
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Malformațiile cardiace congenitale – abordare multidisciplinară a factorilor asociați

Doctorand: **Alexandru-Cristian BOLUNDUȚ**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Carmen Mihaela MIHU**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Malformațiile cardiace congenitale – aspecte generale	5
1.1. Date epidemiologice	5
1.2. Clasificare	6
1.3. Fiziopatologie	7
1.4. Managementul pacientului cu malformație cardiacă congenitală	9
2. Dezvoltarea embriologică a aparatului cardiovascular	11
3. Factori asociați dezvoltării malformațiilor cardiace congenitale	15
3.1. Factori genetici	16
3.2. Factori non-genetici	20
4. Rolul placentei în dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale	23
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
5. Scop și obiective	29
6. Studiul 1. Modificări genetice ale principalilor factori de transcripție și molecule de semnalizare implicate în dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale – sinteză narativă	31
6.1. Introducere	31
6.2. Obiective	31
6.3. Material și metodă	31
6.4. Rezultate	32
6.5. Discuții	35
6.6. Concluzii	37
7. Studiul 2. Evaluarea prin tehnica MLPA a modificărilor genetice de tip variație a numărului de copii (CNV) în rândul pacienților pediatrici cu malformații cardiace congenitale	39
7.1. Introducere	39
7.2. Obiective	40
7.3. Material și metodă	40
7.4. Rezultate	44
7.5. Discuții	49
7.6. Concluzii	53
8. Studiul 3. Evaluarea modificărilor macroscopice și microscopice placentare în relație cu dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale	55
8.1. Introducere	55
8.2. Obiective	56

8.3. Material și metodă	56
8.4. Rezultate	58
8.5. Discuții	67
8.6. Concluzii	71
9. Studiul 4. Evaluarea expresiei factorului de creștere placentar (PIGF) și a receptorului acestuia (VEGFR-1) la nivel placentar în relație cu dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale – studiu pilot	73
9.1. Introducere	73
9.2. Obiective	74
9.3. Material și metodă	74
9.4. Rezultate	77
9.5. Discuții	88
9.6. Concluzii	92
10. Concluzii generale	93
11. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale	95
REFERINȚE	97
ANEXE	109

Cuvinte cheie: malformații cardiace congenitale, factori asociați, CNV, MLPA, placenta, PIGF, VEGFR-1

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Bolunduț AC, Lazea C, Mișu CM. Genetic Alterations of Transcription Factors and Signaling Molecules Involved in the Development of Congenital Heart Defects-A Narrative Review. *Children*. 2023;10(5):812. doi:10.3390/children10050812. *PubMed și ISI Factor de impact JCR₂₀₂₃ – 2 (studiu cuprins în capitolele 2 și 6).*
2. Bolunduț AC, Nazarie F, Lazea C, Șufană C, Miclea D, Lazăr C, Mișu CM. A Pilot Study of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Evaluation of Copy Number Variations in Romanian Children with Congenital Heart Defects. *Genes*. 2024;15(2):207. doi:10.3390/genes15020207. *PubMed și ISI Factor de impact JCR₂₀₂₄ – 2,8 (studiu cuprins în capitolul 7).*
3. Bolunduț AC, Mureșan XM, Suflețel RT, Mocan LP, Pîrv S, Șuşman S, Mișu CM. Placental Pathology and Placental Growth Factor (PIGF)/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) Pathway Expression Evaluation in Fetal Congenital Heart Defects. *Life*. 2025;15(6):837. doi:10.3390/life15060837. *PubMed și ISI Factor de impact JCR₂₀₂₄ – 3,4 (studiu cuprins în capitolele 8 și 9).*

INTRODUCERE

Un suflu cardiac la copii, în special la nou-născuți și sugari, este un motiv frecvent de îngrijorare, fiind uneori expresia unei malformații cardiace congenitale (MCC). Etiologia acestui grup heterogen de boli este considerată a fi multifactorială, reunind factori genetici cu expuneri de mediu și alte elemente non-genetice. Patogeneza complexă a acestora face dificilă stabilirea unor relații de cauzalitate valide între factorii menționați și dezvoltarea MCC, majoritatea studiilor raportând doar factori asociați dezvoltării anomaliilor congenitale cardiace. Cu toate acestea, în mai mult de jumătate din cazuri nu a putut fi identificat niciun factor asociat cunoscut, ceea ce generează un subiect de interes științific deosebit. Elementul principal care a stat la baza cercetărilor cuprinse în lucrarea de față a fost multidisciplinaritatea, abordând factorii asociați dezvoltării MCC dintr-o perspectivă genetică și histologică. Toate rezultatele generate de prezenta cercetare au fost diseminate prin publicarea în reviste indexate ISI, cu factor de impact ≥ 2 , jurnale încadrate în cuartilele Q1 sau Q2 pentru domeniile specifice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Malformațiile cardiace congenitale (MCC) sunt definite ca anomalii structurale ale cordului și/sau ale vaselor mari, determinate de perturbarea precoce a procesului normal de dezvoltare embrionică a aparatului cardiovascular. Sunt cele mai frecvente anomalii congenitale, cu o prevalență la nivel global de 9,41 la 1000 de nou-născuți vii, în creștere în ultimele decade.

Aparatul cardiovascular este unul dintre primele sisteme ale organismului care se dezvoltă în perioada embrionară. Cunoașterea aspectelor referitoare la embriogeneza sa sunt indispensabile pentru înțelegerea anatomiei și fiziopatologiei specifice MCC, esențiale pentru managementul clinic și ulterior terapeutic al acestora.

Etiologia MCC este complexă și incomplet elucidată. Sunt considerate boli multifactoriale, având la origine o componentă genetică, asociată cu factori non-genetici și de mediu care influențează procesul de dezvoltare a cordului și a vaselor mari. Fondul genetic pare a fi determinantul principal, peste o treime din acestea putând fi atribuite unor anomalii genetice identificate, precum aneuploidii cromozomiale, variații ale numărului de copii, respectiv mutații genice. Totuși, în mai mult de jumătate din cazuri, rolul factorilor genetici nu este cunoscut, MCC fiind probabil rezultatul interacțiunilor intergenice, între gene și factori de mediu, sau între gene și mecanisme epigenetice.

De asemenea, se apreciază o contribuție de aproximativ 10% a factorilor non-genetici descriși până în prezent la dezvoltarea MCC, incluzând obezitatea și diabetul zaharat materne, preeclampsia, febra și infecțiile virale materne în primul trimestru de sarcină, vârsta paternă avansată, fumatul parental, consumul patern de alcool, expunerea maternă la unele medicamente. Cu toate că această pondere poate părea redusă,

importanța identificării acestor factori este crucială în prevenirea dezvoltării MCC, întrucât majoritatea sunt influențabili prin strategii de sănătate publică.

Placenta este un organ vascular cu structură complexă, a cărei prezență și funcționare optimă sunt indispensabile pentru dezvoltarea corespunzătoare a fătului. Dezvoltarea embriologică paralelă a sistemului cardiovascular și a placentei din prima parte a sarcinii conferă vulnerabilitate inimii în dezvoltare în cazul modificărilor placentare ce scad eficiența acestui organ, mai ales în cazul dezvoltării anormale cardiace determinată de factori intrinseci genetici. De asemenea, hipoxia fetală și modificările hemodinamice generate de prezența malformațiilor cardiace congenitale accentuează gradul de insuficiență placentară. Se sugerează astfel un model bidirecțional al „loviturilor multiple”, în care mai mulți factori fetalii, placentari și externi acționează sinergic și concură la disfuncția axei cardio-placentare și apariția de anomalii structurale ale cordului fetal.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Modificări genetice ale principalilor factori de transcripție și molecule de semnalizare implicate în dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale – sinteză narativă

Scop / Obiective: Scopul studiului a fost sintetizarea cunoștințelor actuale referitoare la implicarea unor factori de transcripție și molecule de semnalizare în dezvoltarea MCC. Obiectivele propuse au fost: sintetizarea cunoștințelor actuale referitoare la implicarea moleculelor codificate de genele *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1* și *BMP4* în dezvoltarea embriologică normală a aparatului cardiovascular și sumarizarea variației genetice descrise la nivelul acestor gene în relație cu dezvoltarea MCC la subiecți umani.

Material și metode: Pentru a atinge obiectivele propuse, am realizat o sinteză narativă. Am căutat articole relevante în baza de date PubMed, limitând căutarea la ultimii 20 de ani. Am selectat studiile care au investigat modificările genetice ale genelor ce codifică moleculele de interes în relație cu dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale la subiecți umani. Informațiile extrase au fost sintetizate în tabele.

Rezultate: În urma căutării efectuate, am identificat 59 de articole pentru gena *TBX5*, 98 pentru *NKX2-5*, 74 pentru *GATA4*, 8 pentru *CRELD1* și 11 pentru *BMP4*. Din acestea, am inclus în sinteză 11 articole despre variațiile genetice ale *TBX5*, 7 pentru *NKX2-5*, 9 pentru *GATA4*, 5 pentru *CRELD1* și 3 pentru *BMP4*. Datele privind asocierile genotip – fenotip pentru variațiile genetice ale acestor factori de transcripție și molecule de semnalizare au fost prezentate tabelar.

Concluzii: Cu scopul de a explora încărcătura genetică implicată în MCC, studiul a sintetizat, sub forma unei sinteze narative, cunoștințele actuale despre rolul factorilor

de transcripție și al moleculelor de semnalizare codificate de genele *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1* și *BMP4*, în dezvoltarea normală a inimii și în apariția malformațiilor cardiace congenitale la om.

Studiu 2. Evaluarea prin tehnica MLPA a modificărilor genetice de tip variație a numărului de copii (CNV) în rândul pacienților pediatrici cu malformații cardiace congenitale

Scop / Obiective: Scopul acestui studiu a fost să evalueze rolul variațiilor numărului de copii (CNV) în dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale la copii. Obiectivele au inclus: evaluarea prezenței CNV-urilor în regiunile ce includ genele *GATA4* (8p23), *NKX2-5* (5q35), *TBX5* (12q24), *BMP4* (14q22), *CRELD1* (3p25) și în regiunea 22q11.2 la o populație pediatrică cu MCC din România, compararea încărcăturii de CNV-uri în aceste regiuni între pacienții cu MCC sindromice și cele izolate și evaluarea posibilităților asocieri genotip – fenotip.

Material și metode: Am realizat un studiu de cohortă incluzând pacienți sub 18 ani cu malformații cardiace congenitale (MCC). Aceștia au fost clasificați ca MCC sindromice sau izolate, pe baza prezenței sau absenței altor malformații extracardiace, a dismorfismului craniofacial sau a întârzieri în dezvoltarea neuropsihică. Din probele de sânge venos recoltate de la pacienți a fost extras ADN-ul, iar CNV-urile din regiunile de interes au fost determinate prin tehnica de amplificare simultană a sondelor ligaturate (MLPA).

Rezultate: Studiul a inclus 56 de subiecți, jumătate fiind clasificați ca MCC sindromice. Defectul septal ventricular a fost cea mai comună malformație cardiacă (39,28%). Parametrii antropometrici, respectiv greutatea și lungimea la naștere și la momentul recoltării probelor, au fost semnificativ mai mici în cazul pacienților lotului sindromic. Analiza MLPA a relevat două deleții heterozigote la nivelul regiunii 22q11.2, ambele la pacienți cu MCC sindromice. Nu au fost identificate CNV-uri în regiunile ce includ genele *GATA4*, *NKX2-5*, *TBX5*, *BMP4* și *CRELD1*.

Concluzii: Rezultatele sugerează includerea tulburărilor de dezvoltare somatică în criteriile de definire a MCC sindromice. De asemenea, datele susțin utilizarea MLPA ca primă tehnică de screening genetic pentru pacienții cu MCC sindromice, după o fenotipare detaliată a acestora. Se subliniază importanța includerii sondelor pentru regiunea 22q11.2 în kiturile de screening.

Studiul 3. Evaluarea modificărilor macroscopice și microscopice placentare în relație cu dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale

Scop / Obiective: Pornind de la ideea perturbării axei cardio-placentare în patogeneza anomaliilor structurale cardiace, acest studiu a urmărit să evalueze asocierile dintre patologia placentară și malformațiile cardiace fetale. Obiectivele au inclus: evaluarea

relației dintre modificările macroscopice ale cordonului ombilical, respectiv ale placentei, și anomaliile cardiace fetale, descrierea aspectelor histopatologice placentare în sarcinile cu feți cu MCC, precum și evaluarea posibilelor asocieri între aceste elemente și dezvoltarea MCC la făt.

Material și metode: Am efectuat un studiu retrospectiv caz-martor, incluzând probe formate din perechi de placentă și produs de concepție, din sarcini întrerupte (avort spontan/terapeutic) sau cu nou-născuți morți, din perioada 2018–2022. Lotul caz a inclus sarcini cu produși de concepție cu diagnostic de malformații cardiace congenitale la examenul anatomopatologic. Pentru fiecare caz, am selectat o probă control de aceeași vârstă gestațională, cu cord fetal normal. Datele despre produsul de concepție și evaluarea macroscopică și microscopică a placentei au fost colectate retrospectiv, din rapoartele anatomopatologice disponibilele.

Rezultate: Studiul a analizat 102 subiecți (51 cazuri și 51 controale). Defectul septal atrioventricular a fost cea mai comună MCC identificată (21,6%). Fetii cu MCC au prezentat parametrii antropometrici (incluzând greutatea, lungimea cranio–plantară și cranio–caudală) semnificativ mai scăzuți. S-a observat o corelație pozitivă între acești parametri și greutatea placentei, respectiv lungimea cordonului ombilical. Factorii placentari asociați cu MCC fetale au inclus: lungimea redusă a cordonului ombilical, inserția marginală/velamentoasă, artera ombilicală unică, raport redus greutate fetală/placentară și calcifierile placentare. De asemenea, 88,2% dintre placentele din sarcinile cu feți cu MCC au prezentat modificări microscopice, în special leziuni de malperfuzie maternă sau fetală.

Concluzii: Datele noastre arată o creștere somatică redusă la feții cu anomalii structurale cardiace, față de grupul de control. Am observat o frecvență crescută a modificărilor histopatologice placentare (predominant leziuni de malperfuzie maternă sau fetală) în cazul sarcinilor cu feți cu MCC. Analiza a identificat factori placentari asociați cu dezvoltarea MCC fetale, subliniind interacțiunea complexă dintre placentă și cordul fetal în dezvoltare.

Studiul 4. Evaluarea expresiei factorului de creștere placentar (PIGF) și a receptorului acestuia (VEGFR-1) la nivel placentar în relație cu dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale – studiu pilot

Scop / Obiective: Studiul a vizat evaluarea legăturii dintre expresia placentară a PIGF și VEGFR-1 și dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale fetale. Obiectivele specifice au fost: identificarea unei expresii imunohistochimice placentare caracteristice pentru PIGF și VEGFR-1, evaluarea tiparului și intensității imunomarcajului placentar al celor doi epitopi, respectiv identificarea unei asocieri între tiparul/intensitatea imunomarcajului PIGF, respectiv VEGFR-1, și dezvoltarea MCC fetale, inclusiv posibile asocieri fenotipice.

Material și metode: Am efectuat un studiu retrospectiv caz-martor, incluzând probe formate din perechi de placentă și produs de concepție, din sarcini întrerupte (avort spontan/terapeutic) sau cu nou-născuți morți, din perioada 2018–2022. Lotul caz a inclus sarcini cu produși de concepție cu diagnostic de malformații cardiace congenitale la examenul anatomopatologic. Pentru fiecare caz, am selectat o probă control de aceeași vârstă gestațională, cu cord fetal normal. Am utilizat metoda imunohistochimică (IHC) pe blocuri de țesut placentar pentru a determina expresia PIGF și VEGFR-1 la acest nivel. Intensitatea colorației IHC a fost cuantificată folosind o scală semicantitativă.

Rezultate: Am evaluat imunohistochimic 40 de probe placentare (câte 20 în fiecare grup). Nu au existat diferențe semnificative între grupuri privind vârsta maternă, numărul de sarcini anterioare, sexul fătului sau alte anomalii congenitale (non-cardiace). Ambele proteine, PIGF și VEGFR-1, au avut localizare citoplasmatică și un imunomarcaj semnificativ în sincițiotrofoblast, celulele deciduale și endoteliul vascular vilozitar. PIGF a arătat o intensitate a marcajului semnificativ mai redusă în sincițiotrofoblastul și celulele deciduale ale placentelor asociate cu MCC fetale. Nu s-au găsit diferențe semnificative în distribuția intensității imunomarcajului pentru VEGFR-1 între cele două grupuri.

Concluzii: Investigația expresiei placentare a căii de semnalizare PIGF – VEGFR-1 în contextul MCC fetale a arătat o reducere semnificativă a expresiei IHC a PIGF în sincițiotrofoblast și celulele deciduale ale placentelor din sarcinile cu feți cu MCC. Aceste rezultate sugerează că PIGF și VEGFR-1 sunt implicate în medierea interacțiunilor axei cardio-placentare în contextul anomaliilor structurale cardiace fetale.

CONCLUZII GENERALE

Cercetarea doctorală s-a axat pe abordarea multidisciplinară a factorilor asociați dezvoltării malformațiilor cardiace congenitale (MCC). În acest sens, studiile efectuate au permis formularea următoarelor concluzii, descrise în continuare.

1. Există o asociere între variațiile genetice ale moleculelor codificate de genele *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1* și *BMP4* și dezvoltarea malformațiilor congenitale ale aparatului cardiovascular.
2. Investigarea încărcăturii genetice de tip variație a numărului de copii (CNV) de la nivelul regiunilor care includ genele *GATA4* (8p23), *NKX2-5* (5q35), *TBX5* (12q24), *BMP4* (14q22) și *CRELD1* (3p25) și a regiunii 22q11.2 în rândul unei populații pediatrice cu malformații cardiace congenitale din România prin tehnica de amplificare simultană a sondelor ligaturate (MLPA) a identificat prezența deleției heterozigote a unui fragment de cel puțin 630 kbp la nivelul regiunii 22q11.2 la doi pacienți, ambii aparținând lotului sindromic.

3. Se confirmă alterarea semnificativă a creșterii somatice în cazul pacienților cu MCC sindromice, atât intrauterin, cât și postnatal.
4. Este recomandată includerea tulburărilor de dezvoltare somatică printre criteriile ce definesc MCC sindromice, pe lângă cele din definiția actuală, precum asocierea altor anomalii congenitale, a dismorfismului craniofacial, respectiv a tulburărilor de dezvoltare neuropsihică.
5. Este importantă fenotiparea corespunzătoare a pacientului cu anomalie structurală cardiacă pentru încadrarea diagnostică corectă a acestuia și ghidarea ulterioară a evaluării genetice.
6. Este recomandată utilizarea tehnicii MLPA ca metodă de screening genetic a pacienților cu MCC sindromice, precum și includerea unor sonde corespunzătoare regiunii 22q11.2 în kiturile utilizate în acest sens.
7. A fost demonstrată alterarea semnificativă a creșterii somatice fetale în cazul feților cu MCC, validând corelația dintre parametrii antropometrici fetali și greutatea placentei, respectiv lungimea cordonului ombilical.
8. A fost identificată o proporție crescută a modificărilor histopatologice placentare în cazul sarcinilor cu feți cu MCC, în principal modificări determinate de alterarea hemodinamică placentară (leziuni de malperfuzie maternă sau fetală).
9. Au fost identificați factori de natură placentară asociați cu dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale fetale, precum lungimea redusă a cordonului ombilical, inserția marginală și velamentoasă a acestuia, prezența unei artere ombilicale unice, raportul redus dintre greutatea fetală și cea placentară, respectiv prezența calcifierilor placentare.
10. Am demonstrat interacțiunea complexă dintre placentă și cordul fetal în dezvoltare, perturbarea hemodinamicii fetale generată de prezența anomaliilor congenitale cardiace determinând o alterare hemodinamică placentară, care influențează reciproc și procesul de dezvoltare cardiacă.
11. Investigarea expresiei placentare a căii de semnalizare care implică factorul de creștere placentar (PIGF) și receptorul acestuia (VEGFR-1) în contextul malformațiilor cardiace congenitale fetale a evidențiat o reducere semnificativă a expresiei imunohistochemice placentare a PIGF la nivelul sincițiotrofoblastului și a celulelor deciduale în cazul sarcinilor cu feți cu malformații cardiace congenitale.
12. Rezultatele obținute sugerează implicarea PIGF și a VEGFR-1 în medierea interacțiunilor axei cardio-placentare, în contextul malformațiilor cardiace congenitale fetale.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Abordarea multidisciplinară în studiul factorilor asociați dezvoltării malformațiilor cardiace congenitale constituie un element de originalitate al prezentei cercetări.

Prin sinteza narativă alcătuită, am realizat o prezentare unitară a asocierilor descrise între variațiile genelor *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1* și *BMP4* și dezvoltarea malformațiilor congenitale ale aparatului cardiovascular la subiecți umani.

Cercetarea realizată include primul studiu pe o populație din România care investighează încărcătura variației genetice de tip CNV la nivelul regiunilor care cuprind genele *GATA4* (8p23), *NKX2-5* (5q35), *TBX5* (12q24), *BMP4* (14q22) și *CRELD1* (3p25) și a regiunii 22q11.2, în rândul pacienților pediatrici cu malformații cardiace congenitale. De asemenea, este unul dintre puținele studii publicate până în prezent care investighează acest tip de modificări genetice în populații din arealul geografic al Europei Centrale și de Est.

Cu toate că subiectul creșterii somatice a pacienților cu malformații congenitale cardiace a mai fost abordat în literatura de specialitate, sunt publicate puține studii care să îl trateze comparativ între MCC sindromice și cele izolate. Identificarea alterării semnificative a creșterii somatice în cazul pacienților cu MCC sindromice creează premisele modificării definițiilor existente prin includerea criteriului printre cele care caracterizează acest grup de malformații cardiace congenitale.

De asemenea, cercetarea realizată contribuie la consolidarea cunoștințelor referitoare la factori de natură placentară în relație cu anomaliile structurale cardiace fetale, confirmând unele asocieri raportate anterior în alte studii și pe populația din România și fiind primul care identifică asocierea MCC fetale cu calcifierile placentare.

Expresia la nivel placentar a factorului de creștere placentar (PIGF) și a receptorului 1 al factorului de creștere al endoteliului vascular (VEGFR-1) în relație cu MCC fetale a fost foarte puțin studiată, până în prezent în literatură regăsindu-se un singur alt studiu care investighează asocierea în mod specific pentru sindromul de hipoplazie a inimii stângi. Cercetarea noastră a fost prima care a abordat această temă în contextul global al MCC fetale. În plus, studiul publicat a fost primul care a reușit confirmarea imunohistochimică a reducerii expresiei placentare a PIGF în cazul sarcinilor cu feți cu MCC.

Toate acestea reprezintă contribuții inovative ale studiilor desfășurate la înțelegerea mecanismelor care guvernează interacțiunea complexă dintre placentă și cordul fetal, studiul axei cardio-placentare oferind posibilitatea identificării unor mecanisme patogenetice noi implicate în dezvoltarea malformațiilor cardiace congenitale.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Congenital Heart Defects – Multidisciplinary Approach to Associated Factors

Doctoral Student: **Alexandru-Cristian BOLUNDUȚ**

Doctoral Supervisor: **Prof. Dr. Carmen Mihaela MIHU**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS OF THE DOCTORAL THESIS

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	3
1. Congenital Heart Defects – General Aspects	5
1.1. Epidemiological Data	5
1.2. Classification	6
1.3. Pathophysiology	7
1.4. Management of Patients with Congenital Heart Defects	9
2. Embryological Development of the Cardiovascular System	11
3. Factors Associated with the Development of Congenital Heart Defects	15
3.1. Genetic Factors	16
3.2. Non-Genetic Factors	20
4. The Role of the Placenta in the Development of Congenital Heart Defects	23
PERSONAL CONTRIBUTIONS	27
5. Aim and Objectives	29
6. Study 1: Genetic Alterations of Key Transcription Factors and Signaling Molecules Involved in the Development of Congenital Heart Defects – Narrative Review	31
6.1. Introduction	31
6.2. Objectives	31
6.3. Materials and Methods	31
6.4. Results	32
6.5. Discussions	35
6.6. Conclusions	37
7. Study 2: Evaluation of Copy Number Variations (CNVs) in Pediatric Patients with Congenital Heart Defects Using a MLPA Technique	39
7.1. Introduction	39
7.2. Objectives	40
7.3. Materials and Methods	40
7.4. Results	44
7.5. Discussions	49
7.6. Conclusions	53
8. Study 3: Evaluation of Macroscopic and Microscopic Placental Changes in Relation to the Development of Congenital Heart Defects	55
8.1. Introduction	55
8.2. Objectives	56
8.3. Materials and Methods	56
8.4. Results	58

8.5. Discussions	67
8.6. Conclusions	71
9. Study 4: Evaluation of the Placental Expression of Placental Growth Factor (PIGF) and its Receptor (VEGFR-1) in Relation to the Development of Congenital Heart Defects – Pilot Study	73
9.1. Introduction	73
9.2. Objectives	74
9.3. Materials and Methods	74
9.4. Results	77
9.5. Discussions	88
9.6. Conclusions	92
10. General Conclusions	93
11. Originality and Innovative Contributions of the Doctoral Research	95
REFERENCES	97
APPENDICES	109

Keywords: congenital heart defects, associated factors, CNV, MLPA, placenta, PIGF, VEGFR-1

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published in full as a result of doctoral research

1. Bolunduț AC, Lazea C, Mișu CM. Genetic Alterations of Transcription Factors and Signaling Molecules Involved in the Development of Congenital Heart Defects-A Narrative Review. *Children*. 2023;10(5):812. doi:10.3390/children10050812. *PubMed and ISI Impact Factor JCR₂₀₂₃ – 2 (study included in chapters 2 and 6)*.
2. Bolunduț AC, Nazarie F, Lazea C, Șufană C, Miclea D, Lazăr C, Mișu CM. A Pilot Study of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Evaluation of Copy Number Variations in Romanian Children with Congenital Heart Defects. *Genes*, 2024;15(2):207. doi:10.3390/genes15020207. *PubMed and ISI Impact Factor JCR₂₀₂₄ – 2,8 (study included in chapter 7)*.
3. Bolunduț AC, Mureșan XM, Suflețel RT, Mocan LP, Pîrv S, Șuşman S, Mișu CM. Placental Pathology and Placental Growth Factor (PIGF)/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) Pathway Expression Evaluation in Fetal Congenital Heart Defects. *Life*. 2025;15(6):837. doi:10.3390/life15060837. *PubMed and ISI Impact Factor JCR₂₀₂₄ – 3,4 (study included in chapters 8 and 9)*.

INTRODCTION

A heart murmur in children, especially in newborns and infants, is a frequent cause for concern, sometimes being the expression of a congenital heart defect (CHD). The etiology of this heterogeneous group of diseases is considered to be multifactorial, combining genetic factors with environmental exposures and other non-genetic elements. Their complex pathogenesis makes it difficult to establish valid causal relationships between the aforementioned factors and the development of CHDs, with most of the studies reporting only associated factors. However, in more than half of the cases, no known associated factor could be identified, which generates a subject of particular scientific interest. The main element underlying the research included in this work was multidisciplinary, addressing factors associated with CHD development from a genetic and histological perspective. All of the results generated by the present research were disseminated through publication in ISI-indexed journals with an impact factor ≥ 2 , journals ranked in quartiles Q1 or Q2 for the specific fields.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Congenital heart defects (CHDs) are defined as structural abnormalities of the heart and/or great vessels, caused by an early disruption of the normal embryological development of the cardiovascular system. They are the most frequent congenital anomalies, with a global prevalence of 9.41 per 1000 live births, that has been increasing in recent decades.

The cardiovascular system is one of the first systems to develop during the embryonic period. Knowledge of its embryogenesis is essential for understanding the specific anatomy and pathophysiology of CHDs, which is crucial for their clinical and subsequent therapeutic management.

The etiology of CHDs is complex and not fully understood. They are considered multifactorial diseases, originating from a genetic component associated with non-genetic and environmental factors that influence the development of the heart and great vessels. The genetic background appears to be the primary determinant, with over a third of cases attributable to identified genetic anomalies, such as chromosomal aneuploidies, copy number variations, and gene mutations. However, in more than half of the cases, the role of genetic factors is unknown, with CHDs likely being the result of intergenic interactions, interactions between genes and environmental factors, or between genes and epigenetic mechanisms.

Additionally, non-genetic factors described to date are estimated to contribute approximately 10% to the development of CHDs. These include maternal obesity and diabetes, preeclampsia, maternal fever and viral infections in the first trimester of pregnancy, advanced paternal age, parental smoking, paternal alcohol consumption, and

maternal exposure to certain medications. Although this proportion might seem small, identifying these factors is crucial for preventing CHD development, as most of them can be influenced through public health strategies.

The placenta is a complex vascular organ whose presence and optimal functioning are indispensable for the proper development of the fetus. The parallel embryological development of the cardiovascular system and the placenta during the first part of the pregnancy renders the developing heart vulnerable to placental changes that reduce the organ's efficiency, especially in cases of abnormal cardiac development caused by intrinsic genetic factors. Furthermore, fetal hypoxia and hemodynamic changes resulting from the presence of CHDs exacerbate the degree of placental insufficiency. This suggests a bidirectional "multiple-hit" model, where several fetal, placental, and external factors act synergistically and contribute to the dysfunction of the heart-placenta axis and the emergence of structural abnormalities of the fetal heart.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: Genetic Alterations of Key Transcription Factors and Signaling Molecules Involved in the Development of Congenital Heart Defects – Narrative Review

Aim / Objectives: The aim of the study was to synthesize current knowledge regarding the involvement of certain transcription factors and signaling molecules in the development of CHDs. The objectives were: to synthesize current knowledge regarding the involvement of molecules encoded by the *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1*, and *BMP4* genes in the normal embryological development of the cardiovascular system; and to summarize the genetic variation described within these genes in relation to CHD development in human subjects.

Materials and Methods: To achieve the proposed objectives, we conducted a narrative review. We searched for relevant articles in the PubMed database, limiting the search to the last 20 years. We selected studies that investigated genetic alterations of genes encoding the molecules of interest in relation to the development of congenital heart defects in human subjects. The extracted information was then summarized in tables.

Results: Following the search, we identified 59 articles for the *TBX5* gene, 98 for *NKX2-5*, 74 for *GATA4*, 8 for *CRELD1*, and 11 for *BMP4*. From these, we included in the synthesis 11 articles on *TBX5* genetic variations, 7 for *NKX2-5*, 9 for *GATA4*, 5 for *CRELD1*, and 3 for *BMP4*. Data regarding genotype – phenotype associations for the genetic variations of these transcription factors and signaling molecules were presented in tables.

Conclusions: To explore the genetic burden involved in CHDs, this study synthesized, in the form of a narrative review, current knowledge on the role of transcription factors and signaling molecules encoded by the *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1*, and *BMP4* genes

in the normal heart development and in the occurrence of congenital heart defects in humans.

Study 2: Evaluation of Copy Number Variations (CNVs) in Pediatric Patients with Congenital Heart Defects Using a MLPA Technique

Aim / Objectives: The aim of this study was to evaluate the role of copy number variations (CNVs) in the development of congenital heart defects in children. Objectives included: evaluating the presence of CNVs in regions including the *GATA4* (8p23), *NKX2-5* (5q35), *TBX5* (12q24), *BMP4* (14q22), *CRELD1* (3p25) genes and in the 22q11.2 region in a pediatric population with CHD from Romania; comparing the CNV burden in these regions between syndromic and isolated CHD patients; and evaluating possible genotype – phenotype associations.

Materials and Methods: We conducted a cohort study that included patients under 18 years old with CHDs. They were classified as syndromic or isolated CHDs based on the presence or absence of other extracardiac malformations, craniofacial dysmorphism, or neuropsychological developmental delay. DNA was extracted from venous blood samples collected from the patients, and CNVs in the regions of interest were determined using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).

Results: The study included 56 subjects, with half classified as syndromic CHD. Ventricular septal defect was the most common cardiac malformation (39.28%). Anthropometric parameters, specifically weight and length at birth and at the time of sample collection, were significantly lower in patients within the syndromic group. MLPA analysis revealed two heterozygous deletions in the 22q11.2 region, both in patients with syndromic CHD. No CNVs were identified in regions including the *GATA4*, *NKX2-5*, *TBX5*, *BMP4*, and *CRELD1* genes.

Conclusions: The results suggest including somatic developmental disorders in the criteria for defining syndromic CHDs. Furthermore, the data support the use of MLPA as a first genetic screening technique for patients with syndromic CHDs, following their detailed phenotyping. The importance of including probes for the 22q11.2 region in screening kits is emphasized.

Study 3: Evaluation of Macroscopic and Microscopic Placental Changes in Relation to the Development of Congenital Heart Defects

Aim / Objectives: Building on the idea of a disrupted heart–placenta axis in the pathogenesis of structural heart anomalies, this study aimed to evaluate the associations between placental pathology and fetal cardiac malformations. Objectives included: evaluating the relationship between macroscopic changes in the umbilical cord and placenta, respectively, and fetal cardiac anomalies; describing placental

histopathological aspects in pregnancies with fetuses affected by CHDs; and evaluating possible associations between these elements and the development of CHDs in the fetus.

Materials and Methods: We conducted a retrospective case–control study, including samples consisting of pairs of placenta and products of conception from pregnancies that were terminated (spontaneous/therapeutic abortion) or resulted in stillbirths, from 2018–2022. The case group included pregnancies with products of conception diagnosed with congenital heart defects upon anatomopathological examination. For each case, we selected a control sample of the same gestational age with a normal fetal heart. Data regarding the fetus and macroscopic / microscopic evaluation of the placenta were collected retrospectively from the available anatomopathological reports.

Results: The study analyzed 102 subjects (51 cases and 51 controls). Atrioventricular septal defect was the most common CHD identified (21.6%). Fetuses with CHDs showed significantly lower anthropometric parameters (including weight, crown-heel length, and crown-rump length). A positive correlation was observed between these parameters and placental weight, as well as umbilical cord length. Placental factors associated with fetal CHDs included: reduced umbilical cord length, marginal/velamentous insertion of the umbilical cord, single umbilical artery, reduced fetal-to-placental weight ratio, and placental calcifications. Additionally, 88.2% of placentas from pregnancies with fetuses affected by CHDs exhibited microscopic changes, particularly maternal or fetal vascular malperfusion lesions.

Conclusions: Our data showed a reduced somatic growth in fetuses with structural heart anomalies compared to the control group. We observed an increased frequency of placental histopathological changes (predominantly maternal or fetal vascular malperfusion lesions) in pregnancies with fetuses affected by CHDs. The analysis identified placental factors associated with the development of fetal CHDs, highlighting the complex interactions between the placenta and the developing fetal heart.

Study 4: Evaluation of the Placental Expression of Placental Growth Factor (PlGF) and its Receptor (VEGFR-1) in Relation to the Development of Congenital Heart Defects – Pilot Study

Aim / Objectives: The study aimed to evaluate the link between placental expression of PlGF and VEGFR-1 and the development of fetal CHDs. Specific objectives were: identifying characteristic placental immunohistochemical expression for PlGF and VEGFR-1; evaluating the pattern and intensity of placental immunostaining for these two epitopes; and identifying an association between the pattern/intensity of PlGF and VEGFR-1 immunostaining, respectively, and the development of fetal CHDs, including possible phenotypic associations.

Materials and Methods: We conducted a retrospective case–control study, including samples consisting of pairs of placenta and products of conception from pregnancies

that were terminated (spontaneous/therapeutic abortion) or resulted in stillbirths, from 2018–2022. The case group included pregnancies with products of conception diagnosed with congenital heart defects upon anatomopathological examination. For each case, we selected a control sample of the same gestational age with a normal fetal heart. We used the immunohistochemical (IHC) method on placental tissue blocks to determine the expression of PlGF and VEGFR-1 in this area. The intensity of the IHC staining was quantified using a semi-quantitative scale.

Results: We evaluated immunohistochemically 40 placental samples (20 in each group). There were no significant differences between the groups regarding maternal age, number of previous pregnancies, fetal sex, or other congenital (non-cardiac) anomalies. Both proteins, PlGF and VEGFR-1, had a cytoplasmic localization and a significant immunostaining in the syncytiotrophoblast, decidual cells, and villous vascular endothelium. PlGF showed a significantly reduced staining intensity in the syncytiotrophoblast and decidual cells of placentas associated with fetal CHDs. No significant differences were found in the distribution of VEGFR-1 immunostaining intensity between the two groups.

Conclusions: Our investigation of placental expression of the PlGF–VEGFR-1 signaling pathway in the context of fetal CHDs showed a significant reduction in PlGF IHC expression in the syncytiotrophoblast and decidual cells of placentas from pregnancies with CHD-affected fetuses. These results suggest that PlGF and VEGFR-1 are involved in mediating the interactions of the heart–placenta axis in the context of fetal structural heart anomalies.

GENERAL CONCLUSIONS

The doctoral research focused on a multidisciplinary approach to factors associated with the development of congenital heart defects (CHDs). In this regard, the studies conducted led to the following conclusions, described below.

1. There is an association between genetic variations in molecules encoded by the *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1*, and *BMP4* genes and the development of congenital malformations of the cardiovascular system.
2. The investigation of the genetic burden of copy number variations (CNVs) in regions including the *GATA4* (8p23), *NKX2-5* (5q35), *TBX5* (12q24), *BMP4* (14q22), and *CRELD1* (3p25) genes, and the 22q11.2 region among a pediatric population with CHDs in Romania, using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), identified the presence of a heterozygous deletion of a fragment of at least 630 kbp in the 22q11.2 region in two patients, both belonging to the syndromic group.

3. It is confirmed that somatic growth is significantly altered in patients with syndromic CHDs, both prenatally and postnatally.
4. It is recommended to include somatic developmental disorders among the criteria defining syndromic CHDs, in addition to those in the current definition, such as the association of other congenital anomalies, craniofacial dysmorphism, and neuropsychological developmental disorders.
5. Proper phenotyping of a patient with a structural heart anomaly is important for their correct diagnostic classification and to guide subsequent genetic evaluation.
6. It is recommended to use the MLPA technique as a genetic screening method for patients with syndromic CHDs, and to include appropriate probes for the 22q11.2 region in the kits used for this purpose.
7. A significant alteration in fetal somatic growth was demonstrated in fetuses with CHDs, validating the correlation between fetal anthropometric parameters and placental weight, as well as umbilical cord length.
8. An increased proportion of placental histopathological changes was identified in pregnancies with fetuses affected by CHDs, primarily caused by altered placental hemodynamics (maternal or fetal vascular malperfusion lesions).
9. Placental factors associated with the development of fetal congenital heart defects were identified. These include: reduced umbilical cord length, marginal and velamentous umbilical cord insertion, the presence of a single umbilical artery, a reduced fetal-to-placental weight ratio, and the presence of placental calcifications.
10. We demonstrated the complex interaction between the placenta and the developing fetal heart. The disruption of fetal hemodynamics caused by the presence of congenital heart anomalies leads to altered placental hemodynamics, which, in turn, reciprocally influences the process of cardiac development.
11. The investigation of the placental expression of the PIGF-VEGFR-1 signaling pathway in the context of fetal CHDs revealed a significant reduction in placental immunohistochemical expression of PIGF in the syncytiotrophoblast and decidual cells of placentas from pregnancies involving fetuses with CHDs.
12. The results suggest that PIGF and VEGFR-1 are involved in mediating the interactions of the heart-placental axis in the context of fetal CHDs.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL RESEARCH

The multidisciplinary approach to studying factors associated with the development of congenital heart defects is an element of originality in the present research.

Through the narrative review, we synthesized the described associations between variations in the *TBX5*, *NKX2-5*, *GATA4*, *CRELD1*, and *BMP4* genes and the development of congenital malformations of the cardiovascular system, offering a unified presentation of these findings.

This research includes the first study on a Romanian population to investigate the genetic burden of copy number variations (CNVs) in regions including the *GATA4* (8p23), *NKX2-5* (5q35), *TBX5* (12q24), *BMP4* (14q22), and *CRELD1* (3p25) genes, as well as the 22q11.2 region, among pediatric patients with congenital heart defects. It is also one of the few studies published to date that examines this type of genetic alteration in populations from the Central and Eastern European geographical area.

Although the subject of somatic growth in patients with CHDs has been addressed in the specialized literature, few studies have compared it between syndromic and isolated CHD patients. Identifying the significant alteration of somatic growth in patients with syndromic CHDs sets the stage for modifying existing definitions by including this criterion among those that characterize this group of congenital heart defects.

This research also helps to strengthen the knowledge regarding placental factors in relation to fetal structural heart anomalies. It confirms some associations previously reported in other studies also within the Romanian population, and it is the first to identify the association between fetal CHDs and placental calcifications.

The placental expression of placental growth factor (PIGF) and vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) in relation to fetal CHDs has been very minimally studied. To date, only one other study in the literature has investigated this association, specifically for hypoplastic left heart syndrome. Our research was the first to address this topic within the global context of fetal CHDs. Furthermore, our published study was the first to successfully confirm the immunohistochemical reduction of placental PIGF expression in pregnancies with fetuses affected by CHDs.

All these represent innovative contributions of the conducted studies to understanding the mechanisms governing the complex interaction between the placenta and the fetal heart. The study of the heart–placenta axis offers the possibility of identifying new pathogenetic mechanisms involved in the development of congenital heart defects.