

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES MTHFR (C677T / A1298C / A1625C), MTRR (A66G / C524T) E SERPINE-1 (G43A) NA HIPERHOMOCISTEINEMIA DE RECÉM-NASCIDOS COM DIAGNÓSTICO DE CARDIOPATIA CONGÊNITA

ÉRICO JORGE SILVA FREITAS

MANAUS
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ÉRICO JORGE SILVA FREITAS

EFEITO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES MTHFR (C677T / A1298C / A1625C), MTRR (A66G / C524T) E SERPINE-1 (G43A) NA HIPERHOMOCISTEINEMIA DE RECÉM-NASCIDOS COM DIAGNÓSTICO DE CARDIOPATIA CONGÊNITA

Projeto de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

MANAUS
2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F866e Freitas, Érico Jorge Silva
Efeito dos polimorfismos nos genes MTHFR (C677T / A1298C / A1625C), MTRR (A66G / C524T) e SERPINE-1 (G43A) na hiperhomocisteinemia de recém-nascidos com diagnóstico de cardiopatia congênita / Érico Jorge Silva Freitas . 2021
99 f.: il.; 31 cm.

Orientador: José Pereira de Moura Neto
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Doença Cardíaca Congênita. 2. Hiperhomocisteinemia. 3. Polimorfismos. 4. Marcadores Moleculares. 5. Amazonas. I. Moura Neto, José Pereira de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

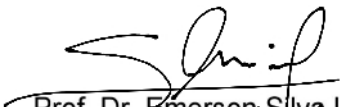
**“EFEITO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES MTHFR (C677T / A1298C /
A1625C), MTRR (A66G / C524T) E SERPINE-1 (G43A) NA
HIPERHOMOCISTEINEMIA DE RECÉM-NASCIDOS COM DIAGNÓSTICO DE
CARDIOPATIA CONGÊNITA”**

DISCENTE: ÉRICO JORGE SILVA FREITAS

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 09/04/2021.



Prof. Dr. Emerson-Silva Lima
Coordenador do PPGCF

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:**



Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto
Orientador e Presidente da Banca (UFAM)



Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Membro (UFBA)



Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque
Membro (UEA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a meu pai, mãe e irmão pelo apoio incondicional durante todo o período da minha formação, sempre procurando me manter incentivado e por prover toda a estrutura que me possibilitasse isso;

Ao meu orientador, José Pereira de Moura Neto por sempre me passar tranquilidade, pelo incentivo, pelas palavras de apoio, por toda dedicação, paciência e ensinamentos durante os dois anos do desenvolvimento deste trabalho, por acreditar nas minhas capacidades e por ressaltar que tudo dará certo;

A Luana Barbosa do Nascimento por todo o apoio, por ter me acompanhado em todos os momentos, apesar de todas as dificuldades, o amor, o carinho e o incentivo foram fundamentais em todos os momentos;

Ao Abdou Gafar, meu grande amigo, trilhamos o caminho da graduação juntos e depois o do mestrado, sempre apoiamos um ao outro e lutamos para aprender, compartilhar experiências e conhecimentos, são momentos que vamos levar para a vida;

Aos médicos Harrison Cardoso Baraúna e Silvano de Jesus Quintino Baraúna, que contribuíram muito com conhecimentos clínicos, técnicos, que abriram muitas portas, além da amizade que foi essencial para a realização deste trabalho;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, pela estrutura disponibilizada para a execução deste trabalho;

À FAPEAM pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa de estudos;

Ao saudoso Joãoilson Teixeira de Lima (*in memoriam*), eu tenho certeza de que você estaria orgulhoso, nossas conversas foram fundamentais para minha formação como farmacêutico, serei eternamente grato por ter te conhecido;

Aos funcionários do Hospital Universitário Francisca Mendes, todos os médicos, enfermeiros, administrativo, pacientes, todos que cederam o seu tempo para nos escutar e buscaram contribuir com a minha formação e com a realização deste trabalho;

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma com a execução deste trabalho.

RESUMO

As doenças cardíacas congênitas (DCC) correspondem a um grupo de alterações que modificam a estrutura e função cardiorrespiratória em complexidade e gravidade variadas. Apesar dos atuais avanços em métodos de detecção, o padrão-ouro se resume aos exames de imagem. No Brasil, estima-se até 50% dos portadores permaneçam sem diagnóstico, sendo a segunda maior causa de morte entre recém-nascidos (RN), atrás apenas de doenças infecciosas. Atribuído a causas multifatoriais, o aspecto genético é fundamental para compreensão dos mecanismos fisiopatológicos. O objetivo deste estudo foi investigar a frequência dos polimorfismos MTHFR C677T (rs1801133), A1298C (rs1801131), A1625C (rs145641996), MTRR A66G (rs1801394), C524T (rs1532268) e SERPINE-1 G43A (rs6092) em recém-nascidos (RN) portadores de DCC atendidos no Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM, centro de referência em cardiologia do Estado do Amazonas e outros estados da Amazônia Ocidental, em associação com níveis séricos de homocisteína (tHcy), folato e vitamina B-12. O estudo contou com 245 RN e respectivas puérperas, sendo 72 RN portadores de DCC (Caso) e 173 RN saudáveis entre março de 2018 e outubro de 2019. Foi observado uma frequência maior de diabetes gestacional e prematuridade entre as puérperas caso (OR: 6.04; 95% CI: 1.79-20.29; $p < 0.001$) e (OR: 3.20; 95% CI: 1.76-5.85; $p < 0.001$). Os RN caso apresentaram em média menor peso ao nascer (2.7 ± 0.73 kg; $p < 0.001$) em comparação aos RN saudáveis (3.47 ± 0.53 kg). A frequência alélica das variantes SNP rs1801133, rs1801394 e rs1532268 foi maior em RN caso em comparação aos saudáveis, assim com associados a presença de maiores níveis de tHcy. Análise de curva ROC apresentou área sob a curva significativa (AUC) (AUC=0.939; 95%CI 0.912-0.966 - $p < 0.001$). Diabetes gestacional, prematuridade e baixo peso ao nascer foram fatores de risco para DCC. Níveis de tHcy foram maiores em RN, principalmente associados aos genótipos 677TT para MTHFR e 66GG e 524TT para MTRR independente da presença de DCC, embora muito maior entre os portadores dos polimorfismos. Níveis séricos de tHcy $> 15.48 \mu\text{mol/L}$ podem representar um valor de referência para presença de DCC.

Palavras-Chave: Doença Cardíaca Congênita, Hiperhomocisteinemia, Polimorfismos, Marcadores Moleculares, Amazonas.

ABSTRACT

The congenital heart disease (CHD) is a collective of conditions which impact the structure and cardiocirculatory function and can varies it presentation at severity. Despite advances in detection methods, the gold standard is limited to imaging tests and considering the irregular distribution of hospital centers, it is believed that up to 50% of patients remain undiagnosed in Brazil, being the second leading cause of death among newborns lagging behind infectious diseases. There's a considerable evidence of that genetic factors contribute to several conditions to predispose the development of CHD or associated with their presence. The aim of this study is to investigate the frequency of the polymorphisms MTHFR C677T (rs1801133), A1298C (rs1801131), A1625C (rs145641996), MTRR A66G (rs1801394), C524T (rs1532268) and SERPINE-1 G43A (rs6092) in newborns (NB) carries of the CHD and associate with the total plasma homocysteine level (tHcy), folic acid and cobalamin levels attended of cardiac reference center at Manaus-Amazonas. The study population was composed of 173 puerperal women-newborns pairs (Control Group) and 72 puerperal women-newborn pairs with newborns diagnosed with heart disease (Group Patients), between March 2018 and October, 2019. Were observed a higher frequency of maternal gestational diabetes and prematurity in the case mother group (OR: 6.04; 95% CI: 1.79-20.29; $p < 0.001$) and (OR: 3.20; 95 % CI: 1.76-5.85; $p < 0.001$). Low birth weight among cases NB (2.7 ± 0.73 kg) was significant ($p < 0.001$), when compared to control NB (3.47 ± 0.53 kg). The allelic frequency of the SNP rs1801133, rs1801394 and rs1532268 were higher on cases NB than controls NB, as the prevalence associated with higher levels of tHcy. The predict range of the Hcy measurement between cases NB expressed a significative area under the ROC curve (AUC=0.939; 95%CI 0.912-0.966 - $p < 0.001$). Gestational Diabetes, Prematurity and low weight income were risk factors to CHD. The levels of tHcy were high in NB, mainly associated to 677TT of MTHFR and 66GG and 524TT of MTRR genotypes, regardless of the presence CHD cases or controls, although much higher in cases. We suggest that serum tHcy levels $> 15.48 \mu\text{mol/L}$ may be a valuable reference point as a predictor CHD.

Keywords: Congenital Heart Disease, Hyperhomocysteinemia, Polymorphisms, Molecular Markers, Amazonas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Embriologia do Coração.....	16
2.2 Doenças Cardíacas Congêntias.....	16
2.3 Impacto e Aspectos Clínicos.....	22
2.4 Epidemiologia das Cardiopatias Congêntias.....	23
2.5 Diagnóstico.....	28
2.5.1 Biomarcadores Bioquímicos.....	29
2.6 Metabolismo do Folato e Homocisteína	30
2.7 Fatores Genéticos.....	33
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4. METODOLOGIA.....	40
4.1 Modelo de Estudo.....	40
4.2 População.....	40
4.3 Critérios de Elegibilidade.....	40
4.3.1 Critérios de Inclusão.....	40
4.3.2 Critérios de Exclusão.....	41
4.4 Informações Éticas e Financiamento.....	41
4.5 Dados Clínicos e Demográficos.....	41
4.6 Amostras.....	41
4.7 Análise Laboratorial.....	42
4.7.1 Testes Bioquímicos e Hematológicos.....	42
4.7.2 Análise Molecular.....	42
4.8 Análise de Dados.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6. PERSPECTIVAS.....	75
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXOS.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumo do ciclo do folato e metionina adaptado de HIRAOKA & KAGAWA, 2017.

Figura 2: Resumo da participação do PAI-1 na manutenção da atividade fibrinolítica. Adaptado de YE et al., 2017.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência de malformação congênita cardiovascular notificadas no Brasil - Período de 2009 a 2013. Número de casos notificados/100.000 nascidos vivos. Adaptado de Brasil, 2017.

Tabela 2: Taxa de Mortalidade Infantil devido malformação congênita cardiovascular - Período de 2009 a 2013 (0 a 365 dias de vida/100.000 nascimentos). Número de casos notificados. Adaptado de Brasil, 2017.

Tabela 3: Percentual da Mortalidade Infantil (0 a 365 dias de vida) atribuída a malformação congênita cardiovascular notificada no Brasil - Período de 2009 a 2013 (0 a 365 dias de vida/100.000 nascimentos). Adaptado de Brasil, 2017.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Identificação das sondas utilizadas para análise de PCR em Tempo Real (qPCR).

LISTA DE SIGLAS

AAP	<i>American Academia of Pediatrics</i>
AoS	Estenose Aórtica
CoA	Coarctação da Aorta
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
DCC	Doenças Cardíacas Congênitas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSA	Defeito de Septo Atrial
DSAV	Defeito no Septo Atrioventricular
DSV	Defeito de Septo Ventricular
EP	Estenose Pulmonar
FEBRASGO	Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia
Hcy	Homocisteína
HHcy	Hiper-homocisteinemia
HUFM	Hospital Universitário Francisca Mendes
LAEBM	Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular
MS	Ministério da Saúde
MTHFR	Metileno-tetra-hidrofolato redutase
MTR	Metionina Sintetase
MTRR	Metionina Sintetase Redutase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Persistência do Canal Arterial
qPCR	PCR em tempo real
RN	Recém-Nascido
SAM	S-adenosilmetionina
SINASC	Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos
SNP	Polimorfismo de Base Única
SUS	Sistema Único de Saúde
TGA	Transposição das Grandes Artérias
ToF	Tetralogia de Fallot
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

UTI	Unidade de Terapia Intensiva
μL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

As malformações cardíacas congênitas podem ser caracterizadas como um grupo de alterações que impactam na estrutura e função cardiocirculatória, podendo variar quanto a repercussão fisiológica e complexidade. Representam aproximadamente um terço de todas as anomalias congênitas, estando presente em aproximadamente 1% dos recém-nascidos, e em até 10% dos casos de aborto espontâneo. Estima-se que até metade dos portadores de alguma cardiopatia congênita necessitam de intervenção cirúrgica no primeiro ano de vida (PINTO JUNIOR et al., 2015; PICARZO et al., 2018; PETERSON, 2018).

A prevalência das cardiopatias é associada a causas multifatoriais como: fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, deficiência nutricional, não acompanhamento pré-natal, entre outros. Ambos estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” vêm demonstrando impactos das alterações genéticas no amadurecimento e crescimento das células musculares esqueléticas e lisas do coração. Por se tratar de um período permeado de interações moleculares, desequilíbrio na expressão destas moléculas pode impactar na diferenciação celular/tecidual e comprometer a formação adequada do órgão (SRIVASTAVA & OLSON, 2000; BACALTCHUK et al., 2001; SALIBA et al., 2019).

Atualmente, mais de 40 defeitos anatômicos cardiovasculares foram descritos. Entre as sintomatologias mais comuns à essas cardiopatias estão: suor excessivo, cansaço extremo, fadiga, perda de apetite, aumento da frequência cardíaca, dor no peito, aumento da frequência respiratória e cianose. Tais manifestações podem se apresentar logo após o nascimento, nos primeiros dias de vida ou na fase adulta. Os exames de imagem, por possuírem maior sensibilidade, são os métodos padrão ouro de diagnóstico. Todavia, há uma dificuldade de acesso e disponibilidade para toda a população (LEITE et al., 2010; VAN DER LINDE et al., 2011; ROSADO et al., 2011; SUN & LIU et al., 2015; JESUS et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a frequência média é de que 1% dos nascidos vivos sejam portadores de alguma doença cardíaca congênita (DCC). Dois grandes estudos sugeriram que a média de prevalência global de DCC entre os anos de 2010 e 2017 foi de 9,41/1000 nascimentos, com a maior prevalência localizada no continente asiático com 9,3/1000 nascidos vivos, enquanto na Europa variando de 6,5 a 8,2/1000 nascidos vivos. A América Latina possui uma carência de dados quanto a prevalência desses casos (VAN DER LINDE et al., 2011; LIU et al., 2019).

Apesar dos avanços nos métodos de diagnóstico e nas técnicas cirúrgicas nas últimas décadas resultarem na diminuição da mortalidade decorrente das cardiopatias congênicas, acredita-se que até 50% dos recém-nascidos permaneçam sem diagnóstico, o que pode implicar na morte de aproximadamente um terço das crianças portadoras de DCC no primeiro ano após o nascimento (MATTOS et al., 2015; BRASIL, 2017; PETERSON, 2018).

Em países onde os recursos são escassos na saúde, a DCC está associada a elevada mortalidade, enquanto em países desenvolvidos, como Estados Unidos e do continente Europeu, estão associadas a morbidades que implicam no acompanhamento a longo prazo, gerando custos elevados para ao sistema de saúde (HOFFMAN & KAPLAN, 2002; ARTH et al., 2017; BAKKER et al., 2019).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), o Brasil registra aproximadamente 2,8 milhões de nascidos vivos por ano, podendo-se estimar 29 mil novos casos/ano de DCC. Todavia, de acordo com o registro das notificações relacionadas a malformações congênicas do aparelho circulatório, estimam-se aproximadamente 1,680 casos/ano, refletindo que o real número de novos casos ainda é desconhecido. Tal situação se confirma, visto que a taxa de mortalidade por defeito congênito cardiovascular é superior à taxa de incidência (BRASIL, 2017).

Frente a diversas manifestações das DCC, com repercussões hemodinâmicas variadas ou assintomáticas, a gênese das malformações congênicas ainda não foi plenamente esclarecida. Nos últimos anos, pesquisadores têm buscado identificar alterações genéticas que possam estar relacionadas às DCC, ou que impactem diretamente no espectro de moléculas envolvidas no desenvolvimento cardíaco durante o período embrionário. Sabe-se que a carência de vitaminas como Folato e B-12 durante o período gestacional são associadas a diversas repercussões fisiológicas que podem envolver malformações congênicas. Estudos recentes apontam que níveis elevados de homocisteína (Hiper-homocisteinemia) podem estar envolvidos indiretamente na diminuição da expressão de proteínas essenciais para o desenvolvimento cardíaco, podendo ser um fator de risco para gênese das DCC. Níveis elevados de homocisteína estão associados a maior gravidade para diversas doenças cardíacas por proporcionar um ambiente de maior estresse oxidativo, dano tecidual, predisposição a diversos eventos cardiovasculares e tromboembólicos (FROSST, 1995; FONSECA et al., 1999; VANNUCCHI & MELO, 2009; SU & LI, 2018; LAI et al., 2020).

A presença de alterações genéticas em enzimas específicas envolvidas no metabolismo do ácido fólico, como a Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e Metionina Sintetase Redutase (MTRR) podem promover a diminuição da atividade enzimática, ocasionando uma

predisposição a níveis elevados de homocisteína e maior risco para DCC. Dentre mutações/polimorfismos associadas a presença de DCC, têm-se descritas na literatura possível envolvimento das variantes C677T, A1298C e A1625C para *MTHFR* e A66G e C524T para *MTRR* (PISHVA et al., 2013; WANG et al., 2015; SU & LI, 2018).

Da mesma forma, acredita-se que a associação entre a presença de hiper-homocisteinemia e eventos cardiovasculares tromboembólicos durante o desenvolvimento fetal seja um fator de risco para gênese das DCC, assim como para pior prognóstico. Alterações do *SERPINA-1*, responsável pela transcrição do PAI-1 (Inibidor do Ativador do Plasminogênio), estão associadas a maior predisposição a coágulos por aumentarem a expressão de PAI-1 e diminuir a atividade fibrinolítica, com impacto direto na manutenção da hemostasia. A variante G43A do *SERPINA-1* promove uma importante alteração funcional/estrutural e acredita-se que esta alteração possa atuar na modulação dos níveis de expressão PAI-1, podendo ser ainda maior quando associada a hiper-homocisteinemia (PANNEKOEK et al., 1986; MORANGE et al., 2007; MARY et al., 2017).

Diante da carência de dados na literatura quanto a prevalência dessas DCC tanto a nível do Estado do Amazonas quanto para cidade de Manaus, estudos que busquem contribuir com dados epidemiológicos são extremamente necessários, pois o diagnóstico tardio das DCC claramente contribui para o risco elevado da morbimortalidade de pacientes portadores. A análise dos níveis séricos de homocisteína e das vitaminas B-12 e folato associados a presença das variantes destes genes na nossa população através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) pode representar uma alternativa para identificação de novos fatores de risco, possíveis biomarcadores de gravidade clínica e melhor ou pior prognóstico associado a estas cardiopatias. Com a necessidade de aumentar o acesso à população, acredita-se que, a identificação de níveis elevados de homocisteína, e de alterações genéticas associadas a enzimas relacionadas ao metabolismo do folato podem se tornar uma alternativa de triagem diagnóstica associada a caracterização de um perfil genético associado a identificação de uma população de risco sujeita a complicações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EMBRIOLOGIA DO CORAÇÃO

A formação do coração ocorre entre o 15º e o 16º dia de gestação, sendo o primeiro órgão a se desenvolver. Ao menos três linhagens celulares estão envolvidas na morfogênese cardíaca: células do mesoderma cardíaco, proepicárdio e cardiogênicas da crista neural. Embora o desenvolvimento cardíaco embrionário esteja bem descrito na literatura, somente nos últimos anos tomou-se conhecimento sobre o impacto das interações genéticas e moleculares participantes deste período. Ambos estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” demonstraram que o desenvolvimento cardiocirculatório envolve uma cascada complexa de sinalizações moleculares específicas mediadas por fatores de transcrição teciduais que promovem sua diferenciação (SRIVASTAVA & OLSON, 2000; SALIBA et al., 2019).

O maior entendimento destes fenômenos a nível molecular tem sido capaz de fornecer dados importantes para compreensão das malformações cardíacas congênitas, por se tratar de um período em que alterações genéticas podem comprometer a formação adequada do órgão (STEFANOVIC et al., 2014; SUN & LIU et al., 2015; KLOESEL et al., 2016).

A doença cardíaca congênita é associada a causas multifatoriais como: fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, herança genética, deficiência nutricional, não acompanhamento pré-natal, entre outros. Nos últimos anos, pesquisadores têm buscado identificar diversos genes associados tanto à gênese do coração quanto a malformações congênitas do órgão. A elucidação de novos genes e variantes genéticas são fundamentais para o esclarecimento dos processos a nível molecular e caracterização dos fenótipos variados das cardiopatias congênitas (BACALTCHUK et al., 2001; CLARK et al., 2006; LEITE et al., 2010; PINTO et al., 2018; WANG et al., 2019).

2.2 DOENÇAS CARDÍACAS CONGÊNITAS

Caracterizadas como um grupo de alterações que impactam na estrutura e função cardiocirculatória, as DCC variam quanto a repercussão fisiológica e complexidade. A malformação cardíaca representa aproximadamente um terço de todas as anomalias congênitas, estando presente em aproximadamente 1% dos recém-nascidos (RN), e em até

10% dos casos de abortos espontâneo (HOFFMAN, 1995; SADOWSKI, 2009). Estima-se que até metade dos portadores de DCC necessitam de intervenção cirúrgica no primeiro ano de vida, o que impacta diretamente nos custos em saúde e na qualidade de vida. Negativamente, trata-se da segunda maior causa de morte no primeiro ano de vida, atrás somente das doenças infecciosas. Além de anomalias cromossômicas, estão associados ao risco aumentado para presença destas cardiopatias fatores ambientais, herança genética e deficiência nutricional (KOSHIYAMA et al., 2009; ELMAGRPY et al., 2011; FAHED et al., 2013; PETERSON, 2018).

Atualmente, mais de 40 defeitos anatômicos cardiovasculares são descritos na literatura médica. Estes podem ser classificados como: Cianóticos (insuficiência de oxigênio no sangue proporcionando uma coloração azul-roxeados na pele e mucosas) e Acianóticos (alterações hemodinâmicas, como fluxo sanguíneo pulmonar aumentado ou diminuído, fluxo misto ou com obstruções). Dentre as DCC Acianóticas mais frequentes podemos citar: Defeito no Septo Ventricular (DSV); Defeito no Septo Atrial (DSA); Defeito no Septo Atrioventricular (DSAV); Estenose Pulmonar (EP); Persistência do Canal Arterial (PCA); Coarctação da Aorta (CoA) e Estenose Aórtica (AoS). As DCC Cianóticas são associadas à maior gravidade por ocasionarem reduções na concentração de hemoglobina no sangue arterial, sendo a mais comum a Tetralogia de Fallot (ToF), também chamada de “Síndrome do Bebê Azul” (10%), seguido da Transposição das Grandes Artérias (TGA) (4%) (VAN DER LINDE et al., 2011; ARAGÃO et al., 2013; BELO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2019).

As cardiopatias congênitas também podem ser classificadas como Simples ou Complexas, associada à presença concomitante de mais de uma condição, cuja correção cirúrgica seja de difícil execução, como a exemplo da associação entre anomalias de drenagem sistêmica e pulmonar. No ano de 2018, a *American Heart Association/ American College of Cardiology* atualizou o manual de conduta para adultos portadores de DCC trazendo classificação Anatômica (Simples; Complexidade Moderada e Alta Complexidade) e quanto ao estado Funcional (ATIK, 1996; JIVANJI et al., 2019; DOLGNER et al., 2020).

2.2.1 Defeito de Septo Ventricular (DSV)

O defeito de septo ventricular, também chamado de Comunicação Interventricular, corresponde a 40% de todas as cardiopatias congênitas. Acredita-se que a prevalência seja

próxima de 4/1000 nascidos vivos. Muitas vezes trata-se de casos assintomáticos, que fecham com o tempo, o que dificulta a obtenção de dados precisos de frequência populacional (HOFFMAN, 1995; SPICER et al., 2014).

A repercussão fisiológica do DSV envolve as características anatômicas dessa comunicação interventricular, o volume de sangue presente nas câmaras cardíacas e subsequente prolapso da valva aórtica com obstrução do fluxo pulmonar. Caso não haja intervenção cirúrgica, tem-se descrito risco 6 vezes maior de desenvolver endocardite quando comparada à população normal (BAUMGARTNER et al., 2010; PENNY & VICK, 2011).

2.2.2 Defeito no Septo Atrial (DSA)

Na literatura, DSA também pode ser encontrada descrita como Comunicação Interatrial e é uma das DCC mais frequentes, representando até 15% dos casos, com ocorrência ~56/100 mil nascidos vivos, com frequência maior no gênero feminino. Embora 80% dos casos se corrijam espontaneamente, aqueles que permanecem até a fase adulta podem apresentar insuficiência cardíaca congestiva, pneumonia, arritmias, embolia paradoxal (DERI & ENGLISH, 2018; MAHMOUD et al., 2019).

Pode ser classificada quanto a sua anatomia, sendo a forma *Ostium secundum* a forma majoritária (75%) geralmente isolada. A presença de DSA é frequentemente acompanhada de PCA (26,1%), hipertensão pulmonar (3,8%) e taquicardia supraventricular (2,4%) (GEVA et al., 2014; ELLESØE et al., 2016).

2.2.3 Defeito no Septo Atrioventricular (DSAV)

Correspondendo ~5% de todas as DCC, o DSAV possui prevalência de aproximadamente 35/100 mil nascidos vivos. É uma condição que envolve a comunicação entre as câmaras cardíacas, quando através da presença de orifícios menores é descrita como manifestação Parcial, enquanto por um único orifício maior de manifestação Completa e de maior gravidade (BAUMGARTNER et al., 2010; DERI & ENGLISH, 2018).

A presença do DSAV se dá ainda na fase embrionária, entre o 34º e 36º dia, com perturbações na formação da septação do coração e formação das valvas atrioventriculares. Quase metade dos casos podem estar associados a outras malformações congênitas como: estenose subaórtica, hipoplasia ventricular e ToF. Pacientes portadores da Síndrome de Down

(trissomia do 21) apresentam uma frequência dessa malformação em até 40%, sendo esta geralmente da forma completa (ASIM et al., 2015; MUREŞAN et al., 2016).

Ocasionalmente, de início pode se apresentar de forma assintomática e os sintomas tendem a agravar com o passar do tempo. O diagnóstico é realizado principalmente por exames de imagem e pode ser identificado precocemente ainda na fase uterina, proporcionando maior tempo de preparo e planejamento para possível correção cirúrgica. Em decorrência dessas alterações, algumas manifestações clínicas envolvem cianose, insuficiência cardíaca congestiva, regurgitação da valva atrioventricular, hipertensão pulmonar, intolerância a exercício, dispneia, arritmia, entre outros (CRAIG, 2006; BAUMGARTNER et al., 2010).

2.2.4 Estenose Pulmonar (EP)

A Estenose Pulmonar é um defeito congênito geralmente isolado, que pode estar associado ao DSA, DSV, PCA e ToF. Representa aproximadamente ~10% das DCC, com prevalência mundial de 1/2000 nascidos vivos, com maior frequência na Ásia em comparação à Europa e Estados Unidos (VAN DER LINDE et al., 2011).

Morfologicamente, pode ser classificada como: Valvar (geralmente associada a demais malformações congênitas), Subvalvar (podendo ser dividida em subinfundibular e infundibular, sendo esta última associada a ToF) ou Supravalvar (de apresentação isolada ou associada a anomalias cromossômicas). A maioria dos casos leves e moderados são assintomáticos, sendo diagnosticados em exames de rotina, de imagem ou presença de ‘sopro’ cardíaco; entretanto para casos críticos é necessária intervenção cirúrgica. A pressão em torno do ventrículo direito pode resultar em dilatação, fraqueza ventricular, regurgitação da tricúspide e cianose. Quando não tratada, a falta de capacidade de aumentar o fluxo pulmonar pode ocasionar dor no peito e síncope durante exercícios físicos (LATSON, 2001; BAUMGARTNER et al., 2010; CUYPERS et al., 2013).

2.2.5 Persistência do Canal Arterial (PCA)

O canal arterial é uma estrutura vascular presente na vida fetal, que conecta a junção da artéria pulmonar principal à aorta descendente, formando um canal de saída do ventrículo direito para contornar a resistência da circulação arterial pulmonar. É comum permanecer

aberto normalmente até os 3 meses, fechando espontaneamente, ou até mais de um ano em caso de prematuridade (CAMPBELL, 1968; ANILKUMAR, 2013).

A repercussão fisiológica pode variar de acordo com o tamanho da abertura. Estima-se maior prevalência em mulheres, presente em 1/2000 nascidos vivos, ou ainda, 1/500 se estimados a PCA que passa não diagnosticada ou assintomática. Em casos leves, pode se apresentar como ‘sopro’ até ser detectado por ecocardiograma e em casos mais graves dependem da quantidade de sangue recirculando na artéria pulmonar. Este volume aumentado pode levar a congestão pulmonar, diminuição da complacência pulmonar, falha do ventrículo esquerdo, infecções pulmonares recorrentes e óbito (MIRCHELL et al., 1971; HOFFMAN & KAPLAN, 2002).

A persistência do canal arterial é atribuída a causas multifatoriais, todavia, fatores genéticos estão prioritariamente envolvidos. Prevalências elevadas são descritas em portadores de síndrome genéticas como Down e Holt-Oram e algumas mutações ligadas ao cromossomo X, independente do sexo. Por outro lado, a maior associação está ligada a infecção por Rubéola durante o primeiro trimestre de gestação (GIBSON & LEWIS, 1952; NORA, 1968; OVERALL, 1972; MANI et al., 2002; ANILKUMAR, 2013).

2.2.6 Coarctação da Aorta (CoA)

O desenvolvimento do arco aórtico se inicia na terceira semana de gestação, concluindo a formação da artéria fetal por volta da oitava semana. É caracterizada por um estreitamento da aorta com obstrução do fluxo sanguíneo. Representa aproximadamente 8% de todas as cardiopatias congênitas e quase metade dos casos envolvem valva aórtica bicúspide, sendo também associada a diversas outras anomalias, sendo mais comum a DSV, PCA e TGA (SINGH et al., 2015; DOSHI & CHIKKABYRAPPA, 2018).

Em recém-nascidos pode apresentar-se de forma assintomática até depois do nascimento. Em casos mais graves, o bebê desenvolve sinais e sintomas de choque cardiogênico à medida que ocorre o fechamento do canal arterial. As manifestações mais comuns são: pulso femoral fraco ou ausente, retardo do enchimento capilar, retardo de resposta, acidose metabólica, isquemia mesentérica, depressão do miocárdio, entre outras (NGUYEN & COOK, 2015).

Além do diagnóstico por exame de imagem, o uso do oxímetro de pulso pode ser utilizado para triagem. Vários métodos cirúrgicos de correção estão disponíveis, entretanto,

tais opções de tratamento devem ser discutidas e analisadas individualmente para cada paciente dependendo dos fatores associados (ROOS-HESSELINK et al., 2003; ENGEL & KOCHILAS, 2016; DOSHI & CHIKKABYRAPPA, 2018).

2.2.7 Estenose Aórtica (AoS)

A estenose aórtica valvar é descrita em ~6% dos casos de malformações cardíacas congênitas. É uma enfermidade grave, podendo ser fatal devida a obstrução da ejeção do ventrículo esquerdo, que é associada a disfunção miocárdica e isquemia. Pode estar associado a demais defeitos congênitos, juntamente com PCA, CoA e DSV, que estão presentes de 15 a 20% dos pacientes (SINGH, 2019).

Os principais métodos de diagnóstico são os exames de imagem, como ecocardiograma de alta sensibilidade, podendo identificar ainda na fase uterina. Os sintomas incluem dispneia, indicadores de falha cardíaca, angina e síncope até os dois meses de idade e quando identificados indicam intervenção urgente. A correção dessa malformação se dá por meio de cirurgia, como a valvuloplastia percutânea com cateter de balão ou valvotomia e substituição da valva (MAXWELL et al., 1991; SANTOS & AZEVEDO, 2002).

2.2.8 Tetralogia de Fallot (ToF)

Compreendida por quatro anomalias cardíacas concomitantes (Estenose Pulmonar, Defeito de Septo Ventricular, Dextroposição da Aorta e Hipertrofia do Ventrículo Direito), é a cardiopatia congênita cianótica mais comum, representando até 10% de todas as malformações congênitas, ocorrendo em 1/3500 nascidos vivos (APITZ et al., 2009; BAILLIARD & ANDERSON, 2009; FORMAN et al., 2019).

Os sintomas mais comuns em recém-nascidos são: cansaço, dificuldade para respirar podendo levar à perda de consciência, dispneia durante a amamentação, respirações rápidas e profundas, perda de peso. A presença de episódios cianóticos é frequente em bebês de 2 a 4 meses, caracterizadas pela coloração azulada na pele, lábios e unhas. Se não for corrigida ainda na primeira infância, estimam-se sobrevivência de até 66% no primeiro ano, 49% até três anos e 24% até dez anos (RIBEIRO et al., 2019).

2.2.9 Transposição das Grandes Artérias (TGA)

É uma desordem rara, ocorrendo em 1/33 mil nascidos vivos, correspondendo a 0,05% de todas as malformações congênitas. É caracterizada pela discordância ventrículoatrial, a qual a aorta surge do ventrículo direito e a artéria pulmonar surge do ventrículo esquerdo, sendo comum a presença de outras anomalias associadas, como DSV (90%), EP (65%) e problemas relacionados a valva tricúspide (46%) (ALGHAMDI et al., 2006; WALLIS et al., 2011; SPIGEL et al., 2019).

O diagnóstico é realizado por exames de imagem, como: raio X, tomografia, ecocardiograma. Em alguns casos pode ser assintomática, mas caso não seja corrigido, a tendência é ocorrer sobrecarga no ventrículo direito e regurgitação da tricúspide, que tende a agravar com o tempo e levar a falha cardíaca congestiva (WARNES, 2006; KUTTY et al., 2018).

2.3 IMPACTO E ASPECTOS CLÍNICOS

Os sintomas provenientes das DCC podem se manifestar logo após o nascimento, nos primeiros dias de vida, na adolescência ou até na fase adulta. Recém-nascidos portadores de DCC, normalmente encontram-se com peso e altura abaixo dos estipulados pela OMS, permanecendo em média 16 dias internados em UTI e utilizando Cateter Venoso Central 70% do tempo. O que, além de gerar custo para unidade de saúde, aumenta riscos associados a aquisição de infecção hospitalar (ROSADO et al., 2011; BELO et al., 2016).

Dependendo do grau de gravidade, o cérebro do RN portador de DCC pode apresentar atraso de maturação, sendo similar ao estágio prematuro, o que indica o risco aumentado de dano cerebral para casos de cirurgias neonatais complexas. Algumas síndromes que estão associadas a anomalias cardíacas também estão associadas com atraso no desenvolvimento neurológico, como no caso da deleção do 22q11.2 (Doença de DiGeorge) e Síndrome de Down. A prevalência do retardo do desenvolvimento neural associado aos portadores tem chamado a atenção da *American Academy of Pediatrics* e da *American Heart Association* para vigilância, avaliação, manejo e atenção à essas crianças (LICHT et al., 2009; HUBER et al., 2010; MCQUILLEN et al., 2010).

Nas últimas décadas, foram observados avanços nos meios de diagnóstico e de técnicas cirúrgicas que resultaram na diminuição da mortalidade pela DCC, elevando até 85%

deste atingirem a idade adulta (>18 anos). A queda da mortalidade resulta numa percentagem significativa de pacientes com comorbidades associadas à DCC. Apesar deste melhoramento, todos os pacientes ainda necessitam de acompanhamento médico prolongado, o que pode refletir em custo para o usuário ou sistema público, como visto em países desenvolvidos (VAN DER LINDE et al., 2011; MARINO et al., 2012).

As mulheres portadoras que atingem a fase adulta sofrem o impacto da DCC durante a gravidez, com risco aumentado de complicações variando de acordo com o diagnóstico e manifestação fisiológica. Segundo diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia, pacientes que apresentem eventos cardiovasculares como cianose, arritmias, obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo e disfunção ventricular, possuem elevado risco de mortalidade (8 a 35%) e morbidade (50%). As complicações fetais mais frequentes são: aborto espontâneo (50%), parto prematuro (30 a 50%) e baixo peso ao nascer (70%) (BORN, 2009; ZENGİN et al., 2019; MUSTAFA et al., 2020).

Mesmo com avanços nos métodos de detecção preliminar, estima-se que até 50% dos RN permaneçam sem diagnóstico, o que pode implicar na morte de aproximadamente um terço das crianças portadoras no primeiro ano de vida. O diagnóstico precoce é fundamental para evitar choque, acidose, parada cardíaca ou agravo neurológico antes do tratamento. Ainda, regiões carentes e afastadas de centros urbanos apresentam grandes dificuldades em realizar o tratamento adequado decorrente da carência de profissionais habilitados e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde, podendo levar à falsa indicação de baixa incidência, o que acarreta a presença de doenças cardíacas simples ou complexas não diagnosticadas em adultos. A importância do diagnóstico precoce das malformações cardíacas é ratificada pelos impactos sociais, na qualidade de vida, no alto custo em saúde associado ao acompanhamento e atenção a longo prazo (MATTOS et al., 2015; BRASIL, 2017; MA & HUANG, 2018; DESAI et al., 2019).

2.4 EPIDEMIOLOGIA DAS CARDIOPATIAS

Segundo a OMS, a frequência média de nascidos vivos portadores de alguma DCC é de aproximadamente 1%, sugerindo prevalência média global entre 7-9/1000 nascidos vivos. Lamentavelmente, a prevalência de malformações cardíacas congênicas tende a aumentar 10%

em escala global a cada 5 anos. Todavia, 90% deste aumento deverá ocorrer devido a melhores formas de detecções de DSV, DSA e PCA (LIU et al., 2019).

A maior incidência de DCC ocorre no continente asiático, com média de 9/1000 nascidos vivos. Dados de 2019 apontam um crescimento de 33% a cada 5 anos nos casos de DSA nos países asiáticos (VAN DER LINDE et al., 2011; LIU et al., 2019).

Na China, estudos preliminares de 1999 estimavam prevalência de casos entre 3-5/1000 nascidos vivos. A partir de um programa com foco em detecção e vigilância em saúde implementado em 1986, verificou-se crescente número de diagnósticos, com 6,21/1000 nascidos vivos. A cidade de Hunan apresentou elevado número de defeitos congênitos, sendo uma das maiores frequências mundiais (9,34/1000 nascidos vivos) (XIE et al., 2018).

Na Índia, apesar de poucos estudos relatarem a frequência de DCC, a prevalência é maior do que as observadas no resto do mundo. Todavia, os principais casos estão dentro dos hospitais de referência, o que pode não refletir a realidade da população devido a elevada densidade populacional e o baixo acesso a saúde. Estudos nestes locais encontraram variação média de 1,3 a 9,2/1000 nascimentos dependendo da população estudada e dos métodos utilizados. A Índia possui características demográficas diferentes, como grande variação na taxa de natalidade entre suas regiões, com quantidade substancial de nascimentos acontecendo em casa, elevada mortalidade e demora de diagnóstico. Apesar do aumento no número de hospitais nos últimos anos, o investimento em saúde ainda é baixo, com estrutura precária e falta de treinamento adequado aos profissionais de saúde indianos (SAXENA, 2018).

Na Europa, frequências variam de 6,5 a 8,2/1000 nascidos vivos. Estudo envolvendo a prevalência de portadores de DCC que necessitam intervenção cirúrgica (ToF, AoS, TGA, CoA), foram descritos médias de casos de 19,1/10.000 nascimentos ou 1 a cada 524 nascimentos, com maior incidência na República Checa com 30,9, seguido pelos países Reino Unido (Gales: 24,7), Alemanha (Saxony Anhalt: 18,8), França (Rhone Alpes: 20), Malta (22,9) e Itália (Toscana: 12,7; Emilia Romagna: 17,9; Lombardia: 19,3) (DOLK et al., 2011; BAKKER et al., 2019).

Em países desenvolvidos, como Estados Unidos e países da Europa, as DCC estão associadas com morbidades que implicam no acompanhamento a longo prazo gerando custo para os sistemas de saúde, principalmente para a parcela que alcança a idade adulta. Nos Estados Unidos, onde a prevalência de DCC é de aproximadamente 1% (40.000 dos nascidos vivos por ano), somente no ano de 2013, o gasto hospitalar para estes pacientes alcançou 6

bilhões de dólares (HOFFMAN & KAPLAN, 2002; KRASUSKI & BASHORE, 2016; ARTH et al., 2017).

O continente Africano possui uma carência de dados quanto aos casos congênitos na região. Em 2011 descreveu-se prevalência de apenas 2/1000 nascidos vivos. Visto que a frequência de DCC tende a ser maior em países desenvolvidos em relação aos países de baixa renda e em desenvolvimento (decorrente da estrutura de saúde) e que estatisticamente, populações carentes apresentam elevada taxa fertilidade e baixa expectativas de vida, acredita-se que a real prevalência de DCC é ainda maior e desconhecida no continente. Hoffman e col. (2013) estimaram que o número de crianças portadoras de alguma malformação seja de 463/milhão de nascidos vivos na África Subsaariana, quase 4 vezes maior que a estimada para o Estados Unidos. A região Subsaariana também possui elevada prevalência de infecções maternas por sífilis e rubéola, que estão associadas a malformações congênitas e da taxa de mortalidade neonatal (JIVANJI et al., 2019; ZIMMERMAN & SABLE, 2020).

Em países da América Latina, a frequência desses eventos ainda é pouco precisa, refletindo condições semelhantes as apresentadas por países africanos, com baixa detecção e elevada mortalidade, subestimando a real prevalência e contribuindo para aumento da mortalidade infantil (ROSANO et al., 2000; AMORIM et al., 2006; HUBER et al., 2010).

De acordo com o MS, o Brasil registra anualmente 2,8 milhões de nascidos vivos, podendo-se estimar quase 29 mil novos casos de DCC ao ano. Todavia, de acordo com o registro das notificações relacionadas a malformações congênitas do aparelho circulatório, estimam-se aproximadamente ~2 mil casos/ano, refletindo que o real número de novos casos ainda é desconhecido, possivelmente pela falta de diagnóstico. Tal situação se confirma, visto que a taxa de mortalidade por DCC é superior à taxa de incidência (BRASIL, 2017).

Em 2013, a incidência de malformações congênitas cardiovasculares notificadas no Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) na região Sudeste brasileira foi maior que a soma de todas as notificações das outras regiões, o que pode indicar uma distribuição desigual de recursos tecnológicos e humanos que possibilitem o diagnóstico precoce na rede nacional de saúde (Tabela 1) (BRASIL, 2017).

Tabela 1: Incidência de malformação congênita cardiovascular notificadas no Brasil - Período de 2009 a 2013. Número de casos notificados/100.000 nascidos vivos. Adaptado de Brasil, 2017.

Região	2009	2010	2011	2012	2013	Total
Norte	21 (7)	50 (16)	38 (12)	36 (12)	27 (9)	172 (11)
Nordeste	124 (14)	155 (18)	173 (20)	143 (17)	177 (22)	772 (18)
Sudeste	831 (74)	860 (77)	1110 (97)	1341 (116)	1892 (165)	6034 (106)
Sul	270 (74)	271 (73)	268 (71)	303 (79)	349 (90)	1461 (78)
Centro-Oeste	41 (18)	41 (19)	44 (19)	58 (25)	64 (27)	248 (22)
Total	1287 (45)	1377 (48)	1633 (56)	1881 (65)	2509 (86)	8687 (60)

Ainda de acordo com dados do MS, a taxa de mortalidade relacionada à DCC no Brasil foi de 107/100 mil nascidos vivos, com concentração maior de casos nas regiões Centro-Oeste e Sul (Tabela 2) e representou 8% da mortalidade infantil no país, sendo mais frequente na região Sul (10%) e menor na região Norte (6,2%) (Tabela 3). Acredita-se que esses dados são subestimados devido à falta de diagnósticos e notificações, principalmente em estados e regiões Norte e Nordeste, que possuem características sociais e econômicas diferentes, o que sugere que esses números sejam ainda mais elevados (JUNIOR et al., 2015; BRASIL, 2017).

Tabela 2: Taxa de Mortalidade Infantil devido malformação congênita cardiovascular - Período de 2009 a 2013 (0 a 365 dias de vida/100.000 nascimentos). Número de casos notificados. Adaptado de Brasil, 2017.

Região	2009	2010	2011	2012	2013
Norte	80	97	85	97	101
Nordeste	101	97	101	101	101
Sudeste	108	105	108	106	108
Sul	109	114	116	112	111
Centro-Oeste	124	123	125	133	124
Total (Média)	104	104	106	107	107

Tabela 3: Percentual da Mortalidade Infantil (0 a 365 dias de vida) atribuída a malformação congênita cardiovascular notificada no Brasil - Período de 2009 a 2013 (0 a 365 dias de vida/100.000 nascimentos). Adaptado de Brasil, 2017.

Região	2009	2010	2011	2012	2013
Norte	4,5	5,7	5,3	6,0	6,2
Nordeste	6,0	6,2	6,6	6,7	6,5
Sudeste	8,2	8,4	8,7	8,6	9,0
Sul	9,1	10,0	9,9	10,0	10,4
Centro-Oeste	8,4	8,9	9,2	9,7	9,0
Total (Média)	7,0	7,5	7,8	7,9	8,0

A estimativa de necessidade de procedimentos cirúrgicos para correção das DCC é de 7,2/1000 nascidos vivos, com relatos de défices significativos nas regiões Norte e Nordeste (PINTO JUNIOR et al., 2004). Estudos epidemiológicos realizados em demais cidades do Brasil têm alertado para a baixa detecção de casos. Em 2000, na cidade de Londrina (PR), estimou incidência de 4/1.000 nascidos vivos. Dentre os anos de 2006 a 2010, foram diagnosticados 345 (4,3%) neonatos portadores de DCC para os 1.086.139 nascidos no estado do Rio de Janeiro, representando uma frequência de 3,18/10 mil nascidos vivos pelo SINASC. Quando comparado com os dados de mortalidade do mesmo período, foram realizados 1.121 registros de óbito associados a cardiopatia congênita, refletindo dificuldade de diagnóstico no pré-natal e/ou horas depois do nascimento (GUITTI, 2000; MIYAGUE et al., 2003; CATARINO et al., 2017).

Em Belém (PA), 417 crianças aguardavam por cirurgia em centro de referência, 407 portadoras de DCC, nenhuma delas neonatos, com média de 5,7 ±3,9 anos. O tempo médio de espera foi de 23±18,3 meses e 63,4% procedentes do interior do estado, o que evidencia a necessidade de descentralização e ampliação de novas unidades de referência de alta complexidade tanto na capital como no interior do estado. As DCC mais frequentes foram DSV (29%), PCA (18,4%), DSA (11%) e ToF (8,6%). Diante do exposto, o aumento do investimento em tecnologia assistencial na ampliação da capacidade de unidades de referência, descentralização do atendimento e aumento da mão de obra especializada são fundamentais para oferta de serviços à população (JESUS et al., 2018; LOPES et al., 2018).

A necessidade de melhorias na detecção e no tempo de diagnóstico, a capacitação de profissionais, a criação de novos polos de referência em capitais e interiores dos estados, a insuficiência do sistema público em garantir suporte à população, são realidades de diversos estados brasileiros. Diante de uma carência de dados na literatura quanto a situação do estado do Amazonas e da cidade de Manaus, estudos que busquem contribuir com dados epidemiológicos e o surgimento de práticas clínicas que possam contribuir para melhoria do atendimento à população são de suma importância para entender a real dimensão do problema.

2.5 DIAGNÓSTICO

Os principais métodos de diagnóstico utilizados para DCC são: Ecocardiograma fetal, Ecocardiograma, Eletrocardiograma, Raio-X de tórax e Oximetria de pulso (conhecido como “Teste do Coraçãozinho”). Os exames de imagem são os de maior sensibilidade, porém há uma dificuldade de acesso e disponibilidade para toda a população (LEITE et al., 2010; SUN & LIU et al., 2015; MA & HUANG, 2018).

Casos não detectados de DCC que necessitem intervenção no primeiro ano de vida, representam ônus adicional para os serviços de saúde e para as famílias. Desde 2011, a oximetria de pulso tem se mostrado como opção para estratégia de triagem em recém-nascidos pela *American Academia of Pediatrics* (AAP) diretamente relacionado à custo e efetividade, possuindo baixo risco ao paciente com 75% de sensibilidade e 99% de especificidade. Com a sua implementação nos Estados Unidos, outros países têm aderido à técnica, como Canadá, Reino Unido, Suíça, entre outros. Na China, o uso da oximetria de pulso associado a auscultação cardíaca resultou na detecção de 92% de DCC com moderado índice de falso-positivos (BRUNO & HAVRANEK, 2015; DESAI et al., 2019).

A Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC-SUS) recomendou através da portaria nº 20/2014 a incorporação da Oximetria de Pulso, como ferramenta de triagem neonatal, de maneira universal pelo SUS, através do programa Rede Cegonha. Todavia, sua implementação ocorreu apenas através da norma técnica nº7/2018 padronizando e orientando os profissionais para realização do teste (BRASIL, 2017, 2018).

Apesar dos avanços no diagnóstico e substancial sucesso em outras partes do mundo, no Brasil, assim como em países de baixa renda e em desenvolvimento, há um elevado

porcentual de pacientes que não possuem acesso ao diagnóstico pelo serviço de saúde e possuem alto índice de morbimortalidade neonatal e adulta. Diante dessa realidade, observa-se a necessidade de novos métodos de triagem para que dessa forma, seja possível identificar populações mais suscetíveis ao risco de desenvolver alguma malformação congênita, como a busca por biomarcadores bioquímicos e genéticos.

2.5.1 Biomarcadores bioquímicos

O uso de biomarcadores cardíacos pode fornecer uma visão estrutural e funcional do coração. No momento atual, os mais utilizados são: Creatinoquinases (CK e CK-MB), padrão-ouro para diagnóstico de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), e as Troponinas (TnI e TnT). Até o momento, não foram apresentadas evidências o suficiente para que haja implementação dessas dosagens em RN, sendo necessários novos estudos para identificação de parâmetros adequados e validados (VIJLBRIEF et al., 2012; NEVES et al., 2016).

A utilização Troponinas (TPN) para o diagnóstico de IAM tem com diferencial sua persistência por até 14 dias após dano miocárdico. A avaliação da TPN Ultrassensível possibilita a análise da variação em até pg/mL com utilização em menores intervalos de tempo. As frações de TPN T (TnT) e I (TnI) possuem elevada especificidade e são sensíveis a necrose miocárdica. Quando em níveis elevados após o início do IAM, foram associados ao risco cinco vezes maior de morte e três vezes maior para eventos isquêmicos. Para casos de cardiopatia congênita, as TPN podem ser detectadas no sangue de cordão umbilical, por não atravessar a barreira placentária e de produção exclusivamente fetal (TREVISANUTO et al., 2009; TARKOWSKA & FURMAGA-JABŁOŃSKA, 2012; NEVES, 2016).

Peptídeos Natriuréticos Cerebral (BNP) e seu Fragmento N-Terminal (NT-proBNP) possuem fácil determinação laboratorial e reprodutividade. Níveis elevados podem estar associados a mortalidade ou reinfarto após eventos agudos. Com base nas informações atuais, sua utilização é aconselhada para auxiliar na determinação de risco cardíaco juntamente a clínica. Variações dos níveis séricos do BNP e do NT-proBNP têm sido relacionados como a presença de malformações congênitas (SUGIMOTO et al., 2015).

A níveis elevados de homocisteína (Hcy), também chamado de hiper-homocisteinemia (HHcy) são associados a doenças cardiovasculares, podendo estar presente em mais de 40% dos pacientes com doença da artéria coronária, cerebrovascular ou vascular periférica. A HHcy está associada a hipertensão, maior risco de eventos cardiovasculares, aumento do

estresse oxidativo, dano tecidual e propensão a trombose. As concentrações plasmáticas de homocisteína podem ser influenciadas tanto por fatores nutricionais (níveis de vitamina B-12 e folato), quanto por fatores genéticos relacionados a enzimas do metabolismo da metionina e do ciclo do folato, além de estados patológicos. Baixos níveis de B-12 associados a níveis elevados de homocisteína são associados a diversas malformações congênitas, como malformação do tubo neural e presença de DCC (VANNUCCHI & MELO, 2009; CZEIZEL et al., 2013; LIU et al., 2018; RONG et al., 2020).

A homocisteína é utilizada como marcador de risco e de gravidade cardiovascular, inclusive associada a outros marcadores para maior poder preditivo e diagnóstico. Estudos recentes têm demonstrado a presença de HHcy tanto em recém-nascidos portadores de DCC quanto em suas respectivas mães, que a dosagem desse marcador pode contribuir para identificação de maior gravidade, com maior preparo, atenção e suporte da equipe de saúde (SURMIAK et al., 2017; LIU et al., 2018; BOUZIDI et al., 2020).

É de suma importância de se conhecer a extensão do dano cardíaco e o risco de possíveis complicações no tratamento de crianças portadoras de DCC. A utilização de biomarcadores são ferramentas que podem ajudar na caracterização hemodinâmica, além de fornecer dados quantitativos futuramente poderão ser padronizados e proporcionando uma alternativa para triagem diagnóstica.

2.6 Metabolismo do Folato e a Homocisteína

O folato ou ácido fólico é um importante cofator que participa de diversos processos bioquímicos, no metabolismo de aminoácidos, na síntese do timidilato e metilação do DNA. O ciclo do folato também é associado ao metabolismo da Hcy, onde um de seus metabólitos participa da metilação da Hcy para metionina e utilizam com cofator a vitamina B-12. A ingestão adequada destes nutrientes, folato e B-12, são de suma importância para manutenção do funcionamento adequado de diversas funções metabólicas (VAN BEYNUM et al., 2006; HIRAOKA & KAGAWA, 2017; ELIZABETH et al., 2017).

A Metionina é um aminoácido essencial que pode ser obtido pela dieta e fundamental para formação da S-adenosilmetionina (SAM) que participa de diversas reações de transmetilação, resulta na transferência de um grupo metil para vários substratos (DNA, RNA, proteínas, entre outros). Após a reação da SAM, ocorre a formação da S-adenosilhomocisteína (SAH), que após hidrólise, origina adenosina e Hcy, esta que pode ser remetilada pela

Metionina sintetase (MTR) e dar origem a Metionina em casos de ingestão insuficiente pela dieta (VANNUCCHI & MELO, 2009; IACOBAZZI et al., 2014; DJURIC et al., 2018).

O folato é absorvido pela célula principalmente na forma de 5m-THF, que pode participar como doador do grupo metil para síntese da metionina e resultando em Tetrahidrofolato (THF). O THF pode ser convertido diretamente em 5,10metileno-THF pela enzima Serina Hidroximetiltransferase (SHMT). Ainda, a conversão de THF para 5,10metileno-THF pode ser realizada pela enzima Metileno-tetraidrofolato desidrogenase (MTHFD), em que um de seus metabólitos intermediários, o 10-formil-THF atua como doador de carbono para síntese de purinas. O 5,10metileno-THF pode atuar como doador de grupo metil para conversão do dUMP em dTMP catalisada pela Timidilato Sintase (TS), esta reação produz Diidrofolato (DHF), que pode retornar a THF pela ação da DHF redutase (DHFR). O 5,10metileno-THF pode ser reduzido em 5m-THF através da ação da enzima Metileno-tetraidrofolato redutase (MTHFR). A atividade da MTHFR é crítica para a disponibilidade deste metabólito para metilação e controle dos níveis de homocisteína. O resumo do ciclo do metabolismo do Folato e da Metionina está demonstrado na Figura 1 (FROSST, 1995; FONSECA et al., 1999; VANNUCCHI & MELO, 2009; HIRAOKA & KAGAWA, 2017).

Para conversão da homocisteína em metionina através da MTR utilizando o 5m-THF, ocorre a formação de um complexo entre a MTR e a vitamina B-12, que perde sua atividade após a reação. Para que a atividade da MTR seja restaurada, ocorre ação da Metionina Sintetase Redutase (MTRR), que juntamente do SAM, promovem ativação da MTR para continuidade da síntese de metionina (CAI et al., 2014; HIRAOKA & KAGAWA, 2017; ELIZABETH et al., 2017).

O desequilíbrio desta via metabólica, seja por carência nutricional, hábitos de vida ou fatores genéticos, pode resultar no acúmulo de homocisteína e no quadro de HHcy, quando acima de 15 $\mu\text{mol/L}$. A homocisteína é um aminoácido que possui um grupo tiol, quando em níveis elevados, podem formar um metabólito tóxico homocisteína tiolactona, que são associados a maior formação de radicais livres, dano tecidual, estado pró-inflamatório e eventos cardiovasculares e ateroscleróticos (EIKELBOOM et al., 1999; VANNUCCHI & MELO, 2009; ELIZABETH et al., 2017; MALIK et al., 2017).

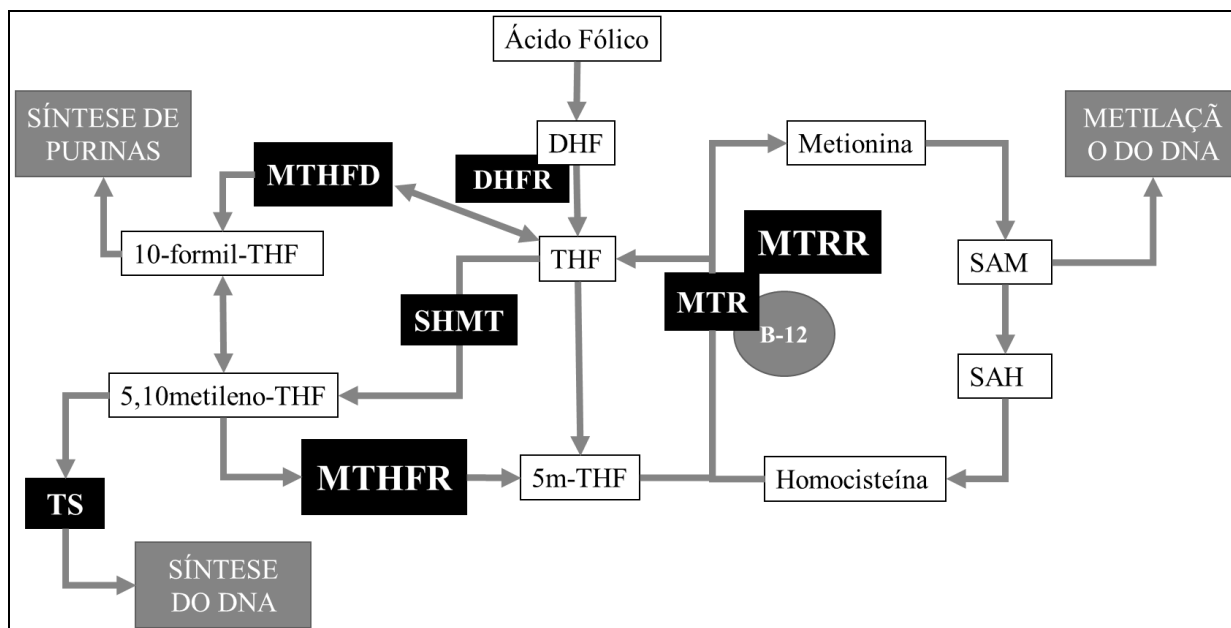


Figura 1 – Resumo do ciclo do folato e metionina adaptado de HIRAOKA & KAGAWA, 2017.

Níveis elevados de Hcy são associados ao maior risco de eventos cardiovasculares e ateroscleróticos por proporcionarem um ambiente de menor atividade fibrinolítica, associado a maior expressão de PAI-1 (Inibidor do Ativador do Plasminogênio). Níveis elevados de PAI-1 acabam por impedir a conversão do Plasminogênio em Plasmina, a qual é fundamental para atividade fibrinolítica e dissolução de coágulos, dessa forma, o desequilíbrio dos níveis de PAI-1 influenciam na hemostasia e no risco cardíaco. O resumo da participação do PAI-1 na manutenção da atividade fibrinolítica está demonstrado na Figura 2 (MIDORIKAWA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2007; YE et al., 2017; SUN et al., 2019).

O período gestacional promove diversas alterações do estado fisiológico, como o aumento do volume circulatório de até 40% da massa eritrocitária, além de leucocitose e trombocitose, como descrito no Manual de Orientação de Assistência Pré-Natal da FEBRASGO (2014). Somado a isso, o período gestacional está associado a um estado de hipercoagulabilidade, ocorre aumento da expressão dos fatores de coagulação, com níveis de plasminogênio aumentando simultaneamente com a elevação do fibrinogênio para manutenção fisiológica. A presença de alterações genéticas capazes de influenciar na manutenção do estado fisiológico pode ocasionar maiores risco de complicações materno/fetais e ainda, maior risco para malformações congênitas (LANGER & WOLOSKER, 2006; PEIXOTO, 2014).

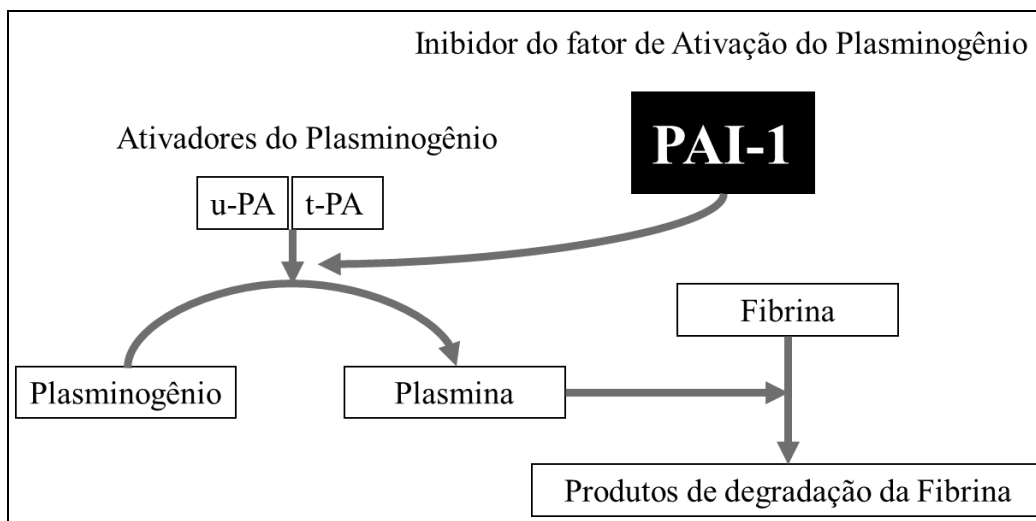


Figura 2 – Resumo da participação do PAI-1 na manutenção da atividade fibrinolítica. Adaptado de YE et al., 2017.

2.7 Fatores Genéticos

A gênese das malformações congênitas é constante objeto de estudo frente a diversas apresentações das DCC, com repercussões hemodinâmicas variadas ou assintomáticas. Ainda que tenham sido realizados experimentos em animais para mimetizar os diferentes fenótipos das DCC, seus mecanismos fisiopatológicos, genéticos, epigenéticos e ambientais necessários para as diversas repercussões cardíacas ainda não foram totalmente esclarecidos (STEFANOVIC et al., 2014; SUN & LIU et al., 2015; LIN et al., 2019).

As alterações genéticas impactam diretamente a gênese das cardiopatias congênitas quando envolvem o espectro de moléculas que participam do desenvolvimento cardíaco no período embrionário. Essas alterações genéticas podem modular a frequência e a expressão gênica de proteínas fundamentais para os processos de diferenciação celular. A presença de alterações genéticas associadas a cardiopatias congênitas pode estar relacionada aos diferentes tipos de malformações, implicando que ocorra maior complexidade das interações para caracterização dos fenótipos específicos (SCHULTHEISS et al., 1997; SRIVASTAVA & OLSON, 2000; MCCULLEY et al., 2008; LI et al., 2019).

Diante do fato dos mecanismos de gênese das cardiopatias ainda não estarem plenamente esclarecidos, acredita-se que haja uma provável relação com alterações da função endotelial. Alguns trabalhos apontam para influência do metabolismo do folato para gênese das DCC e associação à HHcy, assim como impacto de eventos cardiovasculares durante o período de desenvolvimento fetal (KUEHL et al., 2010; LAI et al., 2020).

Alterações genéticas capazes de diminuir a atividade de enzimas-chaves para o metabolismo do folato e síntese da metionina podem refletir em níveis elevados de homocisteína, principalmente envolvendo a *MTHFR* e a *MTRR*. Ainda níveis elevados de homocisteína são capazes de modular a expressão de PAI-1. Alterações genéticas da *SERPINA-1* foram associadas a um aumento da expressão de PAI-1, que juntamente a HHcy, pode ser um fator de risco importante para maior gravidade em pacientes portadores de DCC (MIDORIKAWA et al., 2000; MORANGE et al., 2007; SHAW et al., 2009; NOORI et al., 2017; WANG et al., 2018).

2.7.1 Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

A Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima crítica para a regulação dos níveis de homocisteína por ser responsável pela conversão da 5,10metileno-THF para 5m-THF. Seu gene está localizado na região 1p36.3, com mais de 40 variantes descritas, a presença de mutações/polimorfismos na *MTHFR* capazes de refletir na diminuição da atividade enzimática, que pode diminuir a síntese de metabólitos essenciais para síntese da metionina, estando associadas a níveis elevados de homocisteína. Os principais Polimorfismos de Base Única (SNP) descritos na literatura para *MTHFR* são: C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131). Atualmente, estuda-se a caracterização de variantes da *MTHFR* em diversas populações para elucidar sua prevalência e sua influência na predisposição às malformações congênitas (JUNKER et al., 2001; GARCÍA-FRAGOSO et al., 2010; WANG et al., 2015; YU et al., 2017).

MTHFR C677T (rs1801133)

A variante C677T é caracterizada por uma transição de C para T na posição 677, provocando a substituição de uma alanina para uma valina na posição 222. Essa alteração resulta em uma enzima termolábil que possui sua atividade reduzida em até 70% quando em homozigose, sendo frequentemente associada a HHcy (JUNKER et al., 2001; HUANG et al., 2014; YU et al., 2017)

Estima-se que o genótipo C677T em homozigose seja maior que 25% em hispânicos, 15% em caucasianos e até 16% nas populações asiática, sendo menos comum em indivíduos de africanos (6%), exemplificando sua distribuição variada dentre grupos étnicos e

geográficos. Esta distribuição variada ressalta a importância de caracterização da presença dessas variantes, principalmente em regiões compostas por um grupo heterogêneo e miscigenado, como no caso do Brasil (YANG et al., 2014; JUSIĆ-KARIĆ et al., 2016).

A presença da variante C677T, principalmente em homozigose (TT), foi observada como fator de risco para a presença de malformação cardíaca congênita, principalmente quando na falta de suplementação de ácido fólico pelas gestantes portadoras. (JUNKER et al., 2001; VAN BEYNUM et al., 2006; PISHVA et al., 2013; HUANG et al., 2014; NOORI et al., 2017)

Estudos recentes têm relacionado o risco do desenvolvimento de DCC baseada em mães portadoras da C677T e concentrações plasmáticas de homocisteína. As mães portadoras tanto em heterozigose (CT) quanto em homozigose (TT) apresentaram em média níveis elevados de Hcy em relação ao genótipo selvagem. A presença do alelo mutante é descrita como um fator de risco do desenvolvimento de malformação cardíaca fetal. Embora o mecanismo patogênico dessa relação não está plenamente descrito, pode estar associado a diversas vias metabólicas e entre a mãe e o feto, a presença de HHcy, de fatores de risco para o desenvolvimento fetal aos hábitos de vida e o não acompanhamento pré-natal. (SHI et al., 2021).

MTHFR A1298C (rs1801131)

A variante A1298C também é associada a uma diminuição da atividade enzimática, porém, em menor grau quando comparado com a C677T. Esse polimorfismo ocorre no exon 7, caracterizado pela transição de A para C na posição 1298 ocasionando na mudança do glutamato para uma alanina na posição 429 da proteína. Embora seja descrita na literatura como fator de risco para HHcy, devido ao seu menor impacto nos níveis de homocisteína em comparação a C677T, e de sua diferente distribuição étnico-geográfica, diversos trabalhos não demonstraram associação (FRIEDMAN et al., 1999; HOBBS et al., 2006; MTIRAOUI et al., 2006; DUAN et al., 2018; ZHANG et al., 2018)

Estima-se que a frequência do alelo A1298C seja em torno de 30% entre caucasianos, 24% entre latinos, 22% no leste asiático e de 12% entre negros. A frequência do polimorfismo A1298C em homozigose já foi descrita em torno de 15% para população Iraniana, 3% e 1,6% na população chinesa e japonesa respectivamente. (KUMAR et al., 2005; YANG et al., 2014).

Estudos recentes demonstraram associação para a presença desta variante com risco aumentado em até 40% para DCC em portadores do alelo mutante, principalmente em africanos, oriente médio e leste asiático. Entretanto, em ambos os trabalhos, é indicado a necessidade de novos estudos, principalmente na caracterização da presença desta variante em populações diferentes (SHI et al., 2015; YU et al., 2017; ZHANG et al., 2018)

MTHFR A1625C (rs145641996)

Estudo de Wang e col. (2015) foi o primeiro a indicar possível associação para presença desta variante e a relação com o risco aumentado para malformação cardíaca congênita, indicando a possibilidade de ser relacionado juntamente às variantes C677T e A1298C como fator de risco para DCC. Essa variante corresponde a mutação localizada no exon 10, promovendo a mudança de uma asparagina para treonina na posição 542. Tem-se uma carência na literatura quanto à real contribuição deste polimorfismo e os impactos em níveis de homocisteína, assim como novos estudos são necessários, com variados grupos étnicos e para confirmar possível associação e contribuir com o esclarecimento do mecanismo molecular.

2.7.2 Metionina Sintetase Redutase (MTRR)

A *MTRR* é localizada no cromossomo 5p15.31. A *MTRR* é fundamental para manutenção da atividade da *MTR*. Similar a *MTHFR*, papel da *MTRR* está diretamente associado ao metabolismo da Hcy, e a presença de variantes genéticas podem impactar diretamente nas concentrações tanto de Hcy, como 5mTHF, metionina e THF. Acredita-se que variantes da *MTRR*, principalmente para A66G (rs1801394) e C524T (rs1532268), possam afetar a atividade dessa enzima e dessa forma impactar no acúmulo de homocisteína e favorecer a HHcy juntamente com a presença de demais fatores de risco cardiovascular que, quando no ambiente fetal, ser um forte fator predisponente para gênese das DCC (VANNUCCHI & MELO, 2009; ZENG et al., 2011; CAI et al., 2014).

MTRR A66G (rs1801394)

A variante A66G leva a substituição de uma isoleucina por uma metionina na posição 22 da enzima, sendo descrita como a variante mais comum para *MTRR*. E tem sido associado a diminuição da atividade de interação com a MTR ocasionando aumento dos níveis de Hcy, principalmente quando em carência nutricional, como na falta de folato e B-12 (ZENG et al., 2011; PISHVA et al., 2013).

Estudos tem demonstrado fator de risco aumentado para cardiopatias congênitas na presença do alelo G em pacientes da Ásia e Oriente Médio. Embora verificada associação, ainda são necessários mais estudos, visto que ainda são encontrados resultados divergentes na literatura, provavelmente devida variada distribuição étnico-geográfica (SHAW et al., 2009; CAI et al., 2014; NOORI et al., 2017).

Diversos trabalhos demonstraram maior prevalência do alelo G entre os portadores de cardiopatia congênita, principalmente para o impacto da variante em homozigose em pacientes portadores de DSV e ToF, inclusive associada a presença de HHcy (ZENG et al., 2011; PISHVA et al., 2013; NOORI et al., 2017; YUAN et al., 2019).

MTRR C524T (rs1532268)

Essa variante da *MTRR*, de C>T na posição 524 leva a mudança de uma serina por uma leucina na posição 175 da enzima. Estudos demonstram impacto da presença desta variante com diminuição da afinidade com a MTR, inclusive a frequência do alelo mutante T aumentada em pacientes portadores de DCC, inclusive descrevem a relação da presença concomitante de ambas variantes (A66G e C524T) relacionadas ao risco aumentado para presença de DSA, DSV, PCA e ToF. Todavia outros trabalhos apontam para resultados controversos, podendo ser atribuídos à presença de demais fatores genéticos, e fatores étnicos e geográficos. Entretanto, novos estudos são necessários para investigar seu impacto na atividade enzimática juntamente com a presença de demais fatores de risco, presença de HHcy, seu mecanismo patogênico (ZENG et al., 2011; PISHVA et al., 2013; SU & LI, 2018).

2.7.3 SERPINA-1

As Serpinas são uma família de proteínas que participam principalmente dos processos de coagulação e fibrinólise. A *SERPINA-1* é responsável pela transcrição do PAI-1, (Inibidor do ativador do Plasminogênio-1), este que é o principal inibidor fisiológico dos ativadores do plasminogênio tecidual (t-PA) e uroquinase (u-PA), diminuindo atividade fibrinolítica. A presença de alterações genéticas no *SERPINA-1* foi associadas a uma expressão gênica aumentada, refletindo em maiores concentrações séricas de PAI-1. Níveis elevados de PAI-1 são associados ao maior risco aterotrombóticos, doenças cardiovasculares e predisposição a malformações congênitas, a exemplo da estenose aórtica (PANNEKOEK et al., 1986; DE LUCIA et al., 2009; KUEHL; et al., 2010; MARY et al., 2017; SAES et al., 2018).

SERPINA-1 G43A (rs6092)

O polimorfismo G43A (rs6092) é de importância funcional e estrutural, sendo uma troca de uma alanina por uma treonina na posição 15, no centro hidrofóbico da molécula. O alelo G aumenta o estado de ativação do peptídeo. Acredita-se que este polimorfismo seja capaz de modular a expressão de PAI-1, todavia há uma carência na literatura quanto o impacto deste polimorfismo, e ainda não se tem descrito na literatura possível relação desta variante para presença de malformações congênitas e se a influência de variantes associadas ao *SERPINA-1* juntamente com a expressão aumentada de PAI-1 associada a HHcy pode caracterizar um fator de risco para DCC (ZHANG et al., 2005; MORANGE et al., 2007; KUEHL; et al., 2010)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito dos polimorfismos nos genes MTHFR (C677T, A1298C e A1625C), MTRR (A66G e C524T) e SERPINA-1 (G43A) na hiper-homocisteinemia de recém-nascidos portadores de cardiopatia congênita diagnosticados no Hospital Universitário Francisca Mendes – Manaus – Amazonas.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever os dados demográficos e bioquímicos dos recém-nascidos e de suas respectivas mães puérperas;
- Determinar a frequência dos polimorfismos através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR);
- Avaliar associação do perfil genético com os dados clínicos e bioquímicos dos recém-nascidos;
- Analisar estatística dos genótipos encontrados em associação com os níveis de homocisteína;
- Determinar um perfil de possíveis biomarcadores moleculares de risco para maior ou menor gravidade relacionada a malformação cardíaca congênita.

4 METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

O modelo deste trabalho é um estudo corte transversal. As amostras foram coletadas entre o período de 03/2018 a 10/2020 no Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM e no Instituto da Mulher Dona Lindu, juntamente com a coleta de dados bioquímicos via prontuário dos pacientes. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Análise Especializada em Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

4.2 População

Foram incluídos no presente estudo, todos pacientes recém-nascidos menores de 1 ano, incluindo suas respectivas mães, atendidos nas clínicas, ambulatório e àqueles que realizaram cirurgia e/ou acompanhamento no HUFM, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) quando maior de idade ou pelo responsável quando menor de idade.

A abordagem aos participantes ocorreu durante a consulta e/ou atendimento e juntamente lhe foram explicados o projeto, o termo de consentimento, com livre arbítrio de participação do estudo e aplicação do questionário.

4.3 Critérios de Elegibilidade

4.3.1 Critérios de Inclusão

Foram considerados aptos à inclusão todos os recém-nascidos e neonatos menores de 1 ano atendidos nas clínicas, ambulatório e pacientes que já realizaram cirurgia e/ou acompanhamento no Hospital Universitário Francisca Mendes, de ambos os sexos, mediante assinatura dos pais ou responsável pelo TCLE.

4.3.2 Critérios de Exclusão

- Mães com históricos gestacionais ligados ao uso de drogas/álcool, infecções virais (Zika, Rubéola, etc.) e demais problemas que apresentem associação com manifestação de malformações congênitas.

4.4 Informações Éticas e Financiamento

Este trabalho é um estudo derivado do projeto **“Mapeamento Genético em Pacientes Portadores de Doenças Cardiovasculares”**, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas, conforme protocolo CAAE n° 46020315.4.0000.5020. Este projeto recebeu recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), assim como recursos próprios e dos projetos ao qual este Programa de Pós-Graduação se inclui.

4.5 Dados Clínicos e Demográficos

Os dados clínicos, bioquímicos foram obtidos mediante análise laboratorial realizada no HUFM através de consulta ao prontuário do paciente. Durante a consulta, foi realizada orientação sobre o projeto, juntamente do TCLE. Mediante consentimento, foi aplicado o questionário e entrevista com pais e/ou responsáveis, constando os dados de peso, sexo, raça (branca, negra, parda, indígena ou amarela), idade, logradouro, entre outros.

Os dados foram organizados de forma a gerar fichas individuais de cada paciente. Os dados e questionários foram armazenados e de acesso restrito somente aos participantes do projeto de pesquisa.

4.6 Amostragem

Foram utilizadas amostras de sangue periférico puérperas e recém-nascidos (RN), coletadas por profissional habilitado do próprio hospital. Para as mães, foram coletados a vácuo dois tubos de 3 ml de sangue venoso, um em EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético) e outro sem aditivo anticoagulante. Nos RN, os mesmos tubos foram utilizados, porém, a quantidade de sangue não ultrapassou 2 ml. Ambos tubos coletados foram

direcionados às análises bioquímicas realizadas no HUFM, enquanto uma alíquota do tubo com EDTA foi encaminhado ao Laboratório de Análise Especializada em Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM para análise molecular.

4.7 Análise Laboratorial

4.7.1 Testes Bioquímicos e Dosagens

Os exames bioquímicos foram realizados no laboratório do HUFM através do equipamento LABMAX 240 Premium. Para análise de Folato, Vitamina B12 e homocisteína foi utilizado o equipamento automatizado Architect i4000 (Abbott), pelo método da quimiluminescência. As instruções do fabricante foram seguidas em todos os testes.

Para análises bioquímicas, foram selecionados: Lipidograma (Colesterol total e frações e triglicerídeos), Função hepática (Bilirrubina Total e Frações), Perfil renal (Uréia e Creatinina) Gasometria, Proteína-C Reativa, Creatinoquinases (CK e CK-MB), Troponina, Desidrogenase Láctica (LDH) e Glicose.

4.7.2 Análise Molecular

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de 200 µL de sangue, utilizando-se o método direto QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento das análises atendendo a Resolução 441/2011-CNS durante o período necessário para a análise molecular.

Para os genes MTHFR, MTRR e SERPINE-1, a análise dos polimorfismos foi realizada pela técnica PCR em tempo real (qPCR) pelo sistema TaqMan® e analisados através da plataforma *QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. A identificação das sondas utilizadas para cada gene está descrita no quadro 2. A reação de amplificação foi realizada para o volume final de 10uL/reação, contendo 5uL de 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,2uL de 20x SNP *Genotyping Assay*, 2,8uL de água esterilizada, com 2uL de DNA da amostra.

Quadro 1: Identificação das sondas utilizadas para análise de PCR em Tempo Real (qPCR).

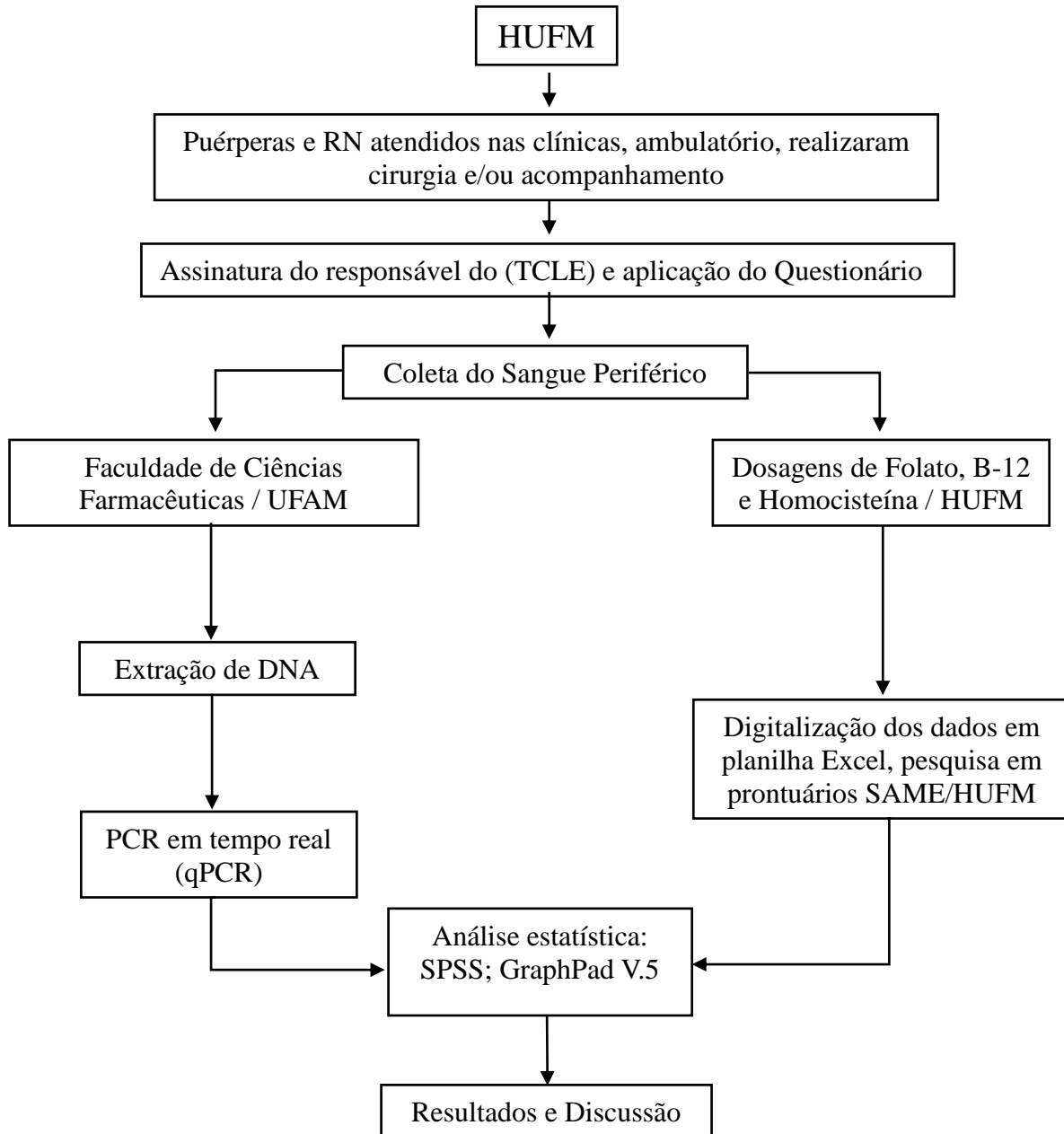
GENE	SNP
MTHFR C677T	rs1801133
MTHFR A1298C	rs1801131
MTHFR A1625C	rs145641996
MTRR A66G	rs1801394
MTRR C524T	rs1532268
SERPINA G43A	rs6092

4.8 Análise de Dados

Todos dados demográficos, laboratoriais e moleculares foram digitalizados em tabela Excel e analisados estatisticamente via softwares Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA-USA) e SPSS versão 23, de acordo com o tipo de variável. A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e aplicados os testes paramétricos ANOVA para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias, enquanto os teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para as distribuições fora do normal. A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Análises de valores inferiores a 4, foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

A estatística descritiva será aplicada para analisar as principais características clínicas e demográficas da amostra. A partir dos resultados das análises moleculares, as frequências alélicas e genótípicas dos perfis genéticos observados foram calculadas por contagem direta e analisados pelo Teste χ^2 para análise de associação das variáveis (pacientes portadores x não portadores). A razão de chances (*OR*) foi calculada para estimar o risco, e o intervalo de confiança adotado foi de 95%. Valores de $P < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

4.9 Fluxograma Das Atividades



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo científico submetido para:

JOURNAL OF MEDICAL GENETICS

Intitulado,

**THROMBOPHILIC GENE POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH SERUM
HOMOCYSTEINE CONCENTRATION IN NEWBORNS DIAGNOSED WITH
CONGENITAL HEART DISEASE**

ABSTRACT

Background: The congenital heart disease (CHD) impact the structure and cardiocirculatory function varying in presentation and your severe presentations are associated with high mortality, with 20% patients dying in the neonatal period. There is considerable evidence that genetic factors are associated with the development of CHD. **Methods:** This study investigated the frequency of the polymorphisms *MTHFR* C677T (rs1801133), A1298C (rs1801131), A1625C (rs145641996), *MTRR* A66G (rs1801394), C524T (rs1532268) and *SERPINE-1* G43A (rs6092), associated with total tHcy: homocysteine serum levels (tHcy), folic acid and cobalamin levels in newborns with CHD treated at a cardiac reference center in Manaus-Amazonas. **Results:** The study population was composed by 173 healthy postpartum women - newborns (Control Group) and 72 by postpartum women – newborn, diagnosed with heart disease (Case Group), between March 2018 and October 2019. In the control group, we observed a high frequency of maternal gestational diabetes (GDM), prematurity (OR: 6.04; 95% CI:1.79-20.29; p<.001) and (OR:3.20; 95% CI:1.76-5.85; p<.001); and still low birth weight (2.7±0.73kg) when compared to control group (3.47±0.53kg). **Conclusion:** Allelic frequencies of SNP rs1801133, rs1801394 and rs1532268 were higher in the case group than in the control group, which was associated with higher tHcy levels. Higher levels of tHcy in NB were associated with the 677TT of *MTHFR* and 66GG and 524TT of *MTRR* genotypes, regardless of the presence of CHD in the case and control groups, although higher in the case group. We suggest that homocysteine serum levels >15.48µmol/L may be a valuable reference point as a predictor CHD.

KEYWORDS: Congenital Heart Disease; Newborn; Thrombophilic Gene Polymorphisms; Homocysteine

INTRODUCTION

The Congenital Heart Disease (CHD) is the most common of all congenital malformations with its prevalence estimated at around ~1% of live births worldwide (1). Although most CHD is associated with an excellent prognosis, severe CHD presentations are associated with excessive mortality, with 20% of those affected still dying in the neonatal period (2). In Brazil, there is a significant gap in epidemiological and outcomes data, as deaths in the neonatal period correspond more than half of all children mortality, and the CHD are second major cause in that population, losing only to infectious diseases (3).

The increase of homocysteine levels during the embryonic development also is suggested to play a role to CHD (4-6). The Hyperhomocysteinemia (HHcy) is well described as risk factor to several cardiac condition and associated to CHD (7,8). A plausible mechanism for the genesis of the CHD involves the imbalance of nutrients supply during the embryologic development, which can be a result of nutritional factors, low enzymatic activity, and HHcy, which could damage the endothelial function and contribute to cardiovascular events, malformation, CHD or lead to miscarriage (9-10).

There is a considerable evidence that genetic factors contribute to predispose the development of CHD or are associated with their presence. A recent research suggest a that HHcy could influence the expression of an important transcriptional factor crucial for the correct development of the heart (11,12).

The most commons genetic alterations associated with HHcy involves the MTHFR and MTRR enzymes, which are essential at folate metabolism, as important risk factor to CHD (13,14). Insofar, others have reports failed to demonstrate a significant relationship, which evidence the need of novel studies that could clarify that possible association and how they can influence others risk factors (4,5).

In addition, the levels of PAI-1 (type 1-plasminogen activator inhibitor), main regulator of the endogenous fibrinolytic system, could be modulated by the presence of HHcy. It is known that mutations/polymorphisms at *SERPINE-1* gene could influence the PAI-1 levels contributing to a pro-thrombotic state, increasing the cardiovascular event risk (15-17). However, so far, no similar studies have related to the association of *SERPINE-1* G43A with PAI-1 modulation as a possible risk factor to CHD.

The aim of our study was to investigate the presence of the variants *MTHFR* C677T (rs1801133), A1298C (rs1801131), A1625C (rs145641996), *MTRR* A66G (rs1801394), C524T (rs1532268) and *SERPINE-1* G43A (rs6092) associating with the serum levels of THcy, folic acid and cobalamin of newborns with CHD and their respective postpartum women at a reference center in cardiology in Manaus-Amazonas.

MATERIAL AND METHODS

Sample population

The study population sample consisted of 173 postpartum women-newborns pairs (Control Group) attended at the women's institute Dona Lindu (IMDL) and 72 postpartum women-newborns pairs (Case Group) attended at the Francisca Mendes University Hospital (HUFM), during the period between, March 2018 and October 2019. All postpartum women answered a questionnaire concerning personal data and their current and previous obstetric history. In the case of the underage postpartum women, the consent form was signed by the parent or guardian. All participants, regardless of the type of childbirth (normal or cesarean), agreed to participate in the study and signed the consent form.

The control group consisted of women without consanguinity, inflammation symptoms and diseases. The case group consisted of all newborns (and their respective mothers) aged between 0 days and 3 months, undergoing cardiac surgery or diagnosed with some cardiac comorbidity. Participants were excluded if they had infectious diseases, smoking, primary diabetes, positive serology to HIV, HTLV and B/C hepatitis.

Peripheral blood samples (2-3ml) were collected in two tubes, one containing EDTA for molecular analysis and one without anticoagulant for serum homocysteine analysis for both groups. Molecular biology techniques were performed in the Specialized Analysis in hematology and molecular biology laboratory (LAEBM/UFAM). The tube without anticoagulant were centrifuged at 5000 rpm for 10 min to separate serum, which was kept at -80°C for further use in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to dosage serum homocysteine.

Molecular analysis

The DNA was extracted from leukocytes using Brazol® technique according to the manufacturer's instructions. SNPs Genotyping was conducted using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a QuantStudio 6 real-time PCR system (Applied Biosystems). The probes used were: rs1801133 (MTHFR C677T); rs1801131 (MTHFR A1298C); rs145641996 (MTHFR C1625C); rs1801394 (MTRR A66G); rs1532268 (MTRR C524T) and rs6092 (SERPIN-1 G43A).

Statistical analysis

Statistical analysis software's used were: IBM SPSS Statistics, Version 23.0 and GraphPad Prism version 5.0. Analysis of the distribution of variables was performed using the Kolmogorov-Smirnov test. The genotypic frequencies for polymorphisms were analyzed according to the expected by Hardy-Weinberg equilibrium. The ANOVA parametric test was used to analyze the distribution of the means of quantitative variables with normal distribution within categories. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the off-normal distributions. The analysis of qualitative or categorical variables of three or more groups was performed by nonparametric chi-square (χ^2), corrected by the Mantel-Haenszel test and Yates. The analysis values of less than 4, these were performed by Fisher's exact test. Allele and genotype frequencies of the SNP's observed were calculated by direct counting and analyzed by χ^2 test for association analysis of the variables (SLE x controls). The odds ratio (OR) was calculated to estimate the risk, and the adopted confidence interval was 95%.

RESULTS

The demographic data are demonstrated on table 1. Among the postpartum women of NB diagnosed with cardiac disorders (Case Group), 83.33% self-declared brown, with 66.67% over 25 years of age and 35% were primiparous. For the healthy postpartum women, 78.61% self-declared brown, 54.36% were over the age of 25, with 46% primiparous. The NB case group was composed by 54.17% female, and 53.18% male gender. Significant associations were observed for the presence of gestational diabetes (GDM) and prematurity in the case group, (OR: 6.04; 95% CI: 1.79-20.29; $p < .001$) and (OR: 3.20; 95 % CI: 1.76-5.85; $p < .001$), respectively. Low birth weight was significant ($p < .001$) among NB in the case group (2.7 ± 0.73 kg), when compared to control NB group (3.47 ± 0.53 kg).

The Table 2 describes associations between total serum concentrations of Homocysteine (tHcy), Folate and Vitamin B12 in the cases and control groups. We observed statistical significance for high tHcy and decreased values for Folate and Vitamin B12 (cobalamin) for NB cases vs NB control groups ($p < .001$). For the postpartum women, only Vitamin B12 was higher in the control group ($p = .006$). The tHcy levels were 2.45 times higher in NB cases than NB controls. The folate levels were 3.0 times higher in control NB than in case group, and B12 levels were 1.93 times lower in NB cases.

The genotype frequencies for the SNPs studied in the case and control groups are demonstrated on Table 3. In the distribution of the *MTHFR* C677T variant (rs1801133), the T variant allele presented a 2.0 times higher risk for the presence of CHD compared to the C allele (OR: 2.06; 95% CI: 1.35-3.14; $p < .001$). Our results for the *MTRR* genotypes, demonstrated that the 66G mutant alleles (rs1801394) presented a risk of 1.6 times ($p = 0.021$) and 524T (rs1532268) of 1.97 times ($p < 0.001$) compared to the normal allele. No significant differences were observed for *MTHFR* A1298C (rs1801131), A1625C (rs145641996) and to *SERPINE-1* G43A (rs6092) variant in the studied population.

The figure 1 shows the frequency of the set of genotypes found for *MTHFR* (1A) and *MTRR* (1B) in NB cases compared to the controls. We observed that for *MTHFR*, there was no difference in distribution of heterozygous genotypes between NB cases (19%) and controls (18.20%). However, no homozygous for the three variants (C677T, A1298C and A1625C) was found in the NB controls, while 14.30% of the NB cases contained the three concomitant SNPs in homozygosis. An association analysis between serum tHcy ($\mu\text{mol/L}$) and the

concomitant *MTHFR* genotypes found significant values in the NB cases (normal: 18.78 ± 6.22 ; heterozygotes: 23.82 ± 5.62 ; homozygotes: 28.31 ± 2.82 ; $p = .041$) and control NB (normal: 7.22 ± 3.02 ; heterozygotes: 10.07 ± 4.75 ; $p = .003$) (data not shown). For the *MTRR* (A66G and C524T), the results shown higher frequencies among the NB cases compared to the control group, being 1.9 times higher (57.6% vs 30.3%) in heterozygotes and 1.5 times higher (15.2% vs 10.1%) in homozygotes, respectively. The analysis of the association between serum tHcy and the concomitant *MTRR* genotypes, we found significant values in the NB cases (normal: 17.5 ± 4.16 ; heterozygous: 22.8 ± 5.36 ; homozygous: 28.42 ± 3.42 ; $p < .001$) and control NB (normal: 7.79 ± 4.01 ; heterozygous: 8.74 ± 2.95 ; homozygous: 15.25 ± 4.62 ; $p < .001$) (data not shown).

The results for the tHcy measurements associated with the genotypes found for each SNPs between the case and control groups are shown in figure 2. The 677TT of *MTHFR* genotype was associated with higher levels of tHcy in both the case and control groups. For the *MTHFR* A1298C, the mutant allele C were associated with a progressive increase in tHcy levels in both studied groups, with a significant difference in controls. So far, our results involving the *MTHFR* A1625C with CHD and tHcy levels are the second in the literature. Our data showed decreased levels in the normal genotype and increased levels in heterozygous and homozygous – Case group 1625AA (20.97 ± 5.08); 1625AC (21.86 ± 6.41); 1625CC (27.67 ± 4.26) ($p = .107$); Control group: 1625AA (8.52 ± 4.29); 1625AC (10.81 ± 5.71); 1625CC (13.65 ± 3.85) ($p < .001$).

The 66GG of *MTRR* genotype was associated with higher levels of tHcy compared to 66AA regardless of case or control groups – Case Group: 66GG (25.26 ± 5.32) vs 66AA (20.31 ± 5.03) ($p < .001$) – Control Group: 66GG (12.94 ± 5.96) vs 66AA (8.40 ± 4.81) ($p = .015$). The presence of the mutant T allele for an *MTRR* C524T variant of was associated with higher levels of tHcy regardless of case or control group – Case group: 524CC (18.74 ± 5.25) vs 524TT (29.57 ± 3.81) ($p < .001$) – Control Group: 524CC (8.15 ± 4.14) vs 524TT (16.13 ± 4.18) ($p < .001$).

To the *SERPINE-1* G34A, our results showed a slightly higher frequency in the mutant genotypes, however, without statistical significance (Table 3). The tHcy levels observed between the genotypes in both case and control groups: Case group: 43GG (21.77 ± 5.72); 43GA (22.20 ± 6.84); 43AA (20.44 ± 4.20) ($p = .835$) – Control group: 43GG (9.19 ± 4.90); 43GA (10.87 ± 4.63); 43AA (9.42 ± 4.78) ($p = .345$).

As demonstrated, the tHcy levels were higher in the case group than in the control group, in an attempt to predict serum tHcy concentration and CHD, we analyzed the sensitivity, specificity, and area under the ROC curve (AUC) between the case and Control groups, the results are demonstrated in Figure 3. Were observed AUC=0.939; 95%CI=0.912-0.966 ($p<.001$), with a sensitivity of 86.11% and a specificity 86,71% for a possible cutoff of tHcy levels $>15.48 \mu\text{mol/L}$.

DISCUSSION

The CHD is a group of malformations which can affect both structurally and cardiac function, with multifactorial causes, mostly related to genetic predisposal and epithelial damage during the embryonic formation. The genesis and pathophysiological mechanism are still not clear and even what could predispose the heterogeneity of CHD presentations. With this data, we demonstrated that the presence of polymorphism related to MTHFR and MTRR could be considered important risk factors to presence of CHD for potentially increase homocysteine levels (7,9,18), which is known to be associated to epithelial damage and oxidative stress, which could be related to malformation of heart (19).

As expected, the prevalence of normal birth was lower in the case group. Normal childbirth in Brazil is almost the mandatory indication by the Ministry of Health from Brazil, as type of delivery to be performed, being in line with medical monitoring to eliminate risks and pregnancy complications (20). Although there was observed higher prevalence of cesarean delivery among the case group (58.33%) compared to controls (46.82%), this result did not demonstrate statistical significance, although several studies reinforces the importance of early detection of any condition in routine prenatal care can, which can decrease the risk of prematurity by up to 50% and it can also influence by the type's delivery choice (21). The higher cesarean birth, GDM and prematurity and low birth weight income has already described as a risk factor to several conditions, including CHD (22,23).

The clinical data are also demonstrated that the case group presented 2.78% dehydration, and 26.39% hypoxia-ischemic syndrome. Cardiac surgeries were performed in 16.67%. We observed that, during the period of the study, most NBs in the case group (63.89%) had a closed diagnosis for some CHD, while 30.55% continued to have heart failure and 5.56% HAD AMI. The hypoxia is related to low supply to tissue and in CHD it could be associated with brain damage, and it is estimated that 16-39% of patients with severe CHD have impaired brain development (24). A Surgical intervention in the first year of life in patients with CHD is understood to be associated with a better prognosis of brain development (25,26). The presence of AMI in NB is a rare event when compared to adults and it is described that the presence of GDM, CHD, genetic changes and thromboembolic events are predisposing risk factors (27). Several studies have described the increased risk of thromboembolic and cardiac events associated with HHcy (18,28,29).

The presence of HHcy and low levels of folate and vitamin B-12 levels are associated with malformations, including in the heart (9,30,31). Although it is demonstrated that high levels of tHcy in postpartum mothers may be associated with an increased risk of CHD (32), our data did not find a significant difference in the levels of tHcy and folate between the groups of postpartum mother's, but we found significant values when comparing the levels of vitamin B-12 which plays an important role in the folate metabolism pathway, in the form of methylcobalamin being a cofactor of MTRR and MTR for Hcy methylation to methionine, which can directly impact the tHcy levels (30,33,34). The lower levels of vitamin B-12 in the postpartum women cases may be caused by nutritional deficiencies or genetic factors that may interfere with its enzyme metabolism and reflect an increase in tHcy levels, and a decrease in folate and B-12 presented by the group case when compared with the control group (18,35).

Our result corroborates to what is described at literature to an increased presence of *MTHFR* 677TT genotype associated with CHD (5,13,36). Albeit no significant differences were observed to *MTHFR* A1298C (rs1801131), we believe that with a larger sample, it will consolidate to be significant, since the genotype 1298CC vs. 1298AA presented OR: 3.29 ($p=.069$) and mutant allele C compared allele A, OR: 1.77 ($p=.052$).

To date, our results involving the *MTHFR* A1625C (rs145641996) and CHD is the second in the literature. The first attempt to associate the *MTHFR* A1625C variant and risk for CHD was made for WANG et al., 2015. They found that the mutant allele "C" as a risk factor for CHD when compared to the normal allele "A" (OR: 1.47; $p=0.008$) and the 1625CC genotype presented a 2.29 times greater risk for CHD ($p=0.016$) (14). In our study we did not find an association of SNPs genotypes rs145641996 in the studied population, we consider it an important variant that should be better explored to retain its possible correlation or not with CHD.

Our results for the *MTRR* variants corroborate that homozygous 66GG and 524TT genotype presented an increased risk for CHD (5,37-39) Although, we emphasize the need for further studies to investigate genetic changes in *MTHFR* and *MTRR* to clarify the risk of HHcy and its pathogenic mechanisms to CHD.

The literature shows that *SERPINE-1* variants can impact its expression, and promote higher levels of PAI-1, which could be directly implicated in thrombotic events, and indirectly in the predisposition to congenital malformations (16, 40). The *SERPINE-1* G43A variant promotes structural change in the hydrophobic center capable of modulating serum levels of

PAI-1 (15). Albeit we did not find association to its prevalence and increased risk to CHD, the concomitant correlation of HHcy that increases PAI-1 expression and cardiovascular events resulting from endothelial damage and thrombotic risk, is well described in the literature, and it can contribute as a predispositional factor (41-43).

When compared the concomitant genotype presence of *MTHFR*, and the same analysis for *MTRR* genotypes in both NB cases and controls, our results evidence the role of HHcy as a predispositional factor to heart's malformations and corroborate those founds in the literature in which associate the concomitant presence of these genetic variants to HHcy and a greater risk for the CHD development (10,34,37,38,44). Nevertheless, the mechanism of how fetal HHcy can influence the period of heart formation is still unknown (13,29,45,46). A recent study by Lai et al., 2020 propose an indirect downregulation of an important gene involved to cardiac genesis due to HHcy, which could be a plausible mechanism. In spite of that, it is appointed to the need of further analysis to characterize the presence of these variants in different ethnical groups (47).

With the analysis to the impact of each variant to tHcy levels, we consider that the elevated tHcy levels in the case group in relation to the control group can be explained by the presence of the other concomitant genetic alterations carried out in this study. Most studies have described a lower impact of the A1298C variant in decreasing the enzyme activity compared to C677T (48,49). The non-significant impact to A1625C at tHcy levels in the case group can be explained by the low frequency of the variant in the population studied, or even to indicate the presence of other concomitant genetic alterations.

The influence of 66GG genotype to tHcy levels presents different results in the literature still we found a higher frequency among the case group (20). In the current literature, there are still few studies describing the impact of *MTRR* C524T at tHcy. However, studies have shown that the presence of the mutant variant 524TT and HHcy is more prevalent in CHD patients (37-39)

Our data related to the *SERPINE-1* G34A is the first in the literature to attempt to associate its genotypes to cardiac NB and their tHcy levels. Our hypothesis was that polymorphisms in this gene could increase the expression of PAI-1, decreasing fibrinolytic processes and, thus, elevating it for atherothrombotic events. This SNP could act synergistically with HHcy for a worsened clinical severity in cardiac patients (16,40,49)

Since we found increased serum levels of tHcy mostly among case group, we attempt to make a ROC curve analysis to verify a valuable reference point as a predictor of cardiac severity in newborns, which is suggested to be tHcy >15.48 $\mu\text{mol/L}$. The use of tHcy as a cardiac biomarker is proposed to many cardiac conditions with moderate specificity and sensitivity, with a worse prognosis rising as tHcy increases. It can be a useful tool to enhance the diagnosis associated with other biomarkers and score systems (31,44,50).

The present study has some limitations, such as the sample size, limitations to pairs of NB and postpartum women, which cannot exceed six (06) weeks of live. Nonetheless, we believe that the frequency observed at our population studied is consistent with previous reports. Our study showed the highest frequency of concomitant variants in NB with congenital defects, but others pointed mutations were not included in this study and it points the need of further investigations on both a possible risk and tHcy influences.

CONCLUSION

Our results demonstrated that the presence of HHcy could play a crucial role in the development of CHD, as the *MTHFR* 677TT genotype was almost 4.0 times more prevalent, while the *MTRR* 66GG and 524TT were 2.5 times in the case group and presented 2.0 times higher levels tHcy than in the control group. The presence of homozygous concomitant genotypes for *MTHFR* variants was unique in cardiac NB patients, who had the highest levels of tHcy. The levels of tHcy were increased in the NB, mainly associated with the 677TT genotypes of *MTHFR* and 66GG and 524TT of *MTRR*, regardless of the cases or controls, although much higher in the cases, which led us to suggests in the analysis of the ROC curve, that the levels serum tHcy $>15.48\mu\text{mol/L}$ may be a valuable reference point as a predictor of cardiac severity in newborns.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

We consider that this original article has no conflict of interest, once that it does not have financial relation with industry, and all subjects involved at the work had the participation allowed by them or by a responsible family member that signed an informed consent. Moreover, this article is original work and that it is not under submission to any other journals.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by two Research Ethics Committee (CEP) at the Federal University of Amazonas (UFAM) under the CAAE number 46020315.4.0000.5020.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM. Processo Number: 062.00192/2019, title “Marcadores Genéticos na Cardiopatia Congênita de Recém-Nascidos da Cidade de Manaus-AM”. EDITAL N.002/2018-UNIVERSAL AMAZONAS / Coordinator: José Pereira de Moura Neto.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

- Érico Jorge Silva Freitas, Abdou Gafar Soumanou Gbadamassi and Rafael de Oliveira Brito performed the collection of samples and performed the practical and laboratorial parts of the entire project.

- Érico Jorge Silva Freitas and Abdou Gafar Soumanou Gbadamassi performed the molecular tests for the polymorphism genotyping. It should be noted that this project was the dissertation for his Master's Degree of Érico Jorge Silva Freitas.
- Rafael de Oliveira Brito, Ronaldo Castillo Camargo, Suely Regina da Silva Teles and George Adrson Butel Tavares assisted in the collection of samples and digitization of results in data analysis programs.
- Sérgio Roberto Lopes Albuquerque, Marilda de Souza Gonçalves and Rajendranath Ramasawmy assisted wrote the manuscript with support from Jose Pereira de Moura Neto.
- Marilda de Souza Gonçalves and Rajendranath Ramasawmy assisted in the development of the project and contributed to the final version of the manuscript.
- José Pereira de Moura Neto conceived the study, was the idealizer of the project and advised Érico Jorge Silva Freitas and Abdou Gafar Soumanou Gbadamassi. He helped supervise the project and assisted in sample collection and performed the analytical calculations and results simulations.
- The authors declare no conflict of interest and have no have financial relations with the industry. All donors were volunteers and provided (or a legal guardian provided) informed, written consent.

TABLES LEGENDS

Table 1: Maternal and newborn characteristics between at postpartum women Groups (Case vs Control) and at newborns Groups (Case vs Control).

Table 1: Serum levels of Homocysteine (tHcy), folate and Vitamin B-12 found between at postpartum women Groups (Case vs Control) (2A), and at newborns Groups (Case vs Control) (2B).

Table 2: Genotypic frequencies of *MTHFR*, *MTRR* and *SERPIN-1* variants in newborn groups (Case vs Control)

FIGURE LEGENDS

Figure 1: The percentage of genotype frequencies for *MTHFR* (1A) and *MTRR* (1B) variants in newborn with congenital heart disease and healthy newborns (controls). 1 – correspond to presence of all wild genotype; 2 – all heterozygous genotype; 3 – all homozygous genotype.

Figure 2: The levels of serum homocysteine compared to each genotype frequencies the variants *MTHFR*, *MTRR* and *SERPINE-1* in newborn with congenital heart disease (patients) and healthy newborns (controls). (A) the leves of homocysteine on controls and patients by the presence of the variant *MTHFR* c.677 C>T; (B) the leves of homocysteine on controls and patients by the presence of the variant *MTHFR* c.1298 A>C; (C) the leves of homocysteine on controls and patients by the presence of the variant *MTHFR* c.1625 A>C; (D) the leves of homocysteine on controls and patients by the presence of the variant *MTRR* c.66 A>G; (E) the leves of homocysteine on controls and patients by the presence of the variant *MTRR* c.524 C>T; (F) the leves of homocysteine on controls and patients by the presence of the variant *SERPINE-1* c.43 G>A;

Figure 3. ROC curve tHcy levels and congenital heart disease.

REFERENCES

1. Liu, Y., Chen, S., Zühlke, L., Black, G. C., Choy, M. K., Li, N., & Keavney, B. D. (2019). Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *International journal of epidemiology*, 48(2), 455–463.
2. Norman, M., Håkansson, S., Kusuda, S., Vento, M., Lehtonen, L., Reichman, B., Darlow, B. A., Adams, M., Bassler, D., Isayama, T., Rusconi, F., Lee, S., Lui, K., Yang, J., Shah, P. S., & International Network for Evaluation of Outcomes in Neonates (iNeo) Investigators* † (2020). Neonatal Outcomes in Very Preterm Infants with Severe Congenital Heart Defects: An International Cohort Study. *Journal of the American Heart Association*, 9(5), e015369.
3. Pinto Júnior, V. C., Branco, K. M., Cavalcante, R. C., Carvalho Junior, W., Lima, J. R., Freitas, S. M., Fraga, M. N., & Souza, N. M. (2015). Epidemiology of congenital heart disease in Brazil. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 30(2), 219–224.
4. Cai, B., Zhang, T., Zhong, R., Zou, L., Zhu, B., Chen, W., Shen, N., Ke, J., Lou, J., Wang, Z., Sun, Y., Liu, L., & Song, R. (2014). Genetic variant in MTRR, but not MTR, is associated with risk of congenital heart disease: an integrated meta-analysis. *PloS one*, 9(3), e89609.
5. Noori, N., Miri-Moghaddam, E., Dejkam, A., Garmie, Y., & Bazi, A. (2017). Are polymorphisms in MTRR A66G and MTHFR C677T genes associated with congenital heart diseases in Iranian population?. *Caspian journal of internal medicine*, 8(2), 83–90.
6. Yu, D., Zhuang, Z., Wen, Z., Zang, X., & Mo, X. (2017). MTHFR A1298C polymorphisms reduce the risk of congenital heart defects: a meta-analysis from 16 case-control studies. *Italian journal of pediatrics*, 43(1), 108.
7. Surmiak, P., Baumert, M., & Paprotny, M. (2017). Abnormal Biomarkers of Homocysteine Metabolism in Neonates with Conotruncal Heart Defects. *BioMed research international*, 2017, 7404397.
8. Djuric, D., Jakovljevic, V., Zivkovic, V., & Srejovic, I. (2018). Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 96(10), 991–1003.
9. Iacobazzi, V., Infantino, V., Castegna, A., & Andria, G. (2014). Hyperhomocysteinemia: related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Molecular genetics and metabolism*, 113(1-2), 27–33.
10. Lin, Z., Li, Q., Sun, Y., Huang, J., Wang, W., Fu, J., Xu, J., & Zeng, D. (2019). Interactions between genetic variants involved in the folate metabolic pathway and serum lipid, homocysteine levels on the risk of recurrent spontaneous abortion. *Lipids in health and disease*, 18(1), 143.
11. Richards, A. A., & Garg, V. (2010). Genetics of congenital heart disease. *Current cardiology reviews*, 6(2), 91–97.

12. Lai, G., Wang, L., Li, Z., & Zhao, Y. (2020). Homocysteine downregulates cardiac homeobox transcription factor NKX2.5 via IGFBP5. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 319(6), H1380–H1386.
13. Wang, W., Wang, Y., Gong, F., Zhu, W., & Fu, S. (2013). MTHFR C677T polymorphism and risk of congenital heart defects: evidence from 29 case-control and TDT studies. *PloS one*, 8(3), e58041.
14. Wang, Y., Sun, L., Du, W., Song, S., Wang, S., Jiang, W., Huang, T., & Li, H. (2015). The association of the MTHFR c.1625A>C genetic variant with the risk of congenital heart diseases in the Chinese. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 19(1), 44–47.
15. Morange, P. E., Saut, N., Alessi, M. C., Yudkin, J. S., Margaglione, M., Di Minno, G., Hamsten, A., Humphries, S. E., Tregouet, D. A., & Juhan-Vague, I. (2007). Association of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs with myocardial infarction, plasma PAI-1, and metabolic parameters: the HIFMECH study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(10), 2250–2257.
16. De Lucia, V., Andreassi, M. G., Sabatini, L., Ait-Ali, L., Spadoni, I., & Giusti, S. (2009). Myocardial infarction and arterial thrombosis in identical newborn twins with homozygosity for the PAI-1 4 G/5 G polymorphism. *International journal of cardiology*, 137(1), e1–e4.
17. Koch, W., Schrempf, M., Erl, A., Mueller, J. C., Hoppmann, P., Schömig, A., & Kastrati, A. (2010). 4G/5G polymorphism and haplotypes of SERPINE1 in atherosclerotic diseases of coronary arteries. *Thrombosis and haemostasis*, 103(6), 1170–1180.
18. Elizabeth, K. E., Praveen, S. L., Preethi, N. R., Jissa, V. T., & Pillai, M. R. (2017). Folate, vitamin B12, homocysteine and polymorphisms in folate metabolizing genes in children with congenital heart disease and their mothers. *European journal of clinical nutrition*, 71(12), 1437–1441.
19. Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition journal*, 14, 6.
20. Brasil. Ministério da Saúde. PORTARIA N° 11, DE 7 DE JANEIRO DE 2015. Brasília/DF; 2015. Available from: <http://www.as.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2016/07/Portaria-GM-MS-no11-do-dia-07-de-janeiro-de-2015.pdf>
21. Amaral AR, Silva JC, Ferreira BDS, et al. Impacto do diabetes gestacional nos desfechos neonatais: uma coorte retrospectiva. *Sci Med (Porto Alegre)*. 2015 Apr 28;25(1):19272. file:///C:/Users/JP/AppData/Local/Temp/19272-Article%20Text-82282-2-10-20150928.pdf
22. Øyen, N., Diaz, L. J., Leirgul, E., Boyd, H. A., Priest, J., Mathiesen, E. R., Quertermous, T., Wohlfahrt, J., & Melbye, M. (2016). Prepregnancy Diabetes and Offspring Risk of Congenital Heart Disease: A Nationwide Cohort Study. *Circulation*, 133(23), 2243–2253.
23. Best, K. E., Tennant, P., & Rankin, J. (2017). Survival, by Birth Weight and Gestational Age, in Individuals with Congenital Heart Disease: A Population-Based Study. *Journal of the American Heart Association*, 6(7), e005213.
24. Mustafa, H. J., Cross, S. N., Jacobs, K. M., Tessier, K. M., Tofte, A. N., McCarter, A. R., & Narasimhan, S. L. (2020). Preterm Birth of Infants Prenatally Diagnosed with

Congenital Heart Disease, Characteristics, Associations, and Outcomes. *Pediatric cardiology*, 41(5), 972–978.

25. Barkhuizen, M., Abella, R., Vles, J., Zimmermann, L., Gazzolo, D., & Gavilanes, A. (2021). Antenatal and Perioperative Mechanisms of Global Neurological Injury in Congenital Heart Disease. *Pediatric cardiology*, 42(1), 1–18.

26. Peterson J. K. (2018). Supporting Optimal Neurodevelopmental Outcomes in Infants and Children with Congenital Heart Disease. *Critical care nurse*, 38(3), 68–74.

27. Papneja, K., Chan, A. K., Mondal, T. K., & Paes, B. (2017). Myocardial Infarction in Neonates: A Review of an Entity with Significant Morbidity and Mortality. *Pediatric cardiology*, 38(3), 427–441.

28. Liu, J., Quan, J., Li, Y., Wu, Y., & Yang, L. (2018). Blood homocysteine levels could predict major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome: A STROBE-compliant observational study. *Medicine*, 97(40), e12626.

29. Vannucchi H, Melo SS. Hiper-homocisteinemia e risco cardiometabólico. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009 Jul;53(5):540–9.

30. Hiraoka, M., & Kagawa, Y. (2017). Genetic polymorphisms and folate status. *Congenital anomalies*, 57(5), 142–149.

31. Li, Y., Cao, L. L., Liu, L., & Qi, Q. D. (2017). Serum levels of homocysteine at admission are associated with post-stroke depression in acute ischemic stroke. *Neurological sciences; official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 38(5), 811–817.

32. Malik, R. A., Lone, M. R., Ahmed, A., Koul, K. A., & Malla, R. R. (2017). Maternal hyperhomocysteinemia and congenital heart defects: A prospective case control study in Indian population. *Indian heart journal*, 69(1), 17–19.

33. Wang, J., Zhao, J. Y., Wang, F., Peng, Q. Q., Hou, J., Sun, S. N., Gui, Y. H., Duan, W. Y., Qiao, B., & Wang, H. Y. (2014). A genetic variant in vitamin B12 metabolic genes that reduces the risk of congenital heart disease in Han Chinese populations. *PloS one*, 9(2), e88332.

34. Yuan, X., Wang, T., Gao, J., Wang, Y., Chen, Y., Kaliannan, K., Li, X., Xiao, J., Ma, T., Zhang, L., & Shao, Z. (2020). Associations of homocysteine status and homocysteine metabolism enzyme polymorphisms with hypertension and dyslipidemia in a Chinese hypertensive population. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y.; 1993)*, 42(1), 52–60.

35. Dilli, D., Doğan, N. N., Örün, U. A., Koç, M., Zenciroğlu, A., Karademir, S., & Akduman, H. (2018). Maternal and neonatal micronutrient levels in newborns with CHD. *Cardiology in the young*, 28(4), 523–529.

36. Junker, R., Kotthoff, S., Vielhaber, H., Halimeh, S., Kosch, A., Koch, H. G., Kassenböhmer, R., Heineking, B., & Nowak-Göttl, U. (2001). Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovascular research*, 51(2), 251–254.

37. Zeng, W., Liu, L., Tong, Y., Liu, H. M., Dai, L., & Mao, M. (2011). A66G and C524T polymorphisms of the methionine synthase reductase gene are associated with congenital

heart defects in the Chinese Han population. *Genetics and molecular research; GMR*, 10(4), 2597–2605.

38. Pishva, S. R., Vasudevan, R., Etemad, A., Heidari, F., Komara, M., Ismail, P., Othman, F., Karimi, A., & Sabri, M. R. (2013). Analysis of MTHFR and MTRR Gene Polymorphisms in Iranian Ventricular Septal Defect Subjects. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 2739–2752.

39. Su, J., & Li, Z. (2018). Analysis of MTR and MTRR Gene Polymorphisms in Chinese Patients with Ventricular Septal Defect. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology; AIMM*, 26(10), 769–774.

40. Kuehl, K., Loffredo, C., Lammer, E. J., Iovannisci, D. M., & Shaw, G. M. (2010). Association of congenital cardiovascular malformations with 33 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, 88(2), 101–110.

41. Midorikawa, S., Sanada, H., Hashimoto, S., & Watanabe, T. (2000). Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(1), 182–185.

42. Rodrigues, C. A., Morelli, V. M., DA Silveira, R. C., D'Almeida, V., & Lourenço, D. M. (2007). Homocysteine reduction by B-vitamin supplementation increases t-PA and PAI-1 levels in patients with venous thromboembolism. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 5(1), 195–198.

43. Sun, T., Ghosh, A. K., Eren, M., Miyata, T., & Vaughan, D. E. (2019). PAI-1 contributes to homocysteine-induced cellular senescence. *Cellular signalling*, 64, 109394.

44. Bouzidi, N., Hassine, M., Fodha, H. et al. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase gene rs1801133 C677T variant with serum homocysteine levels, and the severity of coronary artery disease. *Sci Rep* **10**, 10064 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66937-3>.

45. Wang, H. L., Sun, L., Zhou, S., & Wang, F. (2018). Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate, gene polymorphism and congenital heart disease. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 32(5), 1255–1260.

46. Wang, J., Ouyang, N., Qu, L., Lin, T., Zhang, X., Yu, Y., Jiang, C., Xie, L., Wang, L., Wang, Z., Ren, S., Chen, S., Huang, J., Liu, F., Huang, W., & Qin, X. (2017). Effect of MTHFR A1298C and MTRR A66G Genetic Mutations on Homocysteine Levels in the Chinese Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of translational internal medicine*, 5(4), 220–229.

47. Xuan, C., Li, H., Zhao, J. X., Wang, H. W., Wang, Y., Ning, C. P., Liu, Z., Zhang, B. B., He, G. W., & Lun, L. M. (2014). Association between MTHFR polymorphisms and congenital heart disease: a meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. *Scientific reports*, 4, 7311.

48. Horita M, Bueno CT, Horimoto AR, et al. MTRR rs326119 polymorphism is associated with serum concentrations of homocysteine and cobalamin, but not with congenital heart disease or coronary atherosclerosis in Brazilian patients. *IJC Hear Vasc*. 2017;14:1–5.

49. Mary, M. J., Saravanan, L., Decaraman, M., Vijayalakshmi, M., Umashankar, V., & Sailaja, J. (2017). Polymorphism of the PAI-1 gene (4G/5G) may be linked with Polycystic

Ovary Syndrome and associated pregnancy disorders in South Indian Women. *Bioinformation*, 13(5), 149–153.

50. Liu, Z., Cui, C., Wang, X., Fernandez-Escobar, A., Wu, Q., Xu, K., Mao, J., Jin, M., & Wang, K. (2018). Plasma Levels of Homocysteine and the Occurrence and Progression of Rectal Cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 1776–1783.

Table 1: Maternal and newborn characteristics between at postpartum women Groups (Case vs Control) and at newborns Groups (Case vs Control).

CHARACTERISTICS	Case Group n=72 (%)	Control Group n=173 (%)	p-value	OR (95% IC)
MATERNAL				
<u>Ethnicity:</u>				
Brown	60 (83.33)	136 (78.61)	.401	1.36 (0.66-2.79)
White	07 (9.72)	29 (16.76)	.156	0.54 (0.2-1.28)
Black	05 (6.94)	08 (4.63)	.153	2.46 (0.69-1.78)
Age ≥25 years	48 (66.67)	94 (54.36)	.075	1.68 (0.94-2.98)
Primiparity	25 (34.72)	79 (45.67)	.114	0.63 (0.36-1.12)
Gestational diabetes	09 (12.5)	04 (2.31)	<.001*	6.04 (1.79-20.29)
<u>Type of delivery:</u>				
Normal	28 (38.89)	92 (53.18)	.042	0.56 (0.32-0.98)
Cesarean	42 (58.33)	81 (46.82)	.101	1.59 (0.91-2.77)
Instrumental	02 (2.78)	0 (0)		
NEWBORN				
Female-to-Male ratio	39/33	81/92	.295	1.34 (0.77-2.33)
Premature	31 (43.06)	33 (19.08)	<.001	3.2 (1.76-5.85)
Birth Weight (mean ± SD)	2.7±0.73	3.47±0.53	<.001	
Dehydration	02 (2.78)	-		
Hypoxic Ischemic	19 (26.39)	-		
Neonatal Cardiac Surgery	12 (16.67)	-		
<u>Cardiac Diagnostic:</u>				
Congenital	46 (63.89)	-		
Insufficiency / heart failure	22 (30.55)	-		
AMI	04 (5.56)	-		

Independent – Samples T-tests Post Hoc/ Bonferroni test

OR: Odds Ratio

NB: Newborn

Postpartum Women with NB healthy (control Group)

Postpartum Women with NB diagnosed with CHD (case group)

CI: Confidence Interval

CHD: Congenital Heart Disease

Continuous variables are presented as mean ± SD

N: cases

* Fisher Test

AMI: Acute Myocardial Infarct

NB healthy (controls)

NB diagnosed with CHD (cases)

Table 3: Serum levels of Homocysteine (tHcy), folate and Vitamin B-12 found between at postpartum women Groups (Case vs Control) (2A), and at newborns Groups (Case vs Control) (2B).

2A	Levels Data [pmol/L]	Postpartum Women (Case) (n=72)	Postpartum Women (Control) (n=173)	p-value
	tHcy	13.86 ± 3.74	11.28 ± 2.59	.584
	Folate	9.71 ± 3.45	12.59 ± 3.83	.812
	Vitamin B-12	302.87 ± 88.39	357.27 ± 48.85	.006

2B	Levels Data [pmol/L]	NB (Case) (n=72)	NB (Control) (n=173)	p-value
	tHcy	21.61 ± 5.68	8.83 ± 4.28	<.001
	Folate	5.89 ± 2.61	18.37 ± 5.84	<.001
	Vitamin B-12	264.84 ± 78.32	512.52 ± 46.87	<.001

NB: Newborn CHD: Congenital Heart Disease Continuous variables are presented as mean ± SD
 Postpartum Women with NB healthy (control Group) NB healthy (controls)
 Postpartum Women with NB diagnosed with CHD (case group) NB diagnosed with CHD (cases)

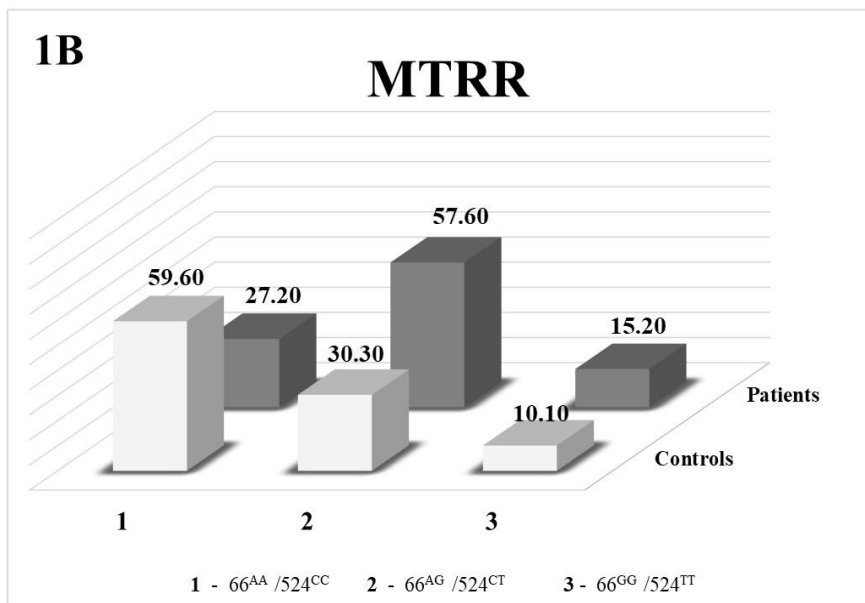
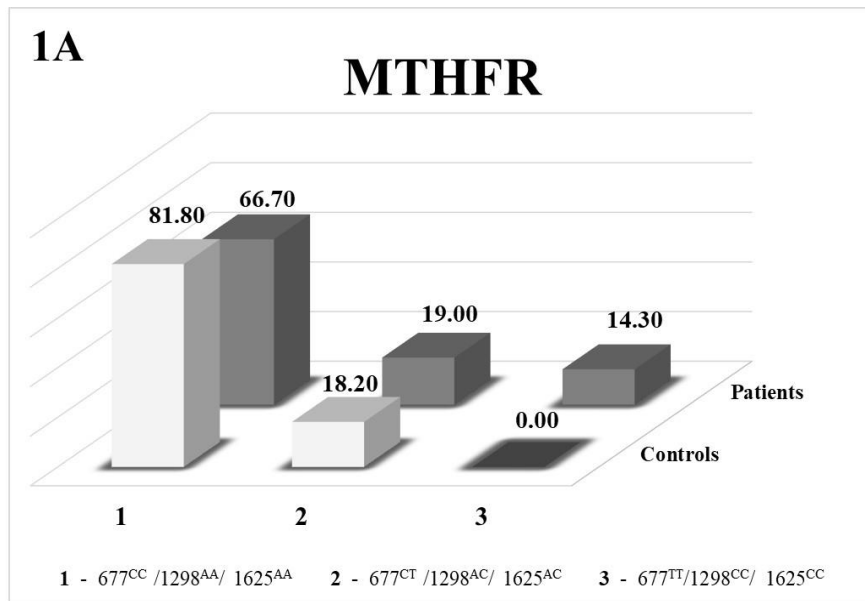
Table 3: Genotypic frequencies of *MTHFR*, *MTRR* and *SERPIN-1* variants in newborn groups (Case vs Control)

Gene	SNP ID	Genotype	CHD Newborns N= 72 (%)	Healthy Newborns N= 173 (%)	Associations	OR (CI 95%)	p-value
<i>MTHFR</i>	rs1801133 (677C > T)	TT	10 (13.88)	10 (5.78)	TT vs. CC	3.75 (1.42-9.89)	.005
		TC	34 (47.22)	58 (33.53)	TT vs. TC	1.71 (0.64-4.51)	.279
		CC	28 (38.89)	105 (60.69)	TT+TC vs. CC	2.42 (1.38-4.23)	.002
		Allele			T vs. C	2.06 (1.35-3.14)	>.001
		T	54 (0.37)	78 (0.23)			
	rs1801131 (1298A > C)	C	90 (0.63)	268 (0.77)			
		CC	05 (6.95)	04 (2.31)	CC vs. AA	3.29 (0.85-12.71)	.069
		CA	12 (16.66)	24 (13.87)	CC vs. CA	2.51 (0.57-11.05)	.219
		AA	55 (76.39)	145 (83.82)	CC+CA vs. AA	1.60 (0.81-3.15)	.171
		Allele			C vs. A	1.77 (0.98-3.17)	.052
rs145641996 (1625 A > C)	C	22 (0.15)	32 (0.09)				
	A	122 (0.85)	314 (0.91)				
	CC	05 (6.94)	06 (3.47)	CC vs. AA	2.29 (0.66-7.87)	.182	
	CA	26 (36.12)	52 (30.06)	CC vs. CA	1.67 (0.47-5.97)	.430	
	AA	42 (56.94)	115 (66.47)	CC +CA vs. AA	1.46 (0.84-2.56)	.183	
<i>MTRR</i>	rs1801394 (66 G > A)	Allele			C vs. A	1.44 (0.90-2.29)	.121
		G	36 (0.25)	64 (0.18)			
		A	110 (0.75)	282 (0.82)			
		GG	16 (22.22)	24 (13.87)	GG vs. AA	2.46 (1.09-5.52)	.028
		GA	37 (51.39)	79 (45.67)	GG vs. GA	1.42 (0.68-2.99)	.351
	rs1532268 (524 C > T)	AA	19 (26.39)	70 (40.46)	GG+GA vs. AA	1.89 (1.04-3.47)	.037
		Allele			G vs. A	1.59 (1.07-2.35)	.021
		G	69 (0.48)	127 (0.37)			
		A	75 (0.52)	219 (0.63)			
		TT	11 (15.28)	16 (9.25)	TT vs. CC	2.52 (1.06-6.01)	.033
rs6092 (43 G > A)	TC	31 (43.06)	47 (27.17)	TT vs. TC	1.04 (0.43-2.54)	.927	
	CC	30 (41.66)	110 (63.58)	TT+TC vs. CC	2.44 (1.41-4.29)	.002	
	Allele			T vs. C	1.97 (1.29-3.01)	<.001	
	T	53 (0.37)	79 (0.23)				
	C	91 (0.63)	267 (0.77)				
<i>SERPIN-1</i>	rs6092 (43 G > A)	AA	06 (8.33)	10 (5.78)	AA vs. GG	1.52 (0.53-4.36)	.438
		AG	09 (12.5)	19 (10.98)	AA vs. AG	1.27 (0.35-4.58)	.718
		GG	57 (79.17)	144 (83.24)	AA+AG vs. GG	1.31 (0.67-2.34)	.451
		Allele			A vs. G	1.34 (0.76-2.38)	.308
		A	21 (0.15)	39 (0.11)			
G	123 (0.85)	307 (0.89)					

Independent – Samples T-tests Post Hoc/ Bonferroni test
OR: Odds Ration CI: Confidence Interval

CHD: Congenital Heart Disease
N: cases

Figure 1. Genotypic frequencies of the polymorphisms in the genes of the MTHFR, MTRR in newborn with congenital heart disease and healthy newborns (controls).



1: Wild-genotypes

2: Heterozygous genotypes

3: Homozygous genotypes.

Figure 2. tHcy levels and genotypic frequencies of the polymorphisms in the genes of the MTHFR, MTRR and Serpine-1 in newborn with congenital heart disease (patients) and healthy newborns (controls).

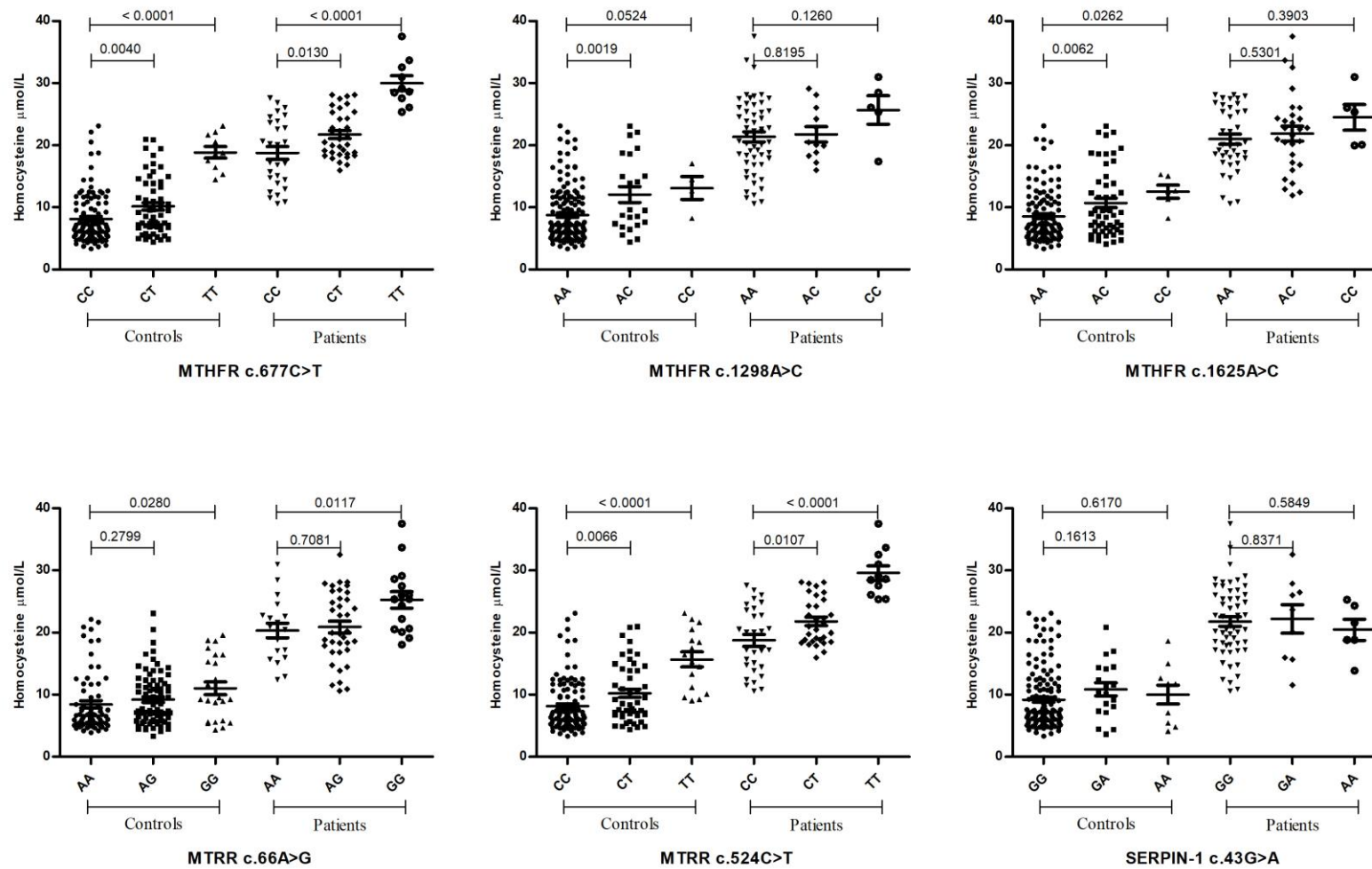
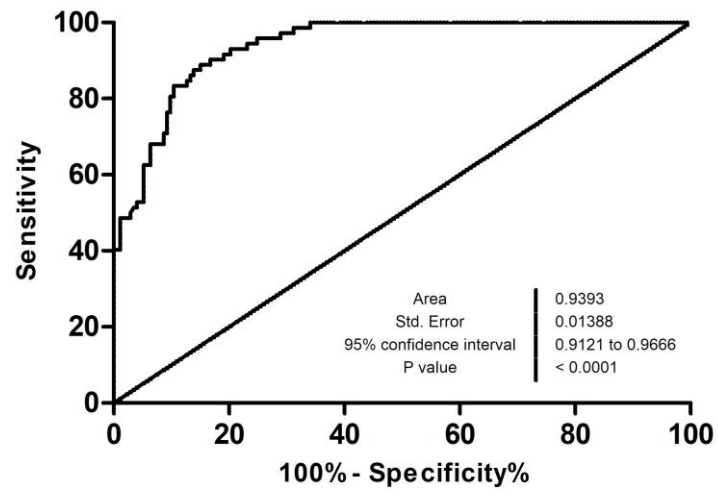


Figure 3. ROC curve tHcy levels and congenital heart disease.



6 PERSPECTIVAS

As cardiopatias congênitas correspondem a um conjunto de condições clínicas com mais de 40 tipos descritos. Entretanto os mecanismos envolvidos na gênese dessas malformações e seus fatores predisponentes, incluindo sua heterogeneidade, ainda são desconhecidas. Embora hoje em dia seja uma doença muito atrelada a comorbidades e aos custos associados ao sistema de saúde, esta é uma realidade de países ricos com elevado índice de desenvolvimento, onde há políticas de acompanhamento e maior acesso das pessoas às unidades de saúde e realização do diagnóstico precoce. A realidade de outros países, inclusive o Brasil, é de uma condição associada a elevada mortalidade infantil, sendo a segunda maior entre recém-nascidos, atrás apenas de doenças infecciosas. A necessidade de novos métodos diagnósticos, uma metodologia ativa para acompanhar e diagnosticar precocemente essas doenças em conjunto do acompanhamento das gestantes com foco na diminuição de riscos ao desenvolvimento dessas cardiopatias são fundamentais para a mudança do panorama da doença no Brasil. Trata-se de um país com dimensões continentais em que regiões distantes dos centros urbanos ainda sofrem com a falta de profissionais habilitados e equipamentos necessários para diagnóstico, tratamento e intervenções cirúrgicas. Os nossos dados demonstram uma alta frequência de alterações genéticas na cidade de Manaus – Amazonas, associadas a um ambiente predisponente à gênese dessas cardiopatias. Nossas perspectivas futuras estão relacionadas ao desenvolvimento de um trabalho ainda mais robusto, envolvendo mais marcadores genéticos relacionados a gênese dessas malformações para contribuir com a elucidação de seus mecanismos fisiopatogênicos, esclarecimentos de genes associados a heterogeneidade fenotípica e contribuir com a importância da implementação de políticas públicas voltadas a novas metodologias diagnósticas em prol da saúde da população. Dessa forma, acreditamos que abordagens com maior número de indivíduos podem corroborar com resultados mais precisos e corretos para o estabelecimento de associações fortes entre estes marcadores genéticos e bioquímicos de suscetibilidade às cardiopatias congênitas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alghamdi AA, McCrindle BW, Van Arsdell GS. Physiologic versus anatomic repair of congenitally corrected transposition of the great arteries: meta-analysis of individual patient data. *Ann Thorac Surg.* 2006 Apr;81(4):1529-35. doi: 10.1016/j.athoracsur.2005.09.035. PMID: 16564320
- Amorim MMR, Vilela PC, Santos ARVD, Melo EFP, Bernardes HF, et al. Impacto das malformações congênitas na mortalidade perinatal e neonatal em uma maternidade-escola do Recife. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant. Recife,* 2006 6(Supl 1): S19-S25. doi: 10.1590/S1519-38292006000500003
- Anilkumar M. Patent ductus arteriosus. *Cardiol Clin.* 2013 Aug;31(3):417-30. doi: 10.1016/j.ccl.2013.05.006. PMID: 23931103.
- Apitz C, Webb GD, Redington AN. Tetralogy of Fallot. *The Lancet,* 2009 374(9699), 1462–1471; doi:10.1016/s0140-6736(09)60657-7
- Aragao JA, Mendonca MP, Silva MS, Moreira NA, et al. O Perfil Epidemiológico dos Pacientes com Cardiopatias Congênitas Submetidos à Cirurgia no Hospital do Coração. *Rev Bras de Ciência em Saúde,* 2013 vol17 3:263-268, 2013. doi:10.4034/RBCS.2013.17.03.08
- Arth AC, Tinker SC, Simeone RM, Ailes EC, Cragan JD, Grosse SD. Inpatient Hospitalization Costs Associated with Birth Defects Among Persons of All Ages - United States, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017 Jan 20;66(2):41-46. doi: 10.15585/mmwr.mm6602a1. PMID: 28103210; PMCID: PMC5657658.
- Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. "Down syndrome: an insight of the disease". *J Biomed Sci.* 2015 Jun 11;22(1):41. doi: 10.1186/s12929-015-0138-y. PMID: 26062604; PMCID: PMC4464633.
- Atik E. Cardiopatias complexas. Do conceito à evolução. *Arquivos brasileiros de card.* 1996 67(6) 369-371 ISSN 0066782X
- Bacaltchuk T, Antunes P, Zielinsky P. Rastreamento Pré-natal de Anormalidades Cardíacas: Papel da Ultrasonografia Obstétrica de Rotina. *RBGO* 2001 v. 23, nº 9 553-558 ISSN: 0100-7203 doi: 10.1590/S0100-72032001000900002
- Bailliard F, Anderson RH. Tetralogy of Fallot. *Orphanet J Rare Dis.* 2009 Jan 13;4:2. doi: 10.1186/1750-1172-4-2. PMID: 19144126; PMCID: PMC2651859.
- Bakker MK, Bergman JEH, Krikov S, Amar E, Cocchi G, Cragan J, de Walle HEK, Gatt M, Groisman B, Liu S, Nembhard WN, Pierini A, Rissmann A, Chidambarathanu S, Sipek A Jr, Szabova E, Tagliabue G, Tucker D, Mastroiacovo P, Botto LD. Prenatal diagnosis and prevalence of critical congenital heart defects: an international retrospective cohort study. *BMJ Open.* 2019 Jul 2;9(7):e028139. doi: 10.1136/bmjopen-2018-028139. PMID: 31270117; PMCID: PMC6609145.

- Baumgartner H, Bonhoeffer P, De Groot NM, de Haan F, Deanfield JE, Galie N, Gatzoulis MA, Gohlke-Baerwolf C, Kaemmerer H, Kilner P, Meijboom F, Mulder BJ, Oechslin E, Oliver JM, Serraf A, Szatmari A, Thaulow E, Vouhe PR, Walma E; Task Force on the Management of Grown-up Congenital Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC); Association for European Paediatric Cardiology (AEPC); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC Guidelines for the management of grown-up congenital heart disease (new version 2010). *Eur Heart J*. 2010 Dec;31(23):2915-57. doi: 10.1093/eurheartj/ehq249. Epub 2010 Aug 27. PMID: 20801927.
- Belo WA, Oselame GB, Neves EB. Perfil clínico-hospitalar de crianças com cardiopatia congênita. *Cad. Saúde Colet*. 2016, 24 (2): 216-220 Rio de Janeiro. doi: 10.1590/1414-462X201600020258
- Born D. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para Gravidez na Mulher Portadora de Cardiopatia. 2009 *Arq Bras Cardiol*. 93(6 supl.1): e110-e178.
- Bouzidi N, Hassine M, Fodha H, Ben Messaoud M, Maatouk F, Gamra H, Ferchichi S. Association of the methylene-tetrahydrofolate reductase gene rs1801133 C677T variant with serum homocysteine levels, and the severity of coronary artery disease. *Sci Rep*. 2020 Jun 22;10(1):10064. doi: 10.1038/s41598-020-66937-3. PMID: 32572074; PMCID: PMC7308346.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Saúde da Criança e Aleitamento Materno. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Secretaria de Atenção à Saúde: Nota Técnica N° 7/2018-CGSCAM/DAPES/SAS/MS; 2018
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Síntese de evidências para políticas em saúde: diagnóstico precoce de cardiopatias congênitas. Brasília: Ministério da Saúde; EVIPNet Brasil, p44; 2017.
- Bruno CJ, Havranek T. Screening for Critical Congenital Heart Disease in Newborns. *Adv Pediatr*. 2015 Aug;62(1):211-26. doi: 10.1016/j.yapd.2015.04.002. PMID: 26205115.
- Cai B, Zhang T, Zhong R, Zou L, Zhu B, Chen W, Shen N, Ke J, Lou J, Wang Z, Sun Y, Liu L, Song R. Genetic variant in MTRR, but not MTR, is associated with risk of congenital heart disease: an integrated meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Mar 4;9(3):e89609. doi: 10.1371/journal.pone.0089609. PMID: 24595101; PMCID: PMC3942359.
- Campbell M. Natural history of persistent ductus arteriosus. *Br Heart J*. 1968 Jan;30(1):4-13. doi: 10.1136/hrt.30.1.4. PMID: 5637557; PMCID: PMC459200.
- Catarino CF, Gomes MASM, Gomes SCS, Magluta C. Registros de cardiopatia congênita em crianças menores de um ano nos sistemas de informações sobre nascimento, internação e óbito do estado do Rio de Janeiro, 2006-2010* *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. Brasília, jul-set 2017 26(3) 535-543 doi: 10.5123/s1679-49742017000300011 ISSN: 1679-4974

- Clark KL, Yutzey KE, Benson DW. Transcription factors and congenital heart defects. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:97-121. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.113828. PMID: 16460268.
- Craig B. Atrioventricular septal defect: from fetus to adult. *Heart.* 2006 Dec;92(12):1879-85. doi: 10.1136/hrt.2006.093344. PMID: 17105897; PMCID: PMC1861295.
- Cuypers JA, Witsenburg M, van der Linde D, Roos-Hesselink JW. Pulmonary stenosis: update on diagnosis and therapeutic options. *Heart.* 2013 Mar;99(5):339-47. doi: 10.1136/heartjnl-2012-301964. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23303481.
- Czeizel AE, Dudás I, Vereczkey A, Bánhidly F. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients.* 2013 Nov 21;5(11):4760-75. doi: 10.3390/nu5114760. PMID: 24284617; PMCID: PMC3847759.
- De Lucia V, Andreassi MG, Sabatini L, Ait-Ali L, Spadoni I, Giusti S. Myocardial infarction and arterial thrombosis in identical newborn twins with homozygosity for the PAI-1 4 G/5 G polymorphism. *Int J Cardiol.* 2009 Sep 11;137(1):e1-4. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.05.030. Epub 2008 Aug 13. PMID: 18703246.
- Deri A, English K. EDUCATIONAL SERIES IN CONGENITAL HEART DISEASE: Echocardiographic assessment of left to right shunts: atrial septal defect, ventricular septal defect, atrioventricular septal defect, patent arterial duct. *Echo Res Pract.* 2018 Mar;5(1):R1-R16. doi: 10.1530/ERP-17-0062. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29432197; PMCID: PMC5840804.
- Desai K, Rabinowitz EJ, Epstein S. Physiologic diagnosis of congenital heart disease in cyanotic neonates. *Curr Opin Pediatr.* 2019 Apr;31(2):274-283. doi: 10.1097/MOP.0000000000000742. PMID: 30730315.
- Djuric D, Jakovljevic V, Zivkovic V, Srejovic I. Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018 Oct;96(10):991-1003. doi: 10.1139/cjpp-2018-0112. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30130426.
- Dolgner SJ, Buber J, Stout KK, Steinberg ZL. What Every Cardiologist Should Know About the 2018 Updated Adult Congenital Cardiology Guidelines. *Curr Cardiol Rep.* 2020 Feb 19;22(4):24. doi: 10.1007/s11886-020-1272-z. PMID: 32076876.
- Dolk H, Loane M, Garne E; European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation.* 2011 Mar 1;123(8):841-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958405. Epub 2011 Feb 14. PMID: 21321151.
- Doshi AR, Chikkabyrappa S. Coarctation of Aorta in Children. *Cureus.* 2018 Dec 5;10(12):e3690. doi: 10.7759/cureus.3690. PMID: 30761242; PMCID: PMC6368362.

- Duan S, Li G, Li X, Chen C, Yan T, Qiu F, Zhao L, Zhao M, Wang L, Feng Z, Ma X. A probe directed recombinase amplification assay for detection of MTHFR A1298C polymorphism associated with congenital heart disease. *Biotechniques*. 2018 May;64(5):211-217. doi: 10.2144/btn-2018-2010. PMID: 29793361.
- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*. 1999 Sep 7;131(5):363-75. doi: 10.7326/0003-4819-131-5-199909070-00008. PMID: 10475890.
- Elizabeth KE, Praveen SL, Preethi NR, Jissa VT, Pillai MR. Folate, vitamin B12, homocysteine and polymorphisms in folate metabolizing genes in children with congenital heart disease and their mothers. *Eur J Clin Nutr*. 2017 Dec;71(12):1437-1441. doi: 10.1038/ejcn.2017.135. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28876333.
- Ellesøe SG, Johansen MM, Bjerre JV, Hjortdal VE, Brunak S, Larsen LA. Familial Atrial Septal Defect and Sudden Cardiac Death: Identification of a Novel NKX2-5 Mutation and a Review of the Literature. *Congenit Heart Dis*. 2016 May;11(3):283-90. doi: 10.1111/chd.12317. Epub 2015 Dec 18. PMID: 26679770; PMCID: PMC5019245.
- Elmagrpy Z, Rayani A, Shah A, Habas E, Aburawi EH. Down syndrome and congenital heart disease: why the regional difference as observed in the Libyan experience? *Cardiovasc J Afr*. 2011 Nov-Dec;22(6):306-9. doi: 10.5830/CVJA-2010-072. PMID: 22159317; PMCID: PMC3721875.
- Engel MS, Kochilas LK. Pulse oximetry screening: a review of diagnosing critical congenital heart disease in newborns. *Med Devices (Auckl)*. 2016 Jul 11;9:199-203. doi: 10.2147/MDER.S102146. PMID: 27468253; PMCID: PMC4946827.
- Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res*. 2013 Feb 15;112(4):707-20. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300853. Erratum in: *Circ Res*. 2013 Jun 7;112(12):e182. PMID: 23410880; PMCID: PMC3827691.
- Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev*. 1999 Oct;20(5):738-59. doi: 10.1210/edrv.20.5.0381. PMID: 10529901.
- Forman J, Beech R, Slugantz L, Donnellan A. A Review of Tetralogy of Fallot and Postoperative Management. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2019 Sep;31(3):315-328. doi: 10.1016/j.cnc.2019.05.003. Epub 2019 Jul 5. PMID: 31351553.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, Mendel M, Kidron M, Bar-On H. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr*. 1999 Sep;129(9):1656-61. doi: 10.1093/jn/129.9.1656. PMID: 10460200.

- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):111-3. doi: 10.1038/ng0595-111. PMID: 7647779.
- García-Fragoso L, García-García I, Leavitt G, Renta J, Ayala MA, Cadilla CL. MTHFR polymorphisms in Puerto Rican children with isolated congenital heart disease and their mothers. *Int J Genet Mol Biol.* 2010 Mar 1;2(3):43-47. PMID: 20657745; PMCID: PMC2908276.
- Geva T, Martins JD, Wald RM. Atrial septal defects. *Lancet.* 2014 May 31;383(9932):1921-32. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62145-5. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24725467.
- Gibson S, Lewis KC. Congenital heart disease following maternal rubella during pregnancy. *AMA Am J Dis Child.* 1952 Mar;83(3):317-9. doi: 10.1001/archpedi.1952.02040070063007. PMID: 14902080.
- Guitti JC. Aspectos epidemiológicos das cardiopatias congênitas em Londrina, Paraná. *Arq Bras Cardiol.* 2000;74(5):395-9.
- Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto).* 2017 Sep;57(5):142-149. doi: 10.1111/cga.12232. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28598562; PMCID: PMC5601299.
- Hobbs CA, James SJ, Parsian A, Krakowiak PA, Jernigan S, Greenhaw JJ, Lu Y, Cleves MA. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):162-6. doi: 10.1136/jmg.2005.032656. Epub 2005 Jun 10. PMID: 15951337; PMCID: PMC2564637.
- Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jun 19;39(12):1890-900. doi: 10.1016/s0735-1097(02)01886-7. PMID: 12084585.
- Hoffman JI. Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence. *Pediatr Cardiol.* 1995 May-Jun;16(3):103-13. doi: 10.1007/BF00801907. PMID: 7617503.
- Hoffman JI. Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. *Pediatr Cardiol.* 1995 Jul-Aug;16(4):155-65. doi: 10.1007/BF00794186. PMID: 7567659.
- Hoffman JIe. The global burden of congenital heart disease. *Cardiovasc J Afr.* 2013 May;24(4):141-5. doi: 10.5830/CVJA-2013-028. PMID: 24217047; PMCID: PMC3721933.
- Huang J, Mei J, Jiang L, Jiang Z, Liu H, Ding F. MTHFR rs1801133 C>T polymorphism is associated with an increased risk of tetralogy of Fallot. *Biomed Rep.* 2014 Mar;2(2):172-176. doi: 10.3892/br.2014.222. Epub 2014 Jan 15. PMID: 24649091; PMCID: PMC3917760.

- Huber J, Peres VC, Santos TJ, Beltrão Lda F, Baumont AC, Cañedo AD, Pellanda LC. Congenital heart diseases in a reference service: clinical evolution and associated illnesses. *Arq Bras Cardiol.* 2010 Mar 1;94(3):313-8.
- Iacobazzi V, Infantino V, Castegna A, Andria G. Hyperhomocysteinemia: related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Mol Genet Metab.* 2014 Sep-Oct;113(1-2):27-33. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.07.016. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25087163.
- Jesus VS, Nascimento AM, Miranda RD, Lima JS, Tyll MD, Veríssimo AD. Fila de espera para tratamento de pacientes com cardiopatia congênita: Retrato de um centro de referência amazônico. *International Journal of Cardiovascular Sciences.* 2018 Aug;31(4):374-82. doi: 10.5935/2359-4802.20180035
- Jivanji SGM, Lubega S, Reel B, Qureshi SA. Congenital Heart Disease in East Africa. *Front Pediatr.* 2019 Jun 26;7:250. doi: 10.3389/fped.2019.00250. PMID: 31294003; PMCID: PMC6606724.
- Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H, Halimeh S, Kosch A, Koch HG, Kassenböhmer R, Heineking B, Nowak-Göttl U. Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res.* 2001 Aug 1;51(2):251-4. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00286-3. PMID: 11470464.
- Jusić-Karić A, Terzić R, Jerkić Z, Avdić A, Pođanin M. Frequency and association of 1691 (G>A) FVL, 20210 (G>A) PT and 677 (C>T) MTHFR with deep vein thrombosis in the population of Bosnia and Herzegovina. *Balkan J Med Genet.* 2016 Aug 2;19(1):43-50. doi: 10.1515/bjmg-2016-0006. PMID: 27785407; PMCID: PMC5026279.
- Kloesel B, DiNardo JA, Body SC. Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease: A Primer for Anesthesiologists. *Anesth Analg.* 2016 Sep;123(3):551-69. doi: 10.1213/ANE.0000000000001451. PMID: 27541719; PMCID: PMC4996372.
- Koshiyama DB, Rosa RF, Zen PR, Pereira VL, Graziadio C, Cóser VM, Ricachinevsky CP, Varella-Garcia M, Paskulin GA. Síndrome de deleção 22q11. 2: importância da avaliação clínica e técnica de FISH. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2009;55(4):442-6.
- Krasuski RA, Bashore TM. Congenital Heart Disease Epidemiology in the United States: Blindly Feeling for the Charging Elephant. *Circulation.* 2016 Jul 12;134(2):110-3. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023370. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27382106.
- Kuehl K, Loffredo C, Lammer EJ, Iovannisci DM, Shaw GM. Association of congenital cardiovascular malformations with 33 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Feb;88(2):101-10. doi: 10.1002/bdra.20630. PMID: 19764075; PMCID: PMC2857411
- Kumar J, Das SK, Sharma P, Karthikeyan G, Ramakrishnan L, Sengupta S. Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. *J Hum*

- Genet. 2005;50(12):655-63. doi: 10.1007/s10038-005-0313-1. Epub 2005 Oct 22. PMID: 16244782.
- Kutty S, Danford DA, Diller GP, Tutarel O. Contemporary management and outcomes in congenitally corrected transposition of the great arteries. *Heart*. 2018 Jul;104(14):1148-1155. doi: 10.1136/heartjnl-2016-311032. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29326110.
 - Lai G, Wang L, Li Z, Zhao Y. Homocysteine downregulates cardiac homeobox transcription factor NKX2.5 via IGFBP5. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020 Dec 1;319(6):H1380-H1386. doi: 10.1152/ajpheart.00347.2020. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33035436
 - Langer, B.; Wolosker, M.; Coagulação e fibrinólise: ideias atuais e suas aplicações clínicas. *Rev Med (São Paulo)*. 85(4) 157-64. out.-dez 2006.
 - Latson LA. Critical pulmonary stenosis. *J Interv Cardiol*. 2001 Jun;14(3):345-50. doi: 10.1111/j.1540-8183.2001.tb00343.x. PMID: 12053395.
 - Leite DD, Miziara H, Veloso M. Malformações cardíacas congênitas em necropsias pediátricas: características, associações e prevalência. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2010 Mar;94(3):294-9.
 - Li Z, Huang J, Liang B, Zeng D, Luo S, Yan T, Liao F, Huang J, Li J, Cai R, Deng X, Tang N. Copy number variations in the GATA4, NKX2-5, TBX5, BMP4 CRELD1, and 22q11.2 gene regions in Chinese children with sporadic congenital heart disease. *J Clin Lab Anal*. 2019 Feb;33(2):e22660. doi: 10.1002/jcla.22660. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30221396; PMCID: PMC6818592.
 - Licht DJ, Shera DM, Clancy RR, Wernovsky G, Montenegro LM, Nicolson SC, Zimmerman RA, Spray TL, Gaynor JW, Vossough A. Brain maturation is delayed in infants with complex congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Mar;137(3):529-36; discussion 536-7. doi: 10.1016/j.jtcvs.2008.10.025. PMID: 19258059; PMCID: PMC2701902.
 - Lin Z, Li Q, Sun Y, Huang J, Wang W, Fu J, Xu J, Zeng D. Interactions between genetic variants involved in the folate metabolic pathway and serum lipid, homocysteine levels on the risk of recurrent spontaneous abortion. *Lipids Health Dis*. 2019 Jun 15;18(1):143. doi: 10.1186/s12944-019-1083-7. PMID: 31200713; PMCID: PMC6570969.
 - Liu J, Quan J, Li Y, Wu Y, Yang L. Blood homocysteine levels could predict major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome: A STROBE-compliant observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Oct;97(40):e12626. doi: 10.1097/MD.00000000000012626. PMID: 30290636; PMCID: PMC6200518.
 - Liu Y, Chen S, Zühlke L, Black GC, Choy MK, Li N, Keavney BD. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol*. 2019 Apr 1;48(2):455-463. doi: 10.1093/ije/dyz009. PMID: 30783674; PMCID: PMC6469300.

- Lopes SA, Guimarães IC, Costa SF, Acosta AX, Sandes KA, Mendes CM. Mortalidade para Cardiopatias Congênitas e Fatores de Risco Associados em Recém-Nascidos. Um Estudo de Coorte. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2018 Nov;111(5):666-73. DOI: 10.5935/abc.20180175
- Ma XJ, Huang GY. Current status of screening, diagnosis, and treatment of neonatal congenital heart disease in China. *World J Pediatr*. 2018 Aug;14(4):313-314. doi: 10.1007/s12519-018-0174-2. Epub 2018 Jul 31. PMID: 30066048.
- Mahmoud H, Nicolescu AM, Filip C, Nicolae G, Duică G, Bălgrădean M, Cintează EE. Complex atrial septal defect closure in children. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(1):49-57. PMID: 31263827.
- Malik RA, Lone MR, Ahmed A, Koul KA, Malla RR. Maternal hyperhomocysteinemia and congenital heart defects: A prospective case control study in Indian population. *Indian Heart J*. 2017 Jan-Feb;69(1):17-19. doi: 10.1016/j.ihj.2016.07.014. Epub 2016 Aug 20. PMID: 28228299; PMCID: PMC5319121.
- Mani A, Meraji SM, Houshyar R, Radhakrishnan J, Mani A, Ahangar M, Rezaie TM, Taghavinejad MA, Broumand B, Zhao H, Nelson-Williams C, Lifton RP. Finding genetic contributions to sporadic disease: a recessive locus at 12q24 commonly contributes to patent ductus arteriosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 12;99(23):15054-9. doi: 10.1073/pnas.192582999. Epub 2002 Oct 30. PMID: 12409608; PMCID: PMC137543.
- Marino BS, Lipkin PH, Newburger JW, Peacock G, Gerdes M, Gaynor JW, Mussatto KA, Uzark K, Goldberg CS, Johnson WH Jr, Li J, Smith SE, Bellinger DC, Mahle WT; American Heart Association Congenital Heart Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Nursing, and Stroke Council. Neurodevelopmental outcomes in children with congenital heart disease: evaluation and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012 Aug 28;126(9):1143-72. doi: 10.1161/CIR.0b013e318265ee8a. Epub 2012 Jul 30. PMID: 22851541.
- Mary MJ, Saravanan L, Deecaraman M, Vijayalakshmi M, Umashankar V, Sailaja J. Polymorphism of the PAI-1 gene (4G/5G) may be linked with Polycystic Ovary Syndrome and associated pregnancy disorders in South Indian Women. *Bioinformation*. 2017 May 31;13(5):149-153. doi: 10.6026/97320630013149. PMID: 28690381; PMCID: PMC5498781.
- Mattos S, Regis CT, Mourato FA, de Paula Hatem T, de Freitas CP, Gomes RG, de Souza VO, Moser LR. Busca ativa por cardiopatias congênitas é factível? Experiência em oito cidades brasileiras. *Int J Cardiovasc Sci*. 2015;28(2):95-100.
- Maxwell D, Allan L, Tynan MJ. Balloon dilatation of the aortic valve in the fetus: a report of two cases. *Br Heart J*. 1991 May;65(5):256-8. doi: 10.1136/hrt.65.5.256. PMID: 2039669; PMCID: PMC1024626.
- McCulley DJ, Kang JO, Martin JF, Black BL. BMP4 is required in the anterior heart field and its derivatives for endocardial cushion remodeling, outflow tract septation, and

semilunar valve development. *Dev Dyn.* 2008 Nov;237(11):3200-9. doi: 10.1002/dvdy.21743. PMID: 18924235; PMCID: PMC2728547.

- McQuillen PS, Goff DA, Licht DJ. Effects of congenital heart disease on brain development. *Prog Pediatr Cardiol.* 2010 Aug 1;29(2):79-85. doi: 10.1016/j.ppedcard.2010.06.011. PMID: 20802830; PMCID: PMC2927012.
- Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Watanabe T. Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 27;272(1):182-5. doi: 10.1006/bbrc.2000.2753. PMID: 10872824.
- Mitchell SC, Korones SB, Berendes HW. Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history. *Circulation.* 1971 Mar;43(3):323-32. doi: 10.1161/01.cir.43.3.323. PMID: 5102136.
- Miyague NI, Cardoso SM, Meyer F, Ultramari FT, Araújo FH, Rozkowisk I, Toschi AP. Estudo epidemiológico de cardiopatias congênitas na infância e adolescência. Análise em 4.538 casos. *Arq Bras Cardiol.* 2003 Mar;80(3):269-73.
- Morange PE, Saut N, Alessi MC, Yudkin JS, Margaglione M, Di Minno G, Hamsten A, Humphries SE, Tregouet DA, Juhan-Vague I. Association of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs with myocardial infarction, plasma PAI-1, and metabolic parameters: the HIFMECH study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Oct;27(10):2250-7. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.149468. Epub 2007 Jul 26. PMID: 17656673.
- Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR, Almawi WY, Mahjoub T. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction.* 2006 Feb;131(2):395-401. doi: 10.1530/rep.1.00815. PMID: 16452733.
- Mureşan D, Mărginean C, Zaharie G, Stamatian F, Rotar IC. Complete atrioventricular septal defect in the era of prenatal diagnosis. *Med Ultrason.* 2016 Dec 5;18(4):500-507. doi: 10.11152/mu-879. PMID: 27981284.
- Mustafa HJ, Cross SN, Jacobs KM, Tessier KM, Tofte AN, McCarter AR, Narasimhan SL. Preterm Birth of Infants Prenatally Diagnosed with Congenital Heart Disease, Characteristics, Associations, and Outcomes. *Pediatr Cardiol.* 2020 Jun;41(5):972-978. doi: 10.1007/s00246-020-02345-8. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32356015; PMCID: PMC7394484.
- Neves AL, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira A, Areias JC. Cardiac injury biomarkers in paediatric age: Are we there yet? *Heart Fail Rev.* 2016 Nov;21(6):771-781. doi: 10.1007/s10741-016-9567-2. PMID: 27255332.
- Nguyen L, Cook SC. Coarctation of the Aorta: Strategies for Improving Outcomes. *Cardiol Clin.* 2015 Nov;33(4):521-30, vii. doi: 10.1016/j.ccl.2015.07.011. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26471817.

- Noori N, Miri-Moghaddam E, Dejkam A, Garmie Y, Bazi A. Are polymorphisms in MTRR A66G and MTHFR C677T genes associated with congenital heart diseases in Iranian population? *Caspian J Intern Med*. 2017 Spring;8(2):83-90. doi: 10.22088/cjim.8.2.83. PMID: 28702146; PMCID: PMC5494041.
- Nora JJ. Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. The genetic-environmental interaction. *Circulation*. 1968 Sep;38(3):604-17. doi: 10.1161/01.cir.38.3.604. PMID: 4876982.
- Overall JC Jr. Intrauterine virus infections and congenital heart disease. *Am Heart J*. 1972 Dec;84(6):823-33. doi: 10.1016/0002-8703(72)90077-4. PMID: 4361535; PMCID: PMC7119417.
- Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, van Zonneveld AJ, van Mourik JA. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J*. 1986 Oct;5(10):2539-44. PMID: 2430793; PMCID: PMC1167150.
- Peixoto, S. Manual de assistência pré-natal. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), 2a. ed. São Paulo; 2014. ISBN: 978-85-64319-24-0
- Penny DJ, Vick GW 3rd. Ventricular septal defect. *Lancet*. 2011 Mar 26;377(9771):1103-12. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61339-6. Epub 2011 Feb 23. PMID: 21349577.
- Peterson JK. Supporting Optimal Neurodevelopmental Outcomes in Infants and Children With Congenital Heart Disease. *Crit Care Nurse*. 2018 Jun;38(3):68-74. doi: 10.4037/ccn2018514. PMID: 29858197; PMCID: PMC6563801.
- Picarzo JP, González MM, Zamalloa PL, Marcos DC. Mortalidad de las cardiopatías congénitas en España durante 10 años (2003-2012). In *Anales de Pediatría* 2018 May 1 (Vol. 88, No. 5, pp. 273-279). Elsevier Doyma.
- Pinto CP, Westphal F, Abrahão AR. Fatores de riscos materno associados à cardiopatia congênita *J Health Sci Inst*. 2018;36(1):34-08
- Pinto Júnior VC, Branco KM, Cavalcante RC, Carvalho Junior W, Lima JR, Freitas SM, Fraga MN, Souza NM. Epidemiology of congenital heart disease in Brazil. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2015 Apr;30(2):219-24.
- Pishva SR, Vasudevan R, Etemad A, Heidari F, Komara M, Ismail P, Othman F, Karimi A, Sabri MR. Analysis of MTHFR and MTRR Gene Polymorphisms in Iranian Ventricular Septal Defect Subjects. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan 28;14(2):2739-52. doi: 10.3390/ijms14022739. PMID: 23358257; PMCID: PMC3588012.
- Ribeiro C, de Souza GO, Matos JP, da Silva LA, de Vasconcelos CR, da Silva Ferreira WF, de Oliveira EM. Tetralogia de Fallot intitulada de síndrome do bebê azul: uma revisão de literatura. *Disciplinarum Scientia| Saúde*. 2019 Jun 21;20(1):37-52.

- Rodrigues CA, Morelli VM, DA Silveira RC, D'Almeida V, Lourenço DM. Homocysteine reduction by B-vitamin supplementation increases t-PA and PAI-1 levels in patients with venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2007 Jan;5(1):195-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02269.x. Epub 2006 Oct 16. PMID: 17059414.
- Rong H, Huang L, Jin N, Hong J, Hu J, Wang S, Xie Y, Pu J. Elevated Homocysteine Levels Associated with Atrial Fibrillation and Recurrent Atrial Fibrillation. *Int Heart J.* 2020;61(4):705-712. doi: 10.1536/ihj.20-099. PMID: 32727999.
- Roos-Hesselink JW, Schölzel BE, Heijdra RJ, Spitaels SE, Meijboom FJ, Boersma E, Bogers AJ, Simoons ML. Aortic valve and aortic arch pathology after coarctation repair. *Heart.* 2003 Sep;89(9):1074-7. doi: 10.1136/heart.89.9.1074. PMID: 12923033; PMCID: PMC1767804.
- Rosado V, Romanelli RM, Camargos PA. Risk factors and preventive measures for catheter-related bloodstream infections. *J Pediatr (Rio J).* 2011 Nov-Dec;87(6):469-77. doi: 10.2223/JPED.2134. PMID: 22170387.
- Rosano A, Botto LD, Botting B, Mastroiacovo P. Infant mortality and congenital anomalies from 1950 to 1994: an international perspective. *J Epidemiol Community Health.* 2000 Sep;54(9):660-6. doi: 10.1136/jech.54.9.660. PMID: 10942444; PMCID: PMC1731756.
- Sadowski SL. Congenital cardiac disease in the newborn infant: past, present, and future. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2009 Mar;21(1):37-48, vi. doi: 10.1016/j.ccell.2008.10.001. PMID: 19237042.
- Saes JL, Schols SEM, van Heerde WL, Nijziel MR. Hemorrhagic disorders of fibrinolysis: a clinical review. *J Thromb Haemost.* 2018 May 30. doi: 10.1111/jth.14160. Epub ahead of print. PMID: 29847021.
- Saliba A, Figueiredo ACV, Baroneza JE, Afiune JY, Pic-Taylor A, Oliveira SF, Mazzeu JF. Genetic and genomics in congenital heart disease: a clinical review. *J Pediatr (Rio J).* 2020 May-Jun;96(3):279-288. doi: 10.1016/j.jpmed.2019.07.004. Epub 2019 Aug 14. PMID: 31421069.
- Santos MA, Azevedo VM. Estenose Aórtica no Recém-Nascido. Importância da Perfusão Miocárdica no seu Prognóstico. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(3):245-50.
- Saxena A. Congenital Heart Disease in India: A Status Report. *Indian Pediatr.* 2018 Dec 15;55(12):1075-1082. PMID: 30745481.
- Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 1997 Feb 15;11(4):451-62. doi: 10.1101/gad.11.4.451. PMID: 9042859.
- Shaw GM, Lu W, Zhu H, Yang W, Briggs FB, Carmichael SL, Barcellos LF, Lammer EJ, Finnell RH. 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal

- heart defects. *BMC Med Genet.* 2009 Jun 3;10:49. doi: 10.1186/1471-2350-10-49. PMID: 19493349; PMCID: PMC2700092.
- Shi H, Yang S, Lin N, Huang P, Yu R, Chen M, Wang L, Jiang Z, Sun X. Study on Maternal SNPs of MTHFR Gene and HCY Level Related to Congenital Heart Diseases. *Pediatr Cardiol.* 2021 Jan;42(1):42-46. doi: 10.1007/s00246-020-02449-1. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33219830; PMCID: PMC7864808.
 - Shi H, Yang S, Liu Y, Huang P, Lin N, Sun X, Yu R, Zhang Y, Qin Y, Wang L. Study on Environmental Causes and SNPs of MTHFR, MS and CBS Genes Related to Congenital Heart Disease. *PLoS One.* 2015 Jun 2;10(6):e0128646. doi: 10.1371/journal.pone.0128646. PMID: 26035828; PMCID: PMC4452709.
 - Singh GK. Congenital Aortic Valve Stenosis. *Children (Basel).* 2019 May 13;6(5):69. doi: 10.3390/children6050069. PMID: 31086112; PMCID: PMC6560383.
 - Singh S, Hakim FA, Sharma A, Roy RR, Panse PM, Chandrasekaran K, Alegria JR, Mookadam F. Hypoplasia, pseudocoarctation and coarctation of the aorta - a systematic review. *Heart Lung Circ.* 2015 Feb;24(2):110-8. doi: 10.1016/j.hlc.2014.08.006. Epub 2014 Aug 23. PMID: 25442062.
 - Spicer DE, Hsu HH, Co-Vu J, Anderson RH, Fricker FJ. Ventricular septal defect. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Dec 19;9:144. doi: 10.1186/s13023-014-0144-2. PMID: 25523232; PMCID: PMC4316658.
 - Spigel Z, Binsalamah ZM, Caldarone C. Congenitally Corrected Transposition of the Great Arteries: Anatomic, Physiologic Repair, and Palliation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu.* 2019;22:32-42. doi: 10.1053/j.pcsu.2019.02.008. PMID: 31027562.
 - Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):221-6. doi: 10.1038/35025190. PMID: 11001064.
 - Stefanovic S, Barnett P, van Duijvenboden K, Weber D, Gessler M, Christoffels VM. GATA-dependent regulatory switches establish atrioventricular canal specificity during heart development. *Nat Commun.* 2014 Apr 28;5:3680. doi: 10.1038/ncomms4680. PMID: 24770533; PMCID: PMC4015328.
 - Su J, Li Z. Analysis of MTR and MTRR Gene Polymorphisms in Chinese Patients With Ventricular Septal Defect. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018 Nov/Dec;26(10):769-774. doi: 10.1097/PAI.0000000000000512. PMID: 29293099; PMCID: PMC6250295.
 - Sugimoto M, Kuwata S, Kurishima C, Kim JH, Iwamoto Y, Senzaki H. Cardiac biomarkers in children with congenital heart disease. *World J Pediatr.* 2015 Nov;11(4):309-15. doi: 10.1007/s12519-015-0039-x. Epub 2015 Oct 11. PMID: 26454435.

- Sun R, Liu M, Lu L, Zheng Y, Zhang P. Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Jul;72(3):857-60. doi: 10.1007/s12013-015-0551-6. PMID: 25638345.
- Sun T, Ghosh AK, Eren M, Miyata T, Vaughan DE. PAI-1 contributes to homocysteine-induced cellular senescence. *Cell Signal*. 2019 Dec;64:109394. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109394. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31472244; PMCID: PMC6936332.
- Surmiak P, Baumert M, Paprotny M. Abnormal Biomarkers of Homocysteine Metabolism in Neonates with Conotruncal Heart Defects. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7404397. doi: 10.1155/2017/7404397. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28819628; PMCID: PMC5551507.
- Tarkowska A, Furmaga-Jabłońska W. The evaluation of diagnostic role of cardiac troponin T (cTnT) in newborns with heart defects. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:682538. doi: 10.1100/2012/682538. Epub 2012 Apr 1. PMID: 22547993; PMCID: PMC3324289.
- Trevisanuto D, Doglioni N, Altinier S, Zaninotto M, Plebani M, Zanardo V. Cardiac troponin I at birth is of fetal-neonatal origin. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2009 Nov;94(6):F464-6. doi: 10.1136/adc.2008.145987. Epub 2009 Mar 22. PMID: 19307224.
- van Beynum IM, Kapusta L, den Heijer M, Vermeulen SH, Kouwenberg M, Daniëls O, Blom HJ. Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation. *Eur Heart J*. 2006 Apr;27(8):981-7. doi: 10.1093/eurheartj/ehi815. Epub 2006 Mar 7. PMID: 16524890.
- van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, Roos-Hesselink JW. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov 15;58(21):2241-7. doi: 10.1016/j.jacc.2011.08.025. PMID: 22078432.
- Vannucchi H, Melo SS. Hiper-homocisteinemia e risco cardiometabólico *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53/5 doi: 10.1590/S0004-27302009000500007
- Vijlbrief DC, Benders MJ, Kemperman H, van Bel F, de Vries WB. Use of cardiac biomarkers in neonatology. *Pediatr Res*. 2012 Oct;72(4):337-43. doi: 10.1038/pr.2012.88. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22797141.
- Wallis GA, Debich-Spicer D, Anderson RH. Congenitally corrected transposition. *Orphanet J Rare Dis*. 2011 May 14;6:22. doi: 10.1186/1750-1172-6-22. PMID: 21569592; PMCID: PMC3116458.
- Wang H, Liu Y, Li Y, Wang W, Li L, Meng M, Xie Y, Zhang Y, Yunfeng Z, Han S, Zeng J, Hou Z, Jiang L. Analysis of NKX2-5 in 439 Chinese Patients with Sporadic Atrial Septal Defect. *Med Sci Monit*. 2019 Apr 15;25:2756-2763. doi: 10.12659/MSM.916052. PMID: 30982828; PMCID: PMC6481236.

- Wang J, Ouyang N, Qu L, Lin T, Zhang X, Yu Y, Jiang C, Xie L, Wang L, Wang Z, Ren S, Chen S, Huang J, Liu F, Huang W, Qin X. Effect of MTHFR A1298C and MTRR A66G Genetic Mutations on Homocysteine Levels in the Chinese Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Transl Int Med.* 2017 Dec 29;5(4):220-229. doi: 10.1515/jtim-2017-0037. PMID: 29340279; PMCID: PMC5767712.
- Wang Y, Sun L, Du W, Song S, Wang S, Jiang W, Huang T, Li H. The association of the MTHFR c.1625A>C genetic variant with the risk of congenital heart diseases in the Chinese. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015 Jan;19(1):44-7. doi: 10.1089/gtmb.2014.0253. PMID: 25494855; PMCID: PMC4278078.
- Warnes CA. Transposition of the great arteries. *Circulation.* 2006 Dec 12;114(24):2699-709. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.592352. PMID: 17159076.
- Xie D, Fang J, Liu Z, Wang H, Yang T, Sun Z, Wang A, Xiong L. Epidemiology and major subtypes of congenital heart defects in Hunan Province, China. *Medicine (Baltimore).* 2018 Aug;97(31):e11770. doi: 10.1097/MD.00000000000011770. PMID: 30075604; PMCID: PMC6081061.
- Yang B, Fan S, Zhi X, Li Y, Liu Y, Wang D, He M, Hou Y, Zheng Q, Sun G. Associations of MTHFR gene polymorphisms with hypertension and hypertension in pregnancy: a meta-analysis from 114 studies with 15411 cases and 21970 controls. *PLoS One.* 2014 Feb 5;9(2):e87497. doi: 10.1371/journal.pone.0087497. PMID: 24505291; PMCID: PMC3914818.
- Ye Y, Vattai A, Zhang X, Zhu J, Thaler CJ, Mahner S, Jeschke U, von Schönfeldt V. Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Pathologies of Female Reproductive Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 29;18(8):1651. doi: 10.3390/ijms18081651. PMID: 28758928; PMCID: PMC5578041.
- Yu D, Zhuang Z, Wen Z, Zang X, Mo X. MTHFR A1298C polymorphisms reduce the risk of congenital heart defects: a meta-analysis from 16 case-control studies. *Ital J Pediatr.* 2017 Dec 4;43(1):108. doi: 10.1186/s13052-017-0425-1. PMID: 29202788; PMCID: PMC5715640.
- Yuan X, Wang T, Gao J, Wang Y, Chen Y, Kaliannan K, Li X, Xiao J, Ma T, Zhang L, Shao Z. Associations of homocysteine status and homocysteine metabolism enzyme polymorphisms with hypertension and dyslipidemia in a Chinese hypertensive population. *Clin Exp Hypertens.* 2020;42(1):52-60. doi: 10.1080/10641963.2019.1571599. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30786773.
- Zeng W, Liu L, Tong Y, Liu HM, Dai L, Mao M. A66G and C524T polymorphisms of the methionine synthase reductase gene are associated with congenital heart defects in the Chinese Han population. *Genet Mol Res.* 2011 Oct 25;10(4):2597-605. doi: 10.4238/2011.October.25.7. PMID: 22057956.
- Zengin E, Mueller G, Blankenberg S, von Kodolitsch Y, Rickers C, Sinning C. Pregnancy in adults with congenital heart disease. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2019 Oct;9(Suppl 2):S416-S423. doi: 10.21037/cdt.2019.07.01. PMID: 31737546; PMCID: PMC6837921.

- Zhang R, Huo C, Wang X, Dang B, Mu Y, Wang Y. Two Common MTHFR Gene Polymorphisms (C677T and A1298C) and Fetal Congenital Heart Disease Risk: An Updated Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(6):2483-2496. doi: 10.1159/000488267. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29554656.
- Zhang ZY, Wang ZY, Dong NZ, Bai X, Zhang W, Ruan CG. A case of deficiency of plasma plasminogen activator inhibitor-1 related to Ala15Thr mutation in its signal peptide. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005 Jan;16(1):79-84. doi: 10.1097/00001721-200501000-00013. PMID: 15650551.
- Zimmerman M, Sable C. Congenital heart disease in low-and-middle-income countries: Focus on sub-Saharan Africa. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2020 Mar;184(1):36-46. doi: 10.1002/ajmg.c.31769. Epub 2020 Feb 6. PMID: 32026623.

ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO RESPONSÁVEL MENOR DE IDADE

Você está sendo convidado para autorizar a participação como responsável legal do menor de idade na pesquisa **“MAPEAMENTO GENÉTICO EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES”**

Estamos realizando uma pesquisa para conhecermos melhor marcadores que possam ser utilizados para doenças cardiovasculares relacionados à doença cardiovascular em pacientes atendidos no Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM, hospital de referência em cardiopatas, atendendo pacientes de todo o Amazonas e de outros estados.

Hoje é possível diagnosticar vários tipos de marcadores genéticos que são fatores de risco e propiciam a ocorrência mais frequente de doenças no coração, como dores no coração conhecido como “angina”, mudanças no ritmo das batidas do coração conhecido como “arritmia” e alterações no músculo cardíaco que impedem uma parte ou a totalidade do coração de se contrair normalmente conhecido como ‘miocardiopatias’. Todos os genes que analisaremos no projeto são ligados a doenças do coração e poderão colaborar com o cardiologista que lhe atender no estabelecimento do diagnóstico de cardiopatias herdadas, para uma correta terapêutica, suporte e prevenção de risco de uma gravidade maior em sua clínica, caso haja. Nosso projeto analisaremos 46 genes associados a cardiopatias herdadas e a identificação de indivíduos com propensão a doença do coração.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

A) A participação do menor é totalmente voluntária;

B) Você poderá interromper a participação do menor antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa da participação do menor não envolverá qualquer prejuízo para o atendimento do menor no serviço caso não aceite a participação do menor;

C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Se você autorizar a participação do menor, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue o menor poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

Todas as amostras de sangue que forem utilizadas neste projeto, você terá acesso total aos resultados, sendo estes enviados para o seu endereço pelos correios ou entregues pessoalmente pelo pesquisador deste projeto.

Também serão anexados ao projeto sem necessidade de nova entrevista, dados da sua clínica obtidos do seu prontuário médico, bem como dados hematológicos e bioquímicos de possíveis coletas de sangue que realizará caso seja acompanhado por médico do hospital ou de posto de saúde. Reitero que os dados hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, não será necessário coletar seu sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico.

BENEFÍCIOS

Até o momento não existe tratamento para qualquer doença genética. Um benefício da participação do menor neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde. Além disso, você e o menor poderão se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a doença cardiovascular mesmo não sendo portador, ou seja, se for negativo para o estudo genético. Tenha certeza de que a participação do menor será de muita importância para um melhor acompanhamento e tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético adequado.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os dados do menor serão armazenados em um computador e o nome do referido não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo o menor tem a garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da participação do menor no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) como representante legal do menor autorizar. A amostra poderá ser utilizada em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da amostra de sangue do menor em estudos posteriores.

Não, a amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

() Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso da amostra no novo projeto de pesquisa

Também em caso de concordar com o armazenamento da amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade e a do menor seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) como representante legal do menor não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação da identidade da amostra do menor e dados:

() Não, a identidade do menor não pode ser desvinculada da amostra e dados

() Sim, concordo que identidade do menor seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo. Você receberá uma via deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEPUFAM) localizado Escola de Enfermagem de Manaus - Sala 07 - Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus – AM- Fone: (92) 3305-1181 Ramal 2004 / (92) 9171-2496. O **Comitê de Ética em Pesquisa - CEP** - é um colegiado independente existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde). As atribuições do **CEP** são de papel consultivo e educativo, visando contribuir para a qualidade das pesquisas, bem como a valorização do pesquisador, que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada.

O **CEP/UFAM** é uma comissão constituída por treze membros das várias áreas do conhecimento, e um representante dos usuários, que tem por finalidade a avaliação da pesquisa com seres humanos em nossa Instituição, em conformidade com a legislação brasileira regulamentada pela CONEP.

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Mouro Neto – Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular – Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM - Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200. Bairro Coroado I - Manaus-AM-Brasil - Contato: (92) 3305-000 – (92) 98187-0920.

Dr. Rafael de Oliveira Brito - Farmacêutico Bioquímico do HUFM- Hospital Universitário Francisca Mendes - Endereço: R. Camapuã, N°108 – Cidade Nova II – Manaus/AM - Contato: (92) 36492758 - (92) 99385-3790.

□ **Érico Jorge Silva Freitas** - Farmacêutico – Mestrando pela PPGCF-UFAM Manaus/AM
– Endereço: R. Montevideu, Nº05 – Planalto – Manaus/AM – Contato: (92) 98210-0017.

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu, como representante legal do menor _____
aceito a participação na pesquisa “**MAPEAMENTO GENÉTICO EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES**”. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e autorizar a participação do menor, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desvincular a participação do menor que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa. Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

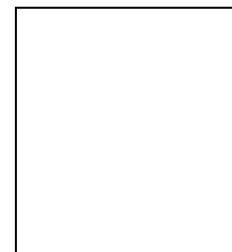
Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Assinatura do pesquisador(a)

Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa



Impressão Datiloscópica:

ANEXO 2

Modelo de questionário para coleta de dados clínicos, bioquímicos e hematológicos.



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO FRANCISCA MENDES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



QUESTIONÁRIO

REGISTRO:

NOME: _____ IDADE: _____ RG/CPF: _____

GÊNERO: M / F INT/CIRUR/AMB INÍCIO: _____ ALTA: _____ RAÇA: _____

MOTIVO DA INTERNAÇÃO E DIAGNÓSTICO

UF: _____ CIDADE: _____ BAIRRO: _____ POSSUI IRMÃOS? QUANTOS? _____

PROFISSÃO: _____ ALTURA: _____ PESO: _____

HISTÓRICO:

CARDIOPATIA DIABETES HAS RENAL FUMANTE ÁLCOOL

DROGAS ILÍCITAS DOENÇA HEMATOLÓGICA DOENÇA HEPÁTICA

PRÁTICA ATIVIDADE FÍSICA? S _____ N _____ AS VEZES _____ MONITORA A FUNÇÃO CARDÍACA

JÁ ESTEVE INTERNADO ANTES? _____ MOTIVO E HÁ QUANTO TEMPO _____

ABO +/- TRANSFUSÃO SANGÜINEA QUANTAS: _____

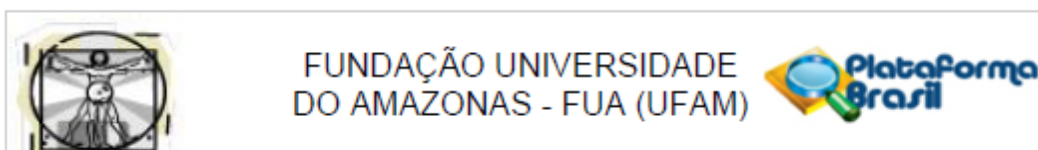
COMO DESCOBRIU PROBLEMA CARDÍACO? _____

OBSERVAÇÕES E MEDICAMENTOS

BIOQUÍMICA	LIPASE _____ / _____	GASOMETRIA	HEMOGRAMA
GLICO _____ / _____	BT _____ / _____	pH _____ / _____	WBC _____ / _____
UREIA _____ / _____	BD _____ / _____	pCO ₂ _____ / _____	RBC _____ / _____
CREAT _____ / _____	BI _____ / _____	pO ₂ _____ / _____	Hb _____ / _____
K _____ / _____	DD _____ / _____	sO ₂ _____ / _____	Htc _____ / _____
Na _____ / _____	CK _____ / _____	FO ₂ Hb _____ / _____	VCM _____ / _____
Ca _____ / _____	CKMB _____ / _____	FCOHb _____ / _____	HCM _____ / _____
Cl _____ / _____	TPN _____ / _____	FHHb _____ / _____	CHCM _____ / _____
Mg _____ / _____	LDH _____ / _____	FMetHb _____ / _____	RDW _____ / _____
P _____ / _____	LACT _____ / _____	CBase _____ / _____	PLAQ _____ / _____
TAP _____ / _____	COLT _____ / _____	CHCO ₂ _____ / _____	VPM _____ / _____
INR _____ / _____	HDL _____ / _____		NEU _____ / _____
PT _____ / _____	LDL _____ / _____		LNF _____ / _____
Alb _____ / _____	TRIG _____ / _____		MON _____ / _____
Glob _____ / _____	T4 _____ / _____		EOS _____ / _____
PCR _____ / _____	BNP-proNT _____ / _____		BAS _____ / _____
TGO/AST _____ / _____	OUTROS: _____ / _____		
TGP/ALT _____ / _____	_____ / _____		
GGT _____ / _____	_____ / _____		
FAL _____ / _____	_____ / _____		

ANEXO 4

Aprovação do comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MAPEAMENTO GENÉTICO EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Pesquisador: José Pereira de Moura neto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 46020315.4.0000.5020

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmaceuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.178.117

Data da Relatoria: 05/08/2015

Apresentação do Projeto:

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, responsáveis por mais de 17 milhões de óbitos ao ano. Aproximadamente 80% desses casos são registrados em países majoritariamente de baixa e média renda, representando 30% do total registrado no mundo. Estudos relativos à epidemiologia, fisiopatologia, biologia molecular, a identificação de genes e mapas genéticos têm sido capazes de estabelecer uma base sólida, tanto para o diagnóstico e tratamento da medicina cardiovascular. Estudos genéticos confirmaram diversas associações entre polimorfismos e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Além disso, sabemos que a distribuição dos diversos genótipos e de seus alelos depende das características étnicas das populações estudadas. Existem no Brasil inúmeros estudos genéticos relacionados às DCV, porém, no estado do Amazonas poucos são os conhecimentos relacionando polimorfismos genéticos em portadores de DCV. **Objetivo:** Nosso projeto tem o intuito de caracterizar molecularmente, hematologicamente e bioquimicamente marcadores relacionados à doença cardiovascular em pacientes atendidos no Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM, hospital de referência em cardiopatas, atendendo pacientes de todo o Amazonas e também de outros estados. **Metodologia:** Serão incluídas no presente estudo pacientes atendido nas clínicas, ambulatórios e os que irão

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.178.117

clínicas, ambulatórios e os que irão realizar cirurgia cardíaca no Hospital Universitário Francisca Mendes, após concordarem com a participação no estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou do Termo de Assentimento. Cumpre ressaltar que por se tratar de um estudo de Coorte, será explicado à cada pacientes sobre as coletas de dados clínicos, hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, e que para isso não será necessário recoletar o sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico. Considerando-se possíveis perdas em torno de 25%, o tamanho adotado foi de 1200 indivíduos. Serão excluídos do estudo indivíduos que discordarem com sua participação no estudo e que não quiserem assinar o TCLE. A abordagem aos pacientes ocorrerá durante o atendimento e a internação na Instituição e juntamente a esta será explicitado o projeto em questão e explicação do Termo de Consentimento. Desta forma, o paciente possuirá livre arbítrio para participar ou não do Projeto. Objetivo 1: As amostras de sangue serão coletadas por profissional habilitado, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Serão coletados a vácuo cinco mililitros de sangue venoso em EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico). Uma fração do sangue será encaminhada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para procedimentos de análises moleculares. Os perfis hematológicos e bioquímicos serão encaminhadas aos os setores agência transfusional e laboratório do Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM. O hemograma será realizado o no aparelho ADVIA 120 e a bioquímica no LABMAX. Objetivo 2: Os indivíduos responderão ao questionário para coleta de dados demográficos, socioeconômicos e clínicos. A complementação relativa aos dados clínicos será obtida dos possíveis prontuários médicos existentes de acompanhamento dos mesmos. Objetivo 3:

Para as análises moleculares, o DNA genômico será isolado de leucócitos a partir de 200L de sangue, utilizando-se o método direto QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. O DNA será armazenado a -20 oC até o momento das análises atendendo a Resolução

441/2011-CNS durante o período necessário para as análises moleculares dos genes abaixo citados. Todavia, o material coletado (amostra de sangue) poderá ser armazenado por até 10 anos para futuras análises se somente autorizado pelo participante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

FOLHA DE ROSTO: ADEQUADA. Assinada pelo pesquisador responsável, e pela Diretora em exercício da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.178.117

TERMO DE ANUÊNCIA: ADEQUADO. Foi apresentada anuência do Diretor do Hospital Universitário Francisca Mendes, Dr. Pedro Elias de Souza.

TCLEs: FORAM REAPRESENTADOS E ESTÃO ADEQUADOS.

ORÇAMENTO: R\$ 7.519,00 - RECURSOS PRÓPRIOS

CRONOGRAMA: INÍCIO 01/09/2015; COLETA DE DADOS 01/09/2015 31/10/2016; TÉRMINO 31/08/2017.

INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS APRESENTADO.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente protocolo de pesquisa apresenta relevância científica, reapresentado por apresentar pendências na primeira apresentação nos riscos, metodologias, TCLE e orçamento. O protocolo foi reapresentado e atende completamente a resolução 466/12 do CNS. Diante do exposto somos pela aprovação. Salvo melhor juízo é o parecer.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

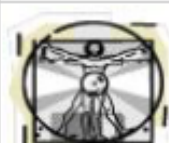
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 10 de Agosto de 2015

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: MAPEAMENTO GENÉTICO EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Pesquisador: José Pereira de Moura neto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP:);

Versão: 3

CAAE: 46020315.4.0000.5020

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmaceuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.169.578

Apresentação do Projeto:

Introdução: As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, responsáveis por mais de 17 milhões de óbitos ao ano. Aproximadamente 80% desses casos são registrados em países majoritariamente de baixa e média renda, representando 30% do total registrado no mundo. Estudos relativos à epidemiologia, fisiopatologia, biologia molecular, a identificação de genes e mapas genéticos têm sido capazes de estabelecer uma base sólida, tanto para o diagnóstico e tratamento da medicina cardiovascular. Estudos genéticos confirmaram diversas associações entre polimorfismos e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Além disso, sabemos que a distribuição dos diversos genótipos e de seus alelos depende das características étnicas das populações estudadas. Existem no Brasil inúmeros estudos genéticos relacionados às DCV, porém, no estado do Amazonas poucos são os conhecimentos relacionando polimorfismos genéticos em portadores de DCV. **Objetivo:** Nosso projeto tem o intuito de caracterizar molecularmente, hematologicamente e bioquimicamente marcadores relacionados à doença cardiovascular em pacientes atendidos no Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM, hospital de referência em cardiopatas, atendendo pacientes de todo o Amazonas e também de outros estados. **Metodologia:** Serão incluídas no presente estudo pacientes atendido nas clínicas, ambulatórios e os que irão realizar cirurgia cardíaca no Hospital Universitário Francisca Mendes, após concordarem com a

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

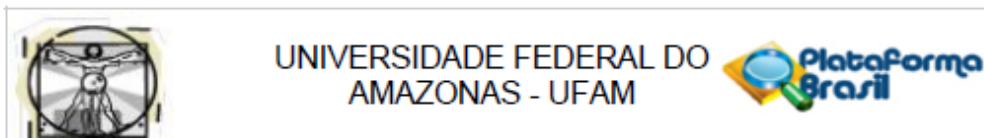
UF: AM

Telefone: (92)3305-1181

Município: MANAUS

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.169.578

MANAUS, 22 de Julho de 2020

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Teresina, 495
Bairro: Adrianópolis **CEP:** 69.057-070
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3305-1181 **E-mail:** cep.ufam@gmail.com

Página 07 de 07