Júlia Daher Carneiro Marsiglia

**Estudo genético de pacientes portadores de
cardiomiopatia hipertrófica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marsiglia, Júlia Daher Carneiro

Estudo genético de pacientes portadores de cardiomiopatia hipertrófica / Júlia Daher Carneiro Marsiglia. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--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.Cardiomiopatia hipertrófica 2.Mutação 3.Genética médica
4.Cardiomiopatia hipertrófica/genética 5.Cardiomiopatia hipertrófica/diagnóstico
6.Análise de sequência de RNA 7.Análise de sequência de DNA 8.Genótipos
9.Fenótipo 10.Reação em cadeia da polimerase 11.Cadeias pesadas de miosina/genética 12.Proteína C de ligação da miosina 13.Troponina T/genética

USP/FM/DBD-212/13

À minha avó Yeda (*in memoriam*)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Alexandre da Costa Pereira, por sua paixão pela ciência, por permitir ao grupo ter ideias grandiosas e por ajudar a transformá-las em realidade, por sempre ter uma sugestão que muda toda a perspectiva, por nos forçar a superar barreiras e medos, por ser um exemplo de pesquisador e uma inspiração a todos que trabalham com ele. É um privilégio ser orientada por um cientista tão brilhante e ao mesmo tempo, uma pessoa tão acessível para assuntos científicos e pessoais. Muito obrigada por me ajudar a superar momentos difíceis e por toda a compreensão durante esses períodos.

Ao professor Dr. José Eduardo Krieger, por me receber no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor e pelo apoio necessário para desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Dr. Edmundo Arteaga Fernández, meu primeiro contato no InCor, pela colaboração para encaminhamento de pacientes, por toda ajuda com a parte clínica, tanto na aquisição quanto na interpretação dos dados e principalmente pela amizade, carinho, conselhos, explicações e ajuda em vários sentidos. Seria impossível chegar onde cheguei sem seu apoio.

Ao grupo da Cardio Geral, Dra. Bárbara, Dr. Fábio, Dr. Félix, Paulinha, Dr. Murillo e Roseli, pelo acolhimento que tornou minha adaptação mais fácil, pela ajuda com pacientes e colaboração nos trabalhos.

Ao meu orientador do mestrado, Dr. Aloir Queiroz de Araújo, por ter me introduzido à genética humana e à cardiomiopatia hipertrófica e por ter me ensinado com tanta paciência e dedicação que a escolha da carreira acadêmica e do tema do doutorado foi um caminho natural.

Aos médicos Dr. João Marcos Bemfica Barbosa Ferreira, de Manaus, e Dr. Rodrigo Pinto Pedrosa, de Recife, pela colaboração no encaminhamento de pacientes dos seus centros que enriqueceram este trabalho.

A todos os colegas do laboratório de genética, do geral e da secretaria, mesmo aqueles que já seguiram outros rumos, pelo companheirismo, ajuda para pequenas e grandes coisas e sugestões para melhoras constantes: Ana Maria, Aline, André Martelini, André Vaquero, André Souza, Andréa Horimoto, Andréa, Arruda, Ashila, D. Antônia, Carol Watanabe, Chester, Cristina, Débora, Diana, Diogo, Fábio, Gabriela Venturini, Gabriela Formigari, Gustavo, Juliana, Larissa, Léa, Lívia Marques, Lorenzo, Lúcia, Luciana Araújo, Luciana Soares, Luciene, Márcio Almeida, Marcos Tadashi, Maria Helena, Maúde, Michelle, Michelli, Mirian, Nilse, Noely, Pamella Malagrino, Pâmela Rodrigues, Patrícia Cajoeiro, Patrícia Yogi, Paulo Caleb, Paulo Roberto,

Rafael Alvim, Rafael Dariolli, Renatinha, Renata Carmona, Rita, Rodrigo, Samantha Omae, Samantha Kawada, Sileide, Silvana, Suellen, Talita, Tatiane e Vytor Hugo.

Às amigas que viraram minha segunda família em São Paulo, obrigada pelas conversas, risadas, colo e ombro nos momentos difíceis, almoços, convites, terças felizes, abraços e ajuda em todos os sentidos: Amanda, Carla Luana, Carol Moron, Cinthia, Júlia, Lívia Selvatici e Luciana Turolla (e Neto).

Flávia, Théo e Rafael Reis, mais que amigos, quase orientados, pela oportunidade de aprender e ensinar. Agradeço profundamente a paciência comigo e espero ter feito jus à confiança depositada. Muito obrigada também pela ajuda técnica, pelos PCRs, gradientes, géis e purificações que me ajudaram a fazer.

Marina, meu braço direito no sequenciamento, obrigada pelo carinho e cuidado com as amostras e ajuda inestimável, além da amizade de todos esses anos.

À minha mãe, grande ajuda em mais sentidos que seria capaz de enumerar. Pelo apoio, conversas, conselhos, desabafos, torcida, paciência, por tentar com afinco entender o que eu conto do trabalho e por tornar a frase “minha filha que faz doutorado em São Paulo” praticamente meu sobrenome, mesmo envergonhada fico feliz com o orgulho.

Ao meu pai, pelo apoio sem a qual teria sido bem mais difícil realizar esse doutorado e pelo retorno, tarde, mas muito bem vindo.

Ao meu padrasto Klinger, pela torcida e apoio constantes, pelos conselhos científicos, sugestões, pela correção da tese e pelo carinho de sempre.

Aos meus irmãos Lucas e Clarice, meus grandes amigos, por toda torcida, pela ajuda incondicional, pelas conversas e desabafos, pelas visitas, pelos abraços nos momentos certos, pelo carinho imenso e por tornarem minha vida completa.

Aos meus avós, tios, primos e agregados, longes em distância física, mas sempre perto de coração, pelo incentivo, torcida, apoio, mensagens carinhosas que foram indispensáveis para superar a saudade e a distância.

À CAPES pelo financiamento da minha bolsa de doutorado e ao CNPq pelo financiamento do projeto, que tornam a execução desse trabalho possível.

A ciência não tem a ver com a predição, com o futuro, com fazer coisas, mas sim com o explicar. Os cientistas são pessoas que têm prazer em explicar.

Humberto Maturana

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVO E METAS	11
2.1 OBJETIVO.....	11
2.2 METAS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 PACIENTES	13
3.2 DADOS CLÍNICOS.....	13
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	14
3.4 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR.....	15
3.5 EXTRAÇÃO DO RNA	16
3.6 SÍNTESE DO cDNA.....	17
3.7 PCR E <i>NESTED</i> PCR.....	18
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	20
3.9 SEQUENCIAMENTO.....	21
3.9.1 <i>Purificação</i>	21
3.9.2 <i>Reação de sequenciamento</i>	21
3.9.3 <i>Precipitação</i>	22
3.10 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	23
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4. RESULTADOS.....	27
4.1 RASTREAMENTO POR SEQUENCIAMENTO DE RNA	27
4.1.1 <i>Padronização</i>	27

4.1.2 Taxa de sucesso da amplificação	30
4.1.3 Sequenciamento.....	30
4.2 RASTREAMENTO POR DNA.....	32
4.2.1 Pacientes	32
4.2.2 Perfil genético	33
4.2.3 Comparação genótipo x fenótipo.....	37
4.3 MODELO DE PREDIÇÃO DE POSITIVIDADE PARA O TESTE GENÉTICO	43
5. DISCUSSÃO	48
5.1 RASTREAMENTO EM LARGA ESCALA POR SEQUENCIAMENTO DE RNA	48
5.2 SEQUENCIAMENTO DE DNA	49
5.2.1 Perfil genético	49
5.2.2 Correlação genótipo x fenótipo.....	52
5.2.2.1 Gene mutado	53
5.2.2.2 Mutação específica	55
5.2.2.3 Presença de múltiplas mutações	56
5.2.2.4 Presença x ausência de mutação	57
5.3 MODELO DE PREDIÇÃO DE POSITIVIDADE PARA O TESTE GENÉTICO	58
5.4 PERSPECTIVAS FUTURAS PARA ESTUDO GENÉTICO DE CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA	60
5.5 CUSTO-EFETIVIDADE DE UM PROGRAMA DE RASTREAMENTO GENÉTICO EM CASCATA PARA CH	63
6. CONCLUSÕES	66
7. ANEXOS	69
8. REFERÊNCIAS	77

Lista de figuras

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CDNA DOS GENES <i>MYH7</i> (A), <i>MYBPC3</i> (B) E <i>TNNT2</i> (C) E A ÁREA AMPLIFICADA ATRAVÉS DA <i>NESTED</i> PCR.	19
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE TOMADA DE DECISÃO DURANTE AS ANÁLISES DE PATOGENICIDADE DAS ALTERAÇÕES IDENTIFICADAS NOS PACIENTES.	24
FIGURA 3 - PRESENÇA DE ARTEFATOS NA SEQUÊNCIA DE CDNA.	31
FIGURA 3 - ALTERAÇÃO IDENTIFICADA EM HOMOZIGOSE NA SEQUÊNCIA DE CDNA MAS ENCONTRADA EM HETEROZIGOSE NA SEQUÊNCIA DE DNA DO MESMO PACIENTE.	31
FIGURA 5 - COMPARAÇÃO DOS TIPOS DE MUTAÇÕES ENCONTRADAS EM CADA GENE.	37
FIGURA 6 - CURVA DE KAPLAN MEIER MOSTRANDO DIFERENÇA NA IDADE DO DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM MUTAÇÃO IDENTIFICADA (1) VERSUS PACIENTES NOS QUAIS NÃO FOI IDENTIFICADA UMA MUTAÇÃO (0).	39
FIGURA 7 - GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DA PROBABILIDADE PREDITA PARA O MODELO DE PREDIÇÃO DE POSITIVIDADE PARA O TESTE GENÉTICO DESENVOLVIDO.	45
FIGURA 8 – CURVA ROC PARA O MODELO DE PREDIÇÃO DE POSITIVIDADE PARA O TESTE GENÉTICO DESENVOLVIDO.	46
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA EVIDENCIANDO OS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA MYH7. CADA ASTERISCO REPRESENTA UM PACIENTE COM MUTAÇÃO NA REGIÃO.	51

Lista de tabelas

TABELA 1 - LISTA DE GENES RELACIONADOS À CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA.	4
TABELA 2 - VALORES MÉDIOS E FREQUÊNCIAS DOS DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	33
TABELA 3 - LISTA DE MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO DNA DE PACIENTES PORTADORES DE CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA, NÚMERO DE PACIENTES AFETADOS PELA MESMA MUTAÇÃO E NO CASO DE MUTAÇÕES AINDA NÃO DESCRITAS, O RESULTADO DE TESTES DE BIOINFORMÁTICA QUE VERIFICAM A PATOGENICIDADE DA ALTERAÇÃO.	35
TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE UMA MUTAÇÃO IDENTIFICADA.	38
TABELA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS COM O GENE MUTADO....	40
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DE HISTÓRICO FAMILIAR POSITIVO OU NEGATIVO PARA CH COM RELAÇÃO E CRITÉRIOS CLÍNICOS E GENÉTICOS.	41
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DE HISTÓRICO FAMILIAR POSITIVO, NEGATIVO OU DUVIDOSO PARA CH E IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO.	42
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DE HISTÓRICO FAMILIAR POSITIVO OU NEGATIVO PARA MORTE SÚBITA COM RELAÇÃO E CRITÉRIOS CLÍNICOS E GENÉTICOS.	43
TABELA 9 - VARIÁVEIS INCLUÍDAS NA REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA.....	44
ANEXO A - SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA REAÇÃO DA <i>NESTED</i> PCR	69
ANEXO B - SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA PCR DO DNA	71
ANEXO C - COORDENADAS DE PROBABILIDADE PREDITA COM OS VALORES DE <i>CUTOFF</i> E A SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MODELO EM CADA PONTO.	73

Resumo

Introdução: A cardiomiopatia hipertrófica (CH) é uma doença genética cardíaca primária, caracterizada por hipertrofia do ventrículo esquerdo, sem dilatação, geralmente assimétrica e predominantemente septal, com prevalência estimada em 1:500. Atualmente já foram descobertos 20 genes associados à doença, mas os genes mais frequentemente relacionados são o da Cadeia Pesada da β -miosina (*MYH7*), Proteína C de Ligação da Miosina (*MYBPC3*) e Troponina T (*TNNT2*). O diagnóstico molecular dos pacientes é importante e custo-efetivo do ponto de vista de saúde pública, além de recomendado pela Sociedade Europeia de Cardiologia. Entretanto, o custo inicial do exame é muito alto, de forma que estudos tentam reduzir esse custo. Uma das propostas descritas utilizou o RNA extraído de leucócitos para sequenciamento com sucesso para o gene *MYBPC3*. Este trabalho tem como objetivo testar a metodologia de sequenciamento de RNA em larga escala e testar a aplicabilidade da mesma para os genes *MYH7* e *TNNT2*, estimar as principais mutações envolvidas nos pacientes do estudo e estabelecer correlações entre os diferentes genótipos avaliados e os fenótipos dos grupos familiares portadores da doença. **Métodos:** Os sujeitos incluídos no estudo são portadores de cardiomiopatia hipertrófica nos quais foi feita uma coleta de sangue para extração de DNA e RNA. Foi utilizada *nested* PCR para amplificação do cDNA e PCR convencional para amplificação de DNA e posterior sequenciamento em sequenciador automático. As análises estatísticas dos dados clínicos foram realizadas utilizando-se ANOVA para comparação de médias e teste exato de Fisher para comparação de frequências. **Resultados:** O sequenciamento de RNA se mostrou problemático, com baixa taxa de amplificação, falsos positivos e possíveis falsos negativos, de forma que optou-se por utilizar o sequenciamento de DNA para identificação das alterações. Dos 268 pacientes estudados foi identificada uma mutação em 131 deles (48,8%). Das mutações encontradas, 78 (59,5%) estavam no gene *MYH7*, 50 (38,2%) no gene *MYBPC3* e 3 (2,3%) no gene *TNNT2*. Foram identificadas 69 mutações diferentes, 24 delas ainda não descritas. Pacientes com mutação identificada possuíam em média idade de diagnóstico e idade atual menores, maior frequência cardíaca média e maior frequência de pacientes com taquicardia ventricular não sustentada quando comparados ao grupo sem mutação identificada. Pacientes com mutação no gene *MYH7* possuíam maior tamanho de átrio esquerdo, maior frequência de fibrilação atrial e maior frequência de histórico familiar da doença do que pacientes com mutação em *MYBPC3*. **Conclusões:** A técnica sequenciamento de RNA extraído de leucócitos não é adequada para uma rotina de rastreamento em larga escala para CH devido à alta frequência de falsos positivos, possibilidade de falsos negativos e baixa taxa de amplificação, mas o sequenciamento de DNA, embora trabalhoso, se mostrou muito sensível para a análise. A identificação de uma mutação específica ainda não pode ser usada para prognóstico de gravidade da CH, mas as comparações de genótipo e fenótipo mostraram algumas relações interessantes que devem ser melhor avaliadas nos pacientes. Este é o primeiro trabalho a caracterizar a epidemiologia molecular da CH em pacientes brasileiros para os genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2*.

Descritores: 1.Cardiomiopatia hipertrófica 2.Mutação 3.Genética médica 4.Cardiomiopatia hipertrófica/genética 5.Cardiomiopatia hipertrófica/diagnóstico 6.Análise de sequência de RNA 7.Análise de sequência de DNA 8.Genótipos 9.Fenótipo 10.Reação em cadeia da polimerase 11.Cadeias pesadas de miosina/genética 12.Proteína C de ligação da miosina 13.Troponina T/genética

Abstract

Introduction: Hypertrophic cardiomyopathy (HC) is a primary genetic cardiac disease characterized by left ventricular hypertrophy without dilation, usually asymmetric and predominantly septal, with an estimated prevalence of 1:500. There are 20 genes associated to the HC, but the ones more often related to the disease are β -myosin heavy chain (*MYH7*), myosin binding protein C (*MYBPC3*) and troponin T (*TNNT2*). The molecular diagnosis of patients is important and cost-effective from the standpoint of public health, and recommended by the European Society of Cardiology. However, the initial cost of the exam is very high, so several studies are attempting to reduce it. One of the proposals described used the RNA extracted from leukocytes for sequencing successfully to the *MYBPC3* gene. The present study aims to test the methodology for large-scale sequencing and test its applicability to the *MYH7* and *TNNT2* genes, to estimate the main mutations involved in the studied patients and establish correlations between their genotypes and phenotypes. **Methods:** The subjects included in the study were patients previously diagnosed with hypertrophic cardiomyopathy in whom a blood sample was collected to DNA and RNA extraction. It was used nested PCR for cDNA amplification and conventional PCR for DNA amplification for posterior sequencing on an automatic sequencer. Statistical analyzes of clinical data were performed using ANOVA to compare means and Fisher's exact test for frequencies comparison. **Results:** The RNA sequencing was problematic with low rate of amplification, false positives and possible false negatives, so was used DNA sequencing to identify the mutations. Of the 268 patients studied a mutation was identified in 131 of them (48.8%). Among the mutations found, 78 (59.5%) were in the *MYH7* gene, 50 (38.2%) in the *MYBPC3* gene and three (2.3%) in the *TNNT2* gene. We have identified 69 different mutations, 24 of them not yet described. Patients with an identified mutation had an average smaller age of diagnosis and current age, higher average cardiac frequency and higher frequency of patients with nonsustained ventricular tachycardia compared to those without an identified mutation. Patients with mutations in the *MYH7* gene had larger left atrium size, higher frequency of atrial fibrillation and higher frequency of family history of the disease than patients with a mutation in the *MYBPC3* gene. **Conclusions:** The technique of sequencing RNA extracted from leucocytes is not suitable for large scale routine screening for CH due to the high frequency of false positives, possibility of false negatives and low rate of amplification, but the DNA sequencing, though laborious, was very sensitive to the analysis. Identification of a specific mutation cannot yet be used for prognosis of the disease's severity, but comparisons of genotype and phenotype have shown some interesting relationships that should be further evaluated. The presente study is the first one to characterize the molecular epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy in Brazilian patients for those three more important genes mentioned above.

Descriptors: Cardiomyopathy, hypertrophic; Mutation; Genetics, medical; Cardiomyopathy, hypertrophic/genetics; Cardiomyopathy, hypertrophic/diagnosis; Sequence analysis, RNA; Sequence analysis, DNA; Genotype; Phenotype; Polymerase chain reaction; Myosin heavy chains/genetics; Myosin-binding protein C; Troponin T/genetics

1. Introdução

1. Introdução

A cardiomiopatia hipertrófica (CH) é uma doença genética cardíaca primária, caracterizada por hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), sem dilatação, geralmente assimétrica e predominantemente septal, na ausência de qualquer outra doença cardíaca ou sistêmica que possa causar a hipertrofia miocárdica, como hipertensão arterial, estenose aórtica e amiloidose ^{1, 2}. Os principais sintomas da doença, quando presentes, são dispnéia aos esforços físicos, angina, palpitações, ortostase, pré-síncope e síncope, mas muitos pacientes podem permanecer assintomáticos, podendo ter a morte súbita como primeira manifestação da doença. Além da hipertrofia das fibras miocárdicas, ocorre um desarranjo histológico dessas fibras e graus variáveis de fibrose intersticial e perivascular contribuindo para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, isquemia miocárdica, arritmias ventriculares e morte súbita ².

A prevalência estimada da CH é de 0,2% (1:500), correspondendo a 0,5% de todas as cardiopatias ³, mas essa estimativa pode não ser muito acurada por várias razões. Primeiro, a CH pode ser totalmente assintomática em uma parcela considerável de doentes, e se não for descoberta incidentalmente poderá passar despercebida; segundo, doenças concomitantes como hipertensão e doenças valvulares cardíacas podem confundir o diagnóstico; terceiro, a expressão fenotípica da doença é idade-dependente e pode não ser detectada no período da avaliação; quarto, a

penetrância do gene em algumas famílias é muito baixa ⁴. A expressão fenotípica se manifesta mais comumente após a adolescência, mas pode estar presente desde o nascimento, ou somente aparecer na meia-idade ou idades muito avançadas. A incidência anual de morte súbita é maior nos grupos mais jovens comparados aos grupos de idade mais avançada. Em jovens atletas a CH é a causa mais comum de morte súbita, muitas vezes como primeira manifestação da doença ⁵.

A CH é doença genética autossômica dominante, causada por uma mutação em genes de proteínas do sarcômero, do disco Z e do transporte de cálcio. Atualmente já foram descobertos 20 genes associados à CH (tabela 1) e mais de 1000 diferentes mutações já foram identificadas em indivíduos afetados pela doença, aumentando a complexidade de sua caracterização genética. Entretanto, os genes mais frequentemente relacionados à CH são o da cadeia pesada da β -miosina (*MYH7*), proteína C de ligação da miosina (*MYBPC3*) e troponina T (*TNNT2*) ⁶.

A maioria das mutações heterozigóticas é do tipo sentido trocado (*missense*), especialmente no gene *MYH7*, gerando uma proteína mutante pela substituição de um aminoácido por outro; foi demonstrado que essa proteína mutante se incorpora ao sarcômero e, supostamente, interfere com a proteína selvagem, agindo como um polipeptídio de efeito negativo dominante ⁷. O resultado da incorporação é uma função anormal ou um desarranjo das miofibrilas do sarcômero. Por outro lado, especialmente no gene *MYBPC3*, a identificação de mutações nulas (mudança de quadro de leitura e sem sentido) sugere um mecanismo de haploinsuficiência pela produção de um transcrito instável e/ou uma proteína truncada incapaz de se incorporar ao sarcômero ². Para outros genes relacionados o mecanismo específico

ainda não é elucidado. A maior parte das mutações é de substituições únicas, mas não se sabe se a doença é causada por dominância negativa ou haploinsuficiência ⁸⁻

10.

Tabela 1 - Lista de genes relacionados à cardiomiopatia hipertrófica.

Gene	Proteína	Cromossomo	Frequência
Genes de miofilamento			
<i>TTN</i>	Titina	2	<1%
<i>MYH7</i>	Cadeia Pesada da β -miosina	14	15-40%
<i>MYH6</i>	Cadeia Pesada da α -miosina	14	<1%
<i>MYL2</i>	Cadeia Leve da Miosina Regulatória	12	<2%
<i>MYL3</i>	Cadeia Leve da Miosina Essencial	3	<1%
<i>MYBPC3</i>	Proteína C de Ligação da Miosina	11	15-40%
<i>TNNT2</i>	Troponina T	1	<5%
<i>TNNI3</i>	Troponina I	19	<5%
<i>TPM1</i>	α -tropomiosina	15	<5%
<i>ACTC</i>	Actina cardíaca α	15	<1%
<i>TNNC1</i>	Troponina C	3	<1%
Genes do disco Z			
<i>LBD3</i>	Domínio 3 de ligação LIM	10	1-5%
<i>CSRP3</i>	Proteína Muscular LIM	17	<1%
<i>TCAP</i>	Teletonina	17	<1%
<i>VCL</i>	Vinculina/Metavinculina	10	<1%
<i>ACTN2</i>	α -actina	1	<1%
<i>MYOZ2</i>	Miozenina	4	<1%
<i>NEXN</i>	Nexilina	1	<1%
Genes controladores de cálcio			
<i>JPH2</i>	Junctofilina-2	20	<1%
<i>PLN</i>	Fosfolambam	6	<1%

Apesar do grande número de genes já relacionados com a CH, que foram extensivamente comprovados por modelos animais ¹¹⁻¹⁴, os mecanismos moleculares que levam ao fenótipo ainda permanecem pouco claros. A primeira hipótese

proposta foi que a incorporação de uma proteína mutada levaria a uma depressão da função contrátil e isso desencadearia uma hipertrofia compensatória ^{15, 16}. Entretanto, de acordo com alguns autores, essa proposta se mostrou inconsistente com evidências clínicas e laboratoriais. Em sua revisão, Asharafian et al ¹⁷ listaram três argumentos que refutam essa hipótese: 1) Inicialmente, os experimentos com proteínas mutantes revelaram uma função diminuída, especialmente caracterizada pela redução de motilidade da proteína. Entretanto, com o desenvolvimento de ensaios mais avançados, percebeu-se para algumas mutações existe na verdade um aumento da motilidade da proteína, sugerindo um ganho de função da proteína mutada. Portanto, de acordo com os autores, o decréscimo de função não pode ser o único estímulo para hipertrofia. Corroborando esses dados, pacientes mutados sem hipertrofia têm um aumento de motilidade no tecido cardíaco que pode ser visualizado pelo ecocardiograma. 2) A hipertrofia presente nos pacientes é normalmente assimétrica, muito diferente da hipertrofia concêntrica vista em corações com aumento de carga como na hipertensão; 3) pacientes normalmente desenvolvem a hipertrofia durante a puberdade e aparentemente ela não progride muito após esse período. Além disso, alguns pacientes desenvolvem a hipertrofia na idade adulta. Assim, esses padrões não podem ser explicados por um mecanismo compensatório, considerando que a mutação está presente desde o desenvolvimento cardíaco. Os autores afirmam ainda que a disfunção unificadora em CH é o aumento da demanda de energia devido à utilização ineficiente de ATP e, baseados nisso, criaram uma hipótese denominada “a hipótese de depleção de energia” sugerindo que o aumento da demanda compromete a capacidade do

cardiomiócito em manter níveis de energia nos compartimentos subcelulares. A depleção de energia crônica e consequentemente a disfunção do miocárdio, elevação de Ca^{2+} sistólico e ativação das proteínas quinases AMP-ativadas (AMPK) resultam em hipertrofia. Em 2008, Belus et al ¹⁸ estudaram os mecanismos de contração e relaxamento de miofibrilas isoladas de pacientes com a mutação *MYH7-R403Q* e compararam com fibras de corações normais. Os autores perceberam que a geração de tensão e o relaxamento após aumento e diminuição de Ca^{2+} foram muito mais rápidos na miofibrila mutada, mas a um custo maior de energia, corroborando a ideia de utilização ineficiente de ATP para geração de tensão. Essa hipótese também explica a hipertrofia assimétrica, já que a tensão da parede do miocárdio e a demanda de energia não são uniformes em todo o coração e o requerimento extra de energia pode ser mais danoso em regiões específicas do miocárdio.

Baudenbacher et al ¹⁹ estudaram a sensibilidade ao Ca^{2+} , que está alterada no coração hipertrofiado, como um mecanismo levando aos fenótipos de CH. Existe uma crescente evidência de que mutações em diferentes genes de proteínas de miofilamento aumentam a sensibilidade ao Ca^{2+} e o defeito consequente na homeostase, tais como transporte intracelular de Ca^{2+} , recaptação de Ca^{2+} no retículo endoplasmático e fosforilação de algumas proteínas, provavelmente contribuem para vários aspectos da doença ^{20, 21} e os autores mostraram que uma maior sensibilidade miofibrilar ao Ca^{2+} é suficiente para aumentar a probabilidade de arritmias. Em camundongos, foi demonstrado que com o aumento da sensibilização a Ca^{2+} , o formato dos potenciais de ação foi modificado, resultando

em períodos refratários mais curtos, maior variabilidade de duração de potencial de ação entre os batimentos e aumento da dispersão da velocidade de condução ventricular em frequências cardíacas mais altas. Os autores acreditam que isso é suficiente para criar um substrato arritmogênico ¹⁹. Essa associação foi reforçada pelo estudo de camundongos transgênicos com mutação no gene da troponina T, no qual a carga de arritmia ventricular teve uma correlação com o grau de sensibilidade ao Ca^{2+} . Além disso, o sensibilizador de miofilamentos ao Ca^{2+} EMD 57033 exacerbou a arritmia nesse modelo animal enquanto o uso de blebistatina, que reverte a sensibilização ao Ca^{2+} eliminou quase que inteiramente as arritmias ¹⁹. Entretanto, segundo os autores, não está claro se essas alterações observadas são causadoras da hipertrofia ou um epifenômeno de todo o processo patológico. As evidências sugerem que esse mecanismo pode modular o fenótipo clínico e explicar uma grande parte da variabilidade fenotípica interindividual, mas não pode ser considerada condição suficiente para o desenvolvimento de hipertrofia do miócito e desarranjo miofibrilar.

Apesar de o mecanismo molecular da doença não estar completamente elucidado, sabe-se que o diagnóstico molecular dos pacientes é extremamente importante por vários motivos. Quando o diagnóstico clínico é uma certeza, o estabelecimento do defeito molecular através de análises do DNA constitui-se em confirmação diagnóstica, já que a CH é uma doença genética. Por outro lado, o diagnóstico molecular pode contribuir para aumentar a certeza diagnóstica em casos incertos, com hipertrofia limítrofe ou moderada, em hipertrofia miocárdica identificada em atletas ou em pacientes hipertensos suspeitos de também apresentarem CH ².

Ainda, o estabelecimento do diagnóstico molecular de mutações permite a identificação de crianças e adultos com manifestações subclínicas da doença. Esses indivíduos, especialmente quando no contexto de uma família com CH, seriam candidatos a um controle mais rígido de fatores de risco ao desenvolvimento da doença, assim como de uma monitorização médica mais rigorosa. É importante que seja esclarecido ao paciente, entretanto, que a identificação de uma mutação em familiares de pacientes com diagnóstico genético não significa doença e sim um risco aumentado ao desenvolvimento da mesma ⁶. Também é importante ressaltar que a ausência de identificação de uma mutação no caso de um paciente não familiar com suspeita clínica não garante a ausência da doença, já que uma porcentagem importante de pacientes não tem o diagnóstico molecular, mesmo estudando-se todos os genes relacionados à doença, o que sugere que podem existir genes relacionados à CH ainda não descobertos.

Uma grande promessa do diagnóstico molecular é a possibilidade de se relacionar a mutação com quadro clínico, de forma que o tratamento do paciente possa ser mais individualizado. Entretanto, essa correlação ainda está longe de ser utilizada na prática clínica. Diversos estudos abordaram essa questão e há algumas evidências com relação a diversos aspectos do diagnóstico molecular. Inicialmente, quando estudos de rastreamento genético de pacientes de CH eram bastante incipientes, existia um consenso de que mutações no gene *MYH7* possuíam uma variabilidade muito grande com relação a parâmetros clínicos e ecocardiográficos com algumas mutações muito malignas ^{22, 23}, mutações no gene *MYBPC3* eram normalmente relacionadas a um prognóstico mais benigno ^{24, 25} e mutações no gene

TNNT2 estavam relacionadas a maiores taxas de morte súbita com pouca ou nenhuma hipertrofia, provavelmente devido a um maior desarranjo miofibrilar^{26, 27}.

Essas relações não foram corroboradas em estudos mais recentes, de forma que ainda não existe um consenso sobre a real utilidade desse dado na prática clínica.

Do ponto de vista econômico, estudos já mostraram que o rastreamento genético é mais custo efetivo do que o rastreamento clínico. Embora o custo inicial do teste seja alto, aqueles familiares que não têm a mutação estariam dispensados de exames clínicos periódicos, o que reduziria os custos a longo prazo²⁸.

Apesar de o sequenciamento ser custo-efetivo, estudos tentam reduzir o custo inicial do teste. Uma das propostas foi descrita por Miller et al²⁹, que utiliza o RNA extraído de leucócitos para sequenciamento. Como o RNA só contém éxons, o sequenciamento da molécula reduziria o número de fragmentos a serem sequenciados e aumentaria a rapidez no diagnóstico e, segundo o autor, para o gene *MYBPC3* isso é possível. Dessa forma este trabalho tem a finalidade de testar essa metodologia em rastreamento de mutações em uma escala maior e testar a aplicabilidade da mesma para os genes *MYH7* e *TNNT2*.

2. Objetivo e Metas

2. Objetivo e metas

2.1 Objetivo

O objetivo do projeto foi estudar os genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2* em pacientes portadores de cardiomiopatia hipertrófica na população brasileira.

2.2 Metas

- Testar a aplicabilidade do sequenciamento de RNA extraído de leucócitos para identificação de mutações que causam a cardiomiopatia hipertrófica;
- Estimar as principais mutações envolvidas;
- Estabelecer correlações entre os diferentes genótipos avaliados e os fenótipos dos grupos familiares portadores da CH.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Pacientes

Os sujeitos incluídos no estudo são portadores de cardiomiopatia hipertrófica com diagnóstico clínico realizado por profissional especialista, utilizando como critério principal espessura acima de 15 mm em qualquer uma das paredes do VE. O trabalho contou principalmente com pacientes do Instituto de Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor - HC/FMUSP), mas também de outros centros como Vitória, Manaus e Recife. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e o projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Hospital das Clínicas - FMUSP, número CAPPesq 3316/09/067. Nesta pesquisa foi incluído apenas um paciente por família, denominado caso índice. Os familiares, mesmo portadores da doença, não foram incluídos nas análises.

3.2 Dados clínicos

Para comparação de genótipo x fenótipo, foram utilizados dados clínicos obtidos dos prontuários físico e eletrônico do InCor no caso dos pacientes desse centro e para pacientes de outros centros o médico responsável preencheu uma ficha com

os dados clínicos disponíveis de cada um dos indivíduos testados. Foram avaliadas as medidas ecocardiográficas (espessura de septo interventricular e parede posterior do VE, tamanho do átrio esquerdo, fração de ejeção e obstrução na via de saída), eletrocardiográficas (fibrilação atrial, frequência cardíaca média e taquicardia ventricular não sustentada - TVNS) e ressonância magnética (fibrose), sempre que disponíveis. Os pacientes incluídos no estudo responderam a um questionário a respeito de história familiar de cardiomiopatia hipertrófica e morte súbita.

3.3 Extração do DNA

A extração do DNA foi feita a partir de sangue periférico pelo método deprecipitação salina. Nesse protocolo, inicialmente foram transferidos 8 mL de sangue para um tubo de 50 mL e o volume foi completado para 30 mL com tampão A (1 mM NH_4HCO_3 + 144 mM NH_4Cl). A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e mantida a 4°C por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 3.000 rpm, o sobrenadante descartado e o processo foi repetido. O sedimento leucocitário foi ressuspenso em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8 + 400 mM NaCl + 2 mM EDTA pH 8) + 200 µl de SDS 10% + 500 µl de tampão C (50 µl de SDS 10% + 2 µl de EDTA 0,5 M, pH 8 + 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 µl de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e deixado a 37°C por 12-18 horas. Após esse período, foi adicionado 1 mL de solução

D (NaCl 6M), a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 1 minuto e centrifugada a 4°C por 20 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL onde foram adicionados 10 mL de etanol absoluto gelado. Após uma leve agitação, o DNA precipitado foi “pescado” e transferido para um microtubo de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O tubo foi levado a uma microcentrífuga a 4°C por 15 minutos a 13.500 rpm e após o término da centrifugação o etanol foi descartado e o sedimento foi mantido em temperatura ambiente até a evaporação completa do etanol. O DNA foi ressuspendido em 1 mL de água ultrapura e armazenado em freezer -20°C até o momento de uso.

3.4 Isolamento da fração mononuclear

Para extração de RNA de sangue, inicialmente foi realizada uma etapa de isolamento da fração mononuclear para posterior extração de RNA a partir desse grupo celular. O sangue foi homogeneizado e adicionou-se a ele o mesmo volume de solução fisiológica. Essa mistura foi despejada suavemente sobre uma camada de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) em um tubo falcon de 15 mL. Foram utilizados 10 mL da solução soro/sangue para cada 3 mL de Ficoll, tomando-se o cuidado de não misturar as fases. O tubo foi então centrifugado em temperatura ambiente a 3000 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, a solução separa-se em quatro fases: na fase superior ficam o plasma e seus constituintes solúveis, na

interface as células mononucleares, em seguida o Ficoll e após os eritrócitos e granulócitos que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo. A camada monocelular foi colhida junto com o Ficoll e transferida para um tubo falcon de 50 mL limpo, onde foram adicionados 40mL de soro para lavagem. A mistura foi centrifugada 1.200 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem foi repetido. Após a segunda lavagem e descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de TRIzol® (Invitrogen) e mantido em freezer -20°C até o momento da extração do RNA.

3.5 Extração do RNA

A primeira etapa do processo consiste em lisar as células com TRIzol® através de pipetagem repetitiva, utilizando-se 2 mL do reagente. Após, as amostras foram incubadas por 5 minutos, entre 15 e 30°C e posteriormente foi adicionado 0,4 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente na mão por 15 segundos e incubados entre 15 e 30°C por 2 a 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos entre 2 e 8°C. Após a centrifugação, a mistura separa-se em uma camada vermelha, a fase fenol clorofórmio, uma interfase e uma fase superior aquosa incolor. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Essa fase foi então transferida para um tubo limpo e o RNA foi precipitado da fase aquosa misturando-se 1 mL de isopropanol. As amostras foram incubadas entre 15 e 30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12000 rpm por 10

minutos entre 2 e 8°C. O RNA precipitado forma um pellet gelatinoso nos lados e no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o *pellet* passou por um processo de lavagem uma vez com 2 mL de etanol 75%, onde a amostra foi misturada em vórtex e centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos entre 2 e 8°C. Ao final do procedimento, o RNA foi seco rapidamente e dissolvido em água ultrapura livre de RNase.

3.6 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado com o Kit *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen) utilizando-se Oligo-dT ou *Random Hexamers* como *primer* para síntese. No primeiro protocolo, o RNA foi diluído em água ultrapura livre de RNase para o volume de 11 µl de forma que todas as amostras atingissem a mesma concentração. A cada amostra de RNA foram adicionados 1 µl de *primer* (oligodT ou *Random hexameres*) e 1 µl de dNTP (10 mM). Os tubos foram levados ao termociclador a 65°C por 5 minutos e mantidos em gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida foram adicionados 4 µl de tampão 5X, 1 µl de DTT (0,1 M), 0,5 µl de RNase OUT, 1 µl de SuperScript III RT e 0,5 µl de água ultrapura livre de RNase a cada amostra. A mistura foi levada novamente ao termocicladora 50°C por uma hora e a 70°C por 15 minutos. Após a finalização da síntese, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C até o momento de uso.

3.7 PCR e *Nested* PCR

Para o processo de amplificação das amostras, foram utilizados *primers* que englobam toda a região codificante dos genes da cadeia pesada da β -miosina (*MYH7*), proteína C de ligação da miosina (*MYBPC3*) e troponina T (*TNNT2*). Foi utilizada *nested* PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificar cDNA ou PCR convencional para DNA. Na *nested* PCR, para o gene *MYBPC3* foram usados os mesmo *primers* descritos por Miller et al²⁹. Para o gene *MYH7*, foram utilizados os *primers* descritos por Pegararo et al³⁰ (sequências gentilmente cedidas por e-mail após solicitação) como *primers* internos e foram desenhados *primers* externos com o programa *Primer3*³¹ disponível online. Para o gene *TNNT2*, os *primers* internos e externos foram desenhados usando o programa *Primer3* (anexo A). A figura 1 mostra o esquema de ligação dos *primers* internos e externos no cDNA de cada gene. Na PCR convencional de DNA foram utilizados *primers* retirados do banco de dados online do *Laboratory of Cardiogenomics* de Harvard, sob responsabilidade da Dra. Christine Seidman (removido da internet em 2013) e alguns foram redesenhados utilizando-se o programa *Primer3* (anexo B).

Figura 1 - Representação esquemática do cDNA dos genes *MYH7* (A), *MYBPC3* (B) e *TNNT2* (C) e a área amplificada através da *nested* PCR.

Setas pretas no cDNA indicam onde os *primers* externos se ligam e as setas cinzas indicam a ligação dos *primers* internos. Retângulos cinza claro se referem aos éxons codificantes enquanto retângulos cinza escuro representam os éxons não codificantes. A numeração nos retângulos indica o número do éxon.

Para todas as reações foi utilizada a enzima DNA polimerase *GoTaq® DNA polymerase enzyme* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O programa utilizado para as PCRs convencionais é composto de várias etapas, descritas a seguir. Uma etapa de desnaturação de 94°C por 10 minutos, seguida por uma programação de ciclo que incluía uma etapa de desnaturação a 94°C por 20 segundos, uma etapa de anelamento com a temperatura específica para cada *primer* por 20 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 30 segundos. Esse ciclo era repetido 35 vezes e em seguida havia uma etapa de extensão final de 7 minutos. Para a *nested* PCR, o programa era semelhante, com a diferença nos tempos do

ciclo. A etapa de desnaturação consistia em 30 segundos, a etapa de anelamento também durava 30 segundos e a etapa de extensão durava um minuto. Esse ciclo era repetido 35 vezes e as etapas de desnaturação inicial e extensão final foram iguais à programação de PCR convencional. Os produtos da PCR foram mantidos em freezer a -20°C até o momento de uso. Todas as PCRs foram realizadas junto com um controle negativo, no qual era adicionada água no lugar do DNA, para verificação de possíveis contaminações durante o processo.

3.8 Eletroforese em gel de agarose

Após as reações de PCR, tanto convencional como *nested*, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% com uma alíquota do produto e posterior análise através no sistema de fotodocumentação Quantum ST4-1100/26MX (VilberLourmat), para confirmação de amplificação da banda de interesse, sem contaminação com bandas inespecíficas.

3.9 Sequenciamento

Após a eletroforese e confirmação da amplificação dos produtos esperados e ausência de qualquer contaminação, os mesmos foram purificados e sequenciados em um sequenciador automático ABI3500xl (Applied Biosystems)

3.9.1 Purificação

Foi realizada uma purificação enzimática dos produtos de PCR com a ExoSAP-IT[®] (GE Healthcare) segundo instruções do fabricante para retirada de excesso de *primer* e nucleotídeos livres que poderiam interferir no sequenciamento.

3.9.2 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado com o kit *BigDye Terminator V3.1 Cycle sequencing Kit*[®] (Applied Biosystems), e a reação utilizou 2,5 µL de produto de PCR purificado, 1 µL de água ultrapura, 2,5 µL *primer* (5 µM), 3 µL de tampão e 1 µL de BigDye para cada amostra. A reação foi levada ao termociclador em programação específica para sequenciamento.

3.9.3 Precipitação

A precipitação foi realizada através do protocolo com EDTA/etanol utilizando-se 2,5 µl de EDTA 125 mM por amostra. A placa foi vortexada e submetida à centrifugação rápida e foram acrescentados 30 µl de etanol 100%. A placa foi envolvida com papel alumínio, mantida a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos a 4°C. Com a placa aberta e invertida, foi realizada uma centrifugação rápida (até 300 rpm no máximo) para eliminação do sobrenadante e foram acrescentados 100 µl de etanol 100% em cada poço. A placa foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C, novamente submetida a uma centrifugação rápida invertida e aberta para retirada do sobrenadante e levada ao termociclador a 80°C por 2 minutos para evaporação do sobrenadante restante. A placa foi então envolvida com papel alumínio e mantida em freezer a -20°C até o momento do sequenciamento, quando então foram adicionados 10 µl de formamida HiDi. Em seguida a placa foi levada ao termociclador por 3 minutos a 96°C para desnaturação, mantida em gelo até resfriamento das amostras e então colocada no sequenciador.

3.10 Análise do sequenciamento

O resultado obtido através do sequenciamento foi avaliado no programa de análise de sequências SeqMan (DNASTAR Lasergene) e as sequências obtidas foram comparadas com a sequência referência disponível no banco de dados do NCBI. Utilizou-se a sequência referência inscrita sob o registro NM_000257.2 para o gene *MYH7*, NM_000256.3 para *MYBPC3* e NM_000364.3 para *TNNT2* (isoforma 1). Toda divergência encontrada entre a sequência obtida e a referência foi avaliada quanto à possível patogenicidade. Era verificado se a alteração estava no éxon ou intron, se gerava alguma troca de aminoácido na proteína correspondente e se estava presente no banco de dados de polimorfismos do NCBI, o dbSNP. Caso a alteração fosse identificada como possivelmente patogênica, era verificado se a mesma já havia sido descrita previamente por outros autores. Em caso positivo, o artigo original que descreveu a mutação era acessado para verificação e nessa análise era verificado se o autor havia feito alguma análise de segregação ou ensaio funcional. Em caso positivo, a mutação era caracterizada como patogênica já descrita. No caso de mutações ainda não descritas ou sem evidências de patogenicidade na literatura, foram utilizados alguns parâmetros para determinar seus potenciais. Inicialmente as alterações foram analisadas em programas de bioinformática para prever o efeito da alteração na proteína. O SIFT ³² e o *Polyphen* ³³ são utilizados apenas para alterações do tipo substituição de aminoácidos e o *MutationTaster* ³⁴ também analisa deleções, inserções e alterações em intron. Foi avaliada também a

Meier para comparação da idade de diagnóstico e regressão logística uni e multivariada para gerar o modelo de predição de positividade no teste genético.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Rastreamento por sequenciamento de RNA

4.1.1 Padronização

Inicialmente foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para verificação da qualidade dos RNAs extraídos, através do qual foi concluído que nenhum dos RNAs utilizados para os testes estavam degradados e todos estavam livres de contaminação com DNA. Os cDNAs sintetizados foram submetidos a uma PCR com *primers* que amplificam um gene controle para checar a qualidade do cDNA. O gene teste utilizado foi a ciclofilina A (*PPIA*) e foi escolhido por possuir uma expressão alta em células mononucleares, de forma que garantiria que se a PCR teste não funcionasse não seria devido à baixa expressão do gene no tecido alvo, mas provavelmente a algum problema na síntese do cDNA.

Para cada *primer* utilizado na *nested* PCR foi feito uma PCR gradiente com o cDNA sintetizado de RNA extraído de leucócitos de um indivíduo controle sem doença cardíaca para avaliar a melhor temperatura de funcionamento do *primer* e se a adição de DMSO melhoraria a reação. Para a primeira reação da *nested*, foi utilizada a temperatura de 50°C para todos os *primers*, considerando que nessa reação não é

visualizada banda e assim não é possível fazer gradiente. Para a segunda PCR, foram testadas temperaturas de anelamento variando de 45°C a 65°C.

Para cada *primer* foi escolhida a melhor temperatura de anelamento, como mostrado no anexo A. Verificou-se que o DMSO não interferiu positiva ou negativamente no teste, de forma que o reagente não foi utilizado nas reações subsequentes. Foi testada também a melhor concentração inicial de RNA para síntese de cDNA, variando de 25 ng/μL, 50 ng/μL, 100 ng/μL e 200 ng/μL, utilizando-se 4 μL do cDNA. Esse teste foi realizado com os *primers* A1 e A2, ambos do gene *MYBPC3* e A1 do gene *TNNT2*, e cinco amostras distintas para cada *primer*. Em todas as concentrações testadas, foram amplificadas com sucesso duas amostras de cada *primer*. Dessa forma, foi concluído que o aumento de quantidade de RNA para síntese de cDNA não melhora o resultado, e então foi utilizada a menor concentração para as reações seguintes.

Com a temperatura e concentrações ótimas encontradas, foi realizado um teste preliminar com 20 amostras e os *primers* A1 e A2 do gene *MYBPC3*. Para o fragmento A1, nenhuma das amostras foi amplificada e para o *primer* A2, quatro amostras mostraram amplificação. Foram testadas mais modificações no protocolo para aumentar a taxa de sucesso de amplificação, e a primeira delas foi incluir uma etapa de purificação com ExoSAP-IT® entre a primeira e segunda reação de PCR. Essa alteração aumentou a taxa de sucesso. Em um teste com os *primers* B1 e C1 do gene *MYBPC3*, foram utilizadas 40 amostras por *primer*, com e sem a etapa de purificação. Sem a purificação, a reação com o *primer* B1 apresentou amplificação de 4 amostras (10%) e com a etapa de purificação, foram amplificadas 8 amostras

(20%). Para o *primer* C1, sem a etapa de purificação, foram amplificadas cinco amostras (12%) e com a etapa de purificação 10 amostras foram amplificadas (25%). Com esse resultado positivo, a purificação enzimática foi incluída no protocolo.

Ainda assim a taxa de sucesso estava abaixo do esperado, de forma que foi testado utilizar uma DNA polimerase de melhor qualidade. Foi feito um teste com a *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) no lugar da enzima padrão *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega) utilizada no laboratório, mas não houve nenhuma alteração na taxa de amplificação. Em um teste comparativo com os *primers* A1 e B1 do gene *MYBPC3* foi possível amplificar quatro amostras para o *primer* A1 e cinco para o *primer* A2, independente da enzima utilizada.

A última tentativa de modificação do protocolo foi utilizar *random hexamers* (RH) como *primer* para síntese de cDNA no lugar do oligo-DT (ODT). O resultado encontrado mostrou que para os genes selecionados, o oligo-DT funcionou melhor. Foram testadas seis amostras para os *primers* A1, A2, B1 e C1 do gene *MYBPC3*, seguindo instruções do fabricante. Para o *primer* A1, foram amplificadas cinco das seis amostras testadas tanto com ODT quanto com RH. Para o *primer* A2, foram amplificadas duas amostras com ODT e nenhuma com RH, das seis testadas. Para o *primer* B1, com ODT foram amplificadas quatro amostras enquanto com RH foram amplificadas três. Finalmente, com o *primer* C1 foram amplificadas quatro amostras tanto com ODT quanto com RH.

4.1.2 Taxa de sucesso da amplificação

A taxa de sucesso de amplificação, mesmo com todos os testes e modificações, ficou aquém da esperada. Foi feita a PCR de 1150 amostras e foi possível identificar apenas uma banda no gel de eletroforese, sem bandas inespecíficas e com o tamanho esperado em apenas 336 amostras, totalizando aproximadamente 29% das amostras testadas. Além disso, a eficiência dos *primers* foi muito desigual. O *primer* C1 do gene *MYBPC3*, por exemplo, atingiu uma taxa de sucesso de 59% enquanto para o *primer* A1 do gene *TNNT2*, a taxa não excedeu 17%. Além disso, mesmo utilizando o protocolo otimizado, foram testadas 10 amostras distintas com 6 pares de *primers* distintos do gene *MYH7* e nenhuma amostra apresentou amplificação.

4.1.3 Sequenciamento

Apesar de 336 fragmentos apresentarem amplificação adequada, os resultados de sequenciamento foram sub ótimos. Foi possível analisar com confiança apenas 133 fragmentos, o que reduziu a taxa de sucesso para aproximadamente 11,5% de todas as amostras testadas. Nas amostras sequenciadas, foram identificadas 82 substituições de base única. Para cada variante identificada, foi sequenciado o DNA

do paciente correspondente para dupla checagem. A comparação entre as duas sequências se mostrou discrepante em 76,8% dos casos. Em 63,4%, a substituição encontrada em RNA não foi confirmada em DNA (figura 3) e em 13,4% dos casos, a substituição encontrada em homozigose no RNA aparecia em heterozigose no DNA (figura 4). Esses resultados sugerem alta taxa de artefatos na sequência e provavelmente amplificação de apenas um dos cromossomos, o que pode levar a falsos negativos.

Figura 3 - Presença de artefatos na sequência de cDNA.

Figura 3 - Alteração identificada em homozigose na sequência de cDNA mas encontrada em heterozigose na sequência de DNA do mesmo paciente.

Devido à baixa taxa de sucesso, aliada aos problemas com análise dos dados, decidiu-se realizar em paralelo o sequenciamento direto por DNA dos pacientes para os três principais genes relacionados à CH.

4.2 Rastreamento por DNA

4.2.1 Pacientes

O presente estudo analisou o DNA de 268 pacientes, 58% do sexo masculino, com uma média de idade de 46 anos (DesvPad = 15,6). O paciente mais novo tinha 13 anos e o mais velho 90 anos de idade. A espessura média do septo interventricular foi 20 mm, a espessura média da parede posterior do VE foi 12 mm, o tamanho do átrio esquerdo foi 42 mm e a fração de ejeção média foi 71%. Não foi observada diferença estatística em nenhum dos critérios citados acima entre homens e mulheres. A tabela 2 resume os dados clínicos e demográficos da população estudada.

Tabela 2 - Valores médios e frequências dos dados clínicos e demográficos da população estudada.

	Média	Desvio Padrão	
Idade do diagnóstico (anos)	36	15	
Idade atual (anos)	46	16	
Septo (mm)	20	6	
PP (mm)	12	5	
AE (mm)	42	8	
FE (%)	71	9	
		Contagem	Porcentagem
Sexo	F	155	57,8%
	M	113	42,2%
HFCH	Não	23	15,6%
	Sim	58	39,5%
	Não sabe	66	44,9%
HCMS	Não	101	68,7%
	Sim	46	31,3%
TVNS	Não	113	64,9%
	Sim	61	35,1%
Obstrutiva	Não	154	67,5%
	Sim	74	32,5%
Fibrose	Não	16	15,4%
	Sim	88	84,6%

Septo = espessura do septo interventricular, PP = espessura da parede posterior do VE, AE = tamanho do átrio esquerdo, FE = fração de ejeção, HFCH = história familiar de cardiomiopatia hipertrófica (o critério não sabe foi aplicado quando o paciente relata histórico de doença cardíaca na família mas não tem certeza se é CH), HFMS = histórico familiar de morte súbita, TVNS = taquicardia ventricular não sustentada, obstrutiva = gradiente interventricular maior que 30 mmHg.

4.2.2 Perfil genético

Entre os 268 pacientes estudados, foi identificada uma mutação patogênica em 131 deles (48,8%). Das mutações encontradas, 78 (59,5%) estavam no gene *MYH7*, 50 (38,2%) no gene *MYBPC3* e 3 (2,3%) no gene *TNNT2*. Foram identificadas 69 mutações diferentes, 24 delas ainda não descritas. As alterações encontradas estão

listadas na tabela 3, bem como se ela já foi descrita previamente e as respectivas predições dos programas de bioinformática. As mutações mais frequentes foram *MYBPC3*-R495Q (encontrada em 10 pacientes), *MYH7*-A797T (encontrada em 8 pacientes) e *MYBPC3*-F305fs delTT (encontrada em 6 pacientes). Dos pacientes com mutação identificada, 3 apresentaram múltiplas mutações. Um paciente possuía a mutação *MYH7*-A797T em homozigose, outro apresentou heterozigose composta no gene *MYBPC3* (E619K/L1221fs delT) e um terceiro paciente apresentou dupla heterozigose, com mutação nos genes *MYH7* (H1524R) e *MYBPC3* (L1221fs delT).

Tabela 3 - Lista de mutações encontradas no DNA de pacientes portadores de cardiomiopatia hipertrófica, número de pacientes afetados pela mesma mutação e no caso de mutações ainda não descritas, o resultado de testes de bioinformática que verificam a patogenicidade da alteração.

Gene	Éxon	Mutação	Número de pacientes	Descrita	SIFT	PolyPhen	MutationTaster
MYH7	5	R143Q	1	sim	*	*	*
MYH7	9	R249Q	2	sim	*	*	*
MYH7	9	F252C	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease Causing</i>
MYH7	9	I263T	5	sim	*	*	*
MYH7	10	S291F	1	sim	*	*	*
MYH7	11	V320M	5	sim	*	*	*
MYH7	14	R453C	4	sim	*	*	*
MYH7	14	R453H	1	sim	*	*	*
MYH7	15	M493I	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Benign</i>	<i>Disease Causing</i>
MYH7	15	I511T	1	sim	*	*	*
MYH7	16	G584R	4	sim	*	*	*
MYH7	16	V606M	1	sim	*	*	*
MYH7	18	R663H	3	sim	*	*	*
MYH7	19	I702V	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Benign</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	19	G716R	3	sim	*	*	*
MYH7	19	R719P	2	sim	*	*	*
MYH7	19	R719Q	2	sim	*	*	*
MYH7	20	R723G	3	sim	*	*	*
MYH7	20	P731S	4	sim	*	*	*
MYH7	20	Q734P	1	sim	*	*	*
MYH7	20	G741R	2	sim	*	*	*
MYH7	21	F764Y	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	21	A797T	8	sim	*	*	*
MYH7	22	K847del	4	sim	*	*	*
MYH7	22	M852T	1	sim	*	*	*
MYH7	22	R858C	1	sim	*	*	*
MYH7	22	R869H	2	sim	*	*	*
MYH7	22	L873P	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	22	N885K	1	sim	*	*	*
MYH7	23	E924K	2	sim	*	*	*
MYH7	23	E965K	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	27	Q1215H	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	30	R1344Q	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	32	K1459N	3	sim	*	*	*
MYH7	33	H1524R	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	34	R1606H	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYH7	37	G1808S	1	não	<i>Affect Protein Function</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Disease causing</i>
MYBPC3	2	S78fs InsA	1	não	*	*	<i>Disease Causing</i>
MYBPC3	6	E258K	2	sim	*	*	*
MYBPC3	10	F305fs delTT	6	não	*	*	<i>Disease Causing</i>
MYBPC3	13	E441K	1	sim	*	*	*
MYBPC3	14	P453fs delC	1	sim	*	*	*
MYBPC3	15	R495Q	10	sim	*	*	*

MYBPC3	15	R502Q	1	sim	*	*	*
MYBPC3	15	K505del	1	sim	*	*	*
MYBPC3	15	E542Q	1	sim	*	*	*
MYBPC3	17	E619K	1	sim	*	*	*
MYBPC3	19	Q698X	1	não	*	*	Disease Causing
MYBPC3	22	Q790X	1	não	*	*	Disease Causing
MYBPC3	22	W792X	3	não	*	*	Disease Causing
MYBPC3	22	G799fs insT	1	não	*	*	Disease Causing
MYBPC3	23	N850fs delC	2	não	*	*	Disease causing
MYBPC3	23	K811del	1	sim	*	*	*
MYBPC3	23	Y847X	1	sim	*	*	*
MYBPC3	24	R891fs InsG	3	sim	*	*	*
MYBCP3	25	T927fs delCA	1	não	*	*	Disease Causing
MYBCP3	25	P955fs delCT	1	sim	*	*	*
MYBCP3	25	IVS25+1G>A	1	sim	*	*	*
MYBPC3	27	R1022P	1	sim	*	*	*
MYBPC3	28	Y1100X	1	não	*	*	Disease Causing
MYBPC3	28	E1096X	1	sim	*	*	*
MYBPC3	29	V1139fs InsC	1	não	*	*	Disease Causing
MYBPC3	30	K1209fs InsC	1	não	*	*	Disease Causing
MYBPC3	30	L1200P	1	sim	*	*	*
MYBPC3	31	L1221fs delT	2	não	*	*	Disease causing
MYBPC3	31	W1214X	1	sim	*	*	*
TNNT2	13	I221T	1	não	Tolerated	Probably damaging	Disease causing
TNNT2	15	N268I	1	sim	*	*	*
TNNT2	9	R92W	1	sim	*	*	*

No gene da *MYH7*, foram encontradas mutações do tipo substituição simples que levou a troca de um aminoácido por outro (sentido trocado) ou deleção de bases, levando a deleção de um aminoácido, sem mudar o quadro de leitura. No gene da *TNNT2*, foram encontradas apenas substituições que levaram à troca de aminoácidos. Já para o gene da *MYBPC3*, foram encontradas além das substituições e deleções de aminoácidos, deleções e inserções que mudavam o quadro de leitura e substituições que geraram códon de parada (sem sentido). A figura 6 resume os tipos de alteração encontrados em cada gene.

Figura 5 - Comparação dos tipos de mutações encontradas em cada gene.

4.2.3 Comparação genótipo x fenótipo

A comparação de presença ou ausência de mutação com os critérios clínicos mostrou que pacientes com mutação identificada possuem em média idade de diagnóstico e idade atual menores, maior frequência cardíaca e maior frequência de pacientes com TVNS quando comparados ao grupo sem mutação identificada (tabela 4). Além disso, foi feita uma curva de Kaplan Meier comparando idade de diagnóstico entre pacientes com e sem mutação e percebeu-se que a idade de diagnóstico era significativamente menor em pacientes positivos para a mutação quando comparada a pacientes sem mutação (figura 6).

Tabela 4 - Comparação entre dados clínicos e demográficos com presença ou ausência de uma mutação identificada.

	Mutação					
	Ausência			Presença		
	Média	DesvPad		Média	DesvPad	Valor p
Idade do diagnóstico (anos)	38	16		33	13	0,026
Idade atual (anos)	48	17		43	13	0,028
FCm (bpm)	67	9		71	11	0,006
Septo (mm)	20	6		21	5	0,179
PP (mm)	12	3		12	6	0,581
AE (mm)	42	8		43	8	0,164
FE (%)	71	9		71	9	0,638
		Contagem	Frequência (%)		Contagem	Frequência (%)
Sexo	M	79	57,2	76	58,3	0,902
	F	59	42,8	54	58,5	
FA	Não	91	93,8	90	87,4	0,150
	Sim	6	6,2	13	12,6	
Obstrutiva	Não	73	64,6	81	70,4	0,397
	Sim	40	54,1	34	29,6	
TVNS	Não	63	75,9	50	54,9	0,004
	Sim	20	24,1	41	45,1	
Fibrose	Não	9	17,3	7	13,5	0,787
	Sim	43	82,7	45	86,5	

FCm = frequência cardíaca média, Septo = espessura de septo interventricular, PP = espessura da parede posterior do VE, AE = tamanho de átrio esquerdo, FE = fração de ejeção, FA = fibrilação atrial, Obstrutiva = gradiente interventricular maior que 30 mmHg, TVNS = taquicardia ventricular não sustentada.

Figura 6 - Curva de Kaplan Meier mostrando diferença na idade do diagnóstico de pacientes com mutação identificada (1) versus pacientes nos quais não foi identificada uma mutação (0).

Foram também comparadas as características clínicas com o gene mutado (tabela 5). Para essa comparação foram utilizados apenas os genes *MYH7* e *MYBPC3*, já que no gene *TNNT2* foram identificadas mutações em apenas três pacientes, número muito baixo para realizar análises estatísticas. O resultado das análises mostrou que o tamanho do átrio esquerdo era estatisticamente maior em pacientes com mutações no gene *MYH7* do que em pacientes com mutação no gene *MYBPC3*. A frequência de pacientes com fibrilação atrial também foi maior no grupo com mutação em *MYH7* do que em *MYBPC3*.

Tabela 5 - Comparação entre dados clínicos e demográficos com o gene mutado.

	Gene mutado					
	MYH7			MYBPC3		
	Média	DesvPad		Média	DesvPad	Valor p
Idade do diagnóstico (anos)	33	13		32	13	0,712
Idade atual (anos)	43	12		43	15	0,998
FCm (bpm)	70	10		73	11	0,144
Septo (mm)	21	5		22	5	0,342
PP (mm)	12	7		12	2	0,709
AE (mm)	45	8		40	7	0,001
FE (%)	70	11		70	7	0,851
	Contagem		Frequência (%)	Contagem		Frequência (%)
Sexo	F	31	39,2	20	42,6	0,851
	M	48	60,8	27	57,4	
FA	Não	53	82,8	37	97,4	0,029
	Sim	11	17,2	1	2,6	
Obstrutiva	Não	47	66,2	31	75,6	0,394
	Sim	24	33,8	10	24,4	
TVNS	Não	31	55,4	21	56,8	0,533
	Sim	25	44,6	16	43,2	
Fibrose	Não	2	6,9	4	18,2	0,211
	Sim	27	93,1	18	81,8	

FCm = frequência cardíaca médica, Septo = espessura de septo interventricular, PP = espessura da parede posterior do VE, AE = tamanho de átrio esquerdo, FE = fração de ejeção, FA = fibrilação atrial, Obstrutiva = gradiente interventricular maior que 30 mmHg, TVNS = taquicardia ventricular não sustentada.

Além das análises comentadas, foi realizado um estudo mais detalhado com relação ao tipo de mutação presente nos pacientes desse estudo. As mutações foram divididas em quatro tipos de mutação: substituição simples que levava à troca de um aminoácido por outro (troca de sentido), inserção ou deleção de bases levando a uma mudança de quadro de leitura, deleção de um ou mais aminoácidos sem mudança de quadro de leitura e substituições que levavam a geração de códon de parada (sem sentido). Os dados clínicos dos grupos foram comparados, mas não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa.

Foi comparada também a presença de histórico familiar positivo para CH ou para morte súbita com os fatores clínicos e genéticos dos pacientes estudados (tabela 6).

Tabela 6 - Comparação de histórico familiar positivo ou negativo para CH com relação a critérios clínicos e genéticos.

Histórico familiar de cardiomiopatia hipertrófica					
	Ausente		Presente		Valor p
	Média	DesvPad	Média	DesvPad	
Idade do diagnóstico	32	15	31	13	0,731
Idade atual (anos)	39	15	39	13	0,995
FCm (bpm)	70	12	70	11	0,847
Septo (mm)	23	9	20	5	0,088
PP (mm)	13	3	11	3	0,011
AE (mm)	37	5	41	7	0,022
FE (%)	73	7	71	9	0,285
		Contagem	Frequência (%)	Contagem	Frequência (%)
FA	Não	20	100	47	95,9
	Sim	0	0	2	4,1
Gene	MYH7	1	14,3	26	72,2
	MYBPC3	6	85,7	10	27,8
Obstrutiva	Não	14	77,8	38	77,6
	Sim	4	22,2	11	22,4
TVNS	Não	11	57,9	31	67,4
	Sim	8	42,1	15	32,6
Fibrose	Não	3	27,3	3	10,7
	Sim	8	72,7	25	89,3

FCm = frequência cardíaca média, Septo = espessura do septo interventricular, PP = espessura da parede posterior do VE, AE = tamanho do átrio esquerdo, FE = fração de ejeção, FA = fibrilação atrial, obstrutiva = gradiente interventricular acima de 30 mmHg, TVNS = taquicardia ventricular não sustentada.

Nessa comparação, foram excluídos pacientes com histórico de doença cardíaca na família, mas sem confirmação de CH. Foi encontrada uma relação entre o gene mutado com a presença de histórico familiar da doença. Pacientes com mutação no gene *MYH7* possuíam uma frequência de histórico positivo de doença na família significativamente maior do que pacientes com mutação no gene *MYBPC3*. Além disso, pacientes com história familiar positiva possuíam o tamanho de átrio maior

do que aqueles sem histórico familiar. Também foi encontrada uma maior média de espessura de parede posterior nos pacientes possuíam um histórico negativo para a doença.

Foi relacionado também o histórico familiar da doença com a presença ou ausência de uma mutação identificada e verificou-se que quando existe uma história familiar comprovada de CH, a chance de se encontrar uma mutação é significativamente maior do que quando não existe histórico familiar. Quando existe uma história familiar duvidosa, no caso de o paciente relatar histórico de doença cardíaca na família, mas não sabe se é CH, a frequência de identificação de mutação é maior do que em casos negativos e estatisticamente semelhante aos casos de história familiar confirmada (tabela 7).

Tabela 7 - Comparação de histórico familiar positivo, negativo ou duvidoso para CH e identificação da mutação.

Histórico familiar de cardiomiopatia hipertrófica							
		Ausente		Presente		Duvidosa	
		Contagem	Frequência	Contagem	Frequência	Contagem	Frequência
Mutação	Ausente	16	69,6%	23	37,1%	33	50%
	Presente	7	30,4%	35	62,9%	33	50%

Na comparação de presença de histórico familiar de morte súbita não foi encontrada nenhuma relação com critérios clínicos ou genéticos (tabela 8).

Tabela 8 - Comparação de histórico familiar positivo ou negativo para morte súbita com relação e critérios clínicos e genéticos.

Histórico familiar de morte súbita					
	Ausência		Presença		Valor p
	Média	DesvPad	Média	DesvPad	
Idade do diagnóstico (anos)	34	14	36	15	0,355
Idade atual (anos)	41	13	45	16	0,103
FCm (bpm)	70	10	69	11	0,685
Septo (mm)	22	6	20	6	0,081
PP (mm)	12	3	12	3	0,456
AE (mm)	41	6	42	7	0,308
FE (%)	71	8	72	7	0,552
FA		Contagem		Frequência (%)	0,323
	Não	81	38	100	
	Sim	3	0	0	
Gene	<i>MYH7</i>	33	13	56,5	0,233
	<i>MYBPC3</i>	16	10	43,5	
Mutação	Não	50	25	54,3	0,586
	Sim	51	21	45,7	
Obstrutiva	Não	61	22	62,9	0,284
	Sim	26	13	37,1	
TVNS	Não	50	23	67,6	0,412
	Sim	29	11	32,4	
Fibrose	Não	7	5	25	0,193
	Sim	46	15	75	

FCm = frequência cardíaca média, Septo = espessura do septo interventricular, PP = espessura da parede posterior do VE, AE = tamanho do átrio esquerdo, FE = fração de ejeção, FA = fibrilação atrial, obstrutiva = gradiente interventricular acima de 30mmHg, TVNS = taquicardia ventricular não sustentada.

4.3 Modelo de predição de positividade para o teste genético

Com a informação de quais características estão significativamente relacionadas com a presença ou ausência de mutação, realizamos uma regressão logística multivariada incluindo quatro características que foram identificadas como relacionadas a uma maior probabilidade de se identificar uma mutação: histórico familiar de morte súbita, frequência cardíaca média, TVNS e idade do paciente (tabela 9). Com essa análise, desenvolvemos um algoritmo para identificar

pacientes que tem mais chance de ter um diagnóstico molecular positivo. A distribuição de probabilidades preditas e a curva ROC do modelo estão mostradas respectivamente nas figuras 7 e 8. O valor da área sobre a curva foi de 0,775.

Tabela 9 - Variáveis incluídas na regressão logística multivariada.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
HFCH			7,222	2	0,027			
HFCH(1)	1,767	0,661	7,152	1	0,007	5,856	1,603	21,387
HFCH(2)	1,261	0,665	3,594	1	0,058	3,53	0,958	13,004
FCm	0,044	0,021	4,471	1	0,034	1,045	1,003	1,089
TVNS	1,603	0,479	11,193	1	0,001	4,969	1,943	12,709
Idade	-0,053	0,018	9,211	1	0,002	0,948	0,916	0,981
Constante	-2,507	1,718	2,13	1	0,144	0,081		

HFCH = Histórico familiar de CH, HFCH(1) = pacientes com história confirmada de CH, HFCH(2) = pacientes que tem histórico familiar de doença cardíaca mas não possui diagnóstico de CH, FCm = frequência cardíaca média; TVNS = taquicardia ventricular não sustentada.

Figura 7 - Gráfico de distribuição da probabilidade predita para o modelo de predição de positividade para o teste genético desenvolvido.

Figura 8 – Curva ROC para o modelo de predição de positividade para o teste genético desenvolvido.

Os valores de *cutoff* de probabilidade predita podem ser escolhidos para maximizar a sensibilidade ou especificidade, conforme o cenário escolhido. As coordenadas da curva estão mostradas no anexo C com seus respectivos valores de sensibilidade e especificidade.

5. Discussão

5. Discussão

5.1 Rastreamento em larga escala por sequenciamento de RNA

Apesar de o potencial da técnica de rastreamento de mutação por RNA ser inegável, foram encontrados muitos problemas nos resultados, como alta frequência de falsos positivos, possibilidade de resultados falsos negativos e baixa taxa de amplificação. É possível o uso de sequenciamento de RNA extraído de leucócitos em alguns poucos casos selecionados, como demonstrado previamente em estudos com CH ^{29, 35} e com outras doenças ³⁶⁻³⁸. Entretanto, os problemas encontrados sugerem que a técnica não é adequada para um número muito grande de pacientes, como uma rotina em larga escala, para CH.

Alguns dos problemas identificados na técnica podem ser atribuídos aos níveis extremamente baixos de expressão dos genes em leucócitos isolados de sangue total. É conhecido que os genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2* são expressos quase que exclusivamente em tecido cardíaco. Foi utilizada *nested* PCR, que é mais apropriada para casos de amostras com pouca quantidade de material para estudo, mas aparentemente isso não foi suficiente para os genes em questão, mesmo quando foram utilizadas quantidades muito altas de RNA para síntese de cDNA.

Uma limitação deste estudo foi a utilização de extração de RNA baseada em fenol, em vez da extração baseada em coluna descrita por Miller et al ²⁹. Foram realizados

testes com três marcas de kit de extração de RNA baseados em colunas, mas o rendimento final foi muito baixo, de forma que o TRIzol® foi escolhido. A técnica baseada em fenol permite a obtenção de quantidades de RNA muito mais altas do que com o método de coluna, mas pode deixar resíduos fenólicos que impactam nas aplicações subsequentes do RNA.

Com a introdução de sequenciamento de próxima geração, que permite a análise de milhares de bases em pouco tempo e com custo inferior às técnicas de sequenciamento atuais, esse tipo de recurso perde relevância para redução de custos de rapidez de análise ³⁹. Mas a técnica ainda é muito importante para se detectar alterações em sítios de *splicing* e deleções de éxons inteiros que podem não ser detectadas no sequenciamento comum de DNA. Portanto, é importante ter essa técnica padronizada no laboratório para auxiliar o diagnóstico, em especial para o gene *MYBPC3* que tem frequência alta de alterações desse tipo.

5.2 Sequenciamento de DNA

5.2.1 Perfil genético

Foram encontradas algumas mutações com uma frequência muito alta na população testada, entre elas a *MYBPC3*-E495Q encontrada em 10 pacientes. Essa mutação já foi descrita anteriormente por vários autores, mas em nenhum estudo ela aparece com frequência tão alta ⁴⁰⁻⁴⁵, o que sugere que é uma mutação bem

prevalente na população brasileira. Foi encontrada também a mutação *MYH7*-A797T em oito pacientes. Essa mutação foi descrita inicialmente por Moolman et al⁴⁶ e os autores descreveram em outro estudo posterior uma alta prevalência em pacientes da África do Sul, provavelmente devido a um efeito fundador⁴⁷.

A mutação *MYH7*-K847del foi identificada em apenas quatro pacientes, mas três deles faziam parte da casuística de Manaus e esse número parece relevante considerando que temos apenas 13 pacientes desse centro. Isso pode sugerir um efeito fundador na população em questão, principalmente porque foi encontrada a mesma mutação em apenas um paciente do restante da casuística. Isso ainda não pode ser afirmado com certeza porque o número de pacientes não é alto o suficiente para uma análise estatística. O primeiro estudo que descreveu a mutação em 2004 a encontrou em apenas um sujeito entre 349 pacientes testados do estado de Minnesota, nos EUA⁴⁸.

De acordo com literatura anterior, a região entre os éxons 19 e 23 do gene *MYH7* é a mais rica em mutações⁴⁹. Foi encontrado o mesmo padrão neste estudo, com 18 das 36 mutações diferentes encontradas localizadas nessa região e 40 pacientes com mutação dentro dessa região dos 76 pacientes com mutações nesse gene (figura 9).

De acordo com a literatura, a análise dos três genes estudados nesse trabalho pode identificar até 64% dos casos⁵⁰⁻⁵², mas esse número pode variar de acordo com a população testada. Foi encontrada nesse trabalho mutação em 47% dos pacientes, um pouco abaixo do descrito como máximo, mas compatível com o que é descrito em vários estudos⁵³⁻⁵⁵.

Figura 9 - Representação esquemática evidenciando os domínios da proteína MYH7. Cada asterisco representa um paciente com mutação na região.

Com relação aos tipos de mutações encontradas em cada gene, nosso resultado mostra que existem muitas mutações no gene *MYBPC3* que levam a geração de uma proteína truncada, o que não é visto nos outros genes estudados. Waldmuller et al.⁵⁵ compararam mutações em *MYH7* e *MYBPC3* com CH e cardiomiopatia dilatada (CD) e encontraram o mesmo perfil em sua casuística. É interessante ressaltar que os pesquisadores encontraram mutações sem sentido (*nonsense*) em *MYH7*, mas apenas em pacientes com CD. Eles consideram que mutações desse tipo no gene *MYH7* podem ter um papel no desenvolvimento de CD e sugerem que mais estudos devem ser realizados com esse gene sobre haploinsuficiência do gene *MYH7* e suas possíveis consequências. Já para o gene *MYBPC3* foram encontradas mutações sem sentido em ambas as doenças, em uma frequência muito maior do que em *MYH7*, sugerindo um papel proeminente de mutações causando haploinsuficiência em CH⁵⁵, corroborando o encontrado no presente estudo.

Estudos com modelos animais *knock-out* para o gene *MYBPC3* mostram que esses animais não são inviáveis, mas apresentam uma hipertrofia profunda e prejuízo à

função contrátil⁵⁶. Isso corrobora a hipótese de que o mecanismo de ação principal de mutações nesse gene seja de haploinsuficiência. A escassez da proteína *MYBPC3*, que atua como um limitador da interação com a actomiosina, provavelmente traduz em uma função contrátil (possivelmente devido ao abuso de ATP), alteração da sinalização β -adrenérgica e um aumento subsequente da sensibilidade ao Ca^{2+} .

Existem poucos estudos sobre o perfil genético de pacientes com CH na população brasileira^{57, 58} e nenhum deles com um número elevado de pacientes. Revisões extensivas na literatura mostraram que este é o primeiro trabalho com uma coorte grande na população de CH brasileira.

5.2.2 Correlação genótipo x fenótipo

A correlação de genótipo e fenótipo em CH tem se mostrado difícil, principalmente porque existem muitos genes relacionados com a doença e muitas mutações distintas, de forma que é difícil selecionar um grupo grande e homogêneo de pacientes com a mesma mutação para análises confiáveis. Vários polimorfismos em diferentes genes já foram descritos como modificadores do fenótipo da CH, o que pode confundir a análise da relação. Por exemplo, algumas variantes do receptor tipo 2 da angiotensina II foram associadas com o grau de hipertrofia em pacientes com CH, independente da pressão arterial⁵⁹ enquanto que um outro estudo associou polimorfismos no sistema renina-angiotensina com dilatação do VE com disfunção sistólica em pacientes com CH⁶⁰. Para fazer as correlações no presente

estudo, não foi considerado nenhum gene modificador, apenas as mutações encontradas nos genes estudados, já que não existe evidência de que o efeito poligênico modificador seja maior que o efeito da própria mutação.

5.2.2.1 Gene mutado

Alguns grupos de pesquisa conseguiram uma correlação com gene mutado e critérios clínicos. Por exemplo, Wang et al ⁶¹ compararam pacientes com mutações nos genes *MYH7* e *MYBPC3* e concluíram que pacientes com mutação em *MYH7* desenvolvem a doença em uma idade menor, têm maior taxa de morte súbita familiar, maior proporção de fibrilação atrial e necessitaram de mais intervenções cirúrgicas do que o segundo grupo. Outro grupo de pesquisa realizou uma análise em 389 pacientes não relacionados, agrupando-os em com ou sem mutação no gene *MYH7*. Eles observaram que os pacientes com mutação em *MYH7* eram também mais novos na idade do diagnóstico, possuíam maior grau de hipertrofia e foram submetidos à miectomia com mais frequência, mas não encontraram diferença na história familiar de morte súbita entre os grupos ⁴⁸. Mais um estudo comparando pacientes com mutações nos genes *MYBPC3* e *MYH7* encontrou uma maior espessura de septo em pacientes com mutação no gene *MYBPC3* do que em pacientes com o gene *MYH7* alterado ⁵⁵.

No presente estudo, foram comparados pacientes com mutação nos dois genes citados e encontramos relação em tamanho do átrio esquerdo, maior em pacientes

com mutação em *MYH7* e frequência de pacientes com FA, que também foi maior em pacientes com mutação no gene *MYH7*. É possível que os dois dados estejam relacionados, já que um dos fatores para desenvolvimento de FA é o aumento do tamanho do átrio ⁶²⁻⁶⁴, inclusive na CH ^{65, 66}. Na literatura já foi descrito que alterações no gene *MYBPC3* estão correlacionadas ao tamanho do átrio, dado contraditório a nossa pesquisa ⁵⁵. A presença de FA em pacientes com CH já foi relacionada previamente com pior prognóstico. Melacini et al ⁶⁷ identificaram FA como a variável mais comumente associada a IC em pacientes com CH. Outro estudo com ressonância magnética cardíaca em pacientes portadores de CH encontrou uma maior frequência de fibrose em pacientes com FA quando comparado a pacientes sem FA ⁶⁸. Kubo et al ⁶⁹ analisaram o impacto clínico de FA em pacientes com CH em uma coorte de 261 pacientes do Japão e concluíram que FA foi o maior determinante de deterioração clínica nesses pacientes. 17 dos 18 pacientes do estudo em classe funcional III da *New York Heart Association* (NYHA) possuíam FA, 50% dos pacientes com FA sofreram eventos mórbidos como embolismo e IC e os pacientes portadores de FA necessitaram internação por IC com mais frequência do que pacientes sem FA. Isso sugere que na nossa casuística pacientes com mutação no gene *MYH7* tem pior prognóstico do que pacientes com mutações no gene *MYBPC3*.

5.2.2.2 Mutação específica

A associação de mutações específicas com o fenótipo clínico de CH ainda é muito controversa. Desde a descoberta dos genes causadores da doença, muitos autores tentaram taxar as mutações como malignas ou benignas. Entretanto, para a maior parte das associações, há uma exceção ou não se consegue replicar os dados em outras populações. Esse tópico foi inclusive o assunto de um debate entre os autores Ho ⁷⁰ e Ackerman ⁷¹, e ambos concluíram que ainda é difícil fazer algum prognóstico com base apenas na mutação do paciente.

Algumas mutações apresentam algum tipo de concordância com relação a sua severidade, apesar de a apresentação clínica variar. Por exemplo, a mutação *MYH7*-R723G foi inicialmente associada por Enjuto et al ⁷² a uma alta taxa de morte súbita e insuficiência cardíaca progressiva por volta da 5ª década de vida. Em 2006, um grupo de pesquisa chinês detectou a mesma mutação em uma família com apenas um indivíduo com histórico de síncope. Outros cinco membros da família morreram com insuficiência cardíaca grave e a idade média de morte foi 66 anos. Nenhuma morte súbita foi descrita nessa família ⁶¹. Na casuística do presente estudo, três pacientes possuem a mutação descrita. Um deles apresentou insuficiência cardíaca com fração de ejeção de 40% aos 50 anos e história de morte por IC na família, supostamente por cardiomiopatia chagásica (sem exame para confirmação). O segundo paciente já ultrapassou os 60 e permanece com FE acima de 75%, pouca hipertrofia e sem histórico de MS ou IC na família. O terceiro paciente possui 20

anos, pouca hipertrofia e sem disfunção e sem histórico de MS ou IC na família. A mãe do paciente foi diagnosticada geneticamente e descobriu-se posteriormente uma hipertrofia septal, mas permanece assintomática. Não tivemos acesso aos dados clínicos para comparação. Tais achados exemplificam a dificuldade em se estabelecerem correlações genótipo-fenótipo com mutações específicas.

5.2.2.3 Presença de múltiplas mutações

Zou et al ⁷³ não encontraram relação de dados clínicos com mutação específica ou gene afetado, mas como número de mutações que um sujeito possuía, estando a presença de múltiplas mutações correlacionadas com espessura máxima de parede septal. Em outros estudos, múltiplas mutações estão normalmente relacionadas a um pior prognóstico ^{74, 75}. No presente estudo foram encontrados três pacientes com múltiplas mutações. Dois possuíam hipertrofia moderada (20 e 23 mm) mas ambos possuíam CH obstrutiva, com gradientes maiores que 60 mmHg. O terceiro paciente que possui a mutação *MYH7-A79T* em homozigose apresentou uma hipertrofia um pouco mais acentuada (26 mm), mas sem obstrução. Dessa forma, concluiu-se que na população deste estudo a presença de múltiplas mutações não significa necessariamente um quadro clínico pior, embora nossa casuística seja claramente limitada.

5.2.2.4 Presença x ausência de mutação

A presença de mutação em um dos genes sarcoméricos já foi associada previamente a um aumento da gravidade da doença. Um dos estudos relatou que a razão de espessura do septo e da parede posterior era maior em pacientes com mutações em genes sarcoméricos quando comparados a pacientes sem mutação ⁷⁶. No presente estudo, percebeu-se que os pacientes com genótipo positivo possuíam uma menor idade, menor idade do diagnóstico, maior frequência cardíaca média e maior frequência de TVNS, sugerindo pior prognóstico. Um estudo com uma coorte alemã semelhante ao presente estudo também relacionou a presença de uma mutação com menor idade de diagnóstico ⁵⁵. Em outro estudo com uma coorte de 203 pacientes Olivotto et al ⁷⁷ encontraram maior disfunção do VE e maior risco de morte cardiovascular em pacientes com uma mutação identificada quando comparado a pacientes sem mutação. Pacientes sem mutação desenvolviam a doença mais tardiamente do que pacientes com a mutação identificada. Segundo Ho ⁷⁰, em um estudo relacionando pacientes com e sem mutação sarcomérica, a presença dessa foi o melhor preditor independente de efeitos adversos, superando variáveis como idade, presença de obstrução do VE e fibrilação atrial. O dado de presença ou ausência de mutação segundo a autora é, por enquanto, a única variável genética que pode ser usada na prática clínica como preditora de fenótipo. Correlações de mutações específicas ou gene mutado com o quadro clínico do

paciente ainda não têm uma boa concordância entre os estudos, de forma que é difícil ainda usar esse tipo de resultado para fazer qualquer tipo de prognóstico.

5.3 Modelo de predição de positividade para o teste genético

O modelo para predição de positividade no teste genético desenvolvido nesse estudo é útil para analisar *a priori* a chance de o paciente possuir a mutação, de forma que seriam incluídos no rastreamento genético pacientes com altas chances de ter um resultado positivo, otimizando o rastreamento e economizando reagentes e tempo de análise. Esse modelo é particularmente importante para centros com pouca verba, já que o teste ainda é muito caro. Em especial no cenário brasileiro, com poucos centros acadêmicos com estrutura e verba para realizar o teste, esse método pode servir como uma triagem rápida. Também para um programa de rastreamento genético de abrangência nacional, pode-se usar essa triagem para otimizar os gastos.

Os valores de sensibilidade e especificidade podem ser ajustados conforme o interesse. No caso de um rastreamento genético amplo, é importante que se possa deixar de testar pacientes que teriam o resultado negativo e maximizar o número de pacientes positivos testados. Nesse caso, a sensibilidade pode ser aumentada alterando-se o valor de *cutoff*. Nas simulações para a população estudada, ajustando-se o *cutoff* de probabilidade predita para 0.34, que representaria uma sensibilidade de aproximadamente 90%, dos 122 indivíduos incluídos na análise, 91

seriam testados. Desses, 60 pacientes seriam efetivamente positivos, enquanto 31 não possuiriam uma mutação identificada. Dos 31 pacientes não testados, apenas teriam o resultado positivo. Dessa forma, não seriam testados 24 pacientes que foram preditos como negativos. Esses valores para um programa de rastreamento nacional podem significar uma economia importante. Ingles et al ⁷⁸ também utilizaram essa abordagem para identificar preditores de positividade do teste genético em uma população CH na Austrália. A análise multivariada dessa população identificou sexo feminino, espessura do VE, história familiar de CH e história família de MS como associadas a uma maior chance de se identificar uma mutação nesses pacientes. Os autores consideraram a história familiar como um preditor chave de resultado genético positivo, com um aumento na chance de se identificar uma mutação quase três vezes maior em pacientes com história familiar quando comparado a pacientes sem história familiar, semelhante ao encontrado no presente estudo. Essa taxa de detecção foi ainda maior quando o probando possuía também histórico familiar de morte súbita. Diferente do encontrado neste estudo, a idade de diagnóstico não foi significativa na população da Austrália, embora o valor tenha sido não significativo com um $p = 0,052$. Outro estudo realizado por Gruner et al ⁷⁹ em uma população CH de Toronto demonstrou que nesses pacientes a idade ao diagnóstico, sexo feminino, história familiar de CH e história familiar de MS também foram relacionados a uma maior probabilidade de identificação de uma mutação. Além disso, o estudo também relacionou dislipidemia e hipertensão arterial como fatores preditivos negativo, com uma frequência maior de ambos em pacientes sem uma mutação identificada. Outros preditores fortes identificados foram os subtipos

de morfologia, conforme já descrito anteriormente ⁸⁰ e a razão de espessura máxima da parede do VE e espessura da parede posterior. Os autores acreditam que essa ferramenta pode ajudar a não só otimizar os gastos mas também ajudar no aconselhamento genético ao fornecer ao paciente uma probabilidade de resultado positivo com base na história familiar e clínica.

5.4 Perspectivas futuras para estudo genético de cardiomiopatia

hipertrófica

Em 2002, a técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) foi desenvolvida para determinar duplicação e deleção de éxon através da síntese de sondas específicas para cada região gênica e se tornou um sucesso no teste e identificação de centenas de mutações em diversos genes ⁸¹. O mais importante avanço na técnica de MLPA foi a geração de sondas por síntese química facilitando a criação de novos kits de sondas para qualquer aplicação desejada ⁸². Dessa forma, existem kits disponíveis para análises de MLPA para muitos genes, incluindo *MYBPC3* e *TNNT2*. Essa técnica surgiu como uma possibilidade de se encontrar mutações não identificáveis por sequenciamento naqueles pacientes que possuíam um fenótipo positivo mas genotipagem negativa, mesmo após análise de todos os genes atualmente relacionados a doença. Um estudo desenvolvido por Pezzoli et al

⁸³ se valeu dessa metodologia para estudar um paciente de 16 anos com quadro clínico típico de CH, histórico familiar positivo, mas sem mutação de ponto identificada em oito genes sarcoméricos analisados por sequenciamento tradicional. A análise por MLPA mostrou uma deleção dos éxons 28 ao 35, incluindo a região 3' UTR e um ensaio com *long range* PCR confirmou a mesma alteração nos familiares. A técnica se mostrou útil nesse caso, mas a frequência de pacientes com alguma alteração desse tipo tanto em *MYBPC3* quanto *TNNT2* se mostrou muito baixa. Nesse estudo específico, além do paciente de 16 anos, também foram testados por MLPA para os dois genes 72 pacientes com resultado de rastreamento genético dos genes mais relacionados negativo e somente um apresentou a alteração citada para o gene *MYBPC3* e nenhum para o gene *TNNT2*. Em uma segunda etapa, os pesquisadores analisaram ainda uma segunda coorte de 113 pacientes com uma mutação identificada para checar se grandes deleções ou inserções não detectadas pelo sequenciamento normal podem influenciar nos fenótipos mais graves e não foi encontrada alteração em nenhum deles. Outro estudo ⁸⁴ analisou os mesmos genes via MLPA em 108 pacientes não relacionados e detectou apenas uma mutação no éxon 29 do gene *MYBPC3*. Nenhuma alteração foi encontrada no gene *TNNT2*. Esses resultados sugerem que grandes deleções ou inserções provavelmente não são causas muito frequentes da CH nos genes *MYBPC3* ou *TNNT2* e principalmente considerando-se o alto custo da técnica, ela não é muito custo efetiva no diagnóstico genético de pacientes portadores de CH. Uma nova tecnologia que surgiu nos últimos anos foi o sequenciamento de próxima geração (*next generation sequencing* – NGS) que se refere a uma grupo de

tecnologias que utiliza uma química distinta do sequenciamento tradicional para avaliar milhares de bases em pouco tempo. Pode ser usada para análise de genomas completos, sequenciamento de transcriptoma total (RNA-seq) ou para avaliação de sítios de DNA de ligação de proteínas regulatórios ou cromatina (ChIP-Seq) ⁸⁵⁻⁸⁷. Uma aplicação recente do NGS que tem se mostrado bastante útil para doenças genéticas cujos genes relacionados sejam muito grandes ou numerosos, o que torna o sequenciamento tradicional trabalhoso e muito caro, é o enriquecimento de fragmentos de interesse antes do sequenciamento. Existem várias técnicas disponíveis mas todas funcionam mais ou menos da mesma forma, capturando ou isolando apenas os fragmentos que se deseja seqüenciar do restante do DNA. Alguns estudos com cardiomiopatia hipertrófica foram realizados com sucesso ⁸⁸, inclusive identificando alterações que não poderiam ser visualizadas por sequenciamento comum, como a alteração identificada por Pezzoli et al ⁸³, que utilizou a técnica e conseguiu identificar a mesma alteração encontrada por MLPA. Entretanto, segundo Voelkerding et al ⁸⁹ o NGS ainda é relativamente jovem na evolução e novos desenvolvimentos podem ser esperados em um futuro próximo. Um refinamento contínuo da química de sequenciamento pode melhorar sua acurácia e dispensar a dupla checagem com sequenciamento tradicional que é realizada hoje para identificação de novas mutações. Avanços e melhoras nas ferramentas de bioinformática também serão indispensáveis para melhor aproveitamento da quantidade de informações obtidas hoje pela tecnologia.

5.5 Custo-efetividade de um programa de rastreamento genético em cascata para CH

O rastreamento em cascata é definido como uma abordagem aos familiares de um paciente afetado por uma doença genética e oferecimento de um teste de DNA preditivo para aqueles em risco potencial, baseado em informações sobre uma mutação genética causal confirmada ⁹⁰. Essa abordagem já foi utilizada em outras doenças genéticas como hipercolesterolemia familiar ⁹¹, fibrose cística ⁹², síndrome do X frágil ⁹³ e síndrome do QT longo ⁹⁰, com sucesso. Um estudo analisando especificamente a custo-efetividade do rastreamento genético de pacientes portadores de CH mostrou que essa abordagem é custo efetiva ²⁸, mesmo utilizando técnicas de sequenciamento de 2ª geração, já que familiares com resultado genético negativo estariam dispensados de avaliações clínicas seriadas e indivíduos em risco poderiam ser diagnosticados precocemente, evitando rastreamento cardíaco custoso e desnecessário. O diagnóstico genético de familiares em risco de desenvolverem a doença é particularmente importante porque a CH pode ser assintomática e ter a morte súbita como primeira manifestação da doença ⁹⁴. Especula-se que a abordagem seja ainda mais custo efetiva com as técnicas de sequenciamento de 3ª geração. O rastreamento em cascata já foi utilizado para essa doença, com resultados positivos ⁹⁴ e foi recomendado pela Sociedade Europeia de Cardiologia ⁹⁵. Familiares com resultado de DNA positivo devem ser encaminhados ao médico para acompanhamento e aconselhados a evitar fatores de

risco para a doença, como descartar carreiras atléticas e adquirir hábitos de vida saudáveis, bem como alertados a respeito do risco de terem filhos portadores da doença. O ponto negativo dessa abordagem é o possível impacto psicológico, tanto nos portadores da mutação assintomáticos, principalmente os jovens, quanto nos familiares negativos. No primeiro caso, a descoberta da mutação pode gerar ansiedade e depressão. No segundo, os familiares podem sentir culpa de sobrevivente. Ainda, os pacientes com clínica duvidosa nos quais não foi identificada uma mutação causal podem experimentar frustração diante da incerteza do resultado. Nesses casos, não se pode excluir a doença, mas também ela não é confirmada⁹⁰. O aconselhamento genético, portanto, deve ser cuidadoso e o mais informativo possível, assim como o acolhimento por parte dos médicos responsáveis.

6. Conclusões

6. Conclusões

1. A técnica sequenciamento de RNA extraído de leucócitos tem um potencial inegável de reduzir custos e tornar o diagnóstico genético mais rápido, mas devido à alta frequência de falsos positivos, à possibilidade de falsos negativos e à baixa taxa de amplificação ela não é adequada para uma rotina de rastreamento em larga escala para CH.

2. Foi identificada uma mutação em aproximadamente 50% dos indivíduos testados rastreando-se apenas os três genes mais importantes para CH. Esse resultado é comparável ao encontrado em outras populações testadas no mundo, sugerindo que também na nossa população esses genes são os mais prevalentes.

3. Algumas mutações específicas foram encontradas em alta frequência na nossa população de pacientes portadores de CH e foram identificadas 24 mutações novas não descritas na literatura, sugerindo que embora os genes causais sejam os mesmos de outras populações, o perfil genético de pacientes portadores de CH no Brasil é distinto e deve ser mais bem investigado.

4. A identificação de uma mutação específica ainda não pode ser usada para prognóstico de gravidade da CH, mas a presença de uma mutação em um dos genes

estudados se correlacionou com menor idade dos pacientes, menor idade do diagnóstico, maior frequência cardíaca média e maior frequência de TVNS quando comparados a pacientes sem mutação identificada, sugerindo um pior prognóstico para esses pacientes.

5. Mutações no gene *MYH7* foram relacionadas ao maior tamanho de átrio e à maior frequência de fibrilação atrial nos pacientes, indicando que mutações nesse gene também sugerem um pior prognóstico.

6. A presença de múltiplas mutações não foi um indicativo de pior prognóstico na nossa coorte, mas o número de pacientes nessa categoria foi pequeno não sendo possível realizar uma análise estatística confiável.

7. Esse é o primeiro trabalho a caracterizar a epidemiologia molecular da CH em pacientes brasileiros para os três genes mais importantes na doença.

7. Anexos

7. Anexos

Anexo A - Sequência dos *primers* utilizados para reação da *nested PCR*

Fragmento	Primer Forward	Primer Reverse	Temperatura de anelamento
MYBPC3			
A	TGTGACGTCTCTCAGGATGC	CGTCAATGGTCAGTTTGTGG	50°C
A1	TAGCAAGAAGCCACGGTCAG	TCCAGAATCCCAGTGTCTC	62°C
A2	CAAGTGGTTCAAGGGCAAAT	GTCTGCGATGCTCTGGTACA	56°C
B	GCCCCCTGTGCTCATCACGC	CTGGGGGGACCGATAGGCATG	50°C
B1	GTGGAGCTGACCCGGGAGGAGA	CCTGGACATGCCGATGGCGT	55°C
C	CCTGGAGCGCAAGAAGAAGAGCTACC	CAACTCCCTCCAGGCTCCTGGCA	50°C
C1	GCATGATCGAGGGCGTGGTGTACG	CCTGTAAGTTGGTGGCCCTGCAGACATAG	60°C
TNNT2			
AF	CTGCTGTTCTGAGGGAGAGC	CCATTTCCAAACAGGAGCTG	50°C
A1	CTGGAGAGAGGACGAAGACG	GAGCGAGGAGCAGATCTTTG	55°C
MYH7			
A	CACAGCTCTGTCCTGCTCTG	CGTCACCATCCAGTTGAACA	-
A1	TGTCTTTCCCTGCTGCTCTC	ACGGTCACTGTCTTGCCATA	-
A2	GTCTTCGTGCCTGATGACAA	GTACACCGGCAGCCACTT	-
A3	CAACCTCAAGGATCGTACG	CCCAATGGCTGCAATAACA	-
A4	AGAATCCGGAGCAGGGAAG	TCAGCTGGAAAATAACTCTGGA	-
A5	TTGGGGCAACAGGAAAGTT	CATGGAGTTTTTCTCCTCTGAA	-
A6	CTCATTGATGACGCTGAGG	ATCACCTGCTGGACATTCTG	-
B	TACCTCATGGGGCTGAACTC	GGACACCATCTTCTCTCCA	-
B1	ACCTGCTCAAGGGGCTGT	CATGTGGTGGTTGAAGAACTG	-
B2	GCTTCGAGATCTTCGATTCA	GGAAGTTGGCGGATTTGC	-
B3	AGTGCATGTTCCCAAGG	TGCCTTGCCCTTCTCAATA	-
B4	TCTTCCCTCAAGCTGCTCAG	GGAAGCCTTCTCTGCAGAT	-
B5	ATGGACAACCCCTGGTC	CAGCCTCTCGTCCCTCATT	-
B6	GGCCACACCAAGGTGTTCT	GCGTGTGAACTCCTCCTTCA	-
C	GACTCCCTGCTGGTAATCCA	CCATTCTCGGTTTGCAACTT	-
C1	ATCAAGCCGCTGCTGAAG	GCTGATCACAGCGCTCCT	-
C2	GCTGCAGGAGAAGAATGACC	TGTCAGGTTTTTCACCTTGTTT	-
C3	TGATCTGGAGCTGACACTGG	GTCCATGCGCACCTTCTT	-
C4	CCAAAGTCAAGCTGGAGCA	GTCCTTGAGCTTCTTCTGC	-
C5	CTGAATGCTCTCAACGCAAG	CGCCGCATCTTCTGGAAC	-
C6	GGAGCTGGAGGAGATCAGC	AGGTTAGCCTTGGCCTTGAT	-
D	GCGAGCAGATCGACAACCT	ACGCAACTCCTCCAGCTCAG	-
D1	GCAGAAGCTGGAGAAGGAGA	AGCTGCTGGGTGTAGGTGAG	-
D2	CTGGATGAGAAGGAGGCACT	CCTCCTCGAGCTCCTCAGT	-
D3	GTCCTTTCCAAGGCCAACTC	CTTCCACTCGGCCAGGAT	-
D4	TAGAGCGCTCCAATGCTG	GCTTTCGGACCTTCTCCAG	-

D5	AACAAAAACCTGCAGGAGGA	GGAGGTCTGCAGCGAGTC	-
D6	GGCAGAGAAGGACGAGGAG	CCACGATGGCGATGTTCT	-
E	CCTCCAGAGCTTGTTGAAGG	TTTCTCGGCTTCAAGGAAAA	-
E1	TCAGCTGGACGATGCAGT	GCCTTCTCCTCAGCATTCC	-
E2	ACCTGTCCCAGCTCCAGAC	CTCGGCCTCCAGCTCATT	-
E3	GCAAGAAGCAGCTGCAGAA	CCTCTGCCTCATCCAGCTC	-
E4	AAAGGTCAAGGCCTACAAGC	CTGTTACACAGGCTCCAGCA	-

Anexo B - Sequência dos *primers* utilizados para PCR do DNA

Gene	Éxon	PrimerForward	Primer Reverse
MYH7	3	TCTTGACTCTTGAGCATGGTGCTA	TCTGTCCACCCAGGTGTACAGGTG
MYH7	4	AGGAAGGAGGGAAAGCCCAGGCTG	TCTGCATGCACTCAATCTGAGTAA
MYH7	5	ATCTTTCTCTAACTCCCAAAATCA	ACTCACGTGATCAGGATGGACTGG
MYH7	6	TGTCACCGTCAACCCTTACAAGTG	GAGGCTGAGTCTATGCCTCGGGG
MYH7	7	CTTGCTGGTCTCCAGTAGTATTGT	CTGCGGTACAGGACCTTGGAGGGC
MYH7	8	GCCCTCCAAGGTCCTGTACCGCAG	GTCCAAGTCCAAGGCCAAGGTCA
MYH7	9	GACAACTCCTCCGCTTCGTG	AACAGAGGGAGGGAGGGGAGAG
MYH7	10	CCTTTTGCTTGCTACATTATCAT	GCCACAAGCAGAGGGGACCAG
MYH7	11	CTGCTTCCTCAGGCCATGTGCTGT	ACCAATGGCCAGAGTCTTAGCTCT
MYH7	12	CACAGGGATTAAGGAGACAAGTTT	TTACAGCTGCCCCAAGAATC
MYH7	13	AGTCATCTCTTTACCAACTTTGCTA	ATTATCATCTGAAGATGGACCCACC
MYH7	14	CAAGTTCACCTTCCCAACAAC	ATGTGGGAGCGAGTGAGTGAT
MYH7	15	ACTCACACCCACTTTCTGACT	GAATTCAGGTGGTAAGGCCAA
MYH7	16	ATAACTGTACTCAGAGCTGAGCCTA	TCCATCCCACTGAGTCTGTAAACCT
MYH7	17	GCAAATGCCAGCAAGGATGTAAAG	AGAGAAGGGAGATGGGAAGTAA
MYH7	18	CATCTCTGTGACTTCTCGAATTCT	CACTGTGGTGGTAGGTAGGGAGAT
MYH7	19	ACAAAGCCAGGATCAGAACCCAGA	GTCCAGAGTCACCCATGCTCTGCA
MYH7	20	TGGGTATGAGGGTGCACCAAGAGCT	GCATCAGAGGAGTCAATGGAAAAG
MYH7	21	TAGGCTGTTACCCTTCCTAAG	GCCTCTGACCTGTGACTGCA
MYH7	22	GGACCTCAGGTAGGAAGGAGGCAG	TGTGCAGGGAGGTGCAGGGTTGTG
MYH7	23	TCCTATTTGAGTGATGTGCCTCTC	ATGGTCTGAGAGTCTGATGAGAC
MYH7	24	AGATGGCACCAAGCTGGTGACCTT	TCTGGGCACAGATAGACATGGCAT
MYH7	25	GGCAATCTCACAGTCCCTAATAA	TTTTTGCCAGGGAGGACCATCTAA
MYH7	26	ACTCTTTACCTGTATCATTACCAT	GCCTCCATGGACACATAATCAGTT
MYH7	27	TCTGAGCCCTTTGTGTCTGA	GGAGGAGGAAGTTGGAGGAG
MYH7	28	TTTCCCACTTCCTTCCTCT	GAGACTGTGGTGGGAACCAT
MYH7	29	ATGGTTCCCAACACAGTCTC	TATTGCTGGGAAGGGAAGTG
MYH7	30	GTGGGGTTGCTTTATGGAGA	CCCTGAGAGGAGAAGGAGGT
MYH7	31	TGTTTCCTCTTGTCCTCATC	CTCTGGCCTCTCACTGAACC
MYH7	32	GGTTCAGTGAGAGGCCAGAG	ACACGGTAACTCGGTTGAGG
MYH7	33	CCTCAACCGAGTTACCGTGT	GGATGAGAACAGGGACCAAA
MYH7	34	TTTCTCCACCTTCTGCTTC	CAGTCCCTCTGGGTGAGTA
MYH7	35	TACTACCCAGAGGGGACTG	CTCCCTTCAGGAATGAGCAG
MYH7	36	GCTCAATGCTTTCTGCTC	ACGGAGAGACACTGGTCTGG
MYH7	37	CCGATCCAGACCAAGTGTCTC	TCCTCAGCTGGTTGTCACTG
MYH7	38	ATGACTGTGCCATCTTCACC	TTCTCAGACTCTGGCTTGG
MYH7	39	CCAAGCCAGGAGTCTGAGAA	ATGTGGCTCAAGTGTGTGGA
MYH7	40	GCCCAATACCATCTCTCAA	GCATTTCCACCTCCCCTAGT
MYBPC3	1	GACCTCAGCTCTCTGGAATTCATC	GCTCAGAGGCCACGTCTCTGTCAA
MYBPC3	2	GTGCACGCTCCAACCAAG	CAGCAAAGGCAAGAAAGTGTG
MYBPC3	3	CTGGGACGGGGAGGAGAATGTG	GCTTTTGAGACCTGCCCTGGAC
MYBPC3	4	GGGCACCTGCGGTCCAGCTAACT	ACGCGGGCTGAGAAGGTGATG

MYBPC3	5	GTGAGTGTGAGCTGCTGTGC	GCTCTCCATGTCCCCTCTCT
MYBPC3	6	CTGGAGCTCCTGGTCTTATGTGAT	GGAGCCGTGACACCAAGATGATAA
MYBPC3	7	GCTTCTCAAACGGCCCCCTCTG	AGCTCCGCCCCGCAAATCATCC
MYBPC3	8-9	CCAGGCAGGTGAGGATACTG	AGGTGCAGTGTTGTGCTCAG
MYBPC3	10	CGGCTCCCCACGGACAG	CCCAGGCCAGGCAGGACT
MYBPC3	11	TCCCCAGCCCCTCTTCA	GCCGGACTCCGCTCTTT
MYBPC3	12	GGTGCTCAGCTTTTCAAG	GCACCGATGGACTCAAAGAT
MYBPC3	13	AACACTTCAACGGCCCCCTTCTG	GCCCCCTCCTCCGATACTTCACAC
MYBPC3	14	ACCTGAGGATGTGGGAACCT	CAAGTGCTGTGGCCTCTTCT
MYBPC3	15	GGAGGAGGGGGCGCAAGTCAAAT	GTCAAAGGCCCAAGGTCACAGAGG
MYBPC3	16	ACAGGCACACGTGTTTTAC	CAGTCTCCACCTGTCCCATC
MYBPC3	17-18	AGAATACCAACAAGCCAGGACAAG	GCGGGAAAGTGAGCAGAACC
MYBPC3	19	TCCTCCTGGCTCTCCGTTTCTCT	GCGCCCCCTCTGCTGCTTCTTC
MYBPC3	20	GCTCCTCTGCTCCCTACTTCC	ATGGCCATCAGCACACTTCAC
MYBPC3	21	TCGGTGCCACAGAGATGATTTTGA	GGCTGCCCCCTCTGTGTTCTCCA
MYBPC3	22	CCTGTGGCGGTTAGTTGG	CACCGGTAGCTCTTCTTCTTCTTG
MYBPC3	23	AAACAGATCCGAGGGAAGGT	GTATCCCCAGTCGAGGATGA
MYBPC3	24	GGAAGTGCCCCCTATGT	TCGCACTGCTCAAAGAAG
MYBPC3	25	GGTGTCAGTGGTGACACAGC	CTCCAACCCCTCTGTCTCT
MYBPC3	26	GCCTGGAGTTGCTGTGTTAG	GGCTGCCCCCTTTTGGTC
MYBPC3	27	GCGGCCGGCCCTTGAGT	TGGAATGTGAGCTGTGGGTTGG
MYBPC3	28	ACCCACAGCTCACATTTTCC	GGGATTGAGATCAGCAGAGG
MYBPC3	29	GCAGTACCCTTCACTGTCC	ACACAAAGCTAGGCCCTCT
MYBPC3	30	AGAGGGGCCTAGCTTTGTGT	GGAGAGGACTGCTCAACGTC
MYBPC3	31	GCAGGGCCATGTACTIONCTTG	CCGCCCGCTCTTCCATCTC
MYBPC3	32	CACAGTGACATGGCCTCCTTCT	GCCCCCTACAGCCTCCATTACT
TNNT2	2	GCCAGAGCTCTTCTGAGGAA	GCCCCAAACACACAGCTA
TNNT2	3-4	ATGAGAACGGCAGGCCAGGCTAGTG	GTTTGCCTCAAGACCCGAGCAACC
TNNT2	5	GTAGTGGCTTGGAATTGGA	CAGCAGAAAGCACACAGAA
TNNT2	6	TTGACCCAGCGTTCTTGTGTC	ACTGGGTGCCACCAATGCAACTTC
TNNT2	7	CCAGTGCCGGGAGGGACTCAC	CAGCCCGTGCTCACTGCACCATAC
TNNT2	8	GGATCAGGGCCCTGCCTGTCTGGAC	TCCTCCTCTTTCTTCTGTTCT
TNNT2	9	GCCAGGCCCTGCCAGAGGTCTT	CCCTGGGGGAGGCCTGAAACAG
TNNT2	10	GCGATGTCACCTTCTCCCTA	GACGCAGGCATTTCTGTCTT
TNNT2	11	CCTGGGCAACAAGAGTGAA	CACCTCATTCCTCAGGGCTA
TNNT2	12	GTAAACCCGGCTGACTACAG	AGCCAGCCCAATCTCTTAC
TNNT2	13	CAGGGGGTTTGGGGAGGGTTAG	GTGGGGCACCTGCTCAGTTCTCT
TNNT2	14	GGAGGGCCCTTCTTACTGGAC	CCGGACCCAGTGAACCAGGAGGAG
TNNT2	15	GCCCCCTCTGACCCTTAATATCC	CGGAGGAGCCAGAGAAGGAAACCT
TNNT2	16	GGGGGTGAAATGTGGGGCGGAGAA	GTGTGGGGGCAGGCAGGAGTGGTG

Anexo C - Coordenadas de probabilidade predita com os valores de *cutoff* e a sensibilidade e especificidade do modelo em cada ponto.

Probabilidade predita			
Positivo se maior ou igual a	Sensibilidade	1 - especificidade	Especificidade
0	1	1	0
0,069673	1	0,982	0,018
0,080983	1	0,964	0,036
0,096794	1	0,945	0,055
0,113155	1	0,927	0,073
0,120165	1	0,909	0,091
0,125029	1	0,891	0,109
0,129737	1	0,873	0,127
0,144968	1	0,855	0,145
0,15604	1	0,836	0,164
0,165799	1	0,818	0,182
0,185474	1	0,8	0,2
0,208514	1	0,782	0,218
0,222121	1	0,764	0,236
0,224195	1	0,745	0,255
0,235065	0,985	0,745	0,255
0,247041	0,97	0,745	0,255
0,250253	0,955	0,745	0,255
0,255368	0,94	0,745	0,255
0,26705	0,94	0,727	0,273
0,279486	0,94	0,709	0,291
0,286064	0,94	0,691	0,309
0,288758	0,94	0,673	0,327
0,293571	0,94	0,655	0,345
0,298071	0,94	0,636	0,364
0,302587	0,925	0,636	0,364
0,307801	0,925	0,618	0,382
0,309334	0,925	0,6	0,4
0,313602	0,91	0,6	0,4
0,324911	0,91	0,582	0,418
0,334236	0,91	0,564	0,436
0,341172	0,896	0,564	0,436
0,351984	0,881	0,564	0,436
0,369423	0,881	0,545	0,455
0,381826	0,881	0,527	0,473
0,386039	0,881	0,509	0,491
0,391758	0,866	0,509	0,491
0,398083	0,851	0,509	0,491
0,409323	0,836	0,509	0,491
0,423474	0,836	0,491	0,509
0,438858	0,821	0,491	0,509

0,448157	0,821	0,473	0,527
0,456675	0,821	0,455	0,545
0,468129	0,821	0,436	0,564
0,47277	0,806	0,436	0,564
0,475212	0,806	0,418	0,582
0,490269	0,806	0,4	0,6
0,504559	0,806	0,382	0,618
0,505381	0,791	0,382	0,618
0,506633	0,776	0,382	0,618
0,514028	0,761	0,382	0,618
0,522757	0,746	0,382	0,618
0,525118	0,746	0,364	0,636
0,531972	0,746	0,345	0,655
0,550955	0,746	0,327	0,673
0,566055	0,731	0,327	0,673
0,57035	0,716	0,327	0,673
0,572556	0,701	0,327	0,673
0,573535	0,687	0,327	0,673
0,573798	0,687	0,309	0,691
0,575928	0,672	0,309	0,691
0,586576	0,657	0,309	0,691
0,595244	0,657	0,291	0,709
0,601544	0,657	0,273	0,727
0,608004	0,642	0,273	0,727
0,610256	0,627	0,273	0,727
0,618442	0,612	0,273	0,727
0,624817	0,612	0,255	0,745
0,630262	0,597	0,255	0,745
0,643462	0,597	0,236	0,764
0,65213	0,582	0,236	0,764
0,654117	0,567	0,236	0,764
0,655572	0,567	0,218	0,782
0,656626	0,567	0,2	0,8
0,657577	0,552	0,2	0,8
0,660734	0,537	0,2	0,8
0,66469	0,537	0,182	0,818
0,666593	0,522	0,182	0,818
0,672605	0,522	0,164	0,836
0,679329	0,507	0,164	0,836
0,68124	0,493	0,164	0,836
0,687838	0,493	0,145	0,855
0,695556	0,478	0,145	0,855
0,697628	0,478	0,127	0,873
0,699514	0,463	0,127	0,873

0,70064	0,448	0,127	0,873
0,701488	0,448	0,109	0,891
0,71037	0,448	0,091	0,909
0,720346	0,448	0,073	0,927
0,72294	0,433	0,073	0,927
0,730869	0,433	0,055	0,945
0,744763	0,433	0,036	0,964
0,752226	0,418	0,036	0,964
0,753491	0,403	0,036	0,964
0,758294	0,388	0,036	0,964
0,765148	0,373	0,036	0,964
0,77026	0,358	0,036	0,964
0,778804	0,343	0,036	0,964
0,784861	0,328	0,036	0,964
0,784995	0,313	0,036	0,964
0,788747	0,299	0,036	0,964
0,793116	0,284	0,036	0,964
0,793819	0,269	0,036	0,964
0,803493	0,254	0,036	0,964
0,814736	0,239	0,036	0,964
0,816982	0,224	0,036	0,964
0,818429	0,209	0,036	0,964
0,820136	0,194	0,036	0,964
0,829318	0,179	0,036	0,964
0,840505	0,164	0,036	0,964
0,843447	0,149	0,036	0,964
0,851453	0,134	0,036	0,964
0,862099	0,134	0,018	0,982
0,869803	0,119	0,018	0,982
0,883182	0,104	0,018	0,982
0,892274	0,09	0,018	0,982
0,894733	0,075	0,018	0,982
0,896816	0,06	0,018	0,982
0,900066	0,045	0,018	0,982
0,905906	0,03	0,018	0,982
0,918487	0,015	0,018	0,982
0,941991	0	0,018	0,982
1	0	0	1

8. Referências

8. Referências

1. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 1997;350(9071):127-133.
2. Richard P, Villard E, Charron P, Isnard R. The Genetic Bases of Cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(9_Suppl_A):A79-89.
3. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*. 1995;92(4):785-789.
4. Abchee AB, Roberts R. Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy *Progress in Pediatric Cardiology*. 1999;6(1):63-70.
5. Maron BJ, Roberts WC, Epstein SE. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: a profile of 78 patients. *Circulation*. 1982;65(7):1388-1394.
6. Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(3):201-211.
7. Olsson MC, Palmer BM, Stauffer BL, Leinwand LA, Moore RL. Morphological and functional alterations in ventricular myocytes from male transgenic mice with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2004;94(2):201-207.
8. Andersen PS, Havndrup O, Hougs L, Sorensen KM, Jensen M, Larsen LA, Hedley P, Thomsen AR, Moolman-Smook J, Christiansen M, Bundgaard H. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Hum Mutat*. 2009;30(3):363-370.
9. Matsumoto Y, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Hiroi S, Nakamura T, Arimura T, Nakamura K, Ashizawa N, Yasunami M, Ohe T, Yano K, Kimura A. Functional analysis of titin/connectin N2-B mutations found in cardiomyopathy. *J Muscle Res Cell Motil*. 2005;26(6-8):367-374.
10. Bos JM, Poley RN, Ny M, Tester DJ, Xu X, Vatta M, Towbin JA, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab*. 2006;88(1):78-85.
11. Vikstrom KL, Factor SM, Leinwand LA. Mice expressing mutant myosin heavy chains are a model for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Med*. 1996;2(5):556-567.
12. Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, Seidman JG. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science*. 1996;272(5262):731-734.
13. Fatkin D, Christe ME, Aristizabal O, McConnell BK, Srinivasan S, Schoen FJ, Seidman CE, Turnbull DH, Seidman JG. Neonatal cardiomyopathy in mice homozygous for the Arg403Gln mutation in the alpha cardiac myosin heavy chain gene. *J Clin Invest*. 1999;103(1):147-153.
14. Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J. A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1292-1300.

15. Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L, Sweeney HL. Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1995;95(3):1409-1414.
16. Watkins H, Seidman CE, Seidman JG, Feng HS, Sweeney HL. Expression and functional assessment of a truncated cardiac troponin T that causes hypertrophic cardiomyopathy. Evidence for a dominant negative action. *J Clin Invest.* 1996;98(11):2456-2461.
17. Ashrafian H, Redwood C, Blair E, Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet.* 2003;19(5):263-268.
18. Belus A, Piroddi N, Scellini B, Tesi C, Amati GD, Girolami F, Yacoub M, Cecchi F, Olivotto I, Poggesi C. The familial hypertrophic cardiomyopathy-associated myosin mutation R403Q accelerates tension generation and relaxation of human cardiac myofibrils. *J Physiol.* 2008;586(Pt 15):3639-3644.
19. Baudenbacher F, Schober T, Pinto JR, Sidorov VY, Hilliard F, Solaro RJ, Potter JD, Knollmann BC. Myofilament Ca^{2+} sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3893-3903.
20. Robinson P, Mirza M, Knott A, Abdulrazzak H, Willott R, Marston S, Watkins H, Redwood C. Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac troponin T mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by troponin T mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40710-40716.
21. Guinto PJ, Haim TE, Dowell-Martino CC, Sibinga N, Tardiff JC. Temporal and mutation-specific alterations in Ca^{2+} homeostasis differentially determine the progression of cTnT-related cardiomyopathies in murine models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(2):H614-626.
22. Marian AJ, Mares A, Jr., Kelly DP, Yu QT, Abchee AB, Hill R, Roberts R. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. *Eur Heart J.* 1995;16(3):368-376.
23. al-Mahdawi S, Chamberlain S, Chojnowska L, Michalak E, Nihoyannopoulos P, Ryan M, Kusnierczyk B, French JA, Gilligan DM, Cleland J, et al. The electrocardiogram is a more sensitive indicator than echocardiography of hypertrophic cardiomyopathy in families with a mutation in the MYH7 gene. *Br Heart J.* 1994;72(2):105-111.
24. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, Isnard R, Hagege A, Langlard JM, Bonne G, Richard P, Hainque B, Bouhour JB, Schwartz K, Komajda M. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation.* 1998;97(22):2230-2236.
25. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation.* 2002;105(4):446-451.
26. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG, et al. Mutations in the

- genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1995;332(16):1058-1064.
27. Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, Watkins H. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(3):549-555.
 28. Wordsworth S, Leal J, Blair E, Legood R, Thomson K, Seller A, Taylor J, Watkins H. DNA testing for hypertrophic cardiomyopathy: a cost-effectiveness model. *Eur Heart J*. 2010;31(8):926-935.
 29. Miller TE, You L, Myerburg RJ, Benke PJ, Bishopric NH. Whole blood RNA offers a rapid, comprehensive approach to genetic diagnosis of cardiovascular diseases. *Genet Med*. 2007;9(1):23-33.
 30. Pegoraro E, Gavassini BF, Borsato C, Melacini P, Vianello A, Stramare R, Cenacchi G, Angelini C. MYH7 gene mutation in myosin storage myopathy and scapulo-peroneal myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(4):321-329.
 31. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-386.
 32. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081.
 33. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-249.
 34. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575-576.
 35. Rosenzweig A, Watkins H, Hwang DS, Miri M, McKenna W, Traill TA, Seidman JG, Seidman CE. Preclinical diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *N Engl J Med*. 1991;325(25):1753-1760.
 36. Fonknechten N, Chelly J, Lepercq J, Kahn A, Kaplan JC, Kitzis A, Chomel JC. CFTR illegitimate transcription in lymphoid cells: quantification and applications to the investigation of pathological transcripts. *Hum Genet*. 1992;88(5):508-512.
 37. Kraev N, Loke JC, Kraev A, MacLennan DH. Protocol for the sequence analysis of ryanodine receptor subtype 1 gene transcripts from human leukocytes. *Anesthesiology*. 2003;99(2):289-296.
 38. Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(6):2331-2335.
 39. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011.
 40. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(9):1903-1910.
 41. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and

- late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998;338(18):1248-1257.
42. Maron BJ, Niimura H, Casey SA, Soper MK, Wright GB, Seidman JG, Seidman CE. Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(2):315-321.
 43. Morita H, Rehm HL, Menesses A, McDonough B, Roberts AE, Kucherlapati R, Towbin JA, Seidman JG, Seidman CE. Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1899-1908.
 44. Gandjbakhch E, Gackowski A, Tezenas du Montcel S, Isnard R, Hamroun A, Richard P, Komajda M, Charron P. Early identification of mutation carriers in familial hypertrophic cardiomyopathy by combined echocardiography and tissue Doppler imaging. *Eur Heart J*. 2010;31(13):1599-1607.
 45. Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: a marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(2):182-190.
 46. Moolman JC, Brink PA, Corfield VA. Identification of a novel Ala797Thr mutation in exon 21 of the beta-myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat*. 1995;6(2):197-198.
 47. Moolman-Smook JC, De Lange WJ, Bruwer EC, Brink PA, Corfield VA. The origins of hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in two South African subpopulations: a unique profile of both independent and founder events. *Am J Hum Genet*. 1999;65(5):1308-1320.
 48. Van Driest SL, Jaeger MA, Ommen SR, Will ML, Gersh BJ, Tajik AJ, Ackerman MJ. Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(3):602-610.
 49. Walsh R, Rutland C, Thomas R, Loughna S. Cardiomyopathy: a systematic review of disease-causing mutations in myosin heavy chain 7 and their phenotypic manifestations. *Cardiology*. 2009;115(1):49-60.
 50. Girolami F, Olivotto I, Passerini I, Zachara E, Nistri S, Re F, Fantini S, Baldini K, Torricelli F, Cecchi F. A molecular screening strategy based on beta-myosin heavy chain, cardiac myosin binding protein C and troponin T genes in Italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2006;7(8):601-607.
 51. Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet*. 2005;42(10):e59.
 52. Erdmann J, Daehmlow S, Wischke S, Senyuva M, Werner U, Raible J, Tanis N, Dyachenko S, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet*. 2003;64(4):339-349.
 53. Mora R, Merino JL, Peinado R, Olias F, García-Guereta L, Cerro MJd, Tarín MN, Molano J. Hypertrophic Cardiomyopathy: Infrequent Mutation of the Cardiac Beta-Myosin Heavy-Chain Gene. *Rev Esp Cardiol*. 2009;59(8):4.
 54. Roncarati R, Latronico MV, Musumeci B, Aurino S, Torella A, Bang ML, Jotti GS, Puca AA, Volpe M, Nigro V, Autore C, Condorelli G. Unexpectedly low mutation rates in beta-myosin heavy chain and cardiac

- myosin binding protein genes in italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cell Physiol.* 2011;226(11):2894-2900.
55. Waldmuller S, Erdmann J, Binner P, Gelbrich G, Pankuweit S, Geier C, Timmermann B, Haremza J, Perrot A, Scheer S, Wachter R, Schulze-Waltrup N, Dermintzoglou A, Schonberger J, Zeh W, Jurmann B, Brodherr T, Borgel J, Farr M, Milting H, Blankenfeldt W, Reinhardt R, Ozelik C, Osterziel KJ, Loeffler M, Maisch B, Regitz-Zagrosek V, Schunkert H, Scheffold T. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure. *Eur J Heart Fail.* 2011;13(11):1185-1192.
 56. Harris SP, Bartley CR, Hacker TA, McDonald KS, Douglas PS, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circ Res.* 2002;90(5):594-601.
 57. Marsiglia JD, Batitucci Mdo C, Paula F, Barbirato C, Arteaga E, Araujo AQ. [Study of mutations causing hypertrophic cardiomyopathy in a group of patients from Espirito Santo, Brazil]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(1):10-17.
 58. Tirone AP, Arteaga E, Pereira Ada C, Krieger JE, Buck Pde C, Ianni BM, Mady C. [Research of markers for the genes of the heavy chain of cardiac beta-myosin and myosin binding protein C in relatives of patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(6):467-472.
 59. Carstens N, van der Merwe L, Revera M, Heradien M, Goosen A, Brink PA, Moolman-Smook JC. Genetic variation in angiotensin II type 2 receptor gene influences extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy independent of blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011;12(3):274-280.
 60. Funada A, Konno T, Fujino N, Muramoto A, Hayashi K, Tsubokawa T, Sakata K, Kawashiri MA, Takeda Y, Ino H, Yamagishi M. Impact of renin-angiotensin system polymorphisms on development of systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Evidence from a study of genotyped patients. *Circ J.* 2010;74(12):2674-2680.
 61. Wang S, Zou Y, Fu C, Xu X, Wang J, Song L, Wang H, Chen J, Huan T, Hui R. Worse prognosis with gene mutations of beta-myosin heavy chain than myosin-binding protein C in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol.* 2008;31(3):114-118.
 62. Thamilarasan M, Klein AL. Factors relating to left atrial enlargement in atrial fibrillation: "chicken or the egg" hypothesis. *Am Heart J.* 1999;137(3):381-383.
 63. Vaziri SM, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 1994;89(2):724-730.
 64. Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Kronmal RA, Cushman M, Fried LP, White R, Furberg CD, Rautaharju PM. Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults. *Circulation.* 1997;96(7):2455-2461.
 65. Tani T, Tanabe K, Ono M, Yamaguchi K, Okada M, Sumida T, Konda T, Fujii Y, Kawai J, Yagi T, Sato M, Ibuki M, Katayama M, Tamita K, Yamabe K, Yamamuro A, Nagai K, Shiratori K, Morioka S. Left atrial volume and the risk of paroxysmal atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr.* 2004;17(6):644-648.

66. Losi MA, Betocchi S, Aversa M, Lombardi R, Miranda M, D'Alessandro G, Cacace A, Tocchetti CG, Barbati G, Chiariello M. Determinants of atrial fibrillation development in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2004;94(7):895-900.
67. Melacini P, Basso C, Angelini A, Calore C, Bobbo F, Tokajuk B, Bellini N, Smaniotto G, Zucchetto M, Illiceto S, Thiene G, Maron BJ. Clinicopathological profiles of progressive heart failure in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2010;31(17):2111-2123.
68. Papavassiliu T, Germans T, Fluchter S, Doesch C, Suriyakamar A, Haghi D, Suselbeck T, Wolpert C, Dinter D, Schoenberg SO, van Rossum AC, Borggrefe M. CMR findings in patients with hypertrophic cardiomyopathy and atrial fibrillation. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2009;11:34.
69. Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Hirota T, Hayato K, Yamasaki N, Matsumura Y, Yabe T, Takata J, Doi YL. Clinical impact of atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Results from Kochi RYOMA Study. *Circ J.* 2009;73(9):1599-1605.
70. Ho CY. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2010;122(23):2430-2440; discussion 2440.
71. Landstrom AP, Ackerman MJ. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2010;122(23):2441-2449; discussion 2450.
72. Enjuto M, Francino A, Navarro-Lopez F, Viles D, Pare JC, Ballesta AM. Malignant hypertrophic cardiomyopathy caused by the Arg723Gly mutation in beta-myosin heavy chain gene. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(12):2307-2313.
73. Zou Y, Wang J, Liu X, Wang Y, Chen Y, Sun K, Gao S, Zhang C, Wang Z, Zhang Y, Feng X, Song Y, Wu Y, Zhang H, Jia L, Wang H, Wang D, Yan C, Lu M, Zhou X, Song L, Hui R. Multiple gene mutations, not the type of mutation, are the modifier of left ventricle hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Biol Rep.* 2013.
74. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, Baldi M, Will ML, Baldini K, Torricelli F, Yeates L, Cecchi F, Ackerman MJ, Olivetto I. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(14):1444-1453.
75. Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Baba Y, Hirota T, Hayato K, Yamasaki N, Matsumura Y, Otsuka H, Arimura T, Kimura A, Doi YL. Genetic screening and double mutation in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J.* 2011;75(11):2654-2659.
76. Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, Kitaoka H, Nakamura H, Nakamura K, Okamoto H, Ichida F, Ayusawa M, Nunoda S, Isobe M, Matsuzaki M, Doi YL, Fukuda K, Sasaoka T, Izumi T, Ashizawa N, Kimura A. Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J.* 2012;76(2):453-461.
77. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, Nistri S, Bos JM, Zachara E, Ommen SR, Theis JL, Vaubel RA, Re F, Armentano C, Poggesi C, Torricelli F, Cecchi F. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of

- patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(6):630-638.
78. Ingles J, Sarina T, Yeates L, Hunt L, Macciocca I, McCormack L, Winship I, McGaughan J, Atherton J, Semsarian C. Clinical predictors of genetic testing outcomes in hypertrophic cardiomyopathy. *Genet Med.* 2013.
 79. Gruner C, Ivanov J, Care M, Williams L, Moravsky G, Yang H, Laczay B, Siminovitch K, Woo A, Rakowski H. Toronto hypertrophic cardiomyopathy genotype score for prediction of a positive genotype in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;6(1):19-26.
 80. Binder J, Ommen SR, Gersh BJ, Van Driest SL, Tajik AJ, Nishimura RA, Ackerman MJ. Echocardiography-guided genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy: septal morphological features predict the presence of myofilament mutations. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(4):459-467.
 81. Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis.* 2008;29(23):4627-4636.
 82. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
 83. Pezzoli L, Sana ME, Ferrazzi P, Iascone M. A new mutational mechanism for hypertrophic cardiomyopathy. *Gene.* 2012;507(2):165-169.
 84. Bagnall RD, Yeates L, Semsarian C. The role of large gene deletions and duplications in MYBPC3 and TNNT2 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2009;145(1):150-153.
 85. Hillier LW, Marth GT, Quinlan AR, Dooling D, Fewell G, Barnett D, Fox P, Glasscock JI, Hickenbotham M, Huang W, Magrini VJ, Richt RJ, Sander SN, Stewart DA, Stromberg M, Tsung EF, Wylie T, Schedl T, Wilson RK, Mardis ER. Whole-genome sequencing and variant discovery in *C. elegans*. *Nat Methods.* 2008;5(2):183-188.
 86. Schmidt D, Wilson MD, Spyrou C, Brown GD, Hadfield J, Odom DT. ChIP-seq: using high-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions. *Methods.* 2009;48(3):240-248.
 87. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
 88. Dames S, Durtschi J, Geiersbach K, Stephens J, Voelkerding KV. Comparison of the Illumina Genome Analyzer and Roche 454 GS FLX for resequencing of hypertrophic cardiomyopathy-associated genes. *J Biomol Tech.* 2010;21(2):73-80.
 89. Voelkerding KV, Dames S, Durtschi JD. Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2010;12(5):539-551.
 90. Smart A. Impediments to DNA testing and cascade screening for hypertrophic cardiomyopathy and Long QT syndrome: a qualitative study of patient experiences. *J Genet Couns.* 2010;19(6):630-639.
 91. Nherera L, Marks D, Minhas R, Thorogood M, Humphries SE. Probabilistic cost-effectiveness analysis of cascade screening for familial

- hypercholesterolaemia using alternative diagnostic and identification strategies. *Heart*. 2011;97(14):1175-1181.
92. Dugueperoux I, Audrezet MP, Parent P, Audebert-Bellanger S, Roussey M, Ferec C, Scotet V. Cascade testing in families of carriers identified through newborn screening in Western Brittany (France). *J Cyst Fibros*. 2012.
 93. Sorensen PL, Gane LW, Yarborough M, Hagerman RJ, Tassone F. Newborn screening and cascade testing for FMR1 mutations. *Am J Med Genet A*. 2012;161A(1):59-69.
 94. Miller EM, Wang Y, Ware SM. Uptake of cardiac screening and genetic testing among hypertrophic and dilated cardiomyopathy families. *J Genet Couns*. 2012;22(2):258-267.
 95. Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, Helio T, Keren A, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Perrot A, Rapezzi C, Ristic A, Seggewiss H, van Langen I, Tavazzi L. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2010;31(22):2715-2726.