVs in 19 cases, including trisomy 18 (10 cases), trisomy 21 (4 cases), trisomy 13 (2 cases), mosaic monosomy X (1 case), dup 4p16 (1 case) and dup 11q25 (1 case). Additionally, this study found a strong association between these genomic alterations and atrial and ventricular septal defects. Additionally, our study was demonstrated that the molecular autopsy, using microsatellite marker and MLPA, are efficient in the identification of CNVs in the process of cardiac pathogenesis.</p>
Author Comments:	<p>To: H. Pfeiffer, Th. Bajanowski Editors in chief International Journal of Legal Medicine</p> <p>March 24th, 2018.</p> <p>Dear Editors,</p> <p>I am a young scientist and I refer to the clinical research article "Molecular autopsy of syndromic congenital heart disease in stillbirths and infants", which we would like to publish in the International Journal of Legal Medicine.</p> <p>This study investigated the CNV by cytogenetic methods in post-mortem samples, appearing as an innovative aspect in the diagnosis of syndromic form of Congenital Heart Defects (CHD), as well as providing relevant information for the pathogenesis of CHD.</p> <p>Sincerely yours,</p> <p>Fabírcia</p> <p>Fabírcia Andréia R. Madia Cytogenomics Laboratory, Department of Pathology University of São Paulo Dr. Enéas de Carvalho Aguiar Avenue, 155, 2nd floor, block 12, room 7. São Paulo, SP, Brazil - Phone/fax: +55 11 26619506 e-mail: famadia@usp.com</p>
Suggested Reviewers:	<p>Estela Azeka, PhD Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clínicas Instituto do Coração estela_azeka9@hotmail.com She was published a several papers in congenital heart disease.</p> <p>Marcília Grassi Medical, Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clínicas Instituto da Criança marcilia.grassi@hc.fm.usp.br Doc Marcília has clinical knowledge and cytogenetic diagnosis in CHD</p>

APÊNDICE E – Comprovante de aceitação de artigo (coautoria).

Dear Dr. Lin,

The review process of Case Report 4705192 titled "Gestational tubal choriocarcinoma presenting as a pregnancy of unknown location following ovarian induction" by Lawrence Lin, Koji Fushida, Eliane Hase, Regina Schultz, Laysa Tenorio, Fabricia Madia, Évelin Aline Zanardo, Leslie Kulikowski and Rossana Pulcineli Vieira Francisco submitted to Case Reports in Obstetrics and Gynecology has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/4705192/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to Case Reports in Obstetrics and Gynecology.

Best regards,

Erich Cosmi
ecosmi@hotmail.com