



EXPOSIÇÃO A NICOTINA PARENTAL E A POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM O MAL DESENVOLVIMENTO CARDÍACO EMBRIONÁRIO: RELATO DE CASO.

KEROLAINY ALVES GADELHA¹; BRUNA LIXINSKI DINIZ², DESIRÉE DECONTE², MAIARA ANSCHAU FLORIANI², RAFAEL FABIANO MACHADO ROSA³; PAULO RICARDO GAZZOLA ZEN³

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Graduação em Biomedicina, Bolsista de iniciação científica, Serviço de Genética Clínica – kerolainy@ufcspa.edu.br

² Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Serviço de Genética Clínica – bruldiniz@gmail.com; desideconte@gmail.com; mai.anschau@gmail.com

³ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Serviço de Genética Clínica – rfmrosa@gmail.com; paulozen@ufcspa.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As cardiopatias congênitas (CHDs), também conhecidas como anomalias cardíacas congênitas, são um grupo de anomalias estruturais do coração e grandes vasos que se originam durante o desenvolvimento cardíaco (MCDONALD-MCGINN et al., 2015; SWILLEN & MC DONALD-MCGINN, 2015). Cerca de 20% dos cardiopatas possuem uma anormalidade genética ou cromossômica associada. Contudo, nas últimas décadas, estudos demonstram que as CHDs podem estar atribuídas não só às síndromes genéticas, mas também à exposição a substâncias tóxicas que podem levar a efeitos teratogênicos (DIAO et al., 2021).

A teratogênese é um processo multifatorial caracterizado pelo desenvolvimento de malformações e anomalias durante a embriogênese devido a exposição do embrião a substâncias tóxicas. Dentre as consequências da exposição do embrião a teratógenos, destacam-se as alterações cromossômicas estruturais e as variantes genéticas patogênicas. Os agentes teratógenos podem ser oriundos da exposição crônica ou aguda a substâncias químicas, físicas ou biológicas. A nicotina, por exemplo, é um importante agente teratogênico, uma vez que a sua estrutura química permite a sua passagem através da placenta, ocasionando, assim, alterações no desenvolvimento embrionário - incluindo a embriogênese cardíaca (DIAO et al., 2021; EMILIO, et al. 2010).

O tabaco é um produto químico agrícola e é, atualmente, a principal via de ingestão e inalação de nicotina. A absorção das substâncias do fumo pode ser realizada de forma ativa ou passiva, sendo a última a forma de exposição mais comum entre gestantes (KARATZA, et al., 2011). Além das vias tradicionais, uma maneira pouco relatada de exposição a nicotina é a absorção dérmica, a qual é caracterizada principalmente pela Doença da Folha do Tabaco Verde ou Green Tobacco Sickness (GTS). Essa condição está relacionada, sobretudo, ao risco ocupacional à saúde de agricultores e trabalhadores de campo no plantio de tabaco. Curiosamente, a GTS afeta especialmente as mulheres, já que estas possuem uma área de absorção dérmica relativamente maior quando comparada aos homens (E SILVA et al., 2018).

Apesar dos estudos epidemiológicos de associação entre o tabagismo parental e CHDs serem limitados, as evidências biológicas apontam para uma relação substancial entre ambos. Os efeitos genotóxicos são comumente associados à exposição materna, contudo, já existem relatos das consequências



da nicotina no fluido seminal e na espermatogênese (EMILIO, et al. 2010). Sendo assim, o processo reprodutivo pode ser diretamente afetado pela exposição ao tabaco, acarretando no mal desenvolvimento embrionário e, consequentemente, na aparição de alterações genéticas no genoma do embrião. Ainda, variantes patogênicas associadas a genes transcritores cardíacos que estão direta ou indiretamente interligados às vias de metabolização da nicotina parecem estar presentes em embriões expostos à substância (EMILIO, et al. 2010).

Portanto, nosso trabalho descreve um relato de caso de uma criança diagnosticada com cardiopatia congênita e dismorfias faciais com suspeita causal entre a exposição dérmica à nicotina pelos pais e o mal desenvolvimento cardíaco.

2. METODOLOGIA

Paciente do sexo feminino, nascido de parto vaginal, a termo (37-42 semanas) e com ecografia do 7º mês normal. Primeiro filho de pais agricultores do plantio do fumo que, ao nascimento, apresentou anormalidades craniofaciais e cardiopatia congênita. Para a investigação laboratorial foi coletado o sangue periférico em tubo de heparina e EDTA para posterior cultivo de células e extração de DNA, respectivamente. As análises realizadas foram: cariótipo, Hibridização in situ Fluorescente (FISH) para microdeleção 22q11.2 e Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) para genes associados à cardiopatia congênita e microdeleções cromossômicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cariótipo não apresentou anormalidade (46,XX). A análise por FISH para microdeleção 22q11.2 e MLPA para genes da cardiopatia congênita também não apresentaram alterações. Entretanto, foi evidenciado microdeleções nos genes *TRPS1* (8q23.3), *CREBBP* (16p13.3) e *MECP2* (Xq28) através do MLPA para microdeleções cromossômicas.

Na área da genética, a busca pela causa molecular para determinado fenótipo clínico é um dos maiores desafios encontrados, de forma que diversas síndromes já foram associadas a variantes patogênicas em um ou mais genes. Em nosso relato de caso, os três genes deletados já foram relacionados a diferentes condições genéticas: *CREBBP* (Rubinstein-Taybi Syndrome), *MECP2* (Rett Syndrome), *TRPS1* (Trichorhinophalangeal Syndrome Type I). Entretanto, as características clínicas descritas na literatura para as três síndromes não condizem com o quadro clínico apresentado pela nossa paciente. Dessa forma, a hipótese de uma possível sobreposição de síndromes foi descartada. Entretanto, esses genes são conhecidos por desempenhar papéis importantes no desenvolvimento embrionário como controle de crescimento e homeostase, acoplando a remodelação da cromatina ao reconhecimento do fator de transcrição (*GeneCards®*).

De forma a buscar um diagnóstico mais assertivo e elucidar a relação genótipo-fenótipo, foi levantada a hipótese de correlação direta entre a exposição a nicotina parental e o desenvolvimento de malformações embrionárias, uma vez que ambos pais eram agricultores de plantio de tabaco. Inicialmente, buscamos na literatura dados de análise de single-cell (scRNA-seq) a fim de identificar se os genes alterados em nossa paciente poderiam possuir alguma interação com a nicotina e, consequentemente, acarretar e/ou contribuir para o fenótipo cardíaco.



A scRNA-seq é uma metodologia de sequenciamento que demonstra o perfil transcrional de células fenotipicamente semelhantes, levando em consideração a heterogeneidade tecidual. A análise de células individuais tem sido amplamente reconhecida como técnica chave para o entendimento das funções celulares, sendo capaz de identificar expressões gênicas até então desconhecidas (SVENSSON et al, 2018).

Na literatura, a análise scRNA-seq para os efeitos da exposição à nicotina na diferenciação celular cardíaca evidenciou a inibição e envolvimento de alguns genes importantes para a cardiogênese, como o *ACTA2* (marcador de expressão cardíaca), *SNAI1* (formação e manutenção do mesoderma embrionário, parada do crescimento, sobrevivência e migração celular) e *SNAI2* (geração e migração de células da crista neural). Sendo assim, uma investigação através de softwares *online* (*GeneMania*) (WARDE-FARLEY et al 2010) foi realizada a fim de elucidar a interação entre os genes deletados em nossa paciente e os genes destacados pelo scRNA-seq (HE, BIAOCHUAN et al., 2020). Durante a pesquisa, foram observados mais dois genes *SMARCA2* e *SMARCE1* como intermediários entre os genes deletados em nossa paciente e os genes identificados na análise.

Ao avaliar as possíveis interações gênicas, foi observado que o *CREBBP* pode ser um gene central para o desencadeamento dos efeitos teratogênicos da nicotina. Já existem relatos na literatura sobre mudanças da expressão gênica do *CREBBP* em diferentes tecidos devido aos níveis de exposição ou da via de absorção da nicotina (PORTUGAL et al., 2012; WALTERS et al., 2005). Ainda, a análise de single-cell evidenciou uma inibição importante do *ACTA2*, quando exposto a níveis expressivos de nicotina (HE, BIAOCHUAN et al., 2020). O software *GeneMania* mostrou que o *ACTA2* possui atividade de co-expressão com o *CREBBP* (WARDE-FARLEY et al 2010). Sendo assim, é possível que a inibição do *ACTA2* afete a expressão do *CREBBP*, acarretando na redução ou na inibição da sua atividade proteica e vice-e-versa. Ainda, foram observadas interações gênicas indiretas que interligam os genes *CREBBP*, *MECP2* e *TRPS1*, destacando os genes *SMARCA2*, *SMARCE1* e *SNAI1*, *SNAI2* como vias de ligação importantes entre eles. A análise de single-cell também apontou a inibição significativa do *GATA4* (gene extremamente importante para o desenvolvimento cardíaco), o qual possui um domínio proteico compartilhado com o *TRPS1*, gene deletado na nossa paciente (HE, BIAOCHUAN et al., 2020).

Sendo assim, a hipótese levantada pelo nosso estudo é a de que a cadeia de interação gênica entre todos os genes mencionados ao longo do relato poderia estar sendo negativamente influenciada pela inibição do *ACTA2*. Ademais, a nicotina por absorção dérmica seria um fator externo causal da inibição ou mal funcionamento das vias de interação dos genes deletados, além de ser o teratógeno responsável pelas alterações patogênicas evidenciadas em nossa paciente.

4. CONCLUSÕES

Este relato traz uma possível associação entre a CHDs e a exposição a nicotina parental. Ainda, ressaltamos a importância de ferramentas de bioinformática no auxílio à interpretação de resultados, na correlação entre genótipo-fenótipo e na elucidação da etiologia de malformações congênitas. Como perspectiva futura, pretendemos realizar a análise por exoma desta paciente para poder trazer mais informações sobre a relação que a nicotina pode exercer nos genes evidenciados neste estudo.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIO LUCA GIANICOLO, E; CRESCI, M; AIT-ALI, L; FOFFA, I; GRAZIA ANDREASSI, M. Smoking and congenital heart disease: the epidemiological and biological link. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 23, p. 2572-2577, 2010.
- BIAOCHUAN, H; CHEN, J; TIAN, M; CHEN, J; ZHOU, C; OU, Y; WANG, S; LI, X; ZHUANG, J. Adverse effects of nicotine on cardiogenic differentiation from human embryonic stem cells detected by single-cell RNA sequencing. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 526, n. 3, p. 848-855, 2020.
- DIAO, J; ZHAO, L; LUO, L; LI, J; LI, Y; ZHANG, S; WANG, T; CHEN, L; HUANG, P; QIN, J. Associations and interaction effects of maternal smoking and genetic polymorphisms of cytochrome P450 genes with risk of congenital heart disease in offspring: A case-control study. **Medicine**, v. 100, n. 23, 2021.
- KARATZA, A.A; GIANNAKOPOULOS, I; DASSIOS, T.G; BELAVGENIS, G; MANTAGOS, G.P; VARVARIGOU, A.A. Periconceptional tobacco smoking and isolated congenital heart defects in the neonatal period. **International journal of cardiology**, v. 148, n. 3, p. 295-299, 2011.
- MCDONALD-MCGINN, D; SULLIVAN, K.E; MARINO, B; PHILIP, N; SWILLEN, A; VORSTMAN, J.A.S; ZACKAI, E.H; EMANUEL, B.S; VERMEESCH, J.R; MORROW, B.E; SCAMBLER, P.J; BASSETT, A.S. 22q11.2 deletion syndrome. **Nature reviews Disease primers**, v. 1, n. 1, p. 1-19, 2015.
- PORTUGAL, G.S; WILKINSON, D.S; TURNER, J.R; BLENDY, J.A; GOULD, T.J. Developmental effects of acute, chronic, and withdrawal from chronic nicotine on fear conditioning. **Neurobiology of learning and memory**, v. 97, n. 4, p. 482-494, 2012.
- SILVA, M.S.M; CARVALHO, M.G.C; MOREIRA, J.C; BARRETO, E.O; FARIAS, K.F; NASCIMENTO, C.A; SILVA, F.M.N; ANDRADE, T.G; LUIZ, R.R; NETO, R.S.M.N; RIBEIRO, F.L. Green Tobacco Sickness among Brazilian farm workers and genetic polymorphisms. **BMC research notes**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2018.
- STELZER, G; ROSEN, R; PLASCHKES, I; ZIMMERMAN, S; TWIK, M; FISHILEVICH, S; INY STEIN, T; NUDEL, R; LIEDER, I; MAZOR, Y; KAPLAN, S; DAHARY, D; WARSHAWSKY, D.G.G.Y; KOHN, A; RAPPAPORT, N; SAFRAN, M; LANCET, D. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. **Current protocols in bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 1.30. 1-1.30. 33, 2016.
- SVENSSON, V; VENTO-TORMO, R; TEICHMANN, S.A. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. **Nature protocols**, v. 13, n. 4, p. 599-604, 2018.
- WALTERS, C.L; CLECK, J.N; KUO, Y; BLENDY, J.A. μ -Opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward. **Neuron**, v. 46, n. 6, p. 933-943, 2005.
- WARDE-FARLEY, D; DONALDSON, S.L; COMES, O; ZUBERI, K; BADRAWI, R; CHAO, P; FRANZ, M; GROUOS, C; KAZI, FARZANA; LOPES, C.T; MAITLAND, A; MOSTAFAVI, S; MONTOJO, J; SHAO, Q; WRIGHT, G; BADER, G.D; MORRIS, Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_2, p. W214-W220, 2010.