Gabrielle D’Arezzo Pessente

Aspectos genéticos da fibrilação atrial isolada

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pessente, Gabrielle D'Arezzo

Aspectos genéticos da fibrilação atrial isolada / Gabrielle D'Arezzo Pessente.
-- São Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo
Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Arritmias cardíacas 2.Fibrilação atrial 3.Sequenciamento de
nucleotídeos em larga escala 4.Genética

USP/FM/DBD-121/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa à minha família.

Primeiramente aos meus pais, Marcelo e Adriana que sempre acreditaram no meu potencial e deram seu amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha existência.

Às minhas irmãs Camila e Bruna, e meus sobrinhos tão queridos Rafael e Gabriel por estarem sempre presentes e trazerem bons momentos de “doçura” e alegria.

Ao meu companheiro Bruno, por estar sempre comigo, por toda paciência e alento destes últimos anos.

Aos meus tios e avós por ensinarem o que é amor, carinho e união; e por todo o apoio desde sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Alexandre Pereira, que me acolheu como sua orientanda e possibilitou que a minha experiência como aluna fosse a mais proveitosa possível. Agradeço-lhe pelo apoio e pela dedicação do seu tempo, determinantes para o sucesso deste trabalho.

Ao professor e também orientador Dr. Francisco Darrieux, pela sua incansável ajuda e por todo esforço e dedicação para que esta pesquisa, meu aprendizado, crescimento profissional e acadêmico, pudessem ter o melhor curso possível. Sou imensamente grata por fazer parte da minha vida.

À Dra Luciana Sacilotto, amiga, tutora e parceira, que me acolheu grandiosamente desde o meu primeiro passo no mundo da genética, sempre disponível e me dando suporte todos os dias, além de ensinamentos valiosos. Serei eternamente grata!

Às amigas e companheiras no dia a dia, Leiliane Marcatto e Dra Natália Olivetti, obrigada por toda amizade, confiança, por todo apoio, por me entenderem e me inspirarem profissionalmente.

Aos meus amigos e colegas do Instituto do Coração, àqueles que já se mudaram e aos que ainda estão presentes no dia a dia, por sua amizade, carinho, colaboração sincera e ajuda preciosa que tornaram este caminho mais leve e apaixonante, por sua cordial acolhida, amizade, encorajamento nos momentos difíceis.

Não poderia deixar de agradecer à minha família toda, que me acompanha a cada passo, cada um do seu jeito, com amor, carinho, apoio, broncas, elogios e sugestões, sempre com muita intensidade como uma boa família de origem italiana! Vocês são meu presente, são a razão de eu querer ser sempre melhor. Sem vocês nada teria sentido, amo muito todos vocês!

À minha Mãe, obrigada por toda dedicação e revisão da escrita deste manuscrito.

Ao meu noivo Bruno, você é sempre incrível, e com certeza sou uma pessoa melhor depois de te conhecer. Obrigada por me escutar sempre com muita paciência e sabedoria, quando eu falo em ciência sem parar e com muita empolgação, ou quando tenho muitas reclamações e preciso desabafar com alguém. Obrigada pelo excelente trabalho na elaboração das figuras.

À Universidade de São Paulo, e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, por terem contribuído para minha formação e amadurecimento científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fundamental apoio financeiro para o cumprimento desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos!

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.*

Charles Chaplin

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

LISTA DE FIGURAS

DENOMINAÇÕES E CONCEITOS BÁSICOS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	JUSTIFICATIVA	5
3.	OBJETIVOS	7
	3.1. Objetivos Primários	8
	3.2. Objetivos Secundários	8
4.	REVISÃO DA LITERATURA	9
	4.1. História da Fibrilação Atrial	10
	4.2. Etiologia da Fibrilação Atrial	13
	4.3. Epidemiologia da Fibrilação Atrial	15
	4.4. Mecanismos patofisiológicos da Fibrilação Atrial	17
	4.5. Aspectos Genéticos da Fibrilação Atrial	20
	4.6. Manejo da Fibrilação Atrial	24
5.	MÉTODOS	25
	5.1. Casuística	26
	5.2. Ética em pesquisa	26
	5.3. Aplicação do questionário	27
	5.4. Banco de amostras biológicas	27
	5.5. Sequenciamento	27
	5.5.1. Lavagem leucocitária e extração de DNAg	27
	5.5.2. Construção do Painel Genético e das Sondas para NGS	28
	5.5.3. Construção da biblioteca	30
	5.5.4. Sequenciamento na plataforma <i>MiSeq® Illumina</i>	32

5.5.5.	Análise de dados do NGS	33
5.6.	Desenho de <i>primers</i> e sequenciamento de Sanger	36
5.7.	Característica de base da população estudada	36
5.8.	Análise estatística	36
6.	RESULTADOS	38
6.1.	Características demográficas e clínicas da população estudada	39
6.2.	Descrição dos resultados da análise genômica e suas associações fenotípicas	42
7.	DISCUSSÃO	49
7.1.	Limitações	56
8.	CONCLUSÕES	57
9.	PERSPECTIVAS	59
10.	ANEXOS	61
	Anexo 1 - Frequência populacional e predição <i>in silico</i> dos genes encontrados no grupo B.	62
	Anexo 2 – Gráfico de distribuição dos genes do grupo B	68
	Anexo 3 – Dados evolutivos dos pacientes estudados (n = 101).	69
11.	REFERENCIAS	71
	Apêndice A - Aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).	84
	Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	88
	Apêndice C – Questionário	93

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SIMBOLOS

a.C.	Antes de Cristo
AC	Anomalias cardiovasculares
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ANOVA	Análise de variância
AVC	Acidente vascular cerebral
Buffer AW1	Tampão de lavagem 1
Buffer AW2	Tampão de lavagem 2
Buffer RBC	Cloreto de amônia, bicarbonato de sódio e EDTA
CAPPesq	Comitê de ética para análise de Projeto de Pesquisa
CMD	Cardiomiopatia Dilatada
CMH	Cardiomiopatia Hipertrófica
DAVD	Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	Ácido Desoxirribonucleico genômico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
EUA	Estados Unidos da América
ECO	Ecocardiograma
FA	Fibrilação Atrial
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
HR	<i>Hazard ratio</i> – relação de risco
HCFMUSP	Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração
LGCM	Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
MAF	Menor frequência alélica (do inglês, <i>Minor Allele Frequency</i>)
MiliQ	Sistema de purificação Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation
mL	Mililitro
mM	MiniMolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
mg/dL	Miligrama por decilitro

MNC	Miocardiopatia não-compactada
MS	Morte súbita
MSI	Morte súbita infantil
MULTI	Múltiplas arritmias
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês, <i>Next Generation Sequence</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio – taxa de risco
PBS	Tampão fosfato salino (cloreto de sódio e fosfato de sódio)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pm	Permanente
Pt	Persistente
Px	Paroxística
P/PP	Patogênica ou provavelmente patogênica
PVS	Patogenicidade muito forte
PS	Patogenicidade forte
PM	Patogenicidade moderada
PP	Patogenicidade complementar
RECALL	Registro Brasileiro Cardiovascular de Fibrilação Atrial
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SBr	Síndrome de Brugada
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SOBRAC	Sociedade Brasileira de Arritmias Cardíacas
SQTc	Síndrome do QT curto
SQTI	Síndrome do QT longo
TAE	Tris, Acetato e EDTA
TE	Tris e EDTA
Tris-HCl	Tris e ácido clorídrico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TVPC	Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

VSI	Variante de significado incerto
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
%	Porcentagem
±	Mais e menos

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 -	Painel genético personalizado para miocardiopatias e canalopatias.	29
Tabela 2 -	Critérios do ACMG para classificação de variantes patogênicas.	34
Tabela 3 -	Regras para combinação de critérios e classificação de variantes.	35
Tabela 4 -	Descrição das características demográficas dos pacientes estudados.	40
Tabela 5 -	Descrição da positividade e dos desfechos avaliados.	42
Tabela 6 -	Descrição dos grupos em relação às características clínicas avaliadas.	43
Tabela 7 -	Resultado do modelo com as variáveis que apresentaram nível de significância de no máximo 0,20 para positividade do grupo A.	44
Tabela 8 -	Características dos pacientes do grupo A (n=14)	45
Tabela 9 -	Frequência populacional e predição <i>in silico</i> das variantes encontradas em genes do grupo A.	47
Tabela 10 -	Classificação das variantes do grupo A, conforme critérios da ACMG.	48
Gráfico 1 -	Distribuição de antiarrítmicos (n=101).	41
Gráfico 2 -	Frequência das variantes encontradas do grupo A.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esfigmógrafo de Marey.	10
Figura 2 -	Triângulo equilátero e eixo elétrico do coração (desenho original de Einthoven).	11
Figura 3 -	Registro de 1911 da irregularidade do ritmo cardíaco.	12
Figura 4 -	Publicação de 1953 sobre fibrilação atrial isolada.	12
Figura 5 -	Ritmo sinusal e arritmia.	14
Figura 6 -	Mecanismo de reentrada.	19
Figura 7 -	Reentrada estrutural caracterizada por aumento atrial e fibrose.	19
Figura 8 -	Genes associados à FA e associação com outras arritmias cardíacas.	22
Figura 9 -	Indexes e sequencias adaptadoras.	31
Figura 10 -	Hibridização das regiões alvo com esferas magnéticas.	32
Figura 11 -	<i>Pipeline</i> de sequenciamento genético de nova geração (NGS – <i>Next Generation Sequence</i>)	33

DENOMINAÇÕES E CONCEITOS BÁSICOS

Alelo: um possível estado de um loco polimórfico. Por exemplo, um SNP poderia ter alelos G e T.

Doença complexa: um fenótipo com uma etiologia multifatorial, frequentemente consistindo de vários componentes genéticos e ambientais.

Estudos de associação: buscam relacionar um marcador genético particular com uma doença complexa em uma população.

Fenótipo: são as características observáveis de um indivíduo como, por exemplo: cor de olhos, pressão sanguínea, ou presença de uma doença particular.

Genome-wide association study (GWAS): são estudos de associação do genoma inteiro, no qual um grande número de marcadores polimórficos genéticos são testados em amostras individuais de DNA.

Genótipo: um conjunto de alelos presentes em um loco particular. Genótipos humanos têm geralmente dois alelos, um herdado de cada progenitor.

Genotipagem: é um processo de determinação do genótipo ou conteúdo genômico, na forma de DNA, específico de um organismo biológico, mediante a um procedimento de laboratório.

Haplótipo: um haplótipo é uma combinação de alelos em *loci* adjacentes, que fazem parte do mesmo cromossomo e são transmitidos juntos. Um haplótipo pode ser formado por um ou vários alelos, ou até pelo cromossomo inteiro.

Heterogeneidade genética: na clínica, a heterogeneidade genética se refere à presença de vários defeitos genéticos que causam a mesma doença, frequentemente devido a mutações em locais diferentes no mesmo gene, um achado comum a muitas doenças

humanas, inclusive a Doença de Alzheimer, Fibrose Cística, Deficiência de Lipoproteína Lípase familiar e Neuropatias Policísticas.

Lócus: (do latim "lugar", no plural loci) é o local fixo num cromossomo onde está localizado determinado gene ou marcador genético.

Marcador genético: é um gene ou posição no genoma que existe em dois ou mais alelos distinguíveis, cuja herança pode ser seguida através de um cruzamento genético, permitindo mapear a posição de um gene a determinar. Ex. SNPs.

Penetrância: é um termo utilizado em genética para descrever a proporção de indivíduos portadores de uma variação particular de um gene, que igualmente se expressa no seu fenótipo.

Polimorfismos genéticos: são variantes do genoma que aparecem por mutações em alguns indivíduos, se transmitem à descendência e adquirem certa frequência na população após múltiplas gerações. Os polimorfismos mais frequentes são os de base única, chamados SNPs.

Polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP): um loco com uma única substituição de base. Devido a sua abundância e fácil detecção, SNPs são usados frequentemente como marcadores em estudos de associação do genoma inteiro.

Transposons: elementos genéticos móveis, são segmentos lineares de DNA capazes de mudar de posição dentro do genoma, independente da homologia entre a região onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam. Existem dois tipos de transposição. Em um deles, o transposon se move sem que haja a replicação; ou a transposase simplesmente quebra a fita de DNA nas extremidades onde estão localizadas as repetições terminais e insere o transposon em um outro local dentro do genoma.

RESUMO

Pessente G. D. *Aspectos genéticos da fibrilação atrial isolada* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A fibrilação atrial (FA) é a arritmia cardíaca sustentada mais comum, de origem supraventricular, em que ocorre uma completa desorganização na atividade elétrica atrial, fazendo com que os átrios percam sua capacidade de contração, não gerando sístole atrial. É uma arritmia que acomete 1-2% da população mundial, sendo mais frequente em indivíduos idosos. Geralmente, está associada a algum tipo de doença cardíaca estrutural, podendo acarretar em complicações como o acidente vascular cerebral, internações e gastos com saúde. Algumas vezes a fibrilação atrial surge de forma precoce, em indivíduos jovens, saudáveis, e sem qualquer evidência de doença cardíaca estrutural ou de fatores desencadeantes, o que leva a hipótese da doença ter um componente genético. Trata-se de um estudo observacional, transversal, para identificação de possíveis variantes genéticas em pacientes portadores de fibrilação atrial isolada, a partir do sequenciamento de nova geração de um painel genético customizado para cardiomiopatias e canalopatias hereditárias. Foram incluídos 101 pacientes encaminhados pelo ambulatório de arritmias cardíacas do Instituto do Coração, que foram avaliados quanto às características clínicas principais antes de serem submetidos ao teste genético. A classificação das variantes em genes causais foi baseada nos critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Foram sequenciadas e analisadas amostras de 101 pacientes, onde foram encontradas 144 variantes raras; 14/144 foram classificadas como patogênicas em relação à fibrilação atrial, 130/144 foram classificadas como de significado incerto, e em 28 dos 101 pacientes não foram encontradas variantes raras. Dos 101 pacientes 77,2% eram do sexo masculino, 87,1 % de raça branca, 75,2 % tinham fibrilação atrial paroxística, 52,4 % eram sintomáticos, 65,3% realizaram procedimento de ablação por cateter e 62,4% tinham história familiar de FA precoce, morte súbita, marcapasso e/ou insuficiência cardíaca. A presença dos achados genéticos esteve associada nos pacientes com FA que tinham história familiar de marcapasso e/ou morte súbita. A análise genética desta população permitiu um diagnóstico precoce de miocardiopatias hereditárias que se apresentaram inicialmente como FA isolada.

Descritores: Arritmias cardíacas, fibrilação atrial, Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala, genética.

ABSTRACT

Pessente GD, Genetic aspects of lone atrial fibrillation [Thesis]. São Paulo: University of São Paulo Medical School; 2019.

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia of supraventricular origin, with a complete disorganization in the electrical activity of the atria, losing their capacity of contraction, not generating atrial systole. It is an arrhythmia that affects up to 2% of the world population, appearing more often in elderly individuals. It is usually associated with some types of structural heart disease, which can lead to complications such as stroke, hospitalizations and health costs. In some times atrial fibrillation emerges early, in younger healthy people, with no apparent evidence of structural heart disease or triggering factors, leading to the hypothesis that the disease has a genetic component. This is a cross-sectional, observational study to identify possible genetic variants in patients with isolated atrial fibrillation from new generation sequencing and a customized genetic panel for inherited cardiomyopathies and channelopathies. A total of 101 patients were referred and evaluated by the Cardiac Arrhythmias Outpatient Unit of the Heart Institute for the main clinical characteristics before being submitted to the genetic test. The classification of variants into causal genes was based on the *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) criteria. Samples were sequenced and analyzed from 101 patients, were found 144 rare variants; 14/144 were classified as pathogenic in relation to atrial fibrillation and 130/144 were classified as uncertain significance, and in 28 of 101 patients no rare variants were found. Of the 101 patients, 77.2% were males, 87.1% were white, 75.2% had paroxysmal atrial fibrillation, 52.4% were symptomatic, 65.3% had a catheter ablation procedure, and 62.4% had a family history of early AF, sudden death, pacemaker and/or heart failure. The presence of genetic findings was associated in patients with AF who had a family history of pacemaker and / or sudden death. The genetic analysis of this population allowed an early diagnosis of hereditary cardiomyopathies that initially presented as isolated AF.

Descriptors: Cardiac arrhythmia, atrial fibrillation, High-throughput nucleotide sequencing, genetics.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a sobrevida na população mundial e a prevalência de doenças crônicas, como obesidade, diabetes, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca vêm apresentando aumentos significativos. Como consequência, a incidência de fibrilação atrial tem se mostrado em constante crescimento, uma vez que esses são fatores predisponentes para seu desenvolvimento ¹. De acordo com esses dados, estima-se que até 2050 o número de casos triplique ².

A fibrilação atrial (FA) é caracterizada por uma arritmia supraventricular, com irregularidade do ritmo cardíaco, devido à ativação atrial desordenada. A FA tem sido descrita como a arritmia cardíaca sustentada mais frequente na prática clínica, com prevalência de 1 a 2% na população geral, está associada à redução da qualidade de vida, estado funcional, desempenho cardíaco e sobrevida global ³. A FA é a causa de 15% de todos os acidentes vasculares cerebrais (AVC) ⁴, e até 6% das internações hospitalares por FA estão associadas ao risco de desenvolver insuficiência cardíaca e morte ⁵.

O risco de desenvolver FA aumenta com a idade, sendo que cerca de 80% dos casos ocorrem em pacientes idosos, com mais de 65 anos, e estão associados a algum tipo de doença cardíaca estrutural, como cardiopatia hipertensiva, valvar e isquêmica. Comparando esse grupo de idosos, a prevalência de bloqueio interatrial em indivíduos entre 70 e 79 anos é de 40%, e aumenta para 50% em indivíduos com 80 anos de idade ou mais ⁶. Entretanto, em pacientes menores de 60 anos, a FA pode ocorrer sem evidência de qualquer outra doença cardíaca estrutural, formando um subgrupo de 10 a 20% do total de pacientes com FA, conhecido como FA isolada, o que leva a hipótese da doença ter um componente geneticamente determinado ⁷.

A FA isolada (solitária ou sem causa aparente) é definida como a FA que ocorre na ausência de fatores etiológicos demonstráveis pela história clínica, e pelos exames complementares, incluindo um ecocardiograma (ECO) normal. Sua prevalência descrita é em torno de 1,5 vezes maior em indivíduos do sexo masculino, podendo indicar os efeitos dos hormônios sexuais na eletrofisiologia cardíaca, através dos receptores de esteroides intracelulares correspondentes ⁸.

A FA isolada é um descritor que surgiu para definir a FA em indivíduos mais jovens e sem evidências clínicas ou ecocardiográficas de doença cardíaca. No entanto, a definição pode ser confusa e vem sofrendo críticas quanto a seu uso à medida que o conhecimento etiológico da FA tem se aperfeiçoado ⁹. Recentes publicações orientam quanto ao não uso

deste termo para descrever populações de pacientes com FA, e nem para orientar decisões terapêuticas, porém para outros autores, este se mostra um termo de fácil entendimento ¹⁰.

A FA é uma doença complexa e os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por desencadeá-la ainda não são totalmente compreendidos ⁷. No entanto, modelos experimentais baseados na interação de múltiplos substratos e fatores de indução cardíacos são aceitos. A FA isolada pode ser considerada um distúrbio elétrico causado por alterações nos canais iônicos cardíacos, tendo sido sugeridos diversos modelos exploratórios, que vão desde codificações alteradas nos canais iônicos ¹¹ até variantes genéticas relacionadas às doenças cardíacas incipientes e/ou geradoras de fibrose atrial ¹².

No caso do modelo exploratório de doença de canal iônico, uma hipótese se refere à diminuição nas funções do potencial de ação cardíaco como um substrato para as ondas de reentrada nos átrios. Uma segunda hipótese concentra-se na ideia do prolongamento do período refratário efetivo, devido ao bloqueio do canal de sódio, o que aumenta a susceptibilidade para despolarização imediata e arritmias de reentrada nos átrios ¹¹.

Atualmente, são descritos três padrões relacionados à ocorrência de FA: (1) FA familiar, como uma doença monogênica com padrão de herança Mendeliana; (2) FA familiar no contexto de outra cardiopatia herdada (Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito (DAVD), cardiomiopatia hipertrófica, cardiomiopatia dilatada e amiloidose familiar, por exemplo) ou outra síndrome arritmica herdada (Síndrome do QT Longo (SQTL) e Síndrome de Brugada (SBr), por exemplo) ^{13, 14}; e (3) FA não familiar, associada a alterações predisponentes não genéticas, como fatores ambientais ¹⁵.

Até o momento, Estudos Associação do Genoma (GWAS) e estudos de ligação ¹⁶ mostraram mais de 30 regiões genômicas que podem estar associadas ao fenótipo da FA ¹⁷. Estas regiões foram encontradas em genes de canais iônicos tais como, *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNA5*, *KCND3*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNE5*, *KCNJ2*, *SCN1B*, *SCN3B*, *SCN10A*, *NPPA* e *GJA5*, entre outros ¹⁶.

Outro conceito importante se relaciona à possibilidade de mutações em tais genes apresentarem transmissão autossômica dominante com penetrância incompleta, ocasionando tanto perda quanto ganho de função dos canais iônicos, com consequente encurtamento do potencial de ação atrial e diminuição do período refratário atrial efetivo. Estas alterações no substrato eletrofisiológico são conhecidas por elicitarem a FA ^{7, 18}.

Outros estudos de genoma identificaram diversas variantes de risco para o desenvolvimento da FA, onde os genes mais descritos são *KCNN3*, *PRRX1*, *PITX2*, *CAV1*, *C9orf3*, *SYNE2*, *HCN4*, *TBX5* e *ZFHX3*. No entanto, a variabilidade genética destes genes não

explica completa suscetibilidade à doença, bem como variantes raras não detectadas por GWAS também podem contribuir para o risco genético de FA ¹⁹. Outras possíveis alterações genéticas descritas podem ser explicadas por defeitos nos genes que codificam as moléculas de adesão e as conexinas, em especial a conexina 40 ²⁰.

Assim, embora informações sobre a etiologia genética da FA isolada estejam sempre sendo cogitadas e demonstradas, ainda não há certeza sobre o seu papel no desenvolvimento da doença em questão, o que motivou o desenvolvimento desta pesquisa, uma vez que muitos pacientes jovens com FA apresentam história familiar evidente e ausência de fatores etiológicos.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A FA é responsável por alto índice de morbidade e mortalidade, e um risco acentuadamente maior de acidente vascular cerebral isquêmico. Apesar de os pacientes com FA, em sua maioria, apresentarem diversos sintomas clínicos que podem levar a eventos graves e internações prolongadas, a complicação mais séria conhecida é o tromboembolismo sistêmico, mais especificamente, o acidente vascular cerebral tromboembólico ²¹.

A literatura mostra diversos estudos com associação de variantes genéticas e FA, e indicam que o histórico de FA familiar aumenta o risco de desenvolver a arritmia. No entanto, esses estudos foram realizados em populações específicas, que não condiz com a heterogeneidade da população brasileira, que difere das populações europeias e americanas. Além disso, o conhecimento dos aspectos genéticos e das manifestações clínicas da FA na forma familiar permanece amplamente descaracterizado. Ainda não existem dados suficientes sobre a FA hereditária que englobam a população brasileira e nem genes específicos responsáveis por desencadear esta arritmia.

Neste contexto, este estudo contribui com informações sobre a ocorrência de variantes genéticas em uma população brasileira jovem, de portadores de FA sem fatores etiológicos demonstráveis por exames adicionais, com alta incidência de história familiar de FA precoce, morte súbita e implante de marcapasso em familiares de primeiro grau. Nossos resultados podem proporcionar ao clínico uma evidência do fator etiológico da doença, e como consequência, para os pacientes, e principalmente aos familiares assintomáticos, um acompanhamento mais eficiente, podendo diminuir os seus riscos e melhorar sua qualidade de vida.

Também entendemos que contribuições para a literatura mundial, na área de genética de FA sem causa etiológica clássica aparente, poderão fomentar novos *insights* nos mecanismos da doença.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Principal:

Identificar a ocorrência de variantes genéticas em pacientes portadores de fibrilação atrial isolada pela técnica de sequenciamento de nova geração, a partir de um painel genético desenhado para canalopatias e cardiomiopatias hereditárias.

3.2. Objetivos Secundários:

- Comparar os achados das variantes genéticas da população estudada com dados publicados pela literatura vigente.
- Estudar e comparar a associação entre as variáveis do perfil fenotípico dos pacientes estudados com a presença de variantes genéticas, classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas.
- Discutir as implicações que as informações encontradas possam ter para a prática clínica.

REVISÃO DA LITERATURA

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. História da fibrilação atrial

Desde a Antiguidade, já se sabe da existência do coração e dos diferentes órgãos, bem como noções básicas de anatomia e da circulação sanguínea. No entanto, levou-se algum tempo até que suas funções fossem bem compreendidas ²².

A referência mais antiga que se tem conhecimento em relação ao ritmo cardíaco, é do imperador chinês Huang Ti, que viveu no século II a.C., e notou por meio do tato, algo diferente na regularidade dos batimentos cardíacos. Mais tarde, os gregos antigos, primeiros na Antiguidade ao tentar compreender melhor os mecanismos do coração, perceberam, posicionando a orelha no tórax do paciente, que o coração poderia palpitar ²³.

No século XV, a FA passou a ter conotação mais científica, sendo conhecida como “palpitações revoltosas” ou *delirium cordis* e depois, em 1749, como *pulsus irregularis perpetuus* por Jean Baptiste De Sénac, este último provavelmente referente ao que conhecemos hoje como FA permanente. Neste século ainda, William Harvey (1628) descobriu os mecanismos da circulação sanguínea e detalhes da estrutura cardíaca, como a presença de válvulas, e fez então, a primeira descrição referente à arritmia, em seu livro onde dizia que os batimentos cardíacos se originavam da aurícula (átrio) direita, e que os animais antes de morrerem apresentavam “batimentos irregulares e ineficazes nas aurículas” ²⁴.

Em 1863, Marey desenvolve o esfigmógrafo, onde era possível visualizar as “movimentações das veias”, por meio de traçados (figura 1) ²³.

Figura 1. Esfigmógrafo de Marey.
Fonte: Moss, S.W., 2006 ²⁵

James Mackenzie, em 1894, desenvolveu o polígrafo e realizou o primeiro registro simultâneo de pulsos arteriais, venosos e de batimentos cardíacos, sendo considerado o pioneiro no estudo das arritmias cardíacas ²⁶. Em maio de 1908, foi publicado o primeiro artigo científico usando o termo “arritmia”. Era um relato de caso de um homem com FA descrito por Leonard Willians, médico de um hospital francês ²⁷.

A evolução do conhecimento dos mecanismos das arritmias cardíacas dependia da capacidade de registrar a atividade elétrica do coração. Portanto, após a construção do galvanômetro de cordas por Einthoven, em 1901, o estudo das arritmias se desenvolveu de maneira explosiva ²⁸. O galvanômetro era composto por três derivações usuais, formando um triângulo entre o braço direito, braço esquerdo e o pé esquerdo, e a comparação entre elas a partir de curvas simultâneas (figura 2) ²⁹.

Figura 2. Triângulo equilátero e eixo elétrico do coração (desenho original de Einthoven). Fonte: Maciel R., 1996 ²⁹

Outras especulações sobre a FA foram publicadas em 1909, quando Thomas Lewis, cardiologista do hospital de Londres, publicou o artigo científico onde descrevia que o “*pulsus irregularis perpetuus*,” que se originava do ritmo nodal, era uma condição extremamente comum em sua prática ³⁰. Em 1911, Dr. Herapath publica um documento comentando sobre a irregularidade do coração, que era muito comum na prática clínica, e muitos trabalhos estavam sendo realizados para o melhor conhecimento e classificação dessa condição (figura 3) ³¹.

Figura 3. Registro de 1911 da irregularidade do ritmo cardíaco.

Fonte: Herapath C.E.K., 1911 ³¹

Master, Dack e Jaffe (1937) encontraram arritmia no eletrocardiograma de 14% de seus pacientes de rotina. No entanto, apenas em 1967, Fluck et al. observa através da monitorização contínua de eletrocardiograma que a incidência de arritmias no infarto agudo do miocárdio era muito maior do que se tinha ideia na época ³².

O termo FA isolada foi proposto em 1953, por William Evans e Peter Swann do departamento de cardiologia do hospital de Londres (figura 4) ³³.

Figura 4 – Publicação de 1953 sobre fibrilação atrial isolada.

Fonte: Evans W., 1954. ³³

William B. Phair, em 1963, publica o caso clínico de uma família onde os membros parecem ser saudáveis, no entanto apresentavam FA. Phair conclui que a “Fibrilação atrial familiar benigna é de ocorrência rara”³⁴. Em 1997, Brugada et al., descreve pela primeira vez a identificação de um *locus* genético em uma família composta por 26 membros portadores de FA, com título “*Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation*”³⁵. No entanto, a evidência de uma contribuição genética para o desenvolvimento da FA foi primeiramente apresentada em 1943 por Wolff, quando três irmãos com uma forma autossômica dominante rara de FA foram identificados³⁶.

A ablação por cateter no final da década de 1990, com taxas de sucesso que se aproximam de 99% para taquicardias supraventriculares, também contribuiu para os grandes avanços das arritmias⁴⁸. Nas últimas décadas, houve um grande avanço no conhecimento das arritmias, não só do ponto de vista tecnológico, mas, sobretudo, um maior conhecimento dos mecanismos de ação, bem como a função de canais iônicos e descobertas moleculares do tecido cardíaco, proporcionando uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica dessas doenças.

4.2. Etiologia da fibrilação atrial

O termo “arritmia cardíaca” refere-se a qualquer alteração da sequência normal dos impulsos elétricos, ou seja, qualquer desvio da normalidade na formação e/ou condução do estímulo elétrico para a contração das células do músculo cardíaco. Engloba diversos distúrbios elétricos, que podem acontecer de maneira rápida, conhecida como taquicardia, quando os batimentos cardíacos por minuto (bpm) se encontram acima de 100; muito lenta conhecida como bradicardia, com frequência abaixo de 50 bpm; ou de forma irregular, neste caso, mais conhecido como FA, onde os batimentos cardíacos podem se apresentar elevados ou diminuídos³⁷.

O bombeamento sanguíneo perfeito depende da contração sequencial rítmica do coração, que ocorre por meio de células musculares cardíacas especializadas em automatismo (marcapasso) e condução elétrica, os cardiomiócitos. A contração sequencial coordenada é propagada por meio do estímulo elétrico cardíaco, dos átrios para os ventrículos, que se contraem do ápice para a base do coração³⁸.

O ciclo cardíaco se inicia com o estímulo elétrico originando no nodo sinoatrial, se espalha em forma de ondas, através das vias internodais, despolarizando rapidamente ambos os átrios e causando contração do miocárdio atrial. O estímulo atinge o nódulo

atrioventricular e é conduzido para os ventrículos através do feixe de His, atravessando o esqueleto fibroso, se dividindo em ramos direito e esquerdo, que se ramificam formando as fibras de Purkinje; estas conduzem o estímulo elétrico para despolarizar todo o miocárdio ventricular, contraindo-o ³⁹.

Quando esse processo é interrompido, por qualquer alteração na condução, frequência e/ou local de origem do impulso, o corpo experimentará uma arritmia. Na FA ocorre a formação de focos ectópicos de estímulos elétricos, e, portanto, a contração cardíaca não ocorre de modo coordenado, tornando o bombeamento sanguíneo ineficaz, podendo levar à formação de coágulos no apêndice atrial, e causar sérias complicações tais como acidente vascular cerebral (AVC) (figura 5).

Figura 5 – Ritmo sinusal e arritmia

Fonte: Copyright © 2010-2016 sanofi-aventis, S.A (www.fibrilacionauricularonline.es/).

A FA é, portanto, uma arritmia caracterizada por uma substituição de ondas P consistentes por ondas fibrilatórias que variam em amplitude, forma e tempo, e está frequentemente associada a uma resposta ventricular irregular e rápida, com complexos QRS

irregulares. As manifestações clínicas incluem dispneia, dor torácica, palpitações, tontura, síncope e fadiga ¹⁷.

A doença pode ser classificada, do ponto de vista temporal, em: 1) FA paroxística (Px), caracterizada pela FA que termina de forma espontânea ou com intervenção dentro dos sete dias após o início; 2) FA persistente (Pt), que se apresenta de forma sustentada por mais de sete dias, ou tempo indeterminado, sendo que quando for uma duração maior que 1 ano é chamada de persistente de longa duração; e 3) FA permanente (Pm), também chamada como FA aceita, quando ocorre a decisão por não mais ser revertida, seja por refratariedade ao tratamento clínico e invasivo, seja por situações de decisão médica (exemplo, idosos assintomáticos com frequência ventricular adequada). Há também a FA silenciosa, definida como FA assintomática, diagnosticada por meio de um exame diagnóstico, como eletrocardiograma ou Holter de 24 horas ⁴⁰.

A FA é descrita como uma doença progressiva, na qual podem ocorrer alterações estruturais (dilatação, fibrose, infiltração gordurosa, hipertrofia dos miócitos atriais, etc.) e bioquímicas (mudanças na distribuição, densidade e funcionamento de canais iônicos). Alguns dos fatores de risco para desenvolvimento da FA são: hipertensão arterial, doença cardíaca, obesidade, algumas medicações e apneia do sono, sendo que estes podem ser prevenidos e controlados; outros fatores como: histórico familiar, idade avançada e distúrbios cardíacos congênitos, não são controláveis. Os eventos tromboembólicos, principalmente AVC, e insuficiência cardíaca descompensada são as complicações mais comuns e podem gerar graves consequências com longas internações ⁴¹.

4.3. Epidemiologia da fibrilação atrial

A FA é uma doença de proporções epidêmicas de natureza progressiva e dinâmica, e causas multifatoriais, com potencial para complicações graves e consequências para a saúde pública ⁴².

Segundo a *American Heart Association* ⁴³, em 2010 nos Estados Unidos da América (EUA), a porcentagem reportada de portadores de FA beneficiários do sistema de seguros de saúde do governo (*Medicare*) era de 2% para pacientes menores de 60 anos de idade, e de 9% para maiores de 65 anos de idade. Em indivíduos com descendência europeia, o risco de desenvolver FA depois de 40 anos de idade era de 26% para os homens, e 23% para as mulheres. Em afro-americanos, embora os fatores de risco para FA sejam mais prevalentes, a

incidência parece ser mais baixa, como demonstrado em um estudo americano, onde a prevalência da FA era 32% menor em negros do que em brancos ⁴⁴.

Dados de 2019 do *Medicare* mostraram que indivíduos com FA têm 25,3% de taxa de mortalidade hospitalar, quando comparados com 16,0% dos indivíduos sem FA (odds ratio: 1,21). Em um ano a taxa de mortalidade é de 48,3% para pacientes com FA versus 32,7% para pacientes sem FA (odds ratio: 1,34). Pacientes que desenvolvem FA durante a hospitalização têm um pior prognóstico do que aqueles com FA na admissão. As taxas de acidente vascular cerebral fatal ou sequelar são maiores em pacientes com FA (3,1%) quando comparados à dos pacientes internados por outros motivos ⁴⁵.

A FA afeta entre 2,7 milhões e 6,1 milhões de adultos americanos anualmente, número que deve dobrar nos próximos anos de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC) ⁴⁶. Fato muito esperado em países desenvolvidos, e preocupante, porque aumentaria ainda mais os custos para o sistema de saúde. Porém, também com o mesmo impacto em países de renda baixa e média, devido à um aumento global de formas não transmissíveis das doenças cardíacas ⁴⁶.

Hospitalizações frequentes, anormalidades hemodinâmicas e eventos tromboembólicos estão relacionados à FA, resultando em significativa morbidade e mortalidade. É estimado, que o tratamento para pacientes com FA gere gastos de \$26 bilhões para o sistema de saúde dos EUA, somando aproximadamente \$8.700 de custo adicional por ano (estimativa de 2004-2006) para o paciente, comparado com indivíduo sem a doença. Do total de hospitalizações anuais nos EUA, 467.000 são devidas à FA como primo-diagnóstico, além de contribuir em torno de 99.000 mortes por ano ^{44, 10}.

No Brasil, os dados publicados em relação aos gastos do sistema de saúde com o doente, gastos gerados pelo doente com FA comparado ao indivíduo sem FA, e quantidade de óbitos devido à FA ainda são insuficientes. Estima-se que atualmente cerca de 1,5 milhão de brasileiros sejam afetados pela doença, comparado com 30 milhões de indivíduos em todo o mundo ⁵.

Considerando apenas a população inferior a 60 anos de idade (onde se inclui a maior parte dos casos de FA isolada), a prevalência em brasileiros é inferior a 0,1% ^{5, 47}. Entretanto, tal dado deve ser visto com ressalvas, já que também nesta população mais jovem está ocorrendo um aumento de comorbidades, como obesidade, apneia do sono e hipertensão, que são fatores de risco e podem desencadear a FA. Na ausência de fatores que possam explicar a FA, a hipótese da FA “puramente” genética poderia ser aventada.

Uma pesquisa elaborada pela Sociedade Brasileira de Arritmias Cardíacas (SOBRAC)⁴⁸ com pacientes portadores de FA mostra que, 70% dos pacientes submetidos ao procedimento de ablação são do sexo masculino, e que 89% apresentam a forma paroxística ou persistente da doença, concluindo que em cerca de 40% destes pacientes o procedimento é realizado por mais de uma vez durante a vida do indivíduo. Esta recorrência da arritmia também poderia explicar à hipótese de um fator genético no desenvolvimento da FA.

Outro estudo denominado RECALL (Registro Brasileiro de Fibrilação Atrial Crônica), em andamento, almeja recrutar 5000 pacientes com a participação de aproximadamente 80 centros no território nacional, buscando definir as características de pacientes ambulatoriais com FA. Elucidar as variações regionais no Brasil tem como finalidade um melhor entendimento da FA e seu manejo. Entretanto, ainda não há dados específicos a respeito das características clínicas dos pacientes que se apresentam nos setores de emergência em virtude dessa doença⁵.

4.4. Mecanismos patofisiológicos da fibrilação atrial

As arritmias são quase sempre patológicas, exceto a arritmia sinusal, que é fisiológica³⁷. Até o momento, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela FA não são totalmente compreendidos, e é provável que essa arritmia se apresente com múltiplos fenótipos⁴⁹.

O potencial de ação cardíaco representa o potencial transmembrana cardíaco em função do tempo. O potencial de ação é um determinante da atividade elétrica cardíaca e é moldado por correntes e transportadores iônicos subjacentes. O potencial de repouso celular é definido pelo potássio (K^+), devido a uma alta permeabilidade através dos canais retificadores internos (I_{K1}). Após a ativação, as células são despolarizadas pela entrada rápida sódio (Na^+), gerando grande fluxo de Na^+ para dentro da célula (despolarização), e então o K^+ sai, causando a repolarização. Começa a fase de platô e enquanto o K^+ sai da célula, começa a entrada de Ca^{2+} através das correntes de Ca^{2+} do tipo L. Durante esta fase, há ativação progressiva das correntes retificadoras de K^+ (I_{Kr}), onde termina o potencial de ação³⁷.

Alterações na função dos canais iônicos e dos transportadores cardíacos podem causar várias formas de doença cardíaca e distúrbios do ritmo, incluindo ritmos cardíacos excessivamente rápidos, as taquiarritmias. Estudos com remodelação de canais iônicos arritmogênicos, bem como de suas consequências fisiopatológicas e bases moleculares, têm sido descritos para FA³⁷.

Durante os episódios de FA, a taxa de despolarização nos átrios aumenta acentuadamente. Duas condições devem estar presentes para que isso aconteça: um gatilho para iniciar a arritmia, provavelmente causada por focos ectópicos, e um tecido que permite a disseminação rápida e contínua do impulso, frequentemente visto durante o chamado fenômeno de reentrada ¹⁷.

Distúrbios elétricos diferentes podem encurtar a duração do período refratário, causando excitabilidade precoce, que pode levar a um impulso de reentrada ⁵⁰. Outros distúrbios elétricos podem causar um prolongamento da duração do potencial de ação, o que favorece a reativação dos canais de cálcio e a formação de pós-despolarizações precoces, levando também a um impulso de reentrada ⁵¹.

Durante as fases rápidas de despolarização, o deslocamento da parte despolarizada do miocárdio em relação à porção em estado repolarizado pode causar um aumento na corrente de cálcio intracelular, que por sua vez pode acelerar a repolarização, pela inibição da corrente de cálcio do tipo L e aumentar a corrente de K^+ retificadora retardada (I_K). A FA crônica, o *flutter* atrial e outras formas de taquiarritmias atriais rápidas (taquicardia atrial ectópica, taquicardia reentrante do nó AV) podem fazer com que esse mecanismo fisiológico se torne irreversível ⁵⁰. A função do nó sinoatrial anormal pode causar ritmos cardíacos lentos, as bradicardias, que podem gerar sintomas tais como, fraqueza, síncope, disfunção cardíaca ou colapso circulatório, requerendo implante de marcapasso artificial ³⁷.

Um período refratário reduzido como substrato para arritmias reentrantes, e o alongamento da duração do potencial de ação atrial, que pode levar à despolarização precoce e arritmias de reentrada nos átrios, pode ser explicado por variantes genéticas de ganho e perda de função nas proteínas dos canais iônicos. Por outro lado, a propagação anormal e heterogênea de impulsos de célula para célula pode ser explicada pelo achado de variantes que não estão relacionadas aos canais iônicos ⁵².

A figura 6 mostra o mecanismo de reentrada. A reentrada ocorre por meio de interações entre tecidos interconectados, iniciada por um impulso prematuro, simbolizado como “i”. O impulso resultante é conduzido através do caminho que leva ao ponto nomeado “ii”, que bloqueia o caminho que leva ao ponto de registro “iii” devido ao período refratário mais longo (figura 6A). Em condições normais, o tempo de condução do ponto “i” ao redor do circuito, passando pelo ponto “ii” e voltando pelo ponto “iii”, é menor que o período refratário, e o impulso não pode entrar novamente ⁵³.

Figura 6: Mecanismo de reentrada. A. condições normais; B. O tecido atrial normal mantém a reentrada, que pode resultar de um período refratário encurtado, C. ou de uma condução mais lenta.

Fonte: Wakili R. et. al., 2011.⁵³

Recentemente, foram relatadas alterações fibróticas atriais e cicatrizes teciduais relacionadas ao desenvolvimento de FA. A fibrose é considerada a “marca” da remodelação estrutural do tecido atrial arritmogênico (figura 7)⁵⁴. Em um modelo de cão, a fibrose atrial causou lentidão nas regiões de condução, aumentando a heterogeneidade de condução. Essa heterogeneidade fornece a base para bloqueio de condução unidirecional e reentrada, que são essenciais para o início e perpetuação da FA⁵⁵. Outro estudo relatou a associação entre a quantidade de alterações fibróticas atriais e a recorrência de arritmias após o tratamento com ablação em paciente com FA⁵⁶.

Figura 7: Reentrada estrutural caracterizada por aumento atrial e fibrose.

Fonte: Wakili R. et. al., 2011.⁵³

4.5. Aspectos genéticos da fibrilação atrial

Determinantes genéticos para a FA isolada têm sido explorados usando diferentes métodos, variando desde grandes estudos de associação genômica examinando efeitos em SNP (*single nucleotide polymorphisms*), até estudos de genes candidatos para investigação de mutações raras, com alterações na estrutura e função de cardiomiócitos, principalmente alterações nos canais iônicos ⁸.

Os genes associados à FA têm sido amplamente investigados, apontando evidências de que variantes em genes envolvidos na sinalização elétrica possam levar à ocorrência de distúrbios elétricos que geram a FA ¹⁸, bem como alterações em genes que afetam a função dos canais iônicos, do sistema renina-angiotensina-aldosterona, das respostas inflamatórias e do processo de fibrose causado pelas conexinas cardíacas ^{15, 11, 57, 58}.

Muitos estudos evidenciam a teoria de que a maioria das variantes genéticas esteja relacionada com regiões codificantes dos canais iônicos, responsáveis pela sinalização intercelular e controle homeostático de proteínas envolvidas na despolarização ou repolarização cardíaca ⁵⁹.

Ao longo dos últimos 60 anos, diversos casos esporádicos de famílias com FA foram relatados. A primeira aplicação de técnicas genéticas clássicas aplicadas para FA, como análise de estudo de ligação para identificar a base genética de doenças hereditárias cardíacas, surgiu do trabalho de Ramon Brugada e colaboradores, publicado em 1997 ^{60, 35}. Nesse manuscrito, usando relatos de três famílias espanholas com FA de início precoce, foi sugerido um primeiro *locus* genético para FA familiar, localizado no cromossomo 10q22-24, cujo padrão de transmissão era autossômico dominante, com alta penetrância. Este estudo ajudou a estabelecer uma base genética para alguns pacientes com a doença, embora o gene causador específico deste locus ainda permanecesse desconhecido. A análise de outras famílias usando a mesma região do cromossomo confirmou a ligação e permitiu a oportunidade de estreitar esta região para novas pesquisas ⁶¹.

Estudos epidemiológicos com base em técnicas mais avançadas, como o GWAS, têm fornecido pistas excitantes sobre a predisposição genética para a FA, com a identificação de alguns *loci* do genoma humano, fomentando questões fisiopatológicas desafiadoras. Alterações genéticas comuns podem exercer um papel no desenvolvimento desta doença, já caracterizada como multifatorial, indicando uma forte base genética hereditária ⁶².

Dentre as regiões susceptíveis, foram descritos alguns *loci* em cromossomos humanos, tais como: 10q22, 6q14-16, 11p15.5, 5p15, 10p11-q21, e 5p13, dentre outros, localizados,

principalmente, em dois genes, *KCNQ1* no cromossomo 11p15.5 e *NUP155* no cromossomo 5p13, os quais foram identificados e caracterizados funcionalmente ⁶².

O gene *KCNQ1* associado à FA familiar foi identificado em 2003, codifica a corrente retificadora do canal de potássio cardíaco (I_{Ks}). Esta descoberta levou os investigadores a rastrear outros genes cardíacos como candidatos na patogênese da FA. O primeiro gene atrial não codificador de canal iônico implicado na FA foi o precursor do peptídeo natriurético A (NPPA), que codifica o peptídeo natriurético atrial ⁵².

O papel do sistema renina-angiotensina na FA também já foi investigado por estudos de polimorfismos no gene da enzima conversora da angiotensina humana, conhecido como gene ECA, que está localizado no cromossomo 17q23.3. Os indivíduos homozigotos apresentaram níveis mais altos da enzima, associando-se ao risco de desenvolver FA ⁴².

As pesquisas direcionadas para a expressão genética das correntes iônicas fornecem algum entendimento das alterações moleculares deflagradas pela doença, bem como explicam alguns dos mecanismos que perpetuam a FA crônica. Outras linhas interessantes de pesquisa referem-se ao estudo das disfunções nas conexinas atriais, o que explicaria a perpetuação da fibrose nos átrios, independente das intervenções clínicas e invasivas ^{20, 63}.

Os fatores genéticos caem em dois grandes grupos: variantes genéticas raras com efeitos fortes e fenótipo claro (mutações de gene único), e variantes genéticas comuns com efeitos mais fracos e um fenótipo menos evidente (polimorfismos de nucleotídeo único – SNP) ⁵³. Atualmente, variantes raras em genes individuais e sua possível patogênese na FA têm sido relatada principalmente nos canais de potássio e sódio, no entanto, variantes de canais não-iônicos também têm sido descritas. A figura 8 mostra alguns genes descritos para FA e a associação destes com outras arritmias.

Figura 8: Genes associados à FA e associação com outras arritmias cardíacas. Legenda: LQTS – Síndrome do QT longo; SQTS – síndrome do QT curto; BrS – síndrome de Brugada; SIDS – síndrome da morte súbita infantil; Cardiomyopathy – cardiomiopatias.

Fonte: Andreassen L, 2015 ¹⁷

Um exemplo é a mutação no gene que codifica a proteína adaptadora ankyrina-B, que costuma causar síndrome do QT longo tipo 4. Essa alteração pode impedir a ligação de múltiplas proteínas na membrana celular, alterar o equilíbrio de íons cálcio (Ca^{2+}) e levar à atividade deflagrada por pós potenciais tardios, causando FA. Um SNP de perda de função previsto no gene que codifica a proteína sarcolipina inibitória do Ca^{2+} ATPase do reticulo endoplasmático (SERCA) também está associado à FA, porém ainda não há consistência destes dados ⁶⁴.

A primeira causa genética potencial para o desenvolvimento de FA ligada a um mecanismo de repolarização precoce foi um SNP com perda de função no gene *KCNE1*, que codifica a subunidade β do canal lento de potássio (K^+) conhecido como IKs, também

envolvido na síndrome do QT longo tipo 5. As mutações congênitas clássicas de Síndrome do QT longo promotoras de repolarização precoce também podem predispor à FA ¹⁴.

Outros estudos ⁶³ têm mostrado que um prolongamento no intervalo PR do eletrocardiograma pode ser um fator de risco independente para desenvolvimento de FA e que variações genéticas no gene *SCN10A* podem influenciar na duração deste intervalo PR ^{65, 66, 67, 68}. Pacientes com FA apresentam entalhes na onda P, refletindo graus variáveis de distúrbio de condução interatrial.

À medida que mais genes são rastreados em casos individuais, fica mais claro que muitas pessoas carregam múltiplas variantes raras deletérias e/ou combinações de variantes raras comuns em genes do canal iônico. O ambiente atrial pode ter uma influência modificadora adicional na função do canal, e variantes do canal iônico que não têm efeitos aparentes sob condições basais que podem alterar profundamente a atividade do canal em configurações de estresse mecânico aumentado ⁶⁹.

Um papel para os fatores de transcrição na patogênese da FA foi levado em consideração quando houve a descoberta do gene *PITX2* (fator 2 de transcrição de homeodomínio emparelhado), que é um fator de transcrição pertencente à classe das proteínas homeodomínio. Existem três isoformas, *PITX2a*, *PITX2b* e *PITX2c*, sendo a *PITX2c* a principal isoforma presente no coração. O mapeamento do *locus* do cromossomo 4q25 promoveu uma série de estudos em camundongos *knockout* de *PITX2*, que estabeleceram deficiência de *PITX2* como um mecanismo plausível para FA. No entanto, diversos estudos funcionais posteriores não conseguiram comprovar os efeitos deste gene nos átrios e seus possíveis mecanismos de causa da FA ⁶⁹.

Estudos genéticos têm implicado uma série de outros fatores de transcrição na patogênese da FA. O gene *PITX2*, foi o primeiro exemplo de diversos genes que tiveram associação com a doença, no entanto sem comprovação funcional dos mecanismos de desenvolvimento de patologia. Outros exemplos são os genes, já associados com más formações cardíacas, *GATA4*, *NKX2-5*, *ZFHX3* e *TBX5*, entre outros.

Genes componentes da arquitetura dos miócitos (sarcômero, citoesqueleto e núcleo), também têm sido implicados na gênese da FA. Variantes nesses genes podem dar origem a uma miopatia atrial primária, como resultado de diversos efeitos no tamanho do átrio, função contrátil, conexões célula-célula e velocidade de condução. Além de defeitos estruturais primários induzidos por mutação, o remodelamento estrutural secundário dos átrios em pacientes com FA crônica contribui para a manutenção da arritmia ⁶⁹.

4.6. Manejo da fibrilação atrial

A resposta à terapia é altamente variável entre os pacientes. As atuais terapias medicamentosas para suprimir a FA são limitadas e com eficácia variável, além de poderem acarretar um risco potencial de pró-arritmia e toxicidades não-cardíacas. Uma das causas da limitação dos fármacos no tratamento da FA pode residir no fato da própria heterogeneidade do substrato subjacente, bem como pelas diferenças interindividuais nos mecanismos da doença, onde também são incluídas as diversidades de susceptibilidade genética⁵².

As principais diretrizes recomendam que o tratamento inicial nos pacientes com FA sintomática seja feito por meio do controle dos fatores de risco e pelo uso de fármacos antiarrítmicos. A falha desta abordagem terapêutica (ou quando for opção do paciente) poderá levar à indicação de tratamento de ablação por cateter ou até, em casos específicos, ao implante de marcapasso. Entretanto, na “história natural” da FA, estão previstas recorrências, que podem requerer cardioversões elétricas, reintervenções por cateter e/ou reajustes terapêuticos⁵².

MÉTODOS

5. MÉTODOS

Trata-se de um estudo de natureza transversal, exploratório e analítico em pacientes portadores de FA isolada ou FA sem fatores de risco aparentes, desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) em conjunto com a Unidade de Arritmias Cardíacas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC-FMUSP).

5.1. Casuística

Entre Dezembro de 2015 a Janeiro de 2018, foram incluídos 101 pacientes com diagnóstico médico de FA isolada pela Unidade de Arritmia do Instituto do Coração. Para o diagnóstico de FA isolada foram utilizados os critérios estabelecidos pela *American Heart Association*⁴⁵, que incluem pacientes com idade abaixo de 60 anos, sem evidências clínicas e ecocardiográficas de doença cardiopulmonar, hipertensão arterial sistêmica, distúrbios tireoidianos ou diabetes mellitus. Em todos os casos foi necessário pelo menos uma documentação eletrocardiográfica do episódio de FA, por meio de eletrocardiograma basal, Holter de 24 horas ou teste ergométrico.

Foram considerados critérios de exclusão: pacientes com idade acima ou igual a 60 anos; evidência de cardiopatia estrutural ao ecocardiograma (como hipertrofia ventricular esquerda, valvopatia, miocardiopatia ou discinesias); hipertireoidismo; obesidade mórbida ou diagnóstico conhecido de doença coronária ou apneia do sono.

5.2. Ética em pesquisa

Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do InCor/HCFMUSP e pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa institucional (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (SDC 4042/14/022). (Apêndice A)

Todos os indivíduos participantes foram informados sobre os detalhes do estudo, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual concordam com a coleta de sangue e realização do sequenciamento genético direcionado. (Apêndice B). Todos os procedimentos propostos estão de acordo com recomendações e diretrizes das principais sociedades específicas da área.

5.3. Aplicação do questionário

Foi aplicado um questionário no momento da inclusão do paciente no estudo (apêndice C) e em seu conteúdo foram registrados dados gerais tais como: peso, altura, gênero, pressão arterial, tabagismo, atividade física, data do primeiro episódio de FA e os primeiros sintomas, o tratamento atual, dados sobre ablação, cardioversão, exames realizados e história familiar. Foi construído heredograma de todos os pacientes.

5.4. Banco de amostras biológicas

Foi realizada a punção venosa de cada participante, conforme critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC)⁷⁰. Foram coletados em 2 tubos tipo *vacutainer* contendo K₃EDTA, uma quantidade de 8 mL de sangue periférico para extração do DNA e sequenciamento genético. O material foi colhido na sala de fisiologia humana situada no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração, e encaminhado para setor de extração de DNA.

5.5. Sequenciamento

5.5.1. Lavagem leucocitária e extração de DNAg

Obtivemos o DNA genômico (DNAg) extraído a partir dos leucócitos de acordo com o método do kit comercial de extração *QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®)* conforme protocolo descrito pelo fabricante⁷¹.

As amostras de sangue total foram centrifugadas em gradiente de densidade para a obtenção de *Buffy coat* (camada leuco-plaquetária), a partir das etapas seguintes: inicialmente foram transferidos 8 mL de sangue para um tubo *Falcon*, com capacidade de 15 mL, e adicionado *Buffer* RBC (Cloreto de amônia, Bicarbonato de Potássio e EDTA) à amostra até que se completasse a quantidade de 10 mL. O tubo contendo a mistura foi tampado, incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, e em seguida centrifugado por 10 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm) em temperatura de 4° Celsius (°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido ao mesmo procedimento por mais duas vezes (lavagem), utilizando as centrifugações de 3000 rpm por 5 minutos a 4°C e 1500 rpm por 3 minutos à 4°C, consecutivamente. Foi adicionado ao *pellet* 200 µL de PBS (Tampão fosfato-salino: cloreto de sódio e fosfato de sódio), e todo o conteúdo foi transferido do tubo

Falcon para um tubo tipo *Eppendorf* com capacidade de 1,7 mL, devidamente identificado e a foi amostra congelada.

O *pellet* leucocitário foi posteriormente ressuspensão em 20 µL de enzima RNase, homogeneizado e a mistura incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Ao fim da incubação foi acrescentado 20 µL da enzima Proteinase K e 200 µL de *Buffer AL*, agitado e incubado por 30 minutos a 1000 rpm e 56°C; sob estas condições as células foram lisadas e desnaturadas devido à temperatura elevada.

Para otimizar a ligação do DNA genômico (DNAg) à membrana da coluna para centrifugação do *Mini QIAamp* foi adicionado etanol ao lisado. O lisado foi então aplicado à coluna de extração comercial, o DNAg adsorvido sobre a membrana de gel-sílica, e o lisado passado pela coluna devido a força centrífuga. Em seguida, foi adicionado 200 µL de Etanol absoluto (100%) gelado (-20°C). Todo o material biológico foi cuidadosamente transferido para uma coluna com tubo coletor do kit e submetido à centrifugação de 12000 rpm, durante 1 minuto à temperatura ambiente.

Enquanto o DNAg permanece ligado à membrana da coluna, os contaminantes são arrastados por lavagem utilizando o Tampão de Lavagem 1 (*Buffer AW1*) e o Tampão de Lavagem 2 (*Buffer AW2*). O próximo passo foi transferir a coluna para um novo tubo coletor, acrescentar 500 µL de *Buffer AW1* e centrifugar por 1 minuto à 12000 rpm em temperatura ambiente. Posteriormente, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, adicionado 500 µL de *Buffer AW2* e submetido à centrifugação por 3 minutos a 12000 rpm em temperatura ambiente.

A coluna foi transferida para um tubo tipo *Eppendorf* com capacidade para 1,7 µL, adicionado 150 µL de água *MilliQ* pré-aquecida à 56°C, incubada por 10 minutos a 56°C e centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. Após essa etapa o DNAg foi purificado e eluído da membrana presente na coluna com água *MilliQ* em alta temperatura. Desta maneira o DNAg estava pronto para ser utilizado em diferentes ensaios. Esta amostra foi armazenada a -20°C, de acordo com as especificações técnicas do fabricante ⁷¹.

5.5.2. Construção do painel genético e das sondas para NGS

O painel genético foi personalizado para canalopatias, cardiomiopatias e genes provavelmente relacionados à FA, contendo um total de 114 genes selecionados, tendo como base os dados coletados da literatura vigente (*PubMed*, *Cochrane Library*) e amplamente discutido pelo grupo de estudo composto por biólogos, biomédicos e médicos especializados

em arritmias e genética. Foram incluídos e protocolados pelo grupo de estudo os seguintes genes (Tabela 1):

Tabela 1: Painel genético personalizado para miocardiopatias e Canalopatias.

GENE	DOENÇA RELACIONADA	GENE	DOENÇA RELACIONADA
<i>ABCC6</i>	Hipertrofia cardíaca	<i>KCNJ5</i>	SQT1 13, SÍNCOPE
<i>ABCC9</i>	FA, SBr	<i>KCNJ8</i>	SBr
<i>ACTA2</i>	AC	<i>KCNK17</i>	FA
<i>ACTC1</i>	CMH, MNC	<i>KCNN3</i>	FA
<i>ACTN2</i>	CMH	<i>KCNQ1</i>	SQT1 1, FA
<i>ADRB1</i>	FA	<i>LAMA4</i>	CMD
<i>ADRB2</i>	FA	<i>LDB3</i>	CMD, CMH, MNC
<i>AGTR1</i>	FA	<i>LMNA</i>	CMD
<i>AKAP9</i>	SQT1 11	<i>MEF2A</i>	FA
<i>ANK2</i>	SQT1 4, TVPC	<i>MYBPC3</i>	CMH, MNC
<i>ASPH</i>	FA	<i>MYH6</i>	CMH
<i>C9ORF3</i>	FA	<i>MYH7</i>	CMH
<i>CACNA1C</i>	SBr, SQT1 8	<i>MYL2</i>	CMH
<i>CACNA1D</i>	FA	<i>MYL3</i>	CMH
<i>CACNA2D1</i>	SBr, SQTc	<i>MYLK2</i>	CMH
<i>CACNB2</i>	SBr, RP	<i>MYOZ2</i>	CMH
<i>CALM1</i>	SQT1 14	<i>MYPN</i>	CMH
<i>CALM2</i>	SQT1 15	<i>NEBL</i>	CMD, CMH, MNC
<i>CALR3</i>	CMH	<i>NEXN</i>	CMH
<i>CASQ2</i>	TVPC	<i>NKX2-5</i>	FA
<i>CAVI</i>	FA	<i>NPPA</i>	FA
<i>CAV3</i>	SQT1 9	<i>PDLIM3</i>	CMH
<i>CBL</i>	Síndrome de Noonan	<i>PITX2</i>	FA
<i>CTNNA3</i>	DAVD	<i>PKP2</i>	DAVD
<i>DES</i>	DAVD	<i>PKP4</i>	DAVD
<i>DMD</i>	CMD	<i>PLEC</i>	FA
<i>DSC2</i>	DAVD	<i>PRKAG2</i>	CMH
<i>DSG2</i>	DAVD	<i>PRRX1</i>	FA
<i>DSP</i>	DAVD	<i>RANGRF</i>	SBr
<i>DTNA</i>	MNC	<i>RYR2</i>	TVPC
<i>EMD</i>	CMD	<i>SCN10A</i>	SBr
<i>EYA4</i>	CMD	<i>SCN1B</i>	SBr
<i>FBN1</i>	Fibrilopatias	<i>SCN2B</i>	FA, SBr
<i>FBN2</i>	Fibrilopatias	<i>SCN3B</i>	SBr
<i>FHL2</i>	CMH	<i>SCN4B</i>	SQT1 10
<i>FKTN</i>	CMD	<i>SCN5A</i>	SBr, SQT1 3, FA
<i>FLNC</i>	CMH	<i>SCNN1B</i>	SQT1
<i>GJA1</i>	MSI	<i>SLMAP</i>	SBr
<i>GJA5</i>	FA	<i>SNTA1</i>	SQT1 12
<i>GLA</i>	CMH	<i>SYNE1</i>	CMH
<i>GPD1L</i>	MSI	<i>SYNE2</i>	FA
<i>HCN1</i>	MULTI	<i>SYNP02L</i>	FA
<i>HCN2</i>	MULTI	<i>TAZ</i>	CMD
<i>HCN4</i>	SBr, FA	<i>TBX5</i>	CMH
<i>ILK</i>	CMD	<i>TCAP</i>	CMH, CMD
<i>JPH2</i>	CMH, FA	<i>TGFB3</i>	DAVD
<i>JUP</i>	DAVD	<i>TMEM43</i>	CMH
<i>KCNA5</i>	FA	<i>TNNC1</i>	CMH
<i>KCND2</i>	MS	<i>TNNI3</i>	CMH

GENE	DOENÇA RELACIONADA	GENE	DOENÇA RELACIONADA
<i>KCND3</i>	SBr	<i>TNNI3K</i>	FA
<i>KCNE1</i>	SQT1 5, FA	<i>TNNT2</i>	CMH, MNC
<i>KCNE1L</i>	FA	<i>TPM1</i>	CMH
<i>KCNE2</i>	SQT1 6	<i>TRDN</i>	TVPC
<i>KCNE3</i>	SBr	<i>TRIM63</i>	CMH
<i>KCNE4</i>	FA	<i>TRPM4</i>	SBr
<i>KCNH2</i>	SQT1 2	<i>TTN</i>	MS, CMD, CMH, SBr
<i>KCNJ2</i>	SQT1 7, FA, SQT1 3	<i>ZFHX3</i>	FA

Legenda: FA - Fibrilação Atrial, SBr - Síndrome de Brugada, SQT1 - Síndrome do QT Longo, DAVD - Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito, CMH - Cardiomiopatia Hipertrófica, MNC - Miocardiopatia Não-Compactada, MULTI - múltiplas arritmias, MSI - Morte Súbita Infantil, TVPC - Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica, AC - Anomalias Cardiovasculares, SQTc - Síndrome do QT curto, CMD - Cardiomiopatia dilatada, MS - Morte Súbita.

Os desenhos das sondas foram feitos a partir da plataforma virtual *Design Studio* (Illumina). Foram indicados os genes de interesse de acordo com o genoma humano referência (hg19) e as siglas do *RefSeq* (banco de dados para a anotação do genoma, identificação e caracterização de genes, mutação e análise de polimorfismo, estudos de expressão e análises comparativas). Apenas as regiões codificantes foram indicadas como alvo, mantendo 10 pares de base (pb) de regiões intrônicas nas extremidades 3' e 5' de cada éxon.

5.5.3. Construção da biblioteca

Foi utilizado o protocolo *Nextera® Rapid Capture Custom Enrichment* da *illumina*. Antes de iniciar o enriquecimento, as amostras foram quantificadas com a utilização do fluorômetro *Qubit 2.0* (*Life Technologies*), diluídas em Tris-HCl 10 mM, pH de 8,5 e normalizadas primeiramente para uma concentração de 10 ng/μl, e após segunda quantificação, foram diluídas novamente em Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 e normalizadas à uma concentração de 5 ng/μL em um volume final de 10 μL (50 ng total).

O protocolo de enriquecimento se inicia com a fragmentação do DNAg, com o uso do *transposon Nextera* e, na mesma etapa, sequências adaptadoras foram acopladas aos fragmentos de DNAg. Após esta etapa, foi feita purificação com *beads* específicos, para que houvesse a remoção dos *transposons* restantes, que poderiam ter se ligado na terminação dos fragmentos de DNAg, impedindo o bom desempenho do protocolo nas etapas seguintes. O material resultante desta purificação foi então amplificado, e *indexes* (*barcodes*) foram adicionados às amostras, em reação da cadeia polimerase (PCR) de 10 ciclos. Para cada amostra, foram adicionados dois *index* (*um i7 e um i5*), além de uma sequência adaptadora de

sequenciamento necessária para a posterior amplificação dos *clusters* (figura 9). Após adição dos *index*, foi realizada outra purificação com *beads* para remoção de produtos indesejados.

Figura 9: Indexes e sequencias adaptadoras

Fonte: Fong R, 2016⁷²

Após estarem devidamente marcadas com *indexes* únicos, as bibliotecas de DNAg foram combinadas em um único *pool* e submetidas a uma primeira hibridização, para que ocorresse a ligação das sondas de captura nas regiões alvo do DNAg. Depois desta etapa, esferas magnéticas com estreptavidina foram utilizadas para capturar as sondas hibridizadas com as regiões-alvo (figura 10). Duas lavagens aquecidas foram realizadas para remover a ligação não específica das *beads*. A biblioteca enriquecida foi então eluída e preparada para uma segunda etapa de hibridização. Os fragmentos passaram por uma segunda hibridização, que lhes conferiu alta especificidade das regiões capturadas e, novamente, foram lavados da mesma forma que na primeira hibridização.

Figura 10: Hibridização das regiões alvo com esferas magnéticas.

Fonte: *Illumina*

A biblioteca enriquecida foi eluída e preparada para o sequenciamento. Uma purificação foi feita com *beads*, antes da etapa de amplificação. A amplificação da biblioteca enriquecida foi realizada, em uma PCR de 10 ciclos. Outra etapa de purificação com *beads* foi realizada para a remoção de produtos indesejados.

As bibliotecas enriquecidas foram quantificadas com a utilização do fluorômetro *Qubit 2.0 (Life Technologies)*. A qualidade e tamanho médio da biblioteca foram avaliados através de gel de agarose a 1%.

5.5.4. Sequenciamento na plataforma *MiSeq® Illumina*

Para o sequenciamento na plataforma *MiSeq®* as bibliotecas foram desnaturadas e diluídas para serem colocadas no equipamento. A desnaturação garantia que a concentração de NaOH na solução final estivesse adequada, pois concentrações aumentadas de NaOH podem inibir a hibridização da biblioteca na *flow-cell* (chip de corrida) e, consequentemente, afetar a densidade dos *clusters*. Após esta etapa, as bibliotecas foram inseridas no cartucho de reagentes *MiSeq Reagent Kit v2* (300 ciclos), para primeira corrida, e *MiSeq Reagent Kit v3* (150 ciclos), na segunda corrida, que por sua vez foram inseridos no equipamento *MiSeq® Illumina*, com um *output* (quantidade de dados) máximo de até 5.1Gb, segundo especificações do fabricante. A cobertura esperada para os fragmentos capturados era de 200x.

5.5.5. Análise dos dados do NGS

As sequências geradas no servidor do sequenciador *Miseq Illumina* foram analisadas pelo software *CLC Genomics Workbench 8.0* (CLCBio, *QIAGEN*), de acordo com adaptação do *workflow* estabelecido por Oliveira e colaboradores (2015)⁷³, conforme ilustrado a seguir na figura 11. Esta ferramenta foi utilizada para análise, comparação e visualização dos dados do sequenciamento para identificação de SNP, mutações, inserções e deleções.

Figura 11: Pipeline de sequenciamento genético de nova geração (NGS - Next generation sequence): planejamento de sequenciamento, escolha da plataforma e gerenciamento de análise de dados.
Fonte: Oliveira, et. al., 2015⁷³.

Para a busca de variantes patogênicas nos genes candidatos foi utilizada, inicialmente, menor frequência alélica indicada para doenças raras ($MAF < 0,1\%$)⁷⁴. Os bancos de dados populacionais consultados foram: EVS (*Exome Variant Server*), gnomAD (*Genome Aggregation Database*) e ABraOM (*Arquivo Brasileiro Online de Mutações*). Foram utilizados softwares de predição de patogenicidade, sendo eles: *Polyphen-2* (*Polymorphism Phenotyping v2*), o qual estima efeitos estruturais e funcionais de SNPs humanos e analisa a conservação evolutiva da proteína afetada; *Provean* (*Protein Variation Effect Analyzer*), que

busca o impacto na função biológica de uma proteína; e *Sift* (*Sorting Intolerant From Tolerant*), que se baseia principalmente na condição evolutiva da proteína.

Além disso, as variantes foram comparadas com o banco de dados HGMD® (*Human Gene Mutation Database*) e *ClinVar*, que agregam informações sobre variação genômica e sua relação com a saúde humana; e artigos científicos encontrados no *Pubmed* que descrevessem a alteração de interesse.

As variantes encontradas foram classificadas de acordo com os critérios do ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics e Association for Molecular Pathology*) (tabela 2 e 3)⁷⁵, e separadas em dois grupos:

Grupo A: Neste grupo foram incluídos pacientes dos quais foram encontradas variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas (P/PP), de acordo com critérios do ACMG. Foram consideradas P/PP, variantes com MAF < 0,1%, predição *in silico* patogênica pela maioria dos algoritmos, e genes provavelmente relacionados à FA conforme a descrição na literatura, baseada em estudos funcionais ou dados de segregação familiar.

Grupo B: Neste grupo foram incluídos os pacientes que não apresentavam variantes classificadas como P/PP. Este grupo incluía os pacientes que apresentassem variantes de significado incerto (VSI) ou ausência de variantes. Foram consideradas VSI, variantes com MAF < 0,1%, predição *in silico* patogênica pela maioria dos algoritmos, no entanto, as descrições na literatura, os dados funcionais e a segregação familiar foram inconsistentes em relação à FA.

Tabela 2: Critérios do ACMG para classificação de variantes patogênicas.

Evidência de patogenicidade	Categoria	Descrição
Muito Forte <i>PVSI (very strong)</i>	<i>PVSI</i>	Variante nula (nonsense, frameshift, canonical $\pm$ 1 ou 2 sítios de <i>splice</i> , início de códon, deleção uni ou multiexon) quando o mecanismo é a perda de função dos canais.
Forte <i>PS (strong)</i>	<i>PS1</i> <i>PS2</i> <i>PS3</i> <i>PS4</i>	Troca proteica já descrita como patogênica, porém com diferentes trocas de nucleotídeo. Mutação De novo com paternidade e maternidade confirmadas, na ausência de antecedentes familiares com suspeita da doença. Comprovação de patogenicidade por estudos funcionais. A prevalência da variante em indivíduos com a doença é significativamente maior que a prevalência em controles.

Evidência de patogenicidade	Categoria	Descrição
Moderada <i>PM (moderate)</i>	<i>PM1</i>	Topografia <i>hot spot</i> ou em domínio funcional bem estabelecido, sem variantes benignas.
	<i>PM2</i>	Ausência em controles (ou muito rara para doenças recessivas).
	<i>PM3</i>	Variantes patogênicas detectadas em <i>trans</i> .
	<i>PM4</i>	Mudança no tamanho da proteína por deleções ou inserções <i>in frame</i> em região não repetitiva ou variante <i>stop-loss</i> .
	<i>PM5</i>	Nova troca proteica, onde uma troca por outra base já foi descrita como patogênica.
	<i>PM6</i>	Mutação <i>de novo</i> sem paternidade e maternidade confirmadas, na ausência de antecedentes familiares com suspeita da doença.
Complementar <i>PP (supporting)</i>	<i>PP1</i>	Cosegregação genótipo-fenótipo positiva.
	<i>PP2</i>	Variante <i>missense</i> em um gene com baixa taxa de variantes <i>missense</i> benignas, quando essas são mecanismo conhecido da doença.
	<i>PP3</i>	Evidências computacionais de diferentes bases suportam o efeito deletério da troca proteica.
	<i>PP4</i>	O fenótipo e a história familiar são típicos de doenças monogênicas.
	<i>PP5</i>	Variantes relatadas na literatura como patogênicas.

Tabela 3: Regras para combinação de critérios e classificação de variantes

Patogênico	<p>a) 1 muito forte (<i>PVS1</i>) e ≥ 1 forte (<i>PS1 – PS4</i>) ou ≥ 2 moderadas (<i>PM1 – PM6</i>) ou 1 moderada (<i>PM1 – PM6</i>) e 1 complementar (<i>PP1 – PP5</i>) ou ≥ 2 complementares (<i>PP1 – PP5</i>)</p> <p>b) ≥ 2 fortes (<i>PS1 – PS4</i>) ou</p> <p>c) 1 forte (<i>PS1 – PS4</i>) e ≥ 3 moderadas (<i>PM1 – PM6</i>) ou 2 moderadas (<i>PM1 – PM6</i>) e 2 complementares (<i>PP1 – PP5</i>) ou 1 moderada (<i>PM1 – PM6</i>) e 4 complementares (<i>PP1 – PP5</i>)</p>
Provavelmente patogênico	<p>a) 1 muito forte (<i>PVS1</i>) e 1 moderada (<i>PM1 – PM6</i>) ou</p> <p>b) 1 forte (<i>PS1 – PS4</i>) e 1-2 moderadas (<i>PM1 – PM6</i>) ou</p> <p>c) 1 forte (<i>PS1 – PS4</i>) e ≥ 2 complementares (<i>PP1 – PP5</i>) ou</p> <p>d) ≥ 3 moderadas (<i>PM1 – PM6</i>) ou</p> <p>e) 2 moderadas (<i>PM1 – PM6</i>) e ≥ 2 complementares (<i>PP1 – PP5</i>) ou</p> <p>f) 1 moderada (<i>PM1 – PM6</i>) e ≥ 4 complementares (<i>PP1 – PP5</i>)</p>
Significância incerta	Outros critérios que não são encontrados acima, ou os critérios para patogênico e provavelmente patogênicos são contraditórios

5.6. Desenho de primers e sequenciamento de Sanger

A metodologia de Sanger foi utilizada para confirmação de variantes inconsistentes encontradas no NGS, tais como inserções, deleções e duplicações, uma vez que esta ainda é considerada padrão-ouro no sequenciamento genético. Os *primers* foram desenhados utilizando o programa *on-line primer 3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os *primers* liofilizados foram ressuspensos em 500 µL de TE (10 nM Tris-HCl – pH 8,1 mM, EDTA - pH 8,0), homogeneizados e mantidos em temperatura de -20 °C.

Para definir a melhor temperatura de anelamento para cada par de *primer* foi realizada a reação de PCR gradiente, constituída de 0,4µ de cada *primer* (200 nM), 0,5 U de BioTaq Polimerase DNA (Bio-Química, Brasil) e água MiliQ completando o volume de 10µL. Foi escolhida ciclagem de 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação do DNA molde em 94°C por 120s, desnaturação em 94°C por 30s, anelamento de 45°C a 65°C (em uma escala de 12 temperaturas) por 30s, extensão de 72°C por 120s. Foram realizadas 12 reações, uma para cada temperatura de anelamento testada; a amplificação foi confirmada em gel de agarose a 2%. Conforme a qualidade das bandas de DNA no gel de agarose, foi definida a temperatura de melhor anelamento dos *primers* utilizados.

A metodologia de Sanger foi aplicada com utilização do equipamento *Applied Biosystems® Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers* e a análise dos resultados em formato de cromatograma foi realizada pelo *software Geneious* desenvolvido pela *Biomatters*.

5.7. Característica de base da população estudada

Todos os pacientes avaliados tiveram os seus dados clínicos e genéticos coletados e tabulados. Estes dados principais incluíam: sexo, idade, cor/raça auto declarada, história familiar prévia, manifestações clínicas iniciais, resultado de exames laboratoriais, eletrocardiograma, ecocardiograma e as respectivas variantes genéticas encontradas e dados de sua análise.

5.8. Análise estatística

Foram descritas as características dos pacientes, com uso de frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas e medidas resumo, como média $\pm$ desvio padrão (DP), para as variáveis quantitativas ⁷⁶.

Foram descritas as positivities dos desfechos de interesse segundo as características qualitativas de interesse, e verificada a associação das características com as positivities dos desfechos com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos (teste exato de Fisher ou teste da razão de verossimilhanças) ⁷⁶. As características quantitativas foram descritas segundo positividade dos desfechos e comparadas entre negativos e positivos com uso de testes t-Student ou testes Mann-Whitney conforme distribuição de normalidade dos dados ⁷⁶. Foram estimados os *Odds Ratio* (OR) de cada variável com a positividade dos desfechos, com os respectivos intervalos de 95% de confiança pelo teste de regressão logística ⁷⁷. Foram criados os modelos de regressão múltipla inserindo todas as variáveis que nos testes bivariados apresentaram nível de significância de 0,20 ($p < 0,2$).

As variáveis qualitativas foram descritas segundo quantidade de genes variantes e verificada a associação com uso de testes qui-quadrado ou testes da razão de verossimilhanças. As variáveis quantitativas foram comparadas segundo as categorias de genes variantes por meio do uso de análises de variâncias (ANOVA) seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni, quando significativas, ou testes de Kruskal-Wallis ⁷⁸.

Para realização das análises foi utilizado o *software* IBM-SPSS *for Windows* (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) e para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2003. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Características demográficas e clínicas da população estudada

Foram avaliados 242 pacientes consecutivos no período de 2010 a 2018, destes 141 foram excluídos por ausência de critérios de inclusão ou por recusa em participar da pesquisa. Contudo, foram selecionados 101 pacientes, dos quais as amostras de DNA foram sequenciadas e estudadas. Foram encontradas alterações genéticas em 73/101 amostras, em 28/101 pacientes não foram encontradas variantes genéticas. No total foram encontradas 144 variantes genéticas, das quais foram divididas em dois grupos, grupo A: constituído de 14 pacientes e 14 variantes classificadas como P/PP, e grupo B: constituído de 97 pacientes onde foram encontradas 130 variantes, classificadas como VSI, e 28 pacientes onde não foram encontradas variantes como mostra o diagrama a seguir:

CONSORT 2010 Flow Diagram

Na tabela 4 estão sumarizadas as características gerais, clínicas e demográficas de todos os pacientes submetidos ao sequenciamento de nova geração (NGS) para FA isolada, a partir de um painel genético desenhado para canalopatias, cardiomiopatias e genes possivelmente relacionados à FA.

Tabela 4. Descrição das características demográficas dos pacientes estudados.

Características	Casos de fibrilação atrial (n = 101)
Idade do diagnóstico (anos)	
Média $\pm$ desvio padrão	38,6 $\pm$ 11
Mediana (mín.; máx.)	39 (16; 59)
Gênero, n (%)	
Masculino	78 (77,2)
Feminino	23 (22,8)
Tipo de FA, n (%)	
Paroxística	76 (75,2)
Persistente	19 (18,8)
Permanente	6 (5,9)
Índice de Massa corporal (IMC – Kg/m²)	
Média $\pm$ desvio padrão	25,7 $\pm$ 3,7
Mediana (mín.; máx.)	25,4 (16,5; 38,1)
Frequência cardíaca (bpm)	
Média $\pm$ desvio padrão	73,8 $\pm$ 13,6
Mediana (mín.; máx.)	73,5 (22; 103)
História familiar, n (%)	
Morte súbita	37 (41,1)
Fibrilação atrial	44 (48,9)
Marcapasso	10 (11,1)
Insuficiência cardíaca	13 (14,4)
Ecocardiograma	
Átrio esquerdo	
Média $\pm$ desvio padrão	38 $\pm$ 5,1
Mediana (mín.; máx.)	38 (28; 55)
Fração de Ejeção (FEVE%)	
Média $\pm$ desvio padrão	63,2 $\pm$ 5,9
Mediana (mín.; máx.)	64,5 (25; 71)
Dosagem de Magnésio	
Média $\pm$ desvio padrão	1,87 $\pm$ 0,28
Mediana (mín.; máx.)	1,8 (1,4; 2,4)
Procedimento de Ablação, n (%)	
Nenhum	35 (34,6 %)
1	43 (42,6 %)
Mais que 1	23 (22,8 %)

Como demonstrado na tabela 4, os pacientes incluídos tinham idade média de 38,6 $\pm$ 11, e apresentavam IMC de 25,7 $\pm$ 3,7 Kg/m². A maioria era do sexo masculino (77,2%) e apresentava frequência cardíaca média, no momento da consulta ambulatorial, de 73,8 $\pm$ 13,6 bpm, a maioria em ritmo regular.

Todos os pacientes incluídos eram aparentemente saudáveis no momento da seleção, com exceção da presença de FA no eletrocardiograma, teste ergométrico e/ou Holter de 24h. Todos os exames complementares mostraram valores dentro da normalidade. O ecocardiograma com valor médio do tamanho do átrio esquerdo de 38 $\pm$ 5,1 mm (valor de

referência: 30 a 40 mm), e valor médio de fração de ejeção do ventrículo esquerdo de $63,2 \pm 5,9$ % (valor de referência: $> 52\%$). Quanto ao tipo de FA, 76/101 (75,2%) pacientes apresentaram FA na forma paroxística, 19/101 (18,8%) apresentaram FA persistente e 6/101 (5,9%) tinham a FA na forma permanente.

Dos pacientes com história familiar prévia, 37/101 (41,1%) tinham história de morte súbita na família, 44/101 (48,9%) tinham familiares com história de FA, 10 dos 101 (11,1%) pacientes tinham familiares portadores de marcapasso, 13/101 (14,4%) tinham familiares com diagnóstico de insuficiência cardíaca e 25/101 (24,7%) não tinha história familiar prévia ou não sabiam informar.

Dos 101 pacientes selecionados, 66 (65,3%) já haviam passado por procedimento de ablação por cateter. Deste grupo, 43/101 (42,6%) tinham história de 1 procedimento de ablação, ao passo que 23/101 (22,8%) tinham mais de 1 procedimento realizado, sendo o máximo de 6 procedimentos (paciente número FA 137 - anexo 3). A média de quantidade de ablações calculada para os 101 pacientes foi de $1,07 \pm 1,2$. A mesma situação ocorreu para realização de cardioversões, foi calculado o valor médio de $0,64 \pm 1,35$, onde o número mínimo foi zero enquanto o número máximo de cardioversões em um paciente foi de 8 vezes.

O gráfico 1, mostra as porcentagens de fármacos antiarrítmicos usados pela população estudada, onde a maior parte 37/101 (36,6%) dos pacientes fazia uso de betabloqueadores, enquanto 33/101 (32,7%) fazia uso de propafenona, 7/101 (6,9%) de amiodarona, 6/101 (5,9%) de Sotalol ou bloqueador de cálcio. Por outro lado, 33/101 (32,7%) pacientes não faziam uso de antiarrítmicos durante a aplicação do questionário, ou durante a consulta médica.

Gráfico 1: Distribuição de antiarrítmicos (n=101). **Legenda:** Ca^{2+} - cálcio

6.2. Descrição dos resultados da análise genômica e suas associações fenotípicas

Dos 101 pacientes analisados, 14/101 (13,9%) apresentaram variantes classificadas como P/PP (grupo A – provavelmente relacionadas à FA); em 59/101 (58,4%) foram encontradas variantes de significado incerto (grupo B), ao passo que em 28/101 (27,7%) casos não foram encontradas variantes conforme de critérios de análise utilizados. Por outro lado, 43/101 (42,6%) pacientes apresentaram mais do que uma variante.

Para a associação dos resultados da análise genética e os desfechos clínicos, foi observado que 38/101 (37,6%) pacientes tiveram recorrência de FA durante o período do projeto, 6/101 (6,2%) desenvolveram insuficiência cardíaca, 5/101 (5,2%) tiveram AVC e 3/101 (3,1%) foram à óbito; no entanto, apenas 1 óbito foi por causa cardíaca (anexo 3).

A tabela 5 aparenta a descrição da positividade genética e dos desfechos avaliados em longo prazo de todos os pacientes estudados (n=101).

Tabela 5: Descrição da positividade e dos desfechos avaliados.

Variável	Descrição (n = 101)
Variante P ou PP, n (%)	
Presente	14 (13,9)
Ausente	87 (86,1)
Quantidade de variantes (grupo A ou B), n (%)	
Nenhuma variante	28 (27,7)
1 variante	30 (29,7)
Mais de 1 variante	43 (42,6)
Desfechos em longo prazo (grupo A ou B), n (%)	
Recorrência de FA	
Sim	38 (37,6)
Não	63 (64,4)
Insuficiência cardíaca	
Sim	6 (6,2)
Não	91 (93,8)
AVC	
Sim	5 (5,2)
Não	92 (94,8)
Óbito	
Sim	3 (3,1)
Não	94 (96,9)

A tabela 6 mostra a descrição dos grupos (pacientes com ou sem variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas), segundo as características de interesse e resultado das análises não ajustadas.

Tabela 6. Descrição dos grupos em relação às características clínicas avaliadas.

Características	Grupo		OR	IC (95%)		P
	A (P/PP) (n = 14)	B (VSI/ausente) (n = 87)		Inferior	Superior	
Idade do diagnóstico (anos)			0,96	0,91	1,02	0,173**
Média ± desvio padrão	34,9 ± 9,1	39,2 ± 11,2				
Mediana (mín.; máx.)	33,5 (23; 55)	41 (16; 59)				
Gênero, n (%)						0,180*
Masculino	13 (92,9)	65 (74,7)	1,00			
Feminino	1 (7,1)	22 (25,3)	0,23	0,03	1,84	
Tipo de FA, n (%)						0,226#
Paroxística	11 (78,6)	65 (74,7)	1,00			
Persistente	1 (7,1)	18 (20,7)	0,33	0,04	2,72	
Permanente	2 (14,3)	4 (4,6)	2,96	0,48	18,12	
Índice de Massa corporal (IMC – Kg/m²)			0,95	0,80	1,12	0,545**
Média ± desvio padrão	25,1 ± 3,5	25,8 ± 3,7				
Mediana (mín.; máx.)	24,7 (18; 31)	25,4 (16; 38)				
Frequência cardíaca (bpm)			0,98	0,94	1,02	0,269**
Média ± desvio padrão	70,1 ± 18	74,4 ± 12,8				
Mediana (mín.; máx.)	71,5 (22; 96)	75 (42; 103)				
História familiar, n (%)						
Morte súbita	10 (76,9)	27 (35,1)	6,17	1,57	34,35	0,005
Fibrilação atrial	6 (46,2)	38 (49,4)	0,88	0,27	2,86	0,831
Marcapasso	4 (30,8)	6 (7,8)	5,26	1,24	22,26	0,035*
Insuficiência cardíaca	2 (15,4)	11 (14,3)	1,09	0,21	5,60	>0,999*
Ecocardiograma						
Átrio esquerdo			0,89	0,78	1,02	0,084**
Média ± desvio padrão	35,8 ± 5,4	38,3 ± 5				
Mediana (mín.; máx.)	34 (28; 51)	38 (29; 55)				
Fração de Ejeção (FEVE%)			0,96	0,89	1,21	0,413**
Média ± desvio padrão	61,7 ± 4,8	63,4 ± 6,1				
Mediana (mín.; máx.)	60 (55; 69)	65 (25; 71)				
Dosagem de Magnésio			0,16	0,01	2,51	0,190**
Média ± desvio padrão	1,77 ± 0,26	1,9 ± 0,28				
Mediana (mín.; máx.)	1,7 (1,4; 2,3)	1,9 (1,5; 2,4)				
Recorrência de FA, n (%)			1,29	0,41	4,05	0,663
Sim	6 (42,9)	32 (36,8)				

Legenda: Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher; # teste da razão de verossimilhanças. ** teste t-student.

Considerando dentro deste modelo as variáveis que apresentaram nível de significância de no máximo 0,20 para positividade do grupo A, foi observado que, isoladamente, o histórico familiar de morte súbita e de marcapasso tiveram influência estatisticamente significativa nos pacientes do grupo A em relação aos do grupo B (p = 0,005 e p = 0,035, respectivamente) (Tabela 6).

A Tabela 7 mostra que, conjuntamente, a chance de positividade no grupo A, ou seja, de encontrar o achado de uma variante P/PP, foi menor nas mulheres, ao passo que pacientes com história familiar de morte súbita tiveram chance de positividade 5,6 vezes maior em relação aos pacientes sem história familiar de morte súbita. Os pacientes com história familiar de marcapasso apresentaram chance de positividade no grupo A de 6,8 vezes maior quando comparados aos pacientes sem história familiar de marcapasso, independente das demais características avaliadas.

Tabela 7. Resultado do modelo com as variáveis que apresentaram nível de significância de no máximo 0,20 para positividade do grupo A.

Característica	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Idade no diagnóstico (anos)	1,01	0,94	1,09	0,778
Gênero (feminino)	0,08	0,01	0,98	0,048
História de morte súbita	5,58	1,19	26,12	0,029
História de marcapasso	6,83	1,11	42,04	0,038
Diâmetro de átrio esquerdo	0,93	0,78	1,10	0,376

Legenda: teste de regressão logística múltipla.

As principais características clínicas dos pacientes e dos seus exames complementares, bem como os genes onde foram encontradas as variantes P e PP do grupo do grupo A estão ilustradas na tabela 8. Observamos que foram encontradas variantes no gene *ANK2*, *CACNB2*, *DSC2*, *KCNE2*, *LMNA*, *MYH7*, *SCN5A* e *TTN*.

Tabela 8: características dos pacientes do grupo A (n=14)

Identificação	Idade do Diagnóst.	Gênero	HF-ms	HF-mp	Numero ablações	Número cardiov.	ECO AE	ECO DDVE	ECO DSVE	ECO FEVE%	QTc	Sintoma (tipo FA)	Gene
FA 117	35	M	ND	ND	1	1	35	50	34	60	395	S (px)	ANK2
FA 186	31	M	S	N	0	0	28	50	31	68	302	S (px)	ANK2
FA 99	31	M	S	N	0	0	34	50	34	60	367	N (px)	ANK2
FA 169	39	M	N	N	1	2	51	55	37	61	422	N (pm)	CACNB2
FA 149	41	M	S	N	0	0	39	50	35	57	ND	N (px)	DSC2
FA 194	55	M	N	N	0	0	34	47	32	60	412	S (px)	KCNE2
FA 123	35	M	S	S	2	0	37	53	36	60	400	N (px)	LMNA
FA 58	16	F	S	S	4	0	35	48	31	65	450	S (pm)	LMNA
FAC 16	29	M	S	S	0	0	32	48	30	67	446	N (px)	LMNA
FA 50	32	M	S	S	0	1	38	45	28	68	364	S (px)	MYH7
FA 154	23	M	S	N	1	0	34	44	31	57	417	N (px)	SCN5A
FA 175	49	M	S	N	0	0	33	52	36	55	409	N (px)	TTN
FA 51	25	M	S	S	2	0	40	53	37	57	401	S (pt)	TTN
FA 95	25	M	S	N	1	0	33	49	30	59	377	N (px)	TTN

Legenda: Diagnós. – diagnóstico; HF-ms – história familiar de morte súbita; HF-mp – história familiar de marcapasso; cardiov. – numero de cardioversões; HV – condução His-ventrículo; ECO – ecodardiograma; AE – tamanho de átrio esquerdo; DDVE - diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSVE - diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; QTc – intervalo QT corrigido; ND – não disponível.

A distribuição com a frequência das variantes encontradas no grupo A estão elencadas no gráfico 2, sendo que 21,4% representa a presença de 3 variantes nos genes referentes, e 7,4% representa a presença de 1 variante.

Gráfico 2: Frequência das variantes encontradas do grupo A.

A frequência populacional e a predição *in silico* das variantes encontradas nos pacientes do grupo A, incluindo dados do sequenciamento, encontram-se listadas na tabela 9.

Após avaliação dos resultados genéticos das variantes, as mesmas foram classificadas em níveis de patogenicidade de acordo com os critérios do ACMG. Dos pacientes incluídos no grupo A, 7/14 (50%) foram classificadas como patogênicas, nos genes *ANK2*, *LMNA* e *TTN*; e 7/14 (50%) variantes tiveram classificação final de provavelmente patogênicas, nos genes *ANK2*, *CACNB2*, *DSC2*, *KCNE2*, *MYH7*, *SCN5A* e *TTN*, conforme mostra tabela 10.

Já em relação aos pacientes do grupo B, houve uma grande variedade de alterações encontradas, porém classificadas como variantes de significado incerto (VSI) ou ausentes. Foram encontradas 120 variantes genéticas, que não preencheram critérios para P/PP. Os genes, variantes, predição *in silico* e frequência populacional estão ilustrados no anexo 1. A distribuição e frequência dos genes encontrados no grupo B encontram-se listados no Anexo 2.

Tabela 9 - Frequência populacional e predição *in silico* das variantes encontradas em genes do grupo A.

Gene	Variante	Alteração	Cobertura	F/R	Frequência populacional			Predição <i>in silico</i>			
					GnomAD	AbraOM	EVS %	Provean	Sift	PolyPhen	Mutation taster
<i>ANK2</i>	p.Glu1458Gly	Sítio de splicing	138	0,41	0.000516	0.000821	0.0154	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
<i>ANK2</i>	p.Leu936Val	<i>Missense</i>	247	0,37	---	---	---	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
<i>ANK2</i>	p.Glu1458Gly	Sítio de splicing	55	0.48	0.000516	0.000821	0.0154	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
<i>CACNB2</i>	p.Gly29fs	Inserção	62	0,18	---	---	---	---	---	---	Deletério
<i>DSC2</i>	p.Thr268Pro	<i>Missense</i>	24	0.50	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
<i>KCNE2</i>	p.Ile57Val	<i>Missense</i>	31	0,06	---	---	---	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
<i>LMNA</i>	p.Arg377Cys	<i>Missense</i>	48	0,38	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
<i>LMNA</i>	p.Arg377Leu	<i>Missense</i>	15	0,40	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
<i>LMNA</i>	p.Arg545His	<i>Missense</i>	80	0.43	0.000231	---	0.0234	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
<i>MYH7</i>	p.Met852Thr	<i>Missense</i>	49	0,48	0.000032	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
<i>SCN5A</i>	p.Ile233Thr	<i>Missense</i>	81	0,47	---	---	---	Deletério	Deletério	---	Deletério
<i>TTN</i>	p.Lys8585X	Código de parada	759	0,45	---	---	---	---	---	---	Deletério
<i>TTN</i>	p.Tyr4443X	Código de parada	90	0,50	---	---	---	---	---	---	Deletério
<i>TTN</i>	p.Gly30724fs	Deleção	71	0.23	---	---	---	---	---	---	---

Legenda: Glu - Glutamina; Gly - Glicina; Leu - Leucina; Val – Valina; Thr - Treonina; Pro – Prolina ; Ile - Isoleucina; Arg – Arginina; His – Histidina; Lys - Lisina; Tyr - Tirosina; X – aminoácido terminal; fs – *frameshift*

Tabela 10: Classificação das variantes do grupo A, conforme critérios da ACMG.

Gene	Variante	Alteração	Critérios ACMG	ACMG
ANK2	p.Glu1458Gly	Sítio de splicing	<i>PVS PP2 PP3 PP5</i>	Patogênico
ANK2	p.Leu936Val	<i>Missense</i>	<i>PM2 PM5 PP2 PP3 PP5</i>	Provavelmente patogênico
ANK2	p.Glu1458Gly	Sítio de splicing	<i>PVS PP2 PP3 PP5</i>	Patogênico
CACNB2	p.Gly29fs	Inserção	<i>PM2 PM4 PP2 PP3</i>	Provavelmente patogênico
DSC2	p.Thr268Pro	<i>Missense</i>	<i>PM2 PM5 PP2 PP3</i>	Provavelmente patogênico
KCNE2	p.Ile57Val	<i>Missense</i>	<i>PM2 PM5 PP2 PP3</i>	Provavelmente patogênico
LMNA	p.Arg377Cys	<i>Missense</i>	<i>PM2 PP1 PP2 PP3 PP4 PP5</i>	Patogênico
LMNA	p.Arg377Leu	<i>Missense</i>	<i>PS1 PM2 PM5 PP1 PP2 PP3 PP4</i>	Patogênico
LMNA	p.Arg545His	<i>Missense</i>	<i>PM5 PP1 PP2 PP3 PP4 PP5</i>	Patogênico
MYH7	p.Met852Thr	<i>Missense</i>	<i>PS1 PM5 PP2 PP3 PP5</i>	Provavelmente patogênico
SCN5A	p.Ile233Thr	<i>Missense</i>	<i>PM1 PM2 PP2 PP3</i>	Provavelmente patogênico
TTN	p.Lys8585X	Código de parada	<i>PVS PM2 PP3</i>	Patogênico
TTN	p.Tyr4443X	Código de parada	<i>PVS PM2 PP1 PP3</i>	Patogênico
TTN	p.Gly30724fs	Deleção	<i>PS3 PM2 PM4 PP3</i>	Provavelmente patogênico

Legenda: PVS – patogenicidade muito forte, PS – patogenicidade forte, PM – patogenicidade moderada, PP – patogenicidade complementar.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Inúmeros relatos de fatores de risco modificáveis e não modificáveis contribuem para o desenvolvimento de FA, como: fatores sócio-demográficos, estilo de vida, condições cardiovasculares e outras condições comórbidas, gênero, hipertensão, síndrome coronariana aguda, diabetes, hipertireoidismo, obesidade e tabagismo ⁴⁶. Na população estudada nesta pesquisa, foram incluídos 101 pacientes, que apresentavam FA, no entanto, estes indivíduos, além de serem mais jovens, não eram portadores dos clássicos fatores de risco comumente relatados para desenvolvimento da FA, sendo caracterizados como pacientes com possível diagnóstico inicial de FA isolada.

Diversos estudos mostram que a FA é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino ^{79, 80}. A prevalência de FA na meia-idade em coortes mais velhas é quase duas vezes mais alta nos homens do que nas mulheres ^{81, 82, 83}. William Evans e Peter Swann, em 1953, estudaram a fibrilação isolada em 20 pacientes, e concluíram que a arritmia provavelmente não era encontrada em mulheres, uma vez que todos os pacientes estudados naquela época eram homens, e que embora era mais comum nos idosos, como hoje em dia, às vezes era encontrada em indivíduos mais jovens ³³. Em nossa amostra, grande parte dos integrantes (77,2%) é do sexo masculino e com idade média e mediana ao redor de apenas 39 anos, o que reforça a maior probabilidade de FA isolada.

Em uma pesquisa com 79.793 indivíduos europeus, onde quase a metade (48,3%) era composta por homens, o risco de desenvolver FA foi maior em homens do que em mulheres durante a maior parte da vida, mas se tornou semelhante na idade mais avançada com um risco compatível. A incidência de FA foi associada a um aumento de 3,5 vezes no risco de mortalidade, sem diferença significativa entre os sexos. Entre os fatores de risco clássicos, maior IMC e menor colesterol total foram associados a um maior risco de FA em homens do que em mulheres, no entanto, mulheres com FA apresentam maior risco do que homens de desenvolver AVC ⁸⁴. Os nossos pacientes tinham tanto valor de IMC, quanto exames de colesterol total dentro da faixa de normalidade, de acordo com o valor de referência. Esses valores foram utilizados como critério de inclusão, não sendo possível fazer essa associação.

Por outro lado, um artigo americano, publicado em 2010, mostrou que a doença cardiovascular é a maior causa de morte entre as mulheres nos Estados Unidos, entre elas a de maior prevalência é a FA. Comparando com nossos dados, tivemos três óbitos, apenas um ocorreu em uma mulher, e um foi devido à fatores cardíacos, este último, no entanto ocorreu em indivíduo do gênero masculino. A prevalência de FA, quando ajustada para a idade,

parece ser maior em homens por apresentar aumento exponencial com o tempo, enquanto que em mulheres a prevalência permanece inalterada. Este artigo mostra ainda, que nos pacientes com insuficiência cardíaca, as mulheres demonstraram um risco 14 vezes maior de desenvolver FA, enquanto os homens apresentam um risco de 8,5 vezes, e aos 40 anos, homens e mulheres tinham risco igual, de 1 em 4, para o desenvolvimento de FA ⁸⁵.

Existem os fatores hormonais dos gêneros, onde após a puberdade o intervalo QT corrigido (QTc) masculino encurta, um fenômeno provavelmente relacionado à circulação de andrógenos. As mulheres, no entanto, apresentam maiores frequências cardíacas em repouso, menor tempo de recuperação do nó sinusal e maiores intervalos QTc do que os homens. Durante o estresse mental, as mulheres desenvolvem menor refratariedade no tecido atrial e menor encurtamento do intervalo QTc, o mesmo acontecendo na menopausa, o que pode explicar a baixa incidência de FA em mulheres jovens e a maior incidência em mulheres na pós-menopausa. Os autores sugerem que a mortalidade é maior para mulheres do que para homens com FA, talvez pelo fato das mulheres com FA serem mais velhas, ou serem mais propensas a comorbidades mais graves do que os homens com FA ⁸⁵.

Schnabel et al. mostraram que mulheres são menos propensas a receber terapias não farmacológicas para restaurar o ritmo sinusal, apesar de serem mais sintomáticas ⁸⁶. Outras evidências sugerem que FA isolada esporádica pode ser de herança recessiva, ainda não conhecida, ligada ao cromossomo X, e por esse motivo, nas formas familiares são mais comuns em homens ⁸⁷.

Quanto à raça, tivemos prevalência de FA de 51,5% em brancos autodeclarados. Estudos mostram que os afro-americanos são um grupo geneticamente heterogêneo composto de genomas ancestrais africanos e europeus, dado que pode ser comparado à população brasileira, por esta ser muito miscigenada. Este fato é importante para investigar se fenótipos complexos podem estar associados com antecedentes genéticos, podendo ser aplicado na predisposição de indivíduos com FA ⁸⁸.

Os estudos têm demonstrado que indivíduos de raça preta costumam apresentar taxas mais elevadas de acidente vascular cerebral isquêmico do que outros grupos raciais, entretanto, as taxas de fibrilação atrial clinicamente aparentes são mais baixas ⁸⁹. Não está claro se os indivíduos pretos realmente têm menos FA ou menor oportunidade de diagnóstico de FA. Uma pesquisa com beneficiários pretos do *Medicare* nos Estados Unidos encontrou menor incidência de FA, comparado com beneficiários de outras raças, apesar de uma maior carga de fatores de risco vascular e um maior risco de acidente vascular cerebral ⁹⁰.

Globalmente, cerca da metade dos pacientes com FA morrem de causas cardíacas, incluindo morte súbita, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio ⁹¹. Uma grande porcentagem (75,2%) dos nossos pacientes apresentou história familiar de FA, morte súbita, marcapasso e/ou insuficiência cardíaca. Para morte súbita foram considerados os corte de idades sugeridos pelos dos estudos de Framingham, que diz que o risco de morte súbita diminui após os 75 anos de idade ⁹², e pela Diretriz de Morte Súbita Cardíaca elaborada em conjunto pelas sociedades americanas ACC/AHA/HRS onde é sugerido que o risco na população em geral aumenta ao longo do tempo, começando aos 35 anos de idade ⁹³.

Vários estudos sugerem que a informação de indivíduos com FA dentro de uma família é um fator agregante para predizer o desenvolvimento desta em outros membros. Em um grupo de 2.243 filhos de portadores de FA no estudo de Framingham, a história familiar de FA mostrou-se 1,85 associada a chance de ter eventos de FA na prole ⁹⁴. Um estudo islandês relatou um risco relativo similar de 1,77 para FA em parentes de primeiro grau de pacientes com FA, ou seja, o risco relativo de um indivíduo vir a apresentar FA estaria aumentado em até 85% se houvesse história familiar em pelo menos um dos pais ⁹⁵. Um estudo dinamarquês comparou o risco de FA entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos e estimou uma herdabilidade de 62% ⁹⁶. Outro estudo chamado ORBIT-AF, revelou que riscos semelhantes de tromboembolismo estavam associados a uma história familiar de FA comparada à ausência de história na família ⁹⁷.

Em uma pesquisa ⁶¹, realizada com 2.243 pacientes com FA, 681 tinham pelo menos um dos pais também com a doença, sugerindo que 30% de todos os pacientes com FA, independente da presença de doença cardíaca, apresentam histórico familiar. Shang et al. estudaram a implicação de fatores genéticos e ambientais associados com FA na população de Taiwan, tendo concluído que a história familiar pode não ser informativa no diagnóstico ou tratamento da FA. No entanto, a transmissão familiar da FA foi vista em 23,4% dos casos, na qual os pacientes com um parente de primeiro grau afetado tinham 1,92 vezes mais chances de ter FA do que a população geral, e idade de início da FA foi 10 anos mais jovem em pacientes com história familiar de FA do que naqueles sem histórico familiar ⁹⁸.

Vários estudos descobriram um componente hereditário substancial da FA e, em particular, na FA isolada ^{49, 99, 95, 94, 100}. Oyen et al. demonstraram que uma história familiar de FA e, especialmente de FA solitária, esteve associada a um risco substancial de desenvolvimento desta patologia. Neste estudo, os fatores de risco de maior significância foram, a idade de início da FA nos membros da família e o número de parentes afetados, especialmente se estes eram parentes de primeiro grau ¹⁰¹.

Marcus et al. demonstraram, após ajuste estatístico, que os pacientes com FA isolada (54 pacientes) tinham uma maior probabilidade (41% *versus* 14%) de ter um familiar de primeiro grau com FA do que os demais pacientes com FA (82 casos) do grupo geral (OR 7,2 95%IC 2,1-24,7, $p=0,002$), sugerindo que uma etiologia genética específica para a patologia atrial pode ser particularmente importante neste subgrupo de pacientes com FA ¹⁰².

Em nossa casuística, numa população mais selecionada de 101 pacientes, com idade média de 39 anos de idade, com cerca de 77% dos pacientes do sexo masculino, a presença de história familiar de algum membro afetado por FA ocorreu ao redor de 49% dos casos, o que é um percentagem bastante considerável, quando comparada às demais casuísticas descritas ¹⁰³. Porém, este número pode inclusive estar subestimado, uma vez que esta informação depende do conhecimento prévio da patologia nos familiares dos pacientes afetados, bem como dos registros de prontuário dos mesmos, o que em nosso país, de dimensões continentais e sem registros uniformes e padronizados de conduta entre os diversos estados da federação, acaba sendo um desafio na busca de uma informação precisa. Estes dados iniciais de nossa casuística necessitam ser comparados com os pacientes com FA mais idosos e/ou com fatores etiológicos presentes.

Fauchier et al, estudaram 1.253 mortes registradas em pacientes com diagnóstico inicial de FA, tendo ocorrido 54% de óbitos cardiovasculares e 43% de óbitos não-cardiovasculares. Quando analisados em conjunto, os principais fatores de predição de risco de mortalidade por todas as causas, já ajustados, foram : insuficiência cardíaca (HR 1,78 - 1,53-2,06; $p<0,0001$), insuficiência renal (HR 1,79 - 1,53-2,08; $p<0,0001$), fibrilação atrial permanente (HR 1,35 - 1,19-1,52; $p<0,0001$) e sangramento prévio (HR 1,42 - 1,15-1,75; $p<0,001$). Porém, trata-se de população considerada clássica de FA com fatores de risco e idade média de 70 anos de idade. ¹⁰⁴. Healy e colaboradores, em outra metodologia, reuniram registros de pacientes que se apresentaram com FA em alguma unidade de pronto atendimento de 47 países, com idade média de 68 anos de idade, e detectaram a insuficiência cardíaca e o AVC como principais causas de óbitos cardiovasculares, ocorrendo em torno de 43% dos casos. ¹⁰⁵.

Felizmente, como nossa casuística incluiu apenas pacientes com FA aparentemente isolada e eram mais jovens, a taxa de mortalidade total foi de 3,1% (3/101 pacientes), sendo apenas 1 de causa cardiovascular.

Nosso estudo também demonstrou que os pacientes com maior probabilidade de positividade nos achados genéticos (P ou LP) eram aqueles com história familiar de morte súbita (OR 5,58; 1,19-26,12 IC; $p=0,029$) ou com história familiar de marcapasso (OR

6,83:1,11-42,04 IC; $p=0,038$). Estes dados sinalizam para uma maior probabilidade pré-teste de positividade dos achados genéticos nesta população, com possível aumento do rendimento diagnóstico genético. Estes dados são considerados inovadores nesta área. Entretanto, nossas conclusões devem ainda ser cautelosas, por conta do pequeno número amostral.

A tentativa de identificação de genes candidatos para o fenótipo da FA sem causa aparente (“isolada”) é um tema de extensas investigações e ainda longe de ser plenamente concluído. Embora exista uma lista abrangente de fatores genéticos associados à FA, a maioria dos *loci* detectados em GWAS mostrou ter pouco efeito, e uma grande proporção de herdabilidade permaneceu inexplicada. Isso também é encontrado em outras características complexas, como altura com herdabilidade estimada de 80% e mais de 40 *locus* genéticos associados, mas com apenas 5% de variância fenotípica explicável ¹⁰⁶.

No estudo de Marcus et al. ¹⁰² foram sequenciadas as regiões codificantes dos canais iônicos cardíacos em genes candidatos à FA, bem como genes codificantes das proteínas de junções, proteínas do citoesqueleto e moléculas sinalizadoras associadas à FA, para estimar a prevalência de variantes codificantes de aminoácidos muito raras, em uma população de 54 pacientes com FA isolada. Pelo menos 72% dos pacientes carregavam uma variante rara. No entanto, a maioria dos pacientes apresentou variantes de significado incerto. A alta prevalência de variantes de significado incerto nesta população reflete a dificuldade de encontrar variantes candidatas que expliquem a complexa patologia da FA isolada.

Weeke et. al, avaliaram a prevalência de variantes raras em genes candidatos para FA, usando uma coorte de 186 pacientes probandos com FA isolada. Como resultado, um em cada cinco (1:5) probandos carregava uma ou mais variantes raras, codificantes de aminoácidos, dos quais 53% foram co-segregadas. As variantes estavam ausentes em 80% dos casos, sugerindo um padrão de herança complexo, genes de FA não identificados ou fatores epigenéticos ¹⁰⁷.

Olesen et al. examinaram a sobreposição genética encontrada em diferentes doenças dos canais iônicos e resumiram mutações em proteínas isoladas provavelmente responsáveis pelo desenvolvimento de diferentes tipos de arritmias cardíacas no mesmo paciente, como síndrome do QT longo, síndrome de Brugada e Cardiomiopatias ⁷. Chama atenção o fato de serem também encontrados genes candidatos e suas variantes relacionadas aos defeitos dos canais iônicos e/ou estruturas correlatas e alguns casos de FA isolada. Mutações no gene do canal de potássio resultando em aumento das correntes de repolarização e menor duração do potencial de ação são altamente plausíveis como causa da FA. Modelos animais identificaram o encurtamento do potencial de ação como um dos primeiros efeitos da FA, e esse

"remodelamento elétrico" é conhecido por ser um fator importante na manutenção da arritmia e em sua tendência de recorrência¹⁰⁸.

Assim, têm sido descritas diversas variantes genéticas raras, afetando apenas um único grupo que codifica vários canais iônicos. As proteínas de canal e sinalização aumentam o risco de desenvolver FA através de mecanismos genéticos distintos. Essa diversidade provavelmente contribui para a heterogeneidade genética da FA e a resposta diferencial às terapias. O grau das variantes genéticas, ou combinações de variantes, com penetrância variável, determinam susceptibilidade à FA, sendo esta uma área de investigação ativa⁵².

Em nosso trabalho, nos pacientes onde houve positividade para achados de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, seguindo os critérios da ACMG, foram encontradas alterações genéticas que podem estar relacionadas, em última análise, às anomalias no potencial de ação cardíaco por defeito no canal iônico, como os genes da ANK2, CACNB2, KCNE2 e SCN5A.

Por outro lado, em nossa casuística, de modo interessante, a análise genética pôde revelar genes mais relacionados com miocardiopatias hereditárias, porém que se apresentaram inicialmente como FA isolada, tais como: o gene LMNA, já descrito anteriormente em casos de cardiomiopatia dilatada associada com doença do sistema de condução; o gene MYH7, comumente descrito em casos de cardiomiopatia hipertrófica e outras cardiomiopatias; o gene TTN, também descrita em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica e cardiomiopatia dilatada; e o gene DSC2, mais relacionado com o fenótipo de displasia arritmogênica do ventrículo direito (DAVD). Todos estes pacientes com estes achados genéticos não possuíam o diagnóstico de outra patologia, exceto a própria FA, na ocasião do estudo.

A suscetibilidade aumentada à FA é mediada por diversos mecanismos genéticos, incluindo a modulação da duração do potencial de ação atrial, desaceleração da condução e comunicação célula-a-célula prejudicada, bem como novos mecanismos, como a regulação de proteínas sinalizadoras importantes na patogênese da FA. No entanto, a tradução de dados genéticos para o cuidado de pacientes com FA tem sido limitada devido à dificuldade ainda presente de se entender todos os mecanismos subjacentes associados a *loci* de suscetibilidade à FA comum, bem como à escassez de estudos prospectivos e adequadamente fortalecidos. Assim, permanece a necessidade de ensaios clínicos apropriadamente projetados e direcionados por genótipos⁵².

Devido às inúmeras informações recentes, algumas ainda em investigação, bem como a falta de dados consistentes sobre a relação genótipo-fenótipo, ainda não há indicação

padronizada e de rotina de teste genético em pacientes com FA sem características que direcionem o diagnóstico para outras síndromes hereditárias arritmogênicas¹⁰⁹.

Nossa pesquisa inicial, em uma população selecionada de pacientes portadores de FA isolada, com base na investigação de alterações genéticas, demonstrou que é possível o achado de variantes genéticas patogênicas ou provavelmente patogênicas em torno de 14% dos casos. Porém, o número de pacientes ainda “expostos” à probabilidade de reclassificação ainda é um desafio, pois cerca de 58% dos casos foram concluídos como portadores de variantes de significado incerto, onde parte delas podem estar relacionadas à geração de FA. Estes dados têm sido também encontrados em outras casuísticas¹⁰².

Nossos achados são um passo inicial dentro da investigação de uma coorte brasileira de pacientes com FA isolada e apontam para a importância dos achados genéticos e suas associações fenotípicas.

7.1.Limitações

A idade de corte do nosso trabalho foi para pacientes menores que 60 anos, uma vez que buscou-se uma maior probabilidade de rendimento diagnóstico genético nesta população com maior chance da FA não ter causa aparente (FA isolada). A maior incidência de história familiar de morte súbita e de marcapasso pode estar relacionada a uma população altamente selecionada, porém nossos dados apontam para um possível incremento de rendimento de diagnóstico genético nesta população. Não foram incluídos e nem feitas análises e comparações com os pacientes com FA e fatores de risco etiológico, como doença coronária, hipertensão arterial, dentre outros. Porém, por se tratar de doença multifatorial, houve o cuidado de se excluir esses pacientes, para que se evitasse a necessidade de ampliação do painel genético e o aumento de fatores estatísticos de confusão. Ainda são necessários estudos que investiguem de forma mais específica os detalhes moleculares, para talvez diminuir os riscos e desenvolver tratamentos mais estratégicos para esses pacientes.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- Foi possível a identificação de variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas em 13,9% dos pacientes portadores de FA isolada de um serviço terciário de atendimento, que compunham a casuística deste estudo.
- A presença destes achados, embora pouco frequente, esteve mais associada nos pacientes com FA que tinham história familiar de marcapasso e/ou morte súbita.
- A utilização de um painel personalizado para FA isolada, com auxílio dos critérios do ACMG, permitiu uma análise sistemática das variantes nos genes principais. As variantes encontradas nos genes de significado incerto podem ser melhor exploradas por estudo de segregação familiar.
- Esses achados iniciais podem auxiliar no rendimento dos testes genéticos.
- A análise genética desta população permitiu um diagnóstico precoce de miocardiopatias hereditárias em alguns casos que se apresentaram inicialmente como FA isolada.
- A alta prevalência de VSI nesta população reflete a dificuldade de encontrar variantes candidatas que expliquem a complexa patologia da FA isolada.

PERSPECTIVAS

9. PERSPECTIVAS

Esta pesquisa visa esclarecer dados recentes sobre estudos genéticos de FA isolada em amostra de pacientes mais jovens da população brasileira, em um hospital de referência. Os mecanismos moleculares e os métodos usados para estudar este distúrbio ainda não estão totalmente esclarecidos. Os avanços da genética molecular na cardiologia poderiam prever o surgimento da FA e até individualizar o tratamento, bem como ter impacto no seguimento clínico desses pacientes e no aconselhamento genético familiar.

Ao término destas fases, aliado às sugestões da banca de defesa, se objetivam mais publicações em revista científica e submissões para Congressos internacionais da especialidade. Alguns títulos já foram pré-estabelecidos:

- Prevalência de alterações raras em genes associados a cardiomiopatias hereditárias em uma coorte de FA isolada, onde serão descritos os achados patogênicos e provavelmente patogênicos.
- Enriquecimento de variantes raras em genes candidatos para cardiopatias hereditárias em FA isolada, onde será realizada a análise de cada gene.
- Incremento de rendimento diagnóstico de variantes genéticas com alta probabilidade de associação com FA isolada em pacientes mais jovens.
- Importância e comparação da história de familiar de primeiro grau de pacientes com FA isolada e não isolada.
- Hipomagnesemia em pacientes com FA isolada

Será também realizada matrícula no doutorado, na qual a extensão do tema ainda está em discussão e aperfeiçoamento.

ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO 1 – Frequência populacional e predição *in silico* dos genes encontrados no grupo B.

Paciente	Gene	Alteração	Cobertura	F/R	Frequência populacional			Predição <i>in silico</i>			
					GnomAD	AbraOM	EVS %	Provean	Sift	PolyPhen	Mutation taster
FA 114	ABCC6	Missense	21	0,50	0.0000519	---	---	---	---	---	Tolerado
FA 117	ABCC6	Stop gained	57	0,5	0.0000406	---	---	---	---	---	Deletério
FA 194	ABCC6	Missense	73	0,43	0.0002369	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Tolerado
FAC 25	ABCC6	Missense	28	0,46	0.0000216	0.000821	0.0077	Tolerado	Deletério	Deletério	Tolerado
FA 75	ABCC9	Missense	97	0,48	0.0000244	0.000821	0.0077	Tolerado	Deletério	Tolerado	Deletério
FA 148	ACTC1	Stop codon	17	0.50	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 111	ACTN2	Splice site	31	0,37	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 91	ADRB1	Insertion	100	0,47	---	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 157	ADRB2	Missense	109	0,47	0.0000040	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 132	AGTR1	Missense	146	0,49	0.0001411	0	0.0077	---	---	---	Deletério
FA 118	AKAP9	Indel	266	0,49	---	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 125	AKAP9	Splice site	49	0,44	0.0008840	0.000821	0.0769	Tolerado	Tolerado	Tolerado	Deletério
FA 138	AKAP9	Missense	113	0,43	0.0005666	0.001642	0.0692	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 155	AKAP9	Missense	117	0,48	0.0007006	0.000821	0.0384	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 165	AKAP9	Missense	103	0.36	0.0001083	0.001642	0.0154	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 193	AKAP9	Missense	130	0,46	0.0000108	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 56	AKAP9	Missense	78	0,32	0.0000081	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 93	AKAP9	Missense	35	0.50	---	---	---	Deletério	Deletério	Tolerado	Deletério
FA 166	ANK2	Missense	110	0,10	0.0002311	0.000821	0.0077	Deletério	Tolerado	Tolerado	Deletério
FA 173	ANK2	Missense	238	0,35	0.0000122	0.000821	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério

Paciente	Gene	Alteração	Cobertura	F/R	Frequência populacional			Predição <i>in silico</i>			
					GnomAD	AbraOM	EVS %	Provean	Sift	PolyPhen	Mutation taster
FA 173	CACNA1C	Missense	364	0,35	0.0005933	0.001642	0.0404	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 49	CACNA1C	Splicng Site	111	0,43	---	---	---	Tolerado	Tolerado	Tolerado	Deletério
FA 186	CACNA1D	Missense	387	0,06	0.0001336	---	0.0077	Deletério	Tolerado	Tolerado	Deletério
FA 193	CACNB2	Missense	98	0,44	0.0001336	---	0.0384	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 50	CACNB2	Missense	46	0,38	0.0000081	0.000821	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 96	CACNB2	Missense	13		---	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 152	CALR3	Missense	78	0.5	0.0004473	0.000821	0.1307	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 196	CBL	Missense	47	0,48	0.0000243	---	---	Tolerado	Deletério	Tolerado	Deletério
FA 118	DMD	Missense	29	0,45	0.0000056	---	---	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 109	DSC2	Missense	55	0,44	0.0000203	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 148	DSC2	Missense	10	0.38	0.0001738	0.000821	0.0308	Deletério	Tolerado	Tolerado	Deletério
FA 169	DSP	Missense	40	0,46	0.0007394	0.003284	0.0231	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 169	EYA4	Missense	76	0,49	0.0004557	---	0.0846	Deletério	Deletério	Tolerado	Deletério
FAC 36	EYA4	Intron	18	0,50	---	0.000821	0.0461	Tolerado	Tolerado	---	Deletério
FA 146	FBN1	Missense	81	0,49	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 196	FBN1	Missense	112	0,45	0.0000938	0.000821	0.0462	---	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 193	FBN2	Missense	64	0,42	0.0000722	---	0.0154	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 50	FBN2	Missense	25	0,50	0.0000614	---	---	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 53	FBN2	Missense	62	0,45	0.0000081	---	---	Deletério	Deletério	Tolerado	Deletério
FA 76	FBN2	Missense	17	0,48	0.0000325	---	---	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 151	FHL2	Missense	107	0.43	0.001053	0.000821	0.1461	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 111	FLNC	Missense	93	0,43	0.0003184	---	0.0237	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 111	FLNC	Missense	48	0,47	---	---	---	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 153	FLNC	Missense	22	0,47	0.0000323	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério

Paciente	Gene	Alteração	Cobertura	F/R	Predição <i>in silico</i>			Predição <i>in silico</i>			
					GnomAD	AbraOM	EVS %	Provean	Sift	PolyPhen	Mutation taster
FA 175	FLNC	Missense	184	0,27	---	---	---	Deletério	Damanging	Deletério	Deletério
FA 134	GJA1	Missense	39	0,42	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 135	GLA	Missense	12	0,50	0.0002147	0.001996	0. 0379	Deletério	Deletério	Deletério	Tolerado
FA 58	HCN2	Missense	59	0.49	---	---	---	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FAC 26	HCN2	Stop codon	10	0,50	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 154	JPH2	Missense	14	0,20	0.0001234	0.000821	0.0154	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 53	JPH2	Missense	15	0,50	0.0000042	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 153	JUP	Missense	22	0,47	0.0000220	0.000822	---	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 136	KCNA5	Missense	28	0,44	0.0000400	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Tolerado
FA 137	KCNA5	Missense	17	0,36	0.0000040	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 76	KCNE4	Deletion	36	0,25	0.0000040	---	---	---	---	---	Deletério
FA 75	KCNH2	Missense	63	0,40	0.0000432	---	0.0077	Deletério	Tolerado	Tolerado	Deletério
FA 164	KCNQ1	Missense	50	0,47	0.0000323	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 100	LAMA4	Missense	102	0,36	0.0003323	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 112	LAMA4	Stop codon	126	0.49	0.0006710	0.000821	0.1874	---	---	---	Deletério
FA 160	LAMA4	Stop codon	533	0,22	0.0006710	0.000821	0.1874	---	---	---	Tolerado
FA 87	LAMA4	Missense	304	0,43	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 160	LDB3	Missense	253	0,12	0.0006329	0.001642	0.1538	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 193	LDB3	Missense	164	0,46	0.0000323	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 196	LDB3	Missense	52	0,47	0.0000108	---	---	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 164	LMF1	Missense	30	0,43	0.0002932	---	0.0424	Deletério	Deletério	Tolerado	Tolerado
CPT 47	MEF2A	Deletion	84	0.33	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 118	MEF2A	Deletion	57	0,26	---	---	---	---	---	---	---
FA 134	MEF2A	Frameshift	86	0,33	---	---	---	---	---	---	Deletério

Paciente	Gene	Alteração	Cobertura	F/R	Predição <i>in silico</i>			Predição <i>in silico</i>			
					GnomAD	AbraOM	EVS %	Provean	Sift	PolyPhen	Mutation taster
FA 171	MEF2A	Deletion	32	0,09	---	---	---	---	---	---	---
FA 49	MEF2A	Insertion	63	0,33	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 141	MYBPC3	Splice site	38	0,25	0.0000304	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 171	MYBPC3	Splice site	187	0,31	---	---	---	Tolerado	Deletério	Tolerado	Tolerado
FAC 37	MYBPC3	Missense	39	0,50	0.0000771	---	0.0083	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 193	MYH6	Missense	54	0,31	0.0000252	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 87	MYH7	Missense	283	0,34	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 153	MYLK2	Missense	10	0.50	---	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 49	MYLK2	Missense	90	0,32	0.0001459	0.003284	0.0077	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 116	MYPN	Missense	57	0,43	0.0002238	---	0.123	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 66	MYPN	Missense	82	0,47	0.0004438	---	0.0615	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 85	MYPN	Missense	96	0.44	0.0000122	---	0	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 120	NEBL	Missense	79	0,42	0.0008232	---	0.0077	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FAC 27	NEBL	Stop codon	103	0,07	---	0.000821	---	---	---	---	Deletério
FAC 26	NEXN	Deletion	131	0,19	---	---	---	---	---	---	Deletério
FAC 37	NEXN	Missense	59	0,11	0.0001125	---	0.0169	Tolerado	Deletério	Deletério	Tolerado
FA 194	PKP4	Missense	32	0,44	0.0000122	---	---	Deletério	Deletério	Tolerado	Deletério
FA 114	PLEC	Missense	31	0,48	0.0007230	0.001642	0.1038	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 118	PLEC	Missense	51	0,47	0.0000159	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 134	PLEC	Missense	44	0,48	0.0000144	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 154	PLEC	Missense	32	0,47	0.0004960	0.004950	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 162	PLEC	Missense	112	0,38	0.0000326	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 174	PLEC	Missense	65	0,17	0.0000207	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 186	PLEC	Missense	22	0,27	0.0004524	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério

Paciente	Gene	Alteração	Cobertura	F/R	Predição <i>in silico</i>			Predição <i>in silico</i>			
					GnomAD	AbraOM	EVS %	Provean	Sift	PolyPhen	Mutation taster
FA 186	PLEC	Missense	149	0,43	0.0007230	0.001642	0.1038	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 196	PLEC	Missense	40	0,41	0.0001133	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
CPT 47	RYR2	Missense	49	0,36	0.0002428	0.000821	0.0248	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 104	RYR2	Missense	86	0.46	0.0000180	---	0.016	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 87	RYR2	Missense	205	0,42	0.0001365	---	0.0175	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FAC 36	RYR2	Missense	165	0,49	0.0000040	---	---	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 118	SCN10A	Missense	172	0,50	0.0002717	---	0.0384	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 125	SCN10A	Missense	66	0,47	0	---	---	Tolerado	Deletério	Deletério	Tolerado
FA 152	SCN10A	Missense	109	0.43	0.0000253	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 75	SCN10A	Missense	27	0,45	0.0000905	---	0.0384	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério
FA 174	SCN2B	Missense	107	0,25	0.0000505	---	0.0077	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 139	SCN5A	Missense	25	0,47	0.0000396	---	0.0079	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 194	SCN5A	Missense	90	0,31	0.0000478	---	---	Tolerado	Deletério	Tolerado	Deletério
FAC 25	SCNN1B	Missense	82	0,48	---	0.000821	---	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 125	SYNE1	Missense	102	0,46	0.0002387	---	0.0154	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 158	SYNE1	Missense	476	0.30	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 174	SYNE1	Missense	292	0,48	0.0000325	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 193	SYNE1	Missense	56	0,48	0.0001552	0.000821	0.0769	Deletério	Deletério	Tolerado	Deletério
FA 82	SYNE1	Missense	48	0,48	0.0002348	0.000821	0.1076	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FAC 25	SYNE1	Missense	45	0,50	0.0001372	---	0.0154	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 114	SYNE2	Missense	49	0,44	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 116	SYNE2	Indel	156	0,46	---	---	---	Deletério	Deletério	---	Deletério
FA 131	SYNE2	Missense	15	0,46	0.0000081	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 167	SYNE2	Missense	307	0,34	0.001018	0.000821	0.0692	Tolerado	Deletério	Deletério	Deletério

Paciente	Gene	Alteração	Cobertura	F/R	Predição <i>in silico</i>			Predição <i>in silico</i>			
					GnomAD	AbraOM	EVS %	Provean	Sift	PolyPhen	Mutation taster
FA 60	SYNE2	Missense	62	0,42	0.0007901	0.001642	0.0923	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 138	TBX5	Missense	23	0,43	0.0002130	0.001642	0.0231	Tolerado	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 153	TGFB3	Missense	73	0,48	---	---	---	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 157	TMEM43	Missense	76	0,45	0.0006098	---	0.1307	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 114	TNNC1	Stop codon	10	0,50	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 157	TNNI3	Missense	89	0,48	---	---	---	---	---	---	---
FA 51	TRDN	Missense	75	0,45	---	---	---	---	---	---	Tolerado
FA 142	TRIM63	Missense	28	0,43	0.0000971	---	0.0077	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 127	TTN	Stop codon	135	0,47	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 135	TTN	Stop codon	50	0,45	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 155	TTN	Splicing site	49	0,48	0.0006410	0.000821	0.0424	Deletério	Tolerado	Deletério	Deletério
FA 85	TTN	Insertion	68	0,34	---	---	---	---	---	---	Deletério
FA 123	ZFHX3	Missense	56	0,50	0.0002638	---	0.0231	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
FA 127	ZFHX3	Missense	74	0,44	0.0001732	---	0.0385	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério

ANEXO 2 – Gráfico de distribuição dos genes do grupo B

ANEXO 3 – Dados evolutivos dos pacientes estudados (n = 101).

Paciente	Ablação	Nº de ablações	Cardioversões	Nº de cardiov.	Recor de FA	IC	AVC	Óbito
CPT 47	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
CAVD 57	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FAC 1	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FAC 16	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 58	Sim	4	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FA 123	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FAC 20	Sim	3	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FAC 25	Não	0	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FAC 26	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FAC 27	Sim	2	Sim	8	Sim	Não	Não	Não
FAC 36	Sim	1	Não	0	Sim	Não	Sim	Não
FAC 37	Sim	1	Não	0	Sim	Não	Não	Sim
FA 23	Não	0	Sim	4	Sim	Sim	Não	Não
FA 46	Sim	3	Não	0	Sim	Sim	Não	Não
FA 49	Sim	4	Sim	1	Sim	Não	Não	Não
FA 50	Não	0	Sim	1	Sim	Não	Não	Não
FA 51	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FA 53	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 56	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 60	Sim	1	Sim	1	Sim	Não	Não	Não
FA 61	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 66	Sim	2	Sim	3	Sim	Sim	Não	Não
FA 68	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 69	Sim	1	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FA 75	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 76	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Sim
FA 81	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 82	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 85	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 87	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 91	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 93	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 94	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 95	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 96	Sim	2	Sim	7	Sim	Não	Não	Não
FA 99	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 100	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 101	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 103	Sim	2	Sim	1	Sim	Não	Não	Não
FA 104	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 107	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 109	Não	0	Não	0	Não	Não	Sim	Não
FA 111	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FA 112	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 114	Sim	2	Sim	3	Sim	Não	Não	Não
FA 116	Sim	1	Sim	5	Sim	Não	Não	Não
FA 117	Sim	1	Sim	1	Não	Sim	Não	Não
FA 118	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FA 120	Sim	1	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FA 121	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 122	Sim	5	Sim	1	Sim	Não	Não	Não
FA 125	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FA 127	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 128	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 129	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não

Paciente	Ablação	Nº de ablações	Cardioversões	Nº de cardiov.	Recor de FA	IC	AVC	Óbito
FA 130	Sim	3	Sim	1	Sim	Não	Não	Não
FA 131	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 132	Sim	1	Sim	1	Não	Não	Não	Não
FA 133	Sim	1	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FA 134	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 135	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 136	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 137	Sim	6	Sim	3	Sim	Não	Sim	Não
FA 138	Sim	4	Sim	1	Sim	Não	Não	Não
FA 139	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 140	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 141	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 142	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 143	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 144	Sim	1	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FA 146	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 148	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 149	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 150	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 151	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 152	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 153	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 154	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 155	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 157	Não	0	Sim	1	Não	Não	Não	Não
FA 158	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 159	Sim	1	Sim	1	Não	Não	Não	Não
FA 160	Não	0	Não	0	Não	Não	Sim	Não
FA 161	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 162	Sim	1	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FA 163	Não	0	Sim	1	Não	Não	Não	Não
FA 164	Sim	5	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FA 165	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 166	Não	0	Sim	1	Não	Não	Não	Não
FA 167	Sim	1	Não	0	Não	Sim	Não	Não
FA 168	Sim	2	Não	0	Sim	Não	Não	Não
FA 169	Sim	1	Sim	2	Sim	Não	Não	Não
FA 170	Sim	2	Sim	1	Sim	Não	Não	Sim
FA 171	Sim	1	Sim	3	Sim	Não	Não	Não
FA 173	Sim	1	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 174	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 175	Não	0	Não	0	Sim	Sim	Não	Não
FA 186	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 193	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não
FA 194	Não	0	Não	0	Não	Não	Sim	Não
FA 196	Não	0	Não	0	Não	Não	Não	Não

REFERÊNCIAS

11. REFERÊNCIAS

1. Kerola T, Dewland TA, Vittinghoff E, Heckbert SR, Stein PK, Marcus GM. Predictors of atrial ectopy and their relationship to atrial fibrillation risk. *Europace*. 2019.
2. Colilla S, Crow A, Petkun W, Singer DE, Simon T, Liu X. Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population. *Am J Cardiol*. 2013;112(8):1142-1147.
3. Andrade JG, Macle L, Nattel S, Verma A, Cairns J. Contemporary Atrial Fibrillation Management: A Comparison of the Current AHA/ACC/HRS, CCS, and ESC Guidelines. *Can J Cardiol*. 2017;33(8):965-976.
4. Lip GYH, Brechin CM, Lane DA. The global burden of atrial fibrillation and stroke: a systematic review of the epidemiology of atrial fibrillation in regions outside North America and Europe. *Chest*. 2012;142(6):1489-1498.
5. Almeida ED, Guimarães RB, Stephan LS, et al. Clinical Differences between Subtypes of Atrial Fibrillation and Flutter: Cross-Sectional Registry of 407 Patients. *Arq Bras Cardiol*. 2015;105(1):3-10.
6. Boccanelli A, Mureddu GF, Cesaroni G, et al. Predictive value of interatrial block for atrial fibrillation in elderly subjects enrolled in the PREDICTOR study. *J Electrocardiol*. 2019;54:22-27.
7. Olesen MS, Nielsen MW, Haunsø S, Svendsen JH. Atrial fibrillation: the role of common and rare genetic variants. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(3):297-306.
8. Golubić K, Šmalcelj A, Sertić J, Juričić L. Estrogen receptor 1 gene (TA)n polymorphism is associated with lone atrial fibrillation in men. *Croat Med J*. 2014;55(1):38-44.
9. Wyse DG, Van Gelder IC, Ellinor PT, et al. Lone atrial fibrillation: does it exist? *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(17):1715-1723.

10. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014;129(8):837-847.
11. Hong K, Xiong Q. Genetic basis of atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol*. 2014;29(3):220-226.
12. Zhao G, Zhou J, Gao J, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in permanent atrial fibrillation. *Mol Med Rep*. 2017;16(4):5505-5514.
13. Tsai CT, Lai LP, Hwang JJ, Lin JL, Chiang FT. Molecular genetics of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(4):241-250.
14. Johnson JN, Tester DJ, Perry J, Salisbury BA, Reed CR, Ackerman MJ. Prevalence of early-onset atrial fibrillation in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2008;5(5):704-709.
15. Campuzano O, Perez-Serra A, Iglesias A, Brugada R. Genetic basis of atrial fibrillation. *Genes Dis*. 2016;3(4):257-262.
16. Feghaly J, Zakka P, London B, MacRae CA, Refaat MM. Genetics of Atrial Fibrillation. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(20):e009884.
17. Andreassen L, Nielsen JB, Olesen MS. Genetic aspects of lone atrial fibrillation: what do we know? *Curr Pharm Des*. 2015;21(5):667-678.
18. Olesen MS, Andreassen L, Jabbari J, et al. Very early-onset lone atrial fibrillation patients have a high prevalence of rare variants in genes previously associated with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2014;11(2):246-251.
19. Tsai CT, Hsieh CS, Chang SN, et al. Next-generation sequencing of nine atrial fibrillation candidate genes identified novel de novo mutations in patients with extreme trait of atrial fibrillation. *J Med Genet*. 2015;52(1):28-36.
20. Dupont E, Ko Y, Rothery S, et al. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;103(6):842-849.

21. Hsieh CS, Huang PS, Chang SN, et al. Genome-Wide Copy Number Variation Association Study of Atrial Fibrillation Related Thromboembolic Stroke. *J Clin Med*. 2019;8(3).
22. Michelakis ED. Pulmonary arterial hypertension: yesterday, today, tomorrow. *Circ Res*. 2014;115(1):109-114.
23. Martinelli Filho M, Moreira DA, Lorga AM, et al. [Guideline of atrial fibrillation]. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81 Suppl 6:3-24.
24. Aird WC. Discovery of the cardiovascular system: from Galen to William Harvey. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:118-129.
25. Moss SW. The sphygmograph in America: writing the pulse. *Am J Cardiol*. 2006;97(4):580-587.
26. Fazekas T. [The concise history of atrial fibrillation]. *Orvostört Kozl*. 2007;53(3-4):37-68.
27. Williams L. A Case of Cardiac Arrhythmia. *Hospital (Lond 1886)*. 1908;44(1134):195-196.
28. Merritt C, Tan SY. Willem Einthoven (1860-1927): father of electrocardiography. *Singapore Med J*. 2012;53(1):17-18.
29. Maciel R. [Willem Einthoven. From an arduous beginning to the Nobel Prize]. *Arq Bras Cardiol*. 1996;66(4):179-186.
30. Lewis T. REPORT CXIX. AURICULAR FIBRILLATION: A COMMON CLINICAL CONDITION. *Br Med J*. 1909;2(2552):1528.
31. Herapath CEK. Auricular Fibrillation. *Bristol Med Chir J (1883)*. 1911;29(112):148-156.
32. Fluck DC, Olsen E, Pentecost BL, et al. Natural history and clinical significance of arrhythmias after acute cardiac infarction. *Br Heart J*. 1967;29(2):170-189.
33. EVANS W, SWANN P. Lone auricular fibrillation. *Br Heart J*. 1954;16(2):189-194.

34. PHAIR WB. FAMILIAL ATRIAL FIBRILLATION. *Can Med Assoc J*. 1963;89:1274-1276.
35. Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, et al. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 1997;336(13):905-911.
36. style="margin-bottom:0cm pcM, margin-bottom:.0001pt, text-align:, justify, L 1-hW. Familial auricular fibrillation. . In. Vol 229: *N Engl J Med*.; 1943:396–398.
37. Ludhwani D. Rhythm, Paroxysmal Atrial Fibrillation. In: Wieters JS, ed. *Treasure Island* (FL)2018.
38. .Guyton & Hall. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11 ed: elservier; 2006.
39. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1205-1253.
40. Calkins H, Hindricks G, Cappato R, et al. 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2017;14(10):e275-e444.
41. Wong CX, Brown A, Tse HF, et al. Epidemiology of Atrial Fibrillation: The Australian and Asia-Pacific Perspective. *Heart Lung Circ*. 2017;26(9):870-879.
42. Liu T, Korantzopoulos P, Xu G, et al. Association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and atrial fibrillation: a meta-analysis. *Europace*. 2011;13(3):346-354.
43. Wann LS, Curtis AB, January CT, et al. 2011 ACCF/AHA/HRS focused update on the management of patients with atrial fibrillation (Updating the 2006 Guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Heart Rhythm*. 2011;8(1):157-176.
44. Alonso A, Agarwal SK, Soliman EZ, et al. Incidence of atrial fibrillation in whites and African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am Heart J*. 2009;158(1):111-117.

45. January CT, Wann LS, Calkins H, et al. 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Heart Rhythm*. 2019.
46. Ball J, Carrington MJ, McMurray JJ, Stewart S. Atrial fibrillation: profile and burden of an evolving epidemic in the 21st century. *Int J Cardiol*. 2013;167(5):1807-1824.
47. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes brasileiras de fibrilação atrial. In: Fenelon G. MFM, al. e, eds. Vol 92: Arq Bras Cardiol.; 2009:1-39.
48. Fenelon G, Scanavacca M, Atié J, et al. Atrial fibrillation ablation in Brazil: results of the registry of the Brazilian Society of Cardiac Arrhythmias. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89(5):258-262, 285-259.
49. Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, et al. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(12):2185-2192.
50. Franz MR, Karasik PL, Li C, Moubarak J, Chavez M. Electrical remodeling of the human atrium: similar effects in patients with chronic atrial fibrillation and atrial flutter. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(7):1785-1792.
51. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res*. 1977;41(1):9-18.
52. Darbar D, Roden DM. Genetic mechanisms of atrial fibrillation: impact on response to treatment. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(6):317-329.
53. Wakili R, Voigt N, Käb S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2011;121(8):2955-2968.
54. Gal P, Marrouche NF. Magnetic resonance imaging of atrial fibrosis: redefining atrial fibrillation to a syndrome. *Eur Heart J*. 2017;38(1):14-19.

55. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation*. 1999;100(1):87-95.
56. Marrouche NF, Wilber D, Hindricks G, et al. Association of atrial tissue fibrosis identified by delayed enhancement MRI and atrial fibrillation catheter ablation: the DECAAF study. *JAMA*. 2014;311(5):498-506.
57. Damani SB, Topol EJ. Molecular genetics of atrial fibrillation. *Genome Med*. 2009;1(5):54.
58. Sühling M, Wolke C, Scharf C, Lendeckel U. Proteomics and transcriptomics in atrial fibrillation. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*. 2018;29(1):70-75.
59. Christophersen IE, Ellinor PT. Genetics of atrial fibrillation: from families to genomes. *J Hum Genet*. 2016;61(1):61-70.
60. Tucker NR, Ellinor PT. Emerging directions in the genetics of atrial fibrillation. *Circ Res*. 2014;114(9):1469-1482.
61. Roberts R. Mechanisms of disease: Genetic mechanisms of atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(5):276-282.
62. Yu H, Xu JH, Song HM, et al. Mutational spectrum of the NKX2-5 gene in patients with lone atrial fibrillation. *Int J Med Sci*. 2014;11(6):554-563.
63. Jabbari J, Olesen MS, Yuan L, et al. Common and rare variants in SCN10A modulate the risk of atrial fibrillation. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(1):64-73.
64. Nyberg MT, Stoevring B, Behr ER, Ravn LS, McKenna WJ, Christiansen M. The variation of the sarcolipin gene (SLN) in atrial fibrillation, long QT syndrome and sudden arrhythmic death syndrome. *Clin Chim Acta*. 2007;375(1-2):87-91.
65. Chambers JC, Zhao J, Terracciano CM, et al. Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat Genet*. 2010;42(2):149-152.
66. Pfeufer A, van Noord C, Marciante KD, et al. Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet*. 2010;42(2):153-159.

67. Holm H, Gudbjartsson DF, Arnar DO, et al. Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat Genet.* 2010;42(2):117-122.
68. Butler AM, Yin X, Evans DS, et al. Novel loci associated with PR interval in a genome-wide association study of 10 African American cohorts. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(6):639-646.
69. Fatkin D, Santiago CF, Huttner IG, Lubitz SA, Ellinor PT. Genetics of Atrial Fibrillation: State of the Art in 2017. *Heart Lung Circ.* 2017;26(9):894-901.
70. SBPC, Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso. 2ª Ed. Barueri, São Paulo: editora Manole, 2010.
71. QIAGEN, Inc. Manual do Mini Kit DSP DNA de sangue QIAamp®. Hilden: QIAGEN, 2004, 1-27. . In.
72. Fong R. A comparison of next-generation sequencing protocols for microbial profiling. In:2016
73. Oliveira TG, Mitne-Neto M, Cerdeira LT, et al. A Variant Detection Pipeline for Inherited Cardiomyopathy-Associated Genes Using Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn.* 2015;17(4):420-430.
74. Kobayashi Y, Yang S, Nykamp K, Garcia J, Lincoln SE, Topper SE. Pathogenic variant burden in the ExAC database: an empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation. *Genome Med.* 2017;9(1):13.
75. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.
76. KIRKWOOD BR. *Essential medical statistics*. 2 ed. Massachusetts, USA Blackwell Science: Massachusetts, USA.; 2006.
77. HOSMER DW. *Applied Logistic Regression*. 2 ed. New York2000.

78. NETER J. *Applied Linear Statistical Models*. 4 ed. Illinois: Richard D.; 1996.
79. Schnabel RB, Wilde S, Wild PS, Munzel T, Blankenberg S. Atrial fibrillation: its prevalence and risk factor profile in the German general population. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109(16):293-299.
80. Lip GY, Laroche C, Boriani G, et al. Sex-related differences in presentation, treatment, and outcome of patients with atrial fibrillation in Europe: a report from the Euro Observational Research Programme Pilot survey on Atrial Fibrillation. *Europace*. 2015;17(1):24-31.
81. Schnabel RB, Yin X, Gona P, et al. 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet*. 2015;386(9989):154-162.
82. Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J*. 2006;27(8):949-953.
83. Vermond RA, Geelhoed B, Verweij N, et al. Incidence of Atrial Fibrillation and Relationship With Cardiovascular Events, Heart Failure, and Mortality: A Community-Based Study From the Netherlands. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(9):1000-1007.
84. Magnussen C, Niiranen TJ, Ojeda FM, et al. Sex Differences and Similarities in Atrial Fibrillation Epidemiology, Risk Factors, and Mortality in Community Cohorts: Results From the BiomarCaRE Consortium (Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europe). *Circulation*. 2017;136(17):1588-1597.
85. Michelena HI, Powell BD, Brady PA, Friedman PA, Ezekowitz MD. Gender in atrial fibrillation: Ten years later. *Gend Med*. 2010;7(3):206-217.
86. Schnabel RB, Pecun L, Ojeda FM, et al. Gender differences in clinical presentation and 1-year outcomes in atrial fibrillation. *Heart*. 2017;103(13):1024-1030.
87. Chen LY, Herron KJ, Tai BC, Olson TM. Lone atrial fibrillation: influence of familial disease on gender predilection. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008;19(8):802-806.

88. Kramer H, Han C, Post W, et al. Racial/ethnic differences in hypertension and hypertension treatment and control in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Am J Hypertens*. 2004;17(10):963-970.
89. Kleindorfer D. Sociodemographic groups at risk: race/ethnicity. *Stroke*. 2009;40(3 Suppl):S75-78.
90. Chen ML, Parikh NS, Merkler AE, et al. Risk of Atrial Fibrillation in Black Versus White Medicare Beneficiaries With Implanted Cardiac Devices. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(4):e010661.
91. Gómez-Outes A, Suárez-Gea ML, García-Pinilla JM. Causes of death in atrial fibrillation: Challenges and opportunities. *Trends Cardiovasc Med*. 2017;27(7):494-503.
92. Bogle BM, Ning H, Mehrotra S, Goldberger JJ, Lloyd-Jones DM. Lifetime Risk for Sudden Cardiac Death in the Community. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(7).
93. Al-Khatib SM, Stevenson WG, Ackerman MJ, et al. 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. *Circulation*. 2018;138(13):e272-e391.
94. Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, et al. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA*. 2004;291(23):2851-2855.
95. Arnar DO, Thorvaldsson S, Manolio TA, et al. Familial aggregation of atrial fibrillation in Iceland. *Eur Heart J*. 2006;27(6):708-712.
96. Gundlund A, Christiansen MN, Hansen ML, et al. Familial clustering and subsequent incidence of atrial fibrillation among first-degree relatives in Denmark. *Europace*. 2016;18(5):658-664.
97. Gundlund A, Fosbøl EL, Kim S, et al. Family history of atrial fibrillation is associated with earlier-onset and more symptomatic atrial fibrillation: Results from the Outcomes Registry for Better Informed Treatment of Atrial Fibrillation (ORBIT-AF) registry. *Am Heart J*. 2016;175:28-35.

98. Chang SH, Kuo CF, Chou IJ, et al. Association of a Family History of Atrial Fibrillation With Incidence and Outcomes of Atrial Fibrillation: A Population-Based Family Cohort Study. *JAMA Cardiol.* 2017;2(8):863-870.
99. Ellinor PT, Yoerger DM, Ruskin JN, MacRae CA. Familial aggregation in lone atrial fibrillation. *Hum Genet.* 2005;118(2):179-184.
100. Lubitz SA, Yin X, Fontes JD, et al. Association between familial atrial fibrillation and risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA.* 2010;304(20):2263-2269.
101. Oyen N, Ranthe MF, Carstensen L, et al. Familial aggregation of lone atrial fibrillation in young persons. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(10):917-921.
102. Marcus GM, Smith LM, Vittinghoff E, et al. A first-degree family history in lone atrial fibrillation patients. *Heart Rhythm.* 2008;5(6):826-830.
103. Fauchier L, Bisson A, Clementy N. Prognosis in Familial Atrial Fibrillation. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(11).
104. Fauchier L, Villejoubert O, Clementy N, et al. Causes of Death and Influencing Factors in Patients with Atrial Fibrillation. *Am J Med.* 2016;129(12):1278-1287.
105. Healey JS, Oldgren J, Ezekowitz M, et al. Occurrence of death and stroke in patients in 47 countries 1 year after presenting with atrial fibrillation: a cohort study. *Lancet.* 2016;388(10050):1161-1169.
106. Otway R, Vandenberg JJ, Guo G, et al. Stretch-sensitive KCNQ1 mutation A link between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atrial fibrillation? *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(5):578-586.
107. Weeke P, Parvez B, Blair M, et al. Candidate gene approach to identifying rare genetic variants associated with lone atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2014;11(1):46-52.
108. Ellinor PT, Petrov-Kondratov VI, Zakharova E, Nam EG, MacRae CA. Potassium channel gene mutations rarely cause atrial fibrillation. *BMC Med Genet.* 2006;7:70.

109. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace*. 2011;13(8):1077-1109.

APÊNDICE

Apêndice A. Parecer do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

4012/141012

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo genético em arritmias cardíacas: avaliação de pacientes e familiares.

Pesquisador: Mauricio Ibrahim Scanavacca

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

Versão: 5

CAAE: 39327214.8.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.664.726

Apresentação do Projeto:
Trata-se de uma emenda solicitando a inclusão de Gabrielle D'Arezzo Pessente aluna de mestrado da área de Ciências Médicas e do subprojeto "Aspectos Genéticos da Fibrilação Atrial Isolada" no protocolo aprovado "Estudo genético em arritmias cardíacas: avaliação de pacientes e familiares" sob a orientação do DR. ALEXANDRE DA COSTA e co-orientador o Prof. Dr. Francisco Carlos da Costa Darrieux. O subprojeto está bem elaborado e contribui no desenvolvimento do estudo principal.

Objetivo da Pesquisa:
O objetivo do subprojeto de mestrado será identificar mutações que possam estar presentes em um painel de genes selecionados através de compilação de dados da literatura e verificar se a presença de alterações genéticas conhecidas está relacionada à ocorrência de fibrilação atrial isolada na população estudada. O projeto está bem elaborado e suas justificativas são pertinentes para estudo na área médica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
O subprojeto não altera as condições de risco e benefícios já aprovados no projeto principal.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 01 de 04

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.664.726

Outros	Carta_Cc_TCLE_adicional_ips.pdf	08/12/2015 10:33:34	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	FANNY_TCLE_ATUALIZADO.doc	08/12/2015 10:32:58	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Luciana 19.05.15.pdf	29/07/2015 10:00:00		Aceito
Outros	PARECER PCAR SDC 4042.14.022 - LUCIANA SACILOTTI.doc	29/07/2015 09:56:01		Aceito
Outros	carta pós graduação abri15.pdf	29/07/2015 09:55:39		Aceito
Outros	CAPPesq.pdf	29/07/2015 09:39:59		Aceito
Outros	carta CAPPesq.pdf	29/07/2015 09:39:46		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Subprojeto Mestrado Fanny (1).docx	28/05/2015 12:45:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - DAVD(subprojeto).doc	28/05/2015 12:44:35		Aceito
Outros	Orçamento detalhado.pdf	28/05/2015 12:44:21		Aceito
Outros	Declaração de matrícula mestrado.pdf	28/05/2015 12:44:08		Aceito
Outros	CARTA (1).pdf	28/05/2015 12:40:03		Aceito
Outros	APROVAÇÃO SCOC anonimizado sub Fanny SDC 4042.14.022.pdf	28/05/2015 12:39:45		Aceito
Outros	Análise Orçamentária 4042 14 022 Subestudo Fanny Wulkan.pdf	28/05/2015 12:39:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE CPT.pdf	19/02/2015 10:53:03		Aceito
Outros	Resposta relator.pdf	11/02/2015 13:18:47		Aceito
Outros	ON LINE ASSINADO.pdf	28/11/2014 10:23:06		Aceito
Folha de Rosto	FR ASSINADA.pdf	28/11/2014 10:22:31		Aceito
Outros	2º PARECER SCOC anonimizado SDC 4042.14.022.pdf	13/11/2014 16:09:33		Aceito
Outros	1º PARECER SCOC anonimizado SDC	13/11/2014		Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 325 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.864.726

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os estudos dos aspectos genéticos da fibrilação atrial contribuem para complementar o protocolo principal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O subprojeto não altera o TCLE já aprovado.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendamos sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_758473_E4.pdf	12/07/2016 10:03:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/07/2016 09:55:37	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Subprojeto.pdf	12/07/2016 09:55:16	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Solicitacao_de_inclusao.pdf	12/07/2016 09:54:52	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	PARECER_AD_HOC_anonimizado_EDI TAL_2016_SDC_4042_14_022.pdf	12/07/2016 09:54:33	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Inscricao_de_Pesquisador_Bolsista_Gabrielie.pdf	12/07/2016 09:54:17	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Declaracaodematricula.pdf	12/07/2016 09:53:54	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Declaracao_de_Custos.pdf	12/07/2016 09:53:39	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Carta_de_Recomendacao.pdf	12/07/2016 09:53:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Analise Orcamentaria_SDC_4042_14_022_Sub_Gabrielie.pdf	12/07/2016 09:53:02	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Formulario.pdf	21/01/2016 10:37:27	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	PARECER_SCOC_SDC_4042_14_022_ANONIMIZADO.pdf	08/12/2015 10:34:17	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.664.726

Outros	4042.14.022.pdf	16:04:25		Aceito
Parecer Anterior	Parecer (5).pdf	13/11/2014 15:50:23		Aceito
Outros	Anexo A (1).pdf	13/11/2014 15:49:34		Aceito
Outros	Declaração (5).pdf	13/11/2014 15:47:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Luciana.pdf	13/11/2014 15:46:22		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Agosto de 2016

Alfredo Mansur

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Henrique G.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Conselheiro César

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2561-7585

Fax: (11)2561-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Apêndice B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Dados da pesquisa:

Título do subprojeto: Aspectos Genéticos da Fibrilação Arterial Isolada

Projeto Principal: Estudos Genéticos em arritmias cardíacas: avaliação de pacientes e familiares.

Pesquisador principal : Prof. Maurício Ibrahim Scanavacca

Departamento/Instituto: Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - Instituto do Coração – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP

De acordo com a resolução [466/2012](#) os seguintes conteúdos devem fazer parte das explicações sobre a pesquisa.

II. Descrição e objetivo da pesquisa:

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar uma doença genética (hereditária) que leva a alguns tipos de problemas do ritmo do coração (arritmias). A arritmia que será investigada é a Fibrilação Atrial, comum em pacientes acima de 60 anos, porém ainda em análise em pessoas mais jovens.

Com este estudo poderemos buscar informações importantes, por exemplo, em relação aos diferentes sintomas e as respostas ao tratamento entre pessoas com o mesmo tipo de doença. O exame genético também pode identificar melhor a doença em seus familiares, que devem realizar acompanhamento médico, quando indicado.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável: _____

Rubrica responsável pelo projeto: _____

III. Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados:

Para participar desse projeto de pesquisa, basta ceder uma amostra de sangue. Será efetuada coleta de 8mL de sangue em tubo com EDTA. A coleta deve seguir todas as normas de higiene e segurança estabelecidas para este fim. Esta será efetuada por profissionais treinados e participantes do projeto. Desta amostra de sangue será pesquisado se existe alguma alteração genética.

IV. Riscos e benefícios esperados:

Riscos: Risco mínimo.

O único desconforto pode ser a picada de agulha em seu braço (como em qualquer exame de sangue). O risco mínimo, neste caso, se refere à possibilidade de um pequeno hematoma (roxo ou vermelhidão) no local da coleta de sangue, além da possibilidade de dor mínima na região do procedimento. Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado.

Benefícios esperados para o participante:

Benefícios: Trata-se de estudo genético observacional, que visa identificar a alteração genética que causa as Arritmias Cardíacas. Caso seja possível identificar a mutação, você terá o benefício de diagnosticar a causa da sua arritmia e saber se é possível que ela afete seus familiares. Caso o resultado do teste revele uma alteração que possa modificar o seu tratamento ou que seja importante para conhecimento do seu médico, o Sr.(a) será convocado para esclarecimento e orientação.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável: _____

Rubrica responsável pelo projeto: _____

V. Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre garantias do sujeito da pesquisa consignado

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas;
2. O Sr.(a) tem plena liberdade de não autorizar a utilização da coleta do seu sangue para ser usado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material sanguíneo para essa pesquisa só será feito após a leitura, entendimento e consentimento das informações contidas nesse termo de consentimento.
3. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento de participar do estudo.
4. Direito de confidencialidade: para manter sua privacidade, será fornecido um número de registro à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido no mais absoluto sigilo e não será divulgado em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.
5. Os resultados obtidos que estiverem associados à sua identificação não serão de forma nenhuma divulgados a terceiros.
6. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
7. O paciente terá direito a indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa.
8. Os pacientes que concordarem em participar do projeto deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O não consentimento não acarretará na falta de atendimento no Instituto do Coração/HCFMUSP ou de qualquer outra instituição participante/colaboradora desse projeto.
9. Você assinará as duas vias do termo de consentimento livre esclarecido e receberá por direito uma das vias para controle pessoal.
10. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Maurício Ibrahim Scanavacca que poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, nº 44, andar AB. Telefone: 11 2661-5341. Se o Sr(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, 2661-1548, 2661-1549 - E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.
11. O sangue coletado será processado e armazenado em banco/repositório do InCor. O mesmo será utilizado para sequenciamento de DNA e identificação da presença de mutação. Após os testes, o DNA será mantido no banco/repositório, localizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - 10º andar, Bloco 2 – InCor, para identificações futuras de novas mutações e para futuros estudos envolvendo este ou outro projeto relacionado às Arritmias Cardíacas. O material será mantido no banco/repositório durante os três anos de vigor do Projeto, mas este prazo poderá ser maior caso o Projeto seja renovado.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável: _____

Rubrica responsável pelo projeto: _____

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

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável: _____

Rubrica responsável pelo projeto: _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROJETO PRINCIPAL: Estudos Genéticos em arritmias cardíacas: avaliação de pacientes e familiares.

Subprojeto: Aspectos Genéticos da Fibrilação Atrial Isolada

2. PESQUISADOR: Prof. Mauricio Ibrahim Scanavacca NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 33507

CARGO/FUNÇÃO: Médico Diretor da Unidade Clínica de Arritmia e Marcapasso.

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração – Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

Apendice C. Questionário

TCLE: Sim ☐ Não ☐

ETIQUETA

Questionário - FA

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: M ☐ F ☐ ID InCor: _____ ID LGCM: _____

Caso índice ☐ Familiar ☐ de: _____ Parentesco: _____

Email: _____ Telefone: _____/_____

Endereço: _____ Nº: _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Cidade e estado de nascimento: _____

Etnia: Negro ☐ Branco ☐ Pardo ☐ Asiático ☐ Indígena ☐ Não informado ☐

Coleta: ____/____/____ Tubo EDTA ☐ FTA ☐ Saliva ☐

Estudo genético: _____

Antecedentes patológicos

1. Sobre o diagnóstico da Fibrilação atrial:

- a. Ano do diagnóstico: _____
- b. Quando iniciaram os sintomas? _____
- c. Quais foram os primeiros sintomas? _____
- d. Quem fez o diagnóstico? Médico especialista ☐ médico de atenção primária ☐
- e. Quem controla sua arritmia atualmente? _____
SUS ☐ Particular ☐
- f. Em que ano começou acompanhar no InCor? _____
- g. Onde foi sua última consulta cardiológica? _____
- h. Última consulta cardiológica? ____/____/____
- i. Próxima consulta ____/____/____

*Se mais de um ano, agendar retorno e considerar encaixe.

*Se perda de seguimento: sus = agendar; particular = ver quem poderá atender.

2. Diabetes Mellitus:

- a. Tem ou já teve o diagnóstico? Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐
- a. Ano do diagnóstico: _____
- b. Recebe tratamento para diabetes? Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐

3. Hipertensão arterial:

- a. Tem ou já teve o diagnóstico? Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐
- b. Ano do diagnóstico: _____
- c. Recebe tratamento para Hipertensão? Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐

4. Hipo/Hipertireoidismo:

- a. Tem ou já teve o diagnóstico? Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐
- b. Ano do diagnóstico: _____
- c. Recebe tratamento? Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐

5. Outras patologias: Já teve o diagnóstico médico de alguma das patologias abaixo?

- a. Insuficiência renal Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐
- b. Hepatopatia crônica: Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐
- c. Insuficiência cardíaca: Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐
- d. Enfermidade psiquiátrica (ex.: depressão): Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐
- e. Câncer Sim ☐ Não ☐ Não sei ☐

6. Nos últimos 6 meses passou por cirurgia ou internação?

Cirurgia ☐ Internação ☐ não passou ☐

Especificações: _____

7. Já fez ablação? Sim ☐ Não ☐

- a. Quantas vezes? _____
- b. Data da última: _____
- c. _____

8. Já fez cardioversão? Sim ☐ Não ☐

- a. Quantas vezes? _____
- b. Data da última: _____

9. Usa marcapasso? Sim ☐ Desde quando? _____ Não usa ☐

Somente para mulheres.

Gestações: _____ Partos: _____ Abortos: _____

Especificar abortos: _____

Exames

1. Seus últimos exames foram realizados no InCor? Sim ☐ Não ☐

*Se não, pode enviar (foto simples) para o e-mail: incorarritmia@gmail.com

*Escrever no assunto: "FA – nome completo"

2. Bioquímicos ____/____/____

Glicose: _____	CT: _____	TSH: _____	Mg: _____
HbGlic: _____	HDL: _____	T4: _____	Creat: _____
Triglicér: _____	LDL: _____	K: _____	Zinco: _____

3. Ecocardiograma ____/____/____

Atrio esquerdo: ____ mm	DDVE: ____ mm	Fração de ejeção: ____ %
Septo ventricular: ____ mm	DSVE: ____ mm	Massa: ____ g/m ²
Parede posterior de VE: ____ mm		

4. Já fez Ressonância magnética? Sim ☐ Não ☐
 Laudo: _____

5. Já fez polissonografia? Sim ☐ Não ☐
 Laudo: _____

6. Usa EPAP ou aparelho para dormir? Sim ☐ Não ☐

Tratamento atual

Medicamento	Dosagem

Hábito de saúde

1. Fuma ou já fumou? Sim ☐ Ex-fumante* ☐ Nunca fumou ☐

*Para aquele que não fumou no último ano.

Para resposta "Sim" ou "ex-fumante", especifique:

- Que idade começou a fumar? _____
- Quantos cigarros fuma ou fumava por dia? _____
- Se ex-fumante, com que idade parou de fumar? _____

2. Pratica atividade física? Sim ☐ Não ☐

- Quantas vezes por semana? _____
- Qual atividade? _____

História familiar

1. De Fibrilação Atrial Sim ☐ Não ☐ Familiar: _____
2. De morte súbita Sim ☐ Não ☐ Familiar: _____
3. De marcapasso Sim ☐ Não ☐ Familiar: _____
4. De insuficiência cardíaca Sim ☐ Não ☐ Familiar: _____
5. Algo novo, algum evento na família nos últimos 6 meses?

Exame Físico

Peso: _____ Altura: _____ Pressão arterial: _____ x _____ mmHg FC: _____

Eletrocardiograma: ____/____/____ Padrão ☐ Derivação superior ☐

Especificações: _____

*anexar

Heredograma