

Análise de Teste Genético e de Desfecho da Gestação de 362 Fetos com Cardiopatia Congênita Identificados por Ultrassom Pré-Natal

Genetic Testing and Pregnancy Outcome Analysis of 362 Fetuses with Congenital Heart Disease Identified by Prenatal Ultrasound

Shiyu Luo, Dahua Meng, Qifei Li, Xuehua Hu, Yuhua Chen, Chun He, Bobo Xie, Shangyang She, Yingfeng Li, Chunyun Fu

Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region,¹ Guangxi - China

Resumo

Fundamento: As cardiopatias congênitas (CCs) são as anomalias congênitas mais comuns, e têm sido associadas a anormalidades cromossômicas. Atualmente, a cariotipagem e a análise cromossômica por microarray (CMA) são oferecidas rotineiramente aos pacientes, mas a relação genótipo-fenótipo ainda não foi totalmente estabelecida.

Objetivo: Determinar o tipo e a frequência das anomalias cromossômicas em fetos com CC e analisar os desfechos da gestação de fetos com anormalidades cardíacas causadas por diferentes fatores genéticos.

Métodos: No total, foram admitidos 362 casos de CC entre 2009 e 2016. Ultrassonografia e exames laboratoriais detalhados foram realizados, incluindo cariotipagem e CMA. O resultado foi obtido a partir das folhas de epícrise.

Resultados: Dos 362 fetos, 220 apresentaram doença coronariana isolada e 142 apresentaram doença coronariana com anomalia extracardíaca. Entre esses 362 fetos, foram identificados 140 com causa genética, incluindo 111 casos com aneuploidia, 10 casos com anormalidade da estrutura cromossômica por cariotipagem e 19 casos com variações no número de cópias (CNVs) patogênicas ou provavelmente patogênicas por CMA. A taxa de detecção é de aproximadamente 38,7%. Apenas um (identificado como síndrome da trissomia do cromossomo 18) em 140 casos positivos resultou em morte perinatal, com as demais sendo induzidas. Os 222 casos restantes tiveram resultados negativos para ambos os testes genéticos e, destes, 56 resultaram em trabalho de parto induzido e 77 tiveram partos naturais ou cesarianas. O desfecho da gravidez dos 89 casos restantes foi incerto.

Conclusões: A cariotipagem e a CMA são técnicas genéticas pré-natais eficazes e precisas para a identificação de anomalias cromossômicas fetais associadas a defeitos cardíacos, e isso pode ajudar os médicos a realizar aconselhamento genético adequado com relação à etiologia e ao desfecho das cardiopatias congênitas. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(4):571-577)

Palavras-chave: Cardiopatias Congênitas; Transtornos Cromossômicos; Cariotipagem Espectral; Gravidez; Feto; Ultrassonografia.

Abstract

Background: Congenital heart defects (CHD), as the most common congenital anomaly, have been reported to be associated with chromosomal abnormalities. Currently, patients with CHD are routinely offered karyotyping and chromosomal microarray (CMA) testing, but the genotype-phenotype relationship has not yet been fully established.

Objective: To determine the type and frequency of chromosomal abnormalities in fetuses with CHD and to analyze pregnancy outcomes of fetuses with heart abnormalities caused by different genetic factors.

Methods: A total of 362 cases of CHD were enrolled from 2009 to 2016. Detailed ultrasound and laboratory examinations, including karyotyping and CMA, were performed. Outcome was obtained from discharge summaries.

Results: Of the 362 fetuses, 220 were found with an isolated CHD, and 142 had CHD with extracardiac anomaly. Among these 362 fetuses, 140 were identified with a genetic cause, including 111 cases with aneuploidy, 10 cases with abnormality of chromosomal structure by karyotyping and 19 cases with pathogenic or likely pathogenic copy-number variations (CNVs) by CMA. The detection rate is close to 38.7%. Only one (identified as trisomy 18 syndrome) in 140 positive cases resulted in perinatal death, with the others being induced. The remaining 222 cases had negative results for both genetic testing and of these cases, 56 resulted in induced labor, and 77 had natural childbirth or caesarean births. The pregnancy outcome of the remaining 89 cases was uncertain.

Conclusions: Karyotyping and CMA are effective and accurate prenatal genetic techniques for identifying fetal chromosomal abnormalities associated with cardiac defects, and this can assist clinical doctors to perform appropriate genetic counselling with regard to the etiology and outcome of CHD. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(4):571-577)

Keywords: Heart Defects, Congenital; Chromosome Disorders; Spectral Karyotyping; Pregnancy; Fetus; Ultrasonography.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Chunyun Fu •

Nº. 59 Xiangzhu Road, Nanning, Guangxi - China

E-mail: fuchunyun2008@sina.com, 948178849@qq.com

Artigo recebido em 16/07/2017, revisado em 11/04/2018, aceito em 11/04/2018

DOI: 10.5935/abc.20180144

Introdução

A cardiopatia congênita (DCC) é um dos defeitos congênitos mais comuns, afetando aproximadamente 1 em cada 100 nascidos vivos.¹⁻³ Com a disponibilidade de técnicas cirúrgicas avançadas, é possível restaurar a função cardíaca normal ou quase normal após tratamento cirúrgico da maioria dos tipos de CC, de simples comunicações interventriculares (VSD) a anormalidades cardiovasculares mais complexas. No entanto, o prognóstico a longo prazo de um número pequeno, mas significativo, de fetos com CC costuma ser complicado por anormalidades extracardíacas graves, como atraso no desenvolvimento e deficiência mental. Há cada vez mais evidências de que fatores genéticos influenciam o desenvolvimento da maioria dos tipos de CC,⁴⁻⁶ mas a base genética precisa da maioria dos casos de CC ainda não é totalmente compreendida. As tecnologias atuais de ultrassom são capazes de detectar a maioria das CCs, mas é difícil para os médicos fazerem uma avaliação abrangente dos fetos com CC com base apenas na evidência da ultrassonografia pré-natal, também dificultando o gerenciamento do curso da gravidez já estabelecida.⁷ Por isso, o teste genético agora é altamente recomendado para fetos com CC.

A cariotipagem tem sido o principal método de diagnóstico para detectar anormalidades cromossômicas associadas a CCs.⁸ Nos casos de diagnóstico pré-natal de CC, estima-se que existam até 22 anomalias cromossômicas.^{9,10} Hoje, a análise cromossômica por microarray (CMA) tornou-se a primeira escolha em casos de anomalias estruturais fetais detectadas por ultrassonografia.^{11,12} O advento da tecnologia da CMA permitiu a busca por deleções ou duplicações cromossômicas submicroscópicas em todo o genoma, conhecidas como variações do número de cópias (CNVs). A CNV é uma forma de variação estrutural no genoma: especificamente, é um tipo de duplicação ou deleção que influencia nos pares de bases,¹³ desempenhando também um papel importante na geração de variações necessárias nos fenótipos de populações e de doenças.¹⁴ Estudos recentes demonstraram que foram detectadas CNVs patogênicas em uma proporção considerável dos pacientes com CC,^{15,16} e foram encontrados múltiplos locos recorrentes de CNV em pacientes com CCs síndromicas ou isoladas, como 22q11.2 (região da síndrome de DiGeorge), 7q11.23, 8p23.1, 9q34.3, e 1q21.1.¹⁷⁻¹⁹

Até o momento, apenas alguns estudos relataram testes genéticos em grandes grupos de fetos com CC na China,²⁰⁻²⁴ e a relação genótipo-fenótipo ainda não foi totalmente estabelecida. O Laboratório de Genética e Metabolismo do Hospital de Saúde Materna e Infantil de Guangxi é um dos maiores centros de diagnóstico perinatal no sul da China. Este estudo teve como objetivo analisar as anormalidades cromossômicas e os desfechos da gravidez em 362 fetos com CC.

Métodos

Sujeitos

Exames de anatomia fetal por ultrassonografia foram realizados rotineiramente em gestantes no Centro de Diagnóstico Pré-natal da Região Autônoma de Guangxi Zhuang, na China. Os exames de anatomia foram realizados entre 20 e 28 semanas de gestação por ultrassonografistas experientes,

utilizando máquinas de ultrassom GE E8 (General Electric Healthcare, EUA). Em caso de suspeita de CC, o ecocardiograma era realizado posteriormente para confirmação.

Foram feitos testes para a identificação de defeitos cardíacos fetais em um total de 8.430 gestações entre junho de 2012 e junho de 2016, e 362 fetos com CC foram identificados. O Comitê de Ética Médica do Hospital de Saúde Materno-Infantil de Guangxi aprovou o protocolo do estudo (Aprovação nº. 160220), e os pais de todos os fetos com CC selecionados deram seu consentimento por escrito.

Teste por SNP microarray

Todas as amostras de líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical foram coletadas das mulheres grávidas, e o DNA genômico foi extraído utilizando o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. O teste por SNP microarray (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) foi realizado utilizando o Illumina HumanCytoSNP-12 v2.1 BeadChip (Illumina, EUA). A política laboratorial no momento do teste era a de não relatar polimorfismos bem estabelecidos, CNVs que não continham genes e CNVs menores que 0,20 Mb. No entanto, trechos de homozigose maiores que 10 Mb eram relatados.

Cariotipagem

Todas as amostras de líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical foram usadas para realizar o bandeamento G de acordo com o procedimento padrão, conforme descrito anteriormente.²⁵

Resultados

Dados clínicos

Entre as 8.430 gestações, 362 casos de CC foram diagnosticados por meio de ecocardiografia fetal, com frequência de 4,2%. A idade média das gestantes foi de $31,1 \pm 5,1$ anos, e a idade gestacional média do diagnóstico foi de $24,4 \pm 3,8$ semanas.

Os 5 tipos mais comuns de CC foram, em ordem, comunicação interventricular (51,9%, 188/362), persistência da veia cava superior esquerda (13,0%, 47/362), defeitos do coxim endocárdico (0,9%, 33/362), artéria umbilical única (0,9%, 32/362) e arco aórtico do lado direito (0,8%, 29/362).

Etiologia

No total, 362 fetos foram diagnosticados com CC. Os testes genéticos encontraram 111 casos com aneuploidia, 10 casos com anormalidade na estrutura dos cromossomos e 19 casos com CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas (Tabela 1). Os 222 casos restantes não apresentaram achados genéticos anormais. As anormalidades do número de cromossomos consistiram de: síndrome da trissomia do cromossomo 18 (61 casos), síndrome da trissomia do cromossomo 21 (31 casos) e síndrome da trissomia do cromossomo 13 (19 casos). A CMA identificou 19 CNVs, incluindo síndrome de DiGeorge (8 casos), síndrome de Jacobsen (2 casos), síndrome de Angelman/

Tabela 1 – Testes genéticos realizados em 362 fetos com cardiopatia congênita

Etiologia	Classificação	Números
Aneuploidia (111, 30,7%)	Trissomia 18	61
	Trissomia 21	31
	Trissomia 13	19
	46,X,i(X)(q10)	1
	46,der(18)dup(18)(q11q22)del(18)(q22q23)	1
	46,XY,r(13)(p13q34)	1
	46,XY,der(21;21)(q10;q10),+21	1
	46,XX,der(9)t(9;18)(p22;q21)mat	1
	46,XY,del(10)(q11q22)dn	1
	46,XY,6q-dn	1
Anormalidade da estrutura dos cromossomos (10, 2,8%)	46,XY,der(18)t(7;18)(q22;q23)mat	1
	46,XX,del(5)(p13)	1
	46,XY,der(5)t(5;12)(p13;p12)mat	1
	15q13.2q13.3(30940398-32515681)x1	1
	arr16p11.2(29614976-30199805)x1~2	1
	arr16q21q24.3(63,863,382-90,130,136)x2~3	1
	arr1q21.1q21.2(146,501,348-147,828,939)x1	1
	arr3q21.1q29(123031042-198022430)x2~3	1
	arr22q11.21(18877787-21458625)x1	1
	arr22q11.21(18889490-21460220)x1	1
	arr22q11.21(18895703-21928916)x1	1
	arr22q11.21(18844632-21462353)x1	1
	arr11q24.1q25(123615329-1349444006)x1	1
	arr10q26.13q26.3(126254468-135430043)x3, arr11q24.1q25(122805910-134944006)x1	1
	arr10p15.1p12.31(6085312-21544231)x1	1
	arr5q11.2q12.1(56368573-61428613)x1	1
	arr21q11.2q21.1(14687571-18341062)x1	1
	arr22q11.21(21050552-21811991)x1	1
	arr22q11.21(20740778-21445064)x1	1
arr22q11.21(18895703-21452237)x1	1	
arr11q23.3q25(116728277-134944006)x3, arr22q11.1q11.21(16079545-20306993)x3	1	
arr5p15.33p15.1(354051-17484038)x1, 5q34q35.3(165731079-180705539)x3	1	

CNVs: variações no número de cópias.

Prader-Willi (1 caso), síndrome de microdeleção 16p11.2-p12.2 (1 caso), síndrome de triplicação 16q24 (1 caso), síndrome de Trombocitopenia e Ausência de Rádio (TAR) (1 caso), síndrome de microduplicação 3q29 (1 caso), síndrome de duplicação 22q11 (1 caso), síndrome de Cri-du-Chat (1 caso) e 2 CNVs patogênicas (Tabela 2).

Ocorrência de malformações cardíacas fetais

Das 362 CC, foram observadas malformações cardíacas únicas em 181 fetos, e 181 apresentaram múltiplas anormalidades cardíacas; 220 apresentaram uma CC isolada, e

142 apresentavam CC com anomalia extracardíaca. A Tabela 3 lista a etiologia dos vários tipos de malformações cardíacas fetais observadas.

Desfechos da Gravidez

Entre os 140 casos com resultados positivos nos testes genéticos, apenas uma mulher optou por continuar a gravidez, e o restante optou por induzir o parto. O feto foi diagnosticado com síndrome da trissomia do cromossomo 18, apresentando dificuldades na alimentação, e morreu 4 dias após o nascimento. Entre os 222 casos negativos restantes,

Tabela 2 – Variações no número de cópias (CNVs) em 362 fetos com cardiopatia congênita (CC)

Paciente	Defeito cardíaco	Defeito extracardíaco	CNVs	Tamanho (Mb)	Síndrome conhecida/próxima genes relacionados à CC	Classificação
1	persistência da veia cava superior esquerda	Retardo de crescimento intrauterino	15q13.2q13.3(30940398-32515681)x1	10,0	Síndrome de Angelman/Prader-Willi	patogênica
2	persistência da veia cava superior esquerda, artéria umbilical única		arr16p11.2(29614976-30199805)x1-2	0,5	Síndrome de microdeleção 16p11.2-p12.2	patogênica
3	estenose pulmonar		arr16q21q24.3(63.863.382-90.130.136)x2-3	26,3	Síndrome de triplicação 16q24	patogênica
4	defeito do coxim endocárdico do tipo completo		arr1q21.1q21.2(146.501.348-147.828.939)x1	1,3	Síndrome de Trombocitopenia e Ausência de Rádío (TAR)	patogênica
5	comunicação interventricular	Membros curtos	arr3q21.1q29(123031042-198022430)x2-3	75,0	Síndrome de microduplicação 3q29	patogênica
6	tetralogia de Fallot		arr22q11.21(18877787-21458625)x1	2,6	Síndrome de DiGeorge	patogênica
7	tetralogia de Fallot		arr22q11.21(18889490-21460220)x1	2,6	Síndrome de DiGeorge	patogênica
8	arco aórtico direito, persistência da veia cava superior esquerda		arr22q11.21(18895703-21928916)x1	3,0	Síndrome de DiGeorge	patogênica
9	tetralogia de Fallot, válvula pulmonar ausente		arr22q11.21(18844632-21462353)x1	2,6	Síndrome de DiGeorge	patogênica
10	artéria umbilical única		arr11q24.1q25(123615329-1349444006)x1	11,3	Síndrome de Jacobsen	patogênica
11	defeito do coxim endocárdico, átrio único		arr10q26.13q26.3(126254468-135430043)x3, arr11q24.1q25(122805910-134944006)x1	9,2; 12,1	Síndrome de Jacobsen	patogênica
12	comunicação interatrial		arr10p15.1p12.3(16085312-21544231)x1	15	CACNB2	provavelmente patogênica
13	comunicação interventricular		arr5q11.2q12.1(56388573-61428613)x1	5,1		provavelmente patogênica
14	comunicação interventricular, comunicação interatrial		arr21q11.2q21.1(14687571-18341062)x1	3,7	Síndrome de DiGeorge	patogênica
15	comunicação interventricular	Higroma cístico fetal	arr22q11.21(21050552-21811991)x1	0,7	Síndrome de DiGeorge	patogênica
16	comunicação interventricular		arr22q11.21(20740778-21445064)x1	0,7	Síndrome de DiGeorge	patogênica
17	tetralogia de Fallot, hipoplasia línica	Retardo de crescimento intrauterino	arr22q11.21(18895703-21452237)x1	2,6	Síndrome de DiGeorge	patogênica
18	estenose pulmonar, coarctação aórtica, comunicação interventricular		arr11q23.3q25(116728277-134944006)x3, arr22q11.1q11.21(16079545-20306993)x3	18	Síndrome de duplicação 22q11	patogênica
19	comunicação interventricular, hipoplasia do coração esquerdo	Retardo de crescimento intrauterino	arr5p15.3p15.1(354051-17484038)x1,5q34q35.3(165731079-180705539)x3	17,1; 15,0	Síndrome de Cri-du-Chat	patogênica

Tabela 3 – Detecção genética em diferentes categorias de fetos com cardiopatia congênita (CC)

Classificação da CC	Aneuploidia	Anormalidade da estrutura dos cromossomos	CNVs	Outros
Malformação cardíaca única (n = 181)	40	4	9	128
Múltiplas anormalidades cardíacas (n = 181)	71	6	10	94
CC isolada (n = 220)	26	8	14	172
CC com anomalia extracardíaca (n = 142)	85	2	5	50

CNVs: variações no número de cópias.

56 foram submetidos à indução do parto, e a maioria desses casos foi considerada incurável ou apresentava malformações cardíacas com prognósticos desfavoráveis (incluindo ventrículo único, displasia ventricular esquerda ou direita e tetralogia de Fallot) ou complicadas por anomalias extracardíacas (Figura 1).

As mães de 77 fetos com malformações cardíacas leves ou curáveis optaram por manter a gravidez. Destes casos, 66 foram encontrados sem anormalidade após o nascimento, 8 casos necessitaram de cirurgia, um apresentou atraso no desenvolvimento, um foi encontrado com pé torto, um foi identificado com hipomiotonia e os desfechos da gravidez dos 89 casos restantes foram incertos (Figura 1).

Discussão

Neste estudo, 362 casos de cardiopatia congênita fetal foram identificados em um total de 8.430 gestações em um único hospital materno-infantil da região sul da China, de junho de 2012 a junho de 2016, com uma incidência de 4,2%. Esta incidência foi semelhante à relatada em Xi'an, no noroeste da China,²⁶ e superior à taxa de 2,3% relatada em Guangzhou, no sul da China.²³ Entre os 362 fetos com CC, a comunicação interventricular (51,9%, 188/362) e a persistente da veia cava superior esquerda (13,0%, 47/362) foram as anormalidades cardíacas mais prevalentes detectadas por ultrassonografia.

Muitos fatores, como fatores genéticos (incluindo anomalias cromossômicas e mutações genéticas) e fatores de risco associados às mães (incluindo o vírus da rubéola, outras infecções, radiação, uso de drogas e poluição ambiental) estão associados à CC.^{5-7,27-29} No entanto, as causas da maioria dos tipos de CC ainda são pouco compreendidas. Em nosso estudo, 140 dos 362 fetos com CC apresentaram anormalidades cromossômicas clinicamente significativas por cariotipagem e CMA, com uma taxa de detecção de até 38,7%. As taxas positivas dos testes genéticos neste estudo são muito maiores do que as dos relatórios anteriores em Chongqing, China²⁴ e Holanda.³⁰ Essa taxa é semelhante à dos brasileiros.³¹

Entre as 140 anormalidades cromossômicas, 111 (79,3%) eram aneuploidias, das quais a trissomia do cromossomo 18 era a mais comum; 10 casos (7,1%) foram de anormalidade da estrutura cromossômica; e 19 casos (13,6%) foram CNV patogênicos ou provavelmente patogênicos. Sugere-se que a aneuploidia é a principal causa genética de fetos com CC em nossa população. Dado que o bandeamento G só pode detectar com segurança anormalidades estruturais > 10 Mb de tamanho, 11 CNVs patogênicos podem não ser identificadas por cariotipagem, mas detectadas pela CMA. Com base

nesse fator, é possível estimar que o rendimento incremental de CNVs reportáveis com menos de 10 Mb alcançado pela CMA foi de 3,0%.

Malformações cardíacas múltiplas complexas têm prognóstico desfavorável e afetam fortemente a qualidade de vida dos bebês sobreviventes, mas casos como tetralogia de Fallot leve têm um resultado razoável após cirurgia, e um bom prognóstico. No presente estudo, os resultados ultrassônicos de alguns fetos com CC causada por aneuploidia mostraram apenas malformações cardíacas leves, embora CCs complexas combinadas com defeitos extracardíacos tenham sido mais comuns nesses casos. Além disso, alguns sintomas, como a deficiência mental, não podem ser verificados pela ultrassonografia pré-natal. Nestes casos, os resultados do teste genético são de grande importância, porque esta situação é facilmente ignorada pelos pacientes e médicos. No entanto, vários casos negativos apresentaram CC complexa e defeitos extracardíacos após o cariótipo e o teste de CMA, e esses casos fornecem uma pista importante para o estudo de outros fatores que levam à CC.

Várias limitações no estudo devem ser consideradas ao revisar seus achados. Primeiramente, não foi realizada uma análise abrangente de todos os genes associados a CCs conhecidas. Em segundo lugar, não foi identificada a hereditariedade de CNVs em alguns casos com patogenicidade provável.

Conclusão

Foram realizadas a cariotipagem e a análise de CMA em 362 fetos com CCs, e verificou-se que 38,7% dos fetos com CCs tiveram resultado positivo nos testes genéticos. A aneuploidia é a principal causa de fetos com CC na nossa população. A combinação da detecção ultrassônica e dos testes genéticos pode diagnosticar efetivamente fetos com malformações cardíacas e defeitos extracardíacos, fornecendo informações valiosas ao médico e aos pacientes.

Agradecimentos

Os autores agradecem às famílias por sua participação neste estudo.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Fu C; Obtenção de dados: Meng D, Hu X, Xie B; Análise e interpretação dos dados: Luo S, Li, Q, Chen Y, He C, Xie B, She S, Li Y;

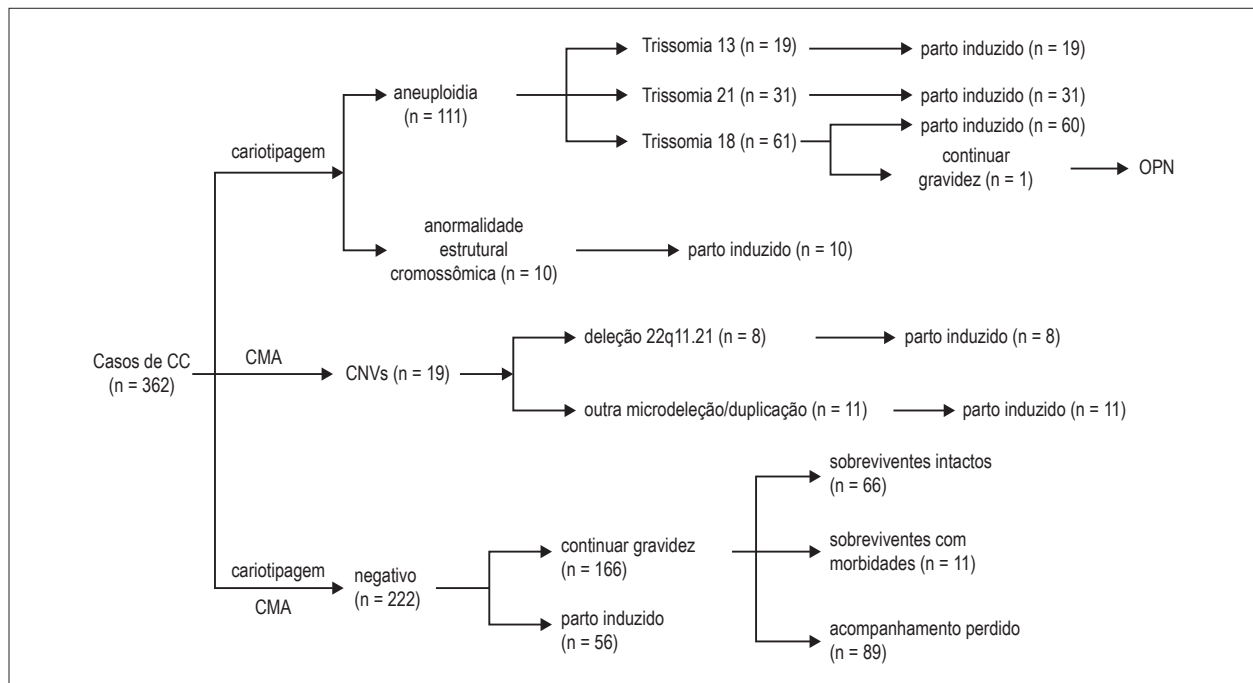


Figura 1 – Evolução dos pacientes no presente estudo. OPN: óbitos perinatais. CMA: análise cromossômica por microarray; CNVs: variações no número de cópias; CC: cardiopatia congênita

Análise estatística: Meng D, Chen Y, He C; Obtenção de financiamento: Meng D; Redação do manuscrito: Luo S, Li, Q; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: She S, Li Y, Fu C.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo não parcialmente financiado pelo Projeto de Pesquisa e Desenvolvimento da Tecnologia Médica e de Saúde de Guangxi (S201309_04 e S201611), Programa da Fundação de Ciências Naturais de Guangxi (2016GXNSFCA380001) e projeto de Ciência e Tecnologia

da Região Autônoma de Guangxi Zhuang (gui-ke-gong 14124004-1-8).

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Saúde Materno-Infantil de Guangxi sob o número de protocolo 160220. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

Referências

- Methlouthi J, Mahdhaoui N, Bellaleh M, Guith A, Zouari D, Ayech H, et al. Incidence of congenital heart disease in newborns after pulse oximetry screening introduction. *Tunis Med*. 2016;94(3):231-4.
- Qu Y, Liu X, Jian Z, Chen G, Mai J, Guo X, et al. Incidence of congenital heart disease: the 9-year experience of the Guangdong registry of congenital heart disease, China. *Plos One*. 2016;11(7):e0159257.
- Sifrim A, Hitz MP, Wilsdon A, Breckpot J, Turki SH, Thienpont B, et al. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet*. 2016;48(9):1060-5.
- Kloesel B, DiNardo JA, Body SC. Cardiac embryology and molecular mechanisms of congenital heart disease: a primer for anesthesiologists. *Anesth Analg*. 2016;123(3):551-69.
- Su W, Zhu P, Wang R, Wu Q, Wang M, Zhang X, et al. Congenital heart diseases and their association with the variant distribution features on susceptibility genes. *Clin Genet*. 2017;91(3):349-54.
- Chaix M, Andelfinger G, Khairy P. Genetic testing in congenital heart disease: a clinical approach. *World J Cardiol*. 2016;8(2):180-91.
- Zhu X, Li J, Ru T, Wang Y, Xu Y, Yang Y, et al. Identification of copy number variations associated with congenital heart disease by chromosomal microarray analysis and next-generation sequencing. *Prenat Diagn*. 2016;36(4):321-7.
- Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, et al. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol*. 2011;32(8):1147-57.

9. Song M, Hu A, Dyamenahalli U, Chitayat D, Winsor E, Ryan G, et al. Extracardiac lesions and chromosomal abnormalities associated with major fetal heart defects: comparison of intrauterine, postnatal and postmortem diagnoses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33(5):552-9.
10. Mademont-Soler I, Morales C, Soler A, Martínez-Crespo JM, Shen Y, Margarit E, et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in fetuses with abnormal cardiac ultrasound findings: evaluation of chromosomal microarray-based analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(4):375-82.
11. South S, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med.* 2013;15(11):901-9.
12. Grati F, Molina Gomes D, Ferreira JC, Dupont C, Alesi V, Gouas L, et al. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2015;35(8):801-9.
13. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2005;77(1):78-88.
14. McCarroll SA, Altshuler DM. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat Genet.* 2007;39(7 Suppl):S37-42.
15. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JC, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res.* 2013;112(4):707-20. Erratum in: *Circ Res.* 2013;112(12):e182.
16. Soemedi R, Wilson I, Bentham J, Darlay R, Töpf A, Zelenika D, et al. Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet.* 2012;91(3):489-501.
17. Pierpont M, Basson C, Benson D, Gelb B, Giglia T, 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):3015-38.
18. Soemedi R, Topf A, Wilson I, Darlay R, Rahman T, Glen E, et al. Phenotype-specific effect of chromosome 1q21.1 rearrangements and GJA5 duplications in 2436 congenital heart disease patients and 6760 controls. *Hum Mol Genet.* 2012;21(7):1513-20.
19. Greenway S, Pereira A, Lin J, DePalma S, Israel S, Mesquita S, et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet.* 2009;41(8):931-5.
20. Zhang J, Ma D, Yan W, Li C, Yun W, Qiao F, et al. Analysis of chromosome 22q11 copy number variations by multiplex ligation-dependent probe amplification for prenatal diagnosis of congenital heart defect. *Mol Cytogenet.* 2015 Dec 29;8:100.
21. Lv W, Wang S. Detection of chromosomal abnormalities and the 22q11 microdeletion in fetuses with congenital heart defects. *Mol Med Rep.* 2014;10(5):2465-70.
22. Liu Z, Wang J, Liu S, Deng Y, Liu H, Li N, et al. Copy number variation of GATA4 and NKX2-5 in Chinese fetuses with congenital heart disease. *Pediatr Int.* 2015;57(2):234-8.
23. Liao C, Li R, Fu F, Xie G, Zhang Y, Pan M, et al. Prenatal diagnosis of congenital heart defect by genome-wide high-resolution SNP array. *Prenat Diagn.* 2014;34(9):858-63.
24. Bao B, Wang Y, Hu H, Yao H, Li Y, Tang S, et al. Karyotypic and molecular genetic changes associated with fetal cardiovascular abnormalities: results of a retrospective 4-year ultrasonic diagnosis study. *Int J Biol Sci.* 2013;9(5):463-71.
25. Steele MW. Letter: chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet.* 1974;2(7890):1210.
26. Wei YJ, Liu BM, Zhou YH, Jia XH, Mu SG, Gao XR, et al. Spectrum and features of congenital heart disease in Xi'an, China as detected using fetal echocardiography. *Genet Mol Res.* 2014;13(4):9412-20.
27. Liu X, Yagi H, Saeed S, Bais AS, Gabriel GC, Chen Z, et al. The complex genetics of hypoplastic left heart syndrome. *Nat Genet.* 2017;49(7):1152-9.
28. Digilio MC, Marino B. What is new in genetics of congenital heart defects? *Front Pediatr.* 2016 Dec 1;4:120.
29. Simeone RM, Tinker SC, Gilboa SM, Agopian AJ, Oster ME, Devine OJ, et al; National Birth Defects Prevention Study. Proportion of selected congenital heart defects attributable to recognized risk factors. *Ann Epidemiol.* 2016;26(12):838-45.
30. Jansen FA, Hoffer MJ, van Velzen CL, Plati SK, Rijlaarsdam ME, Clur SA, et al. Chromosomal abnormalities and copy number variations in fetal left-sided congenital heart defects. *Prenat Diagn.* 2015;36(2):177-85.
31. Bellucco FT, Belangero SI, Farah LM, Machado MV, Cruz AP, Lopes LM, et al. Investigating 22q11.2 deletion and other chromosomal aberrations in fetuses with heart defects detected by prenatal echocardiography. *Pediatr Cardiol.* 2010;31(8):1146-50.

