DIOGO GONÇALVES BIAGI DOS SANTOS

**Investigação genética em pacientes com
cardiomiopatia dilatada**

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

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Diogo Gonçalves Biagi dos

Investigação genética em pacientes com cardiomiopatia dilatada / Diogo
Gonçalves Biagi dos Santos. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo.

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

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Cardiomiopatia dilatada/genética 2.Insuficiência cardíaca 3.Mutação
4.Genes

USP/FM/DBD-041/11

Dedico esta dissertação

Aos meus pais, Fernando e Izilda, por sempre se esforçarem para me dar o melhor, por me ensinarem diferenciar o certo do errado, por aceitarem minhas opiniões diferentes, por me darem o apoio para estudar e me incentivarem a estudar mais do que eles puderam. Dedico a eles esta dissertação, acima de tudo, como forma de agradecimento à confiança que depositaram em mim.

Agradecimentos

Dr. Alexandre C Pereira

Obrigado por acreditar que este Biólogo, que chegou ao laboratório pela Educação Física, poderia se tornar um pesquisador. Obrigado pelas cobranças, pelo apoio, pelos conselhos e, mais ainda, pela confiança nas minhas decisões. Com certeza, a pessoa em quem procurarei me espelhar.

Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Agradeço a oportunidade de me aceitar como seu aluno e pela confiança em mim depositada. Sua dedicação ao trabalho é inspiradora e sempre mostra que eu posso fazer um pouco mais.

Profa. Dra. Patrícia Brum

Por ter me aceitado em seu laboratório para realizar minha iniciação científica, pelo apoio quase de uma mãe, por ter me aberto as portas do laboratório onde estou e por ter me incentivado no mestrado mesmo significando que iria deixá-la.

Débora Leite

Obrigado, simplesmente, por estar na minha vida. Por me suportar chato e me acalmar, por me apoiar, por me ouvir e por me incentivar. Não houve pessoa mais presente na minha vida nesse período e, se não fosse por você, este caminho teria sido muito mais difícil.

Aos meus irmãos, Tiago e Felipe, por estarem sempre ali presentes para qualquer situação. A convivência com vocês, com certeza, influenciou no que hoje sou.

Aos amigos e colegas de trabalho, pelas conversas na “Lan House”, por me suportarem chato como sou. Aos “meus alunos” de iniciação Ashila, Léa, Livia e André, vocês não sabem, mas são parte fundamental dessa conquista; com vocês, percebi o quão prazeroso é ensinar.

À Luciene e ao Márcio, por me ajudarem prontamente nesta parte final do projeto, que, sem a ajuda de vocês, demoraria mais um semestre para terminar.

À Noely, por me aguentar toda vez que eu queria mudar as regras, e à Marina, que passou esses dois anos me aturando, rindo e cantando comigo na mesma sala, além de passar minhas amostras de sequenciamento para frente da fila.

À Amanda, por sempre me ajudar, desde o início. Também pelas conversas no almoço, pela troca de receitas e, principalmente, por me desculpar e continuar acreditando em mim. Admiro muito sua simpatia e, quem sabe, um dia conseguirei ter um pouquinho disso.

Ao Vaquero, a primeira amizade sincera da faculdade. Uma pessoa tão estranha quanto eu. Apesar disso, são 5 anos de amizade e conversas, das bobas às mais “cabeças”. Agradeço pelas piadas ruins que fazem com que as minhas fiquem muito boas e, principalmente, por me entender e acreditar em mim.

Aos meus amigos do “Biosal” e “Joga no Pagode”, como dizemos, pela família que criamos, pelas brigas, desentendimentos e muito companheirismo. Com certeza, vocês participaram muito dessa minha formação. Pelas tardes, almoços, sábados e domingos de futebol com alegria, afinal, corpo são, mente sã.

À minha segunda família: Brenda, Renato, Sérgio e Daniel. Por me receberem muito bem na família, pelos momentos de alegria, pelas noites de carteados e risadas, pelas jantares e almoços, pelo interesse no DNA “invisível” e também pelos conselhos.

Ao André “Kaká”, pela amizade, noitadas de vídeo-game e risadas, e pela excelente convivência nesses 3 anos de república.

À FAPESP, pelo apoio financeiro que permitiu a realização do mestrado.

*Pode-se não atingir um objetivo por ser impossível,
mas nunca por achar que seria impossível antes de
tentar... Não espere de uma entidade superior o que
se pode atingir com o próprio esforço... você é o que
você deseja ser.*

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Listas

Resumo

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura do cardiomiócito	3
1.2 Alterações genéticas e Cardiomiopatia Dilatada	5
1.3 Objetivos	14
2. MÉTODOS	15
2.1 Seleção de Pacientes	15
2.2 Análise do genótipo	17
2.3 Correlação genótipo-fenótipo	26
2.4 Ferramentas de Bioinformática	28
2.5 Histologia	30
2.6 Imunofluorescência Confocal	30
2.7 Ética	31
2.8 Estatísticas	31
3. RESULTADOS	32
3.1 Aspectos Gerais	32
3.2 Alterações no gene <i>ACTC1</i>	33
3.3 Alterações no gene <i>FKBP1A</i>	38
3.4 Alterações no gene <i>FKBP1B</i>	41
3.5 Alterações no gene <i>CSRP3</i>	44
3.6 Resumo Geral	58
4. DISCUSSÃO	60
4.1 Considerações finais	68
5. CONCLUSÃO	71
6. REFERÊNCIAS	72

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
CD	Cardiomiopatia Dilata
CDI	Cardiomiopatia Dilatada idiopática
CH	Cardiomiopatia Hipertrófica
EH-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	Guanina
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
HSF2	<i>Heat Shock Factor 2</i>
Incor	Instituto do Coração
miRNA	Micro RNA
Met	Metionina
MLP	<i>Muscle specific LIM protein</i>
NCX	Trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMCA	Bomba de Ca^{2+}
RyR	Rianodina
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
Serca2a	Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Timina
TCAP	Proteína codificada pelo gene <i>TCAP</i>
Thr	Treonina
UTR	<i>Untranslated Region</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mutações associadas com a Cardiomiopatia Dilatada....	Pg 6
Tabela 2 - Pares de primers para amplificação dos éxons dos genes <i>ACTC1</i> , <i>CSRP3</i> , <i>FKPB1A</i> e <i>FKPB1B</i>	Pg 18
Tabela 3 - Sequência de primers desenhados para verificação das alterações no grupo controle	Pg 27
Tabela 4 - Características demográficas, clínicas e funcionais da população de estudo.	Pg 32
Tabela 5 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene <i>ACTC1</i>	Pg 34
Tabela 6 - Sumarização dos dados para as alterações novas encontradas no gene <i>ACTC1</i>	Pg 37
Tabela 7 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene <i>FKBP1A</i>	Pg 38
Tabela 8 - Sumarização dos dados para as alterações novas encontradas no gene <i>FKBP1A</i>	Pg 39
Tabela 9 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene <i>FKBP1B</i>	Pg 42
Tabela 10 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene <i>CSRP3</i>	Pg 45
Tabela 11 - Sumarização dos dados para as alterações novas encontradas no gene <i>CSRP3</i>	Pg 48
Tabela 12 - Variantes genéticas novas nos éxons e regiões limítrofes dos genes estudados.....	Pg 58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura sarcomérica.....	Pg 4
Figura 2 - Desenho esquemático da estrutura do disco Z.....	Pg 4
Figura 3 - Curvas de decaimento da fluorescência pelo acréscimo da temperatura na reação de HRM geral.....	Pg 25
Figura 4 - Esquema da digestão da alteração rs113178069.....	Pg 28
Figura 5 - Gel de agarose da digestão enzimática do PCR de uma placa de genotipagem do polimorfismo rs113178069.....	Pg 35
Figura 6 - Cromatograma evidenciando as alterações em heterozigose no gene <i>ACTC1</i>	Pg 36
Figura 7 - Ensaio de HRM da alteração no íntron 2 no gene <i>ACTC1</i>	Pg 37
Figura 8 - Cromatograma evidenciando as alterações em heterozigose na região promotora do gene <i>FKBP1A</i>	Pg 40
Figura 9 - Cromatograma evidenciando as alterações em heterozigose na região 5' UTR do gene <i>FKBP1A</i>	Pg 41
Figura 10 - Ensaio de HRM do SNP rs114658911 em uma placa do grupo controle do gene <i>FKBP1B</i>	Pg 43
Figura 11 - Cromatograma evidenciando a alteração em heterozigose na região 5' UTR do gene <i>FKBP1B</i>	Pg 43
Figura 12 - Cromatograma evidenciando alterações no gene <i>CSRP3</i>	Pg 47
Figura 13 - Ensaio de HRM do SNP rs111868331 no gene <i>CSRP3</i>	Pg 47

Figura 14 - Cromatograma evidenciando a alteração em heterozigose no intron 5 do gene <i>CSRP3</i>	Pg 49
Figura 15 - Ensaio de HRM da alteração c.508+18C>T no gene <i>CSRP3</i>	Pg 49
Figura 16 - Cromatograma da alteração p.T47M.....	Pg 51
Figura 17 - Curvas de dissociação do éxon 3 do gene <i>CSRP3</i> .	Pg 51
Figura 18 - Ensaio de HRM em uma placa do grupo controle do éxon 3 do gene <i>CSRP3</i>	Pg 52
Figura 19 - Alinhamento de aminoácidos do gene <i>CSRP3</i> e representação esquemática da estrutura do domínio LIM1 da proteína MLP...	Pg 53
Figura 20 - Esquema da proteína MLP e gene <i>CSRP3</i>	Pg 54
Figura 21 - Cromatograma da alteração p.T47M do paciente e irmãos.	Pg 55
Figura 22 - Heredograma da família do paciente p.T47M.....	Pg 55
Figura 23 - Fenótipo ultraestrutural do paciente p.T47M.....	Pg 57
Figura 24 - Localização celular da proteína MLP.....	Pg 57

RESUMO

Santos DGB. *Investigação genética em pacientes com cardiomiopatia dilatada* [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 78p.

Introdução: A cardiomiopatia dilatada é uma das principais causas de insuficiência cardíaca com alta morbidade e mortalidade. Alterações genéticas em mais de 29 genes já foram relacionadas com a doença, contudo, elas explicam apenas uma pequena porcentagem dos casos sugerindo haver então outros genes relacionados com a doença. Foram relacionados para o presente projeto quatro genes candidatos, previamente relacionados com outras doenças cardíacas, para verificação de uma possível associação com a cardiomiopatia dilatada idiopática. *Objetivos:* Avaliar a presença e frequência de mutações nos genes *ACTC1*, *CSRP3*, *FKBP1A* e *FKBP1B* de pacientes com cardiomiopatia dilatada do Instituto do Coração de São Paulo (InCor, FMUSP), investigar se há correlações entre o genótipo e o fenótipo e estudar as alterações funcionais desencadeadas pelas mutações encontradas. *Métodos:* Amostras de DNA de 186 pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática foram selecionados de um banco de dados do Instituto do Coração e triados geneticamente para alterações nos genes selecionados. *Resultados e Discussão:* Foram encontradas nove novas variantes genéticas. Cinco delas também estavam presentes no grupo controle, sendo excluídas como causativas da doença. Três delas não estavam presentes no grupo controle, contudo, dados de bioinformática avaliaram as alterações com um risco baixo de serem causativas. Uma alteração no gene *CSRP3*, que levava a troca de aminoácido, não estava presente no grupo controle e apresentou dados indicativos de mutação causativa da doença. Lâminas cardíacas foram avaliadas para verificação de possíveis dos mecanismos de ação, contudo, houve apenas a exclusão de alguns mecanismos previamente descritos na literatura. *Conclusões:* Não há evidências de que as alterações nos genes *ACTC1*, *FKBP1A* e *FKBP1B* estariam associadas com o desenvolvimento da doença. A alteração no gene *CSRP3* também é capaz de causar cardiomiopatia dilatada idiopática.

Descritores: 1.Cardiomiopatia dilatada/genética 2.Insuficiência cardíaca 3.Mutação 4.Genes

SUMMARY

Santos DGB. *Genetic screening in dilated cardiomyopathy patients* [Dissertation] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 78p.

Introduction: Dilated Cardiomyopathy is one of the leading causes of heart failure with high morbidity e mortality. Already known genetic alterations explain little percentage of cases suggesting that other genes would be related with the disease. Four candidates genes previously related with other cardiac diseases were selected for the project to verify a possible relationship with dilated cardiomyopathy. *Objectives:* Evaluate the presence and frequency of genetic alterations in *ACTC1*, *FKBP1A*, *FKBP1B* and *CSRP3* genes in dilated cardiomyopathy patients of São Paulo Heart Institute (Incor, FMUSP). To investigate for genotype/phenotype correlations and to study functional alterations triggered by the found mutations. *Methods:* DNA samples from 186 patients with dilated cardiomyopathy were selected from the Incor DNA bank and genetically screened for alterations in the selected genes. *Results and Discussion:* Nine new genetic variants were found. Five of them were present in the control population, thus being excluded as disease causative. Three of them were not present in the control population; however, bioinformatics analysis evaluated the alterations having a low risk of being causatives. One alteration in *CSRP3* gene that resulted in amino-acid change was not present in control population and exhibit indicative data of disease causing mutation. Analysis of patient heart showed no difference from some disease mechanisms described in literature. *Conclusions:* There are no evidences that alterations in *ACTC1*, *FKBP1A* and *FKBP1B* genes would associated with disease development. Alteration in *CSRP3* gene is also capable to cause dilated cardiomyopathy.

Descriptors: 1.Dilated cardiomyopathy/genetics 2.Heart failure 3.Mutation 4.Genes

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de óbito na população em geral. A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 17 milhões de pessoas morram a cada ano devido a essas doenças¹. Dentre as doenças cardiovasculares, podemos destacar pela sua elevada morbimortalidade e impacto econômico as cardiomiopatias, doenças nas quais o músculo cardíaco perde a sua eficiência mecânica².

As cardiomiopatias são classificadas em quatro grupos por suas características morfológicas e hemodinâmicas: dilatada, hipertrófica, restritiva e displasia arritmogênica do ventrículo direito. A cardiomiopatia restritiva é a forma mais rara, representando apenas 5% do total de casos³. No entanto, é também a cardiomiopatia que apresenta pior prognóstico e opções terapêuticas mais restritas⁴. É caracterizada pela rigidez progressiva do ventrículo esquerdo, o que dificulta o enchimento da câmara entre os batimentos.

A displasia arritmogênica do ventrículo direito é uma desordem arritmogênica complexa associada com cardiomiopatia e caracterizada por perda gradual de cardiomiócitos e substituição por tecido gorduroso e fibroso⁵.

Já a cardiomiopatia hipertrófica (CH) é uma doença cardíaca também complexa, mas com características fisiopatológicas distintas. Nessa etiologia, o septo inter-ventricular e a parede posterior do ventrículo esquerdo são espessas, porém, essa hipertrofia é geralmente assimétrica. O

coração apresenta, nas fases iniciais, função sistólica exagerada (hipercontratilidade) e deficiência no relaxamento, o que acarreta em uma disfunção diastólica grave. A hipertrofia assimétrica do septo interventricular pode também ocasionar obstrução do fluxo sanguíneo do ventrículo esquerdo para a aorta⁶.

A cardiomiopatia dilatada (CD) é a causa mais comum de insuficiência cardíaca congestiva⁷. A cardiomiopatia dilatada de etiologia idiopática (CDI), cuja incidência é de 1 a cada 2.700 pessoas por ano⁷, é caracterizada por um aumento no tamanho da câmara ventricular com redução na contratilidade cardíaca, na ausência de doença da artéria coronária, anormalidade valvular ou doença do pericárdio³. Refluxo pela válvula mitral e ritmo cardíaco anormal são comuns. Além disso, características clínicas incluem sintomas comuns de insuficiência cardíaca congestiva, como dificuldade respiratória, aumento da frequência cardíaca, cansaço precoce, incapacidade de tolerar esforço físico, desmaios, suor no repouso e morte súbita. De todos os pacientes adultos portadores de cardiomiopatia, cerca de 35%, apresentam cardiomiopatia dilatada hereditária⁸.

Estão envolvidas na cardiomiopatia dilatada hereditária proteínas do cardiomiócito que fazem parte do sarcômero, do disco Z, do metabolismo celular e da manutenção do Ca^{2+} intracelular.

1.1 Estrutura do Cardiomiócito

O cardiomiócito está envolvido por uma membrana delgada, o sarcolema. O interior de cada miócito contém feixes de miofibrilas longitudinais de aparência estriada característica, similar ao músculo esquelético, formado pela repetição de sarcômeros. O sarcômero (Figura 1) é a estrutura fundamental e unidade funcional do músculo cardíaco e consiste de filamentos finos e espessos intercalados. Os filamentos espessos são compostos predominantemente de miosina, enquanto os filamentos finos são compostos de actina, tropomiosina e troponinas. Cada sarcômero contém uma banda A (composta da sobreposição dos filamentos finos e espessos) com uma linha M central (composta somente por filamentos espessos). De cada lado da banda A estão as bandas I (compostas somente por filamentos finos) limitadas pelos discos Z (Figura 1).

O citoesqueleto sarcomérico, composto pela titina e pelas miomesinas, proporciona suporte para os filamentos espessos e finos. A titina é uma proteína que se estende do disco Z até a linha M. Além de contribuir na montagem e organização do sarcômero, a titina é a maior determinante das propriedades elásticas da miofibrila cardíaca. Miomesinas 1 e 2 são proteínas associadas à titina. O disco Z é formado por um entrelaçado de proteínas que mantém a organização do miofilamento por um cruzamento anti-paralelo da teletonina e filamentos finos dos sarcômeros adjacentes. Compõem o disco Z, principalmente, as proteínas: α -Actinina, Filamina, Nebulina, Teletonina e Miotilina e LIM.

Recentemente, Knoll e colaboradores⁹ concluíram haver uma interação das proteínas MLP e Teletonina e que este complexo seria um componente essencial na maquinaria sensível de estiramento.

Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura sarcomérica (adaptado de Marimoto, 2008¹⁰)

Figura 2 - Desenho esquemático da estrutura do disco Z (adaptado de Frey N. *et al.*, 2008¹¹).

Para que ocorra a contração muscular, o cálcio entra na célula pelos canais de Ca^{2+} . Este Ca^{2+} irá estimular a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático pelos receptores de rianodina (RyR); estes, por sua vez, são regulados pela proteína FKBP1¹². O alto nível de Ca^{2+} no citoplasma irá disparar a contração após ligar-se ao complexo troponina/tropomiosina nos filamentos de actina, fazendo com que esta última se ligue à miosina. A actina ativar a miosina ATP-ase que irá produzir energia pelo fracionamento do ATP; essa energia levará à movimentação das pontes cruzadas de miosina, gerando tensão. O ATP ligar-se-á à miosina, desfazendo sua ligação com a actina e isto tornará possível o deslizamento dos filamentos espessos e finos uns sobre os outros, levando ao encurtamento do músculo¹³. Quando a estimulação cessa, o Ca^{2+} precisa ser removido do citoplasma para que ocorra o relaxamento. Este Ca^{2+} pode ser recaptado pelo retículo sarcoplasmático pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) ou ser extruído da célula pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ou pela bomba de Ca^{2+} (PMCA) da membrana plasmática¹⁴.

1.2 Alterações genéticas e Cardiomiopatia Dilatada

A etiologia da CD é multifatorial e muitas condições clínicas diferentes podem levar ao fenótipo da CD. Recentemente, tem-se tornado evidente que os fatores genéticos têm um importante papel na etiologia e patogênese da CDI. A Tabela 1 lista as alterações descritas na literatura. Nesta estão descritas alterações em 22 genes codificantes para proteínas que atuam em diversos compartimentos celulares. Os fatores genéticos

da CD têm sido intensamente investigados e, por esta razão, o conhecimento das bases genéticas para a CD tem crescido rapidamente.

Tabela 1- Mutações associadas com a Cardiomiopatia Dilatada.^{10,11}

Local	Proteína (gene)	nº de mutações
Sarcomero	Troponina T Cardíaca (<i>TNNT2</i>)	6
	Troponina C Cardíaca (<i>TNNC1</i>)	1
	Troponina I Cardíaca (<i>TNNI3</i>)	1
	Tropomiosina – α (<i>TPM1</i>)	2
	Actina Cardíaca – α (<i>ACTC1</i>)	2
	Cadeia Pesada – β de Miosina (<i>MYH7</i>)	11
Disco Z	Teletonina (<i>TCAP</i>)	2
	MLP (<i>CSRP3</i>)	1
	α -actinina (<i>ACTN2</i>)	1
	Cypher (<i>LBD3</i>)	3
	Desmina	1 ^a
	Integrin Linked Kinase (<i>ILK</i>)	1
	Titina (<i>TNN</i>)	6
Manutenção Ca ⁺² Intracelular	<i>SCN5A</i>	1
	<i>SUR2A</i>	2
	Fosfolambam (<i>PLN</i>)	4
Ancoragem	Vinculina (<i>VCL</i>)	1
	Desmoplakina (<i>DSP</i>)	1
Nucleares	Laminina A/C (<i>LMNA</i>)	12 ^b
	<i>EYA4</i> (<i>EYA4</i>)	1
Membrana Plasmática	Distrofina	2 ^c
	Laminin A	2

^a OMIM: #604765 – 03/2008

^b OMIM: #115200 – 03/2008

^c OMIM: #302045 – 03/2008

1.2.1 Alterações em proteínas sarcoméricas, o papel da Actina cardíaca (*ACTC1*)

Existem hoje 23 mutações distintas, distribuídas em 6 genes de proteínas sarcoméricas, associadas à CD¹⁰. A primeira mutação encontrada

em um gene relacionada com a CD foi identificada em 1998, quando Olson e colaboradores¹⁵ descreveram uma mutação no gene *ACTC1*. O gene *ACTC1* codifica para a actina cardíaca¹⁶, uma proteína essencial para a estrutura e funções normais dos cardiomiócitos, pois representam a maior parte dos filamentos finos no sarcômero. Durante o desenvolvimento, 5 das 6 isoformas codificadas por diferentes genes são expressas no miócito. Nos cardiomiócitos maduros, entretanto, somente as isoformas cardíaca e esquelética são expressas, sendo que a cardíaca se apresenta como a isoforma mais abundante (80%)¹⁷⁻¹⁹.

Para testar a hipótese de que uma disfunção na actina leva à insuficiência cardíaca, Olson e colaboradores examinaram pacientes com CDI hereditária para mutações no gene *ACTC1*. No estudo, identificaram 2 mutações missense (R312H e E361G) que co-segregavam com uma forma de CD. A mutação E361G ocorria em um domínio de ligação para a α -actinina no subdomínio 1, que ancora os filamentos finos ao disco Z e discos intercalares²⁰. Wong e colaboradores²¹ reportaram que esta mutação não afeta a polimerização da actina, a rigidez da ligação, a motilidade *in vitro*, mas reduz levemente a afinidade do filamento de actina pela α -actinina, sugerindo que uma força de transmissão enfraquecida via disco Z e discos intercalares pode ser responsável pela patogênese. Vang e colaboradores²² encontraram ambas as mutações em um estudo realizado com pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, reportando-as como causa da doença pela interferência das mesmas na via de “empacotamento” da proteína e na formação dos filamentos. Estes resultados criam a possibilidade de que um

defeito na transmissão de força nos cardiomiócitos seja um dos mecanismos responsáveis pela insuficiência cardíaca.

Outras sete mutações missense foram encontradas em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica¹⁰. Estas mutações diminuem a estabilidade térmica do monômero de actina e enfraquecem a formação do filamento, sugerindo que a incapacidade em formar miofilamentos e/ou o acúmulo de agregados pode ser um dos efeitos patológicos celulares²¹⁻²³. A mutação E99K reduziu a velocidade de deslizamento e a força média em um estudo de motilidade *in vitro* e diminuiu a afinidade da actina pela miosina²³, sugerindo que uma interação actina/miosina enfraquecida é um defeito molecular num nível primário que leva à cardiomiopatia hipertrófica.

Apesar de muitos estudos encontrarem associação do gene com a cardiomiopatia hipertrófica, sua relação com a CD ainda não é clara, sendo necessários mais estudos sobre o mesmo.

1.2.2 Alterações em proteínas envolvidas nas vias sensitivas de estresse mecânico, o Disco Z.

Entre as possíveis patogêneses para a CD devido a mutações no gene *ACTC1*, foi descrito que uma alteração na interação da actina com o disco Z poderia modificar a força de transmissão²¹. A partir de então, alguns estudos passaram a triar os genes das proteínas do disco Z em busca de alterações que pudessem representar um efeito semelhante. Nos últimos anos, foram encontradas 7 mutações em 4 diferentes genes de proteínas que compõem o disco Z²³.

O disco Z define os limites do sarcômero, constituindo um sítio de ancoragem para os filamentos de actina, titina e filamentos de nebulina. Por esta propriedade de ancoragem, ele é um condutor primário da força gerada pela contração. Um dos maiores componentes do disco Z é a α -actinina, a qual é responsável pela ligação cruzada entre a actina cardíaca e as moléculas de titina de sarcômeros vizinhos. A interação da titina com a teletonina (TCAP) no disco Z é necessária para a função do sarcômero²⁴. Os discos Z de miofibrilas adjacentes são alinhados, fornecendo um meio de coordenação da contração entre miofibrilas individuais para um ponto “focal” onde o disco Z é ligado à membrana muscular. O disco Z possui um papel central em diversos aspectos da estrutura e função do músculo cardíaco²⁵, que inclui a montagem e organização sarcomérica, integridade do sarcolema e geração e transmissão da força muscular.

Camundongos com deficiência na proteína MLP (muscle-specific LIM protein), também pertencente ao disco Z, exibem dilatação da câmara cardíaca e disfunção contrátil²⁶. Isto sustenta a evidência de que defeitos nos componentes do disco Z podem disparar vias de doenças, o que é corroborado pelos fenótipos dos camundongos com ausência da proteína MLP. Estes animais apresentavam alterações na citoarquitetura cardíaca que levavam ao desenvolvimento da CD e insuficiência cardíaca²⁷.

A progressão das cardiomiopatias e insuficiência cardíaca crônica pode ser resultado de um elevado estresse mecânico nos cardiomiócitos, que leva a um dano celular e à perda de células miocárdicas residuais^{28,29}. No coração, o estresse mecânico se inicia, primeiramente, por aumentos

no volume e na pressão da câmara cardíaca e, posteriormente, por dano no miocárdio ou hipertensão. Sob esse aspecto, o estresse biomecânico *in vivo* vem sendo demonstrado como ativador de múltiplas vias de sinalização, que acentuam a sobrevivência da célula miocárdica e previne o começo da CD^{30,31}. Isto sugere um papel importante para uma via sensitiva de estresse mecânico defeituosa na progressão da insuficiência cardíaca. Consequentemente, é possível que uma deficiência da MLP ou outra proteína relacionada ao disco Z possa levar à CD como resultado de um papel intrínseco destas proteínas nas vias sensitivas de estresse mecânico cardíaco.

Knoll e colaboradores⁹, em 2002, descreveram uma mutação no gene CSRP1, codificante para a MLP, onde a substituição do nucleotídeo T por C na posição 10 levava à troca do aminoácido triptofano por uma arginina na posição 4 (W4R). Esta mutação gerava um defeito na interação e localização da MLP com a T-cap. Estes autores propuseram que o complexo MLP/TCAP é um componente chave da maquinaria sensitiva de estresse em cardiomiócitos *in vivo* e que esta mutação poderia estar levando à CD. Contudo, Mohapatra e colaboradores³² encontraram essa mesma mutação, porém ela não segregava com a doença, estando ausente em um indivíduo afetado. Neste mesmo estudo, esses autores descreveram uma nova alteração: uma troca do nucleotídeo A por G na posição 205, resultando na troca de uma lisina por uma arginina na posição 69 (K69R). Esta mutação estava presente em duas crianças falecidas e na mãe fenotipicamente normal. A mutação ocorria em uma região altamente conservada, adjacente

ao primeiro domínio LIM envolvido na ligação com a α -actinina. Análises em um sistema de cultura de células demonstraram que a mutação abolia a interação entre o MLP e a α -actinina e que a localização celular da MLP estava alterada.

A mutação W4R também foi descrita em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, contudo, ela aparecia associada a outras mutações nos genes para proteínas sarcoméricas. Com isso, fica evidente que mais estudos precisam ser realizados para o completo entendimento da relação do gene CRSP3 com a CD.

1.2.3 Alterações na homeostasia do Ca^{2+} : FKBP's, os moduladores da Rianodina.

Um marcador clínico comum e que caracteriza a falência dos cardiomiócitos é a homeostase anormal do cálcio, a qual se manifesta pelo prolongamento dos transientes intracelulares de cálcio e por mudanças em suas concentrações intracelulares tanto na sístole, quanto na diástole³³. Apesar de ser tóxico para qualquer célula, o cálcio representa o maior mensageiro intracelular, regulando diversas atividades, tais como contratilidade, metabolismo, transporte, secreção e transcrição³⁴. A sinalização do cálcio para diferentes respostas celulares depende da manutenção da homeostasia do cálcio intracelular, a qual é fortemente controlada pela cascata de sinalização adrenérgica. Vários canais, bombas e trocadores são responsáveis pela manutenção de altas concentrações de cálcio citosólico durante a sístole e baixas concentrações durante a diástole.

Portanto, o controle do cálcio intracelular é o coordenador central da contratilidade e do relaxamento cardíaco³⁵. A contração se inicia com a entrada de cálcio, principalmente via canais para cálcio voltagem-dependentes (tipo L), presentes no sarcolema da célula, na região dos túbulos-T. Em seguida, a entrada de cálcio na célula induz sua liberação pelos canais para rianodina (RyR), presentes no retículo sarcoplasmático. Este processo é chamado liberação de cálcio - cálcio induzida^{36,37}. Por outro lado, para que ocorra o relaxamento, o cálcio que se encontra no citosol precisa ser reduzido. Uma das principais formas de redução do cálcio citosólico ocorre pela recaptação do mesmo para o retículo sarcoplasmático via a Ca^{2+} ATPase, conhecida como SERCA2a³⁸.

Existem 3 isoformas de RyR nos mamíferos. RyR1 possui expressão predominante no músculo esquelético^{39,40}, enquanto a RyR2 é predominante no músculo cardíaco^{41,42}. A RyR3 é expressa mais globalmente, estando presente principalmente no cérebro, músculo esquelético e diafragma. Interessantemente, o camundongo knock-out para o gene *RyR3* nasce e cresce normalmente⁴³, enquanto que camundongos knock-out para os genes *RyR1* e *RyR2* morrem, em sua maioria, em estágios embrionários de vida⁴⁴⁻⁴⁶.

A RyR1 se liga fortemente com a proteína FKBP1A⁴⁵. A função fisiológica do FKBP1A é modular a RyR1, possivelmente pelo aumento da coordenação entre as 4 subunidades da RyR^{47,48}. Em 1995, Lam e coladores⁴⁹ encontraram uma proteína muito semelhante à FKBP1A, porém com uma mobilidade eletroforética diferente. Essa nova proteína (FKBP1B)

se associava com a RyR2 cardíaca, possuindo 85% de sequência homóloga ao FKBP1A⁵⁰. A estequiometria de ligação é 4 FKBP por um tetrâmero de RyR no músculo esquelético ou no cardíaco⁴⁸. Tanto a proteína FKBP1A, quanto a FKBP1B podem se ligar à RyR1, contudo, a afinidade de ligação da FKBP1A é maior. Já a RyR2 exibe relativamente maior afinidade pela FKBP1B¹².

Shou e colaboradores⁵¹, em 1998, geraram um camundongo mutante deficiente em FKBP1A. Este camundongo possuía musculatura esquelética normal, porém apresentava CD severa. Em 2002, Xin e colaboradores⁵² geraram um camundongo deficiente em FKBP1B. Os camundongos mutantes machos possuíam cardiomiopatia hipertrófica, mas não as fêmeas. Porém, ambos apresentavam desregulação similar na liberação de cálcio, vista como aumento na amplitude e duração dos estímulos de cálcio e ganho na liberação de cálcio – cálcio induzida. Conclui-se no estudo que a proteína FKBP1B modula o acoplamento excitação-contração cardíaca.

As bases genéticas para a cardiomiopatia dilatada idiopática têm sido estabelecidas por estudos de familiares mostrando que mais de 35% dos casos apresentam bases hereditárias. Dentre as bases genéticas para a CDI, mutações nos genes codificantes para proteínas sarcoméricas representam 36% dos casos, enquanto que mutações em genes codificantes para proteínas do disco Z representam 12,5% dos casos. Os genes *ACTC1* e *CSRP3* possuem frequência relativa de, respectivamente, 8% entre as mutações em genes de proteínas sarcoméricas e 12,5% entre mutações em genes de proteínas do disco Z. Além disso, a presença de mutações nos

genes *FKBP1A* e *FKBP1B* em pacientes com CD não é conhecida. Modelos animais sugerem a relação do gene com a CD, sendo este, então, um importante candidato a causador da doença.

Dessa forma, pretendemos no presente trabalho pesquisar por mutações nos genes *ACTC1*, *CSRP3*, *FKBP1A* e *FKBP1B* em pacientes brasileiros com cardiomiopatia dilatada idiopática, que possam alterar a transmissão de força (seja ela por interação actina-actina, actina-miosina, actina-disco Z), a maquinaria sensitiva de estiramento ou o ciclo cardíaco do cálcio e, então contribuir para o desenvolvimento da CDI.

A caracterização de outras mutações deletérias nestes genes ajudará a elucidar o papel funcional dos mesmos na fisiologia cardíaca e seus efeitos na predisposição à doença cardíaca. Portanto, essa caracterização e o conhecimento das frequências relativas, dados ainda não existentes no país, seriam de fundamental importância para se criar estratégias de testes genéticos que fossem custo-efetivas.

1.3 Objetivos

Avaliar a presença e frequência de mutações nos genes *ACTC1*, *CSRP3*, *FKBP1A* e *FKBP1B* de pacientes com cardiomiopatia dilatada do Instituto do Coração de São Paulo (InCor, FMUSP).

Investigar se há correlações entre o genótipo e o fenótipo desses pacientes e estudar as alterações funcionais desencadeadas pelas mutações encontradas.

2. MÉTODOS

2.1 Seleção dos pacientes

Foram estudados 186 pacientes a partir de dois estudos realizados anteriormente no Instituto do Coração. A partir da classificação etiológica de cada paciente em seu respectivo estudo, foram selecionados aqueles enquadrados na etiologia idiopática. Destaca-se aqui que os critérios para classificação foram os mesmos nos diferentes estudos.

2.1.1 – População para seleção de pacientes 1

De março de 1995 a julho de 1997 foram estudados 333 pacientes com cardiomiopatia dilatada com idade de 13 a 68 anos (média 43,3, desvio padrão 10,5), sendo duzentos e sessenta e dois homens (78,7%) e setenta e uma mulheres (21,3%).

O diagnóstico de insuficiência cardíaca foi realizado de acordo com critérios previamente publicados⁵³. A classificação das etiologias da cardiomiopatia dilatada seguiu recomendações anteriores^{3,54}.

2.1.1.1 – *Crítérios de Inclusão*

Foram elegíveis para o estudo pacientes sintomáticos para diferentes etiologias de CD e com fração de ejeção <45% por ecocardiograma Doppler transtorácico bidimensional ou fração de ejeção <35% por ventriculografia radioisotópica. Os pacientes foram avaliados para tratamento cirúrgico da CD, incluindo transplante cardíaco. Especificamente, os pacientes com cardiomiopatia valvar matriculados no estudo foram aqueles com disfunção ventricular cardíaca em níveis não aceitáveis para reparo ou troca da válvula, mas, sim, para transplantes cardíacos.

2.1.1.2 *Critérios de Exclusão*

Pacientes com doença cardíaca valvar candidatos a tratamento cirúrgico convencional (como reparo ou troca da válvula), pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, doença pulmonária obstrutiva crônica, infarto do miocárdio recente ou angina estável foram excluídos. Pacientes com disfunção renal ou hepática severa, doença arterial periférica severa, doença cerebrovascular, infecção ativa, neoplasia coexistente e doença úlcera gástrica ativa também foram excluídos.

2.1.2 População para seleção de pacientes 2

De agosto de 2002 a março de 2004 foram incluídos 503 pacientes com insuficiência cardíaca nas classes funcionais III e IV. O diagnóstico da doença e a classificação da etiologia foram baseados nos mesmo critérios citados para a população 1.

2.1.2.1 *Critérios de Inclusão e Exclusão*

O diagnóstico de CD crônica foi realizado através de análises clínicas e procedimentos de imagem, quando necessários. CD isquêmica foi diagnosticada quando estava presente um histórico claro de infarto do miocárdio prévio e nenhuma outra causa provável de disfunção cardíaca ou, alternativamente, por angiografia coronária. Todos os pacientes diagnosticados como idiopáticos foram estudados por angiografia coronária para a exclusão de um possível diagnóstico de cardiomiopatia isquêmica.

Os critérios de exclusão foram os mesmo citados para a população 1.

2.2 Análise do genótipo

Para a análise do genótipo, foram aplicadas duas metodologias: sequenciamento bidirecional direto ou seleção por High Melting Resolution (HRM), seguida por sequenciamento bidirecional.

2.2.1 Sequenciamento bidirecional direto

2.2.1.1 Extração do DNA

Foram coletados 10 mL de sangue periférico em tubo de hemograma contendo EDTA. A extração do DNA foi realizada como descrito por Miller e colaboradores em 1988⁵⁵. Resumidamente, o sangue foi hemolisado com tampão contendo NH_4Cl 0,144M e NH_4CO_3 0,001M. Em seguida os leucócitos foram lisados (soluções Tris 0,01M, NaCl 0,4M, EDTA 0,002M pH 8,0 e EDTA 0,5M, SDS 10% pH 8,0), o DNA precipitado (solução NaCl 6M) e ressuspenso em TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8,0). A concentração da solução de DNA obtida foi determinada com leitura em espectrofotômetro a 260 nm. A solução de DNA foi diluída em TE (10 ng/ μL) para uso.

2.2.1.2 Primers

Foi utilizado um par de primers para amplificar cada um dos 21 éxons dos 4 genes estudados.. A tabela 2 lista os éxons de cada gene, a sequência dos primers utilizados em seu estudo e a metodologia com a qual ele foi triado. Os primers foram desenhados pelo programa primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), utilizando as configurações padrão.

Tabela 2 – Pares de primers para amplificação dos éxons dos genes *ACTC1*, *CSRP3*, *FKPB1A* e *FKPB1B*.

Gene	Exon	Sentido	Primer	Amplicon	Função
<i>ACTC1</i>	1	F	5'- CCCCTTCCTTACATGGTCTG -3'	292	Sequenciamento direto
		R	5'- ACCAGGCGAGGAGTGAAC -3'		
	2	F	5'- ACAGGCAGCTAAGCGTGGTC -3'	286	Pré-seleção HRM
		R	5'- CATCGAACAAGAGGGTCAGG -3'		
	3	F	5'-TAAATGGACAAGACACTGATTAT-3'	457	Sequenciamento direto
		R	5'-CAGCAAGGTCGGTGACTT-3'		
	4	F	5'- GCTAGAGCAGTGGTGTGTC -3'	292	Pré-seleção HRM
		R	5'- AGGTAGCGCGATTCACTG -3'		
	5	F	5'- CTCACTGAATCCGCCTACCT -3'	292	Pré-seleção HRM
		R	5'- TCTGCACCAGACCCTACAACT -3'		
	6	F	5'- GACTCGTCCCAGGTATGGA -3'	226	Pré-seleção HRM
		R	5'- CTCGGATCTCCCACTCACA -3'		
	7	F	5'-TTGGAAGTTCAGAGTTCACTGG-3'	242	Pré-seleção HRM
		R	5'-AAGAAGCATAATACCGTCATCC-3'		
<i>CSRP3</i>	1	F	5'-CAGGGCTTTGGTCACAGTCT-3'	246	Pré-seleção HRM
		R	5'-AAACCAGCCACAGAACCAAC-3'		
	2	F	5'-GAGATTGGTTCACTCCTGGG-3'	335	Sequenciamento direto
		R	5'-TTCCCAGGTAATGCTGATGC-3'		
	3	F	5'-CAAAGAAGGGGAGAAGGATT-3'	296	Sequenciamento direto
		R	5'-TGGGAACGAAATGAACTGTC-3'		
	4	F	5'-TTTGCCAAGGGAAATCTACG-3'	323	Sequenciamento direto
		R	5'-GGCTGAGGATGTGTGGTTTC-3'		
	5	F	5'-GCTGGTCAGGGACTTGAAAT-3'	252	Sequenciamento direto
		R	5'-CCTCCAGGCATGAACGTAAT-3'		
	6	F	5'-TAAAAGGACTGTGCTCAGAC-3'	270	Sequenciamento direto
		R	5'-GTACGACTACAAAGGAGAGG-3'		

Continua

Conclusão Tabela 2

Gene	Exon	Sentido	Primer	Amplicon	Função
FKBP12	1	F	5'- TCTCGGGGCTTCTGGGCTTC -3'	269	Sequenciamento direto
		R	5'- GCGCCACTACTCACCGTCTC -3'		
	2	F	5'- CATGCCCCGTCTCTGTCTCCTCA -3'	242	Sequenciamento direto
		R	5'- AAGCCCCAGGCTGCCCCTGA -3'		
	3	F	5'- TGCTGCTGGTTTCTGACTTGT -3'	299	Pré-seleção HRM
		R	5'- TGGCATGAGGGTGAGACTTTTC -3'		
	4	F	5'- TTTCTTACAGAGACAGTTGGGG -3'	253	Pré-seleção HRM
		R	5'- GCCCTTCAGTATTCCATTTTCCT -3'		
FKBP12.6	1	F	5'- GAATGGATGGATGGAGGATG -3'	527	Sequenciamento direto
		R	5'- TCCTAGACCCCCAAGAATCC -3'		
	2	F	5'-CCAGAGAGGTGACGTGA-3'	390	Pré-seleção HRM
		R	5'-TAGACTGGCTGGGAGGA-3'		
	3	F	5'-GGGAGTTTACTCATGACCA-3'	368	Sequenciamento direto
		R	5'-CAGGGACACAAAAGAGGTA-3'		
	4	F	5'-CAGTCACATCTCTGCTGA-3'	510	Sequenciamento direto
		R	5'-CGCATGAACACTGACGAA-3'		

2.2.1.3 Reação em cadeia da polimerase

A região codificadora do gene foi amplificada a partir do DNA genômico por reações em cadeia da polimerase (PCR), como descrito por Caufield e colaboradores, em 1995⁵⁶. As condições de reação para o par de primers (vide tabela 2) foram determinadas posteriormente. De maneira geral, o protocolo desenvolvido possuía: DNA (20 ng/μl) adicionados a solução de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (10 mM), tampão para PCR (10X), MgCl₂ (25 mM), primers sense e antisense na concentração de 12,5 μM e 0,625 U de enzima Taq polimerase (BioQuímica, Brasil). O programa da reação e a temperatura de anelamento dos primers foram estabelecidos por um PCR de gradiente de temperatura no termociclador (MJ Reseach,

USA) como se segue: 2 minutos a 95°C para ativação da enzima, a repetição 35 vezes dos passos 30 segundos a 95°C para denaturação do DNA, 30 segundos de gradiente de 45 a 65°C para anelamento dos primers e 30 segundos a 72°C para extensão das cadeias. As amostras das reações foram visualizadas em gel de agarose 1%.

2.2.1.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação da PCR foram analisados em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, USA). A agarose foi suspensa em tampão tris-acetato-EDTA e fervida em forno de microondas até dissolução completa. Inicialmente, as amostras foram coradas para visualização com brometo de etídeo 25mM, na proporção de 50µl/100mL de gel antes de sua polimerização. O tampão utilizado no preparo das amostras foi composto de glicerol 30%, de azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%. Posteriormente, o uso do brometo foi excluído do laboratório e as amostras passaram a ser coradas com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Brasil), diluído 1:4 em glicerol e na proporção de 1 µl para cada 5 µl de PCR. A eletroforese foi realizada em tampão tris-acetato-EDTA com aplicação de, aproximadamente, 120 V por 30 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados de acordo com o tamanho e visualizados pela exposição do gel à luz ultra-violeta no equipamento EagleEye II (Stratagene).

2.2.1.5 Purificação das amostras amplificadas por PCR

Após amplificação por PCR, as amostras foram purificadas para sequenciamento. A purificação foi realizada com ExoSAP-IT (USB Corporation, USA). Este produto utiliza duas enzimas hidrolíticas, Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), para remover dNTPs e primers remanescentes. A Exonuclease I hidrolisa os primers fita simples residuais e qualquer outra fita simples de DNA não desejada produzida no PCR. A SAP hidrolisa os dNTPS remanescentes da mistura de PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento.

Adicionou-se 2µL de ExoSAP para 5µl de produto de PCR. Essa solução foi aquecida em um termociclador por 15 minutos a 37°C, para ativação e ação das enzimas, e 15 minutos a 85°C, para inativação. Após a reação, a amostra se encontrava pronta para o sequenciamento.

2.2.1.6 Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas por dois equipamentos diferentes, uma vez que o equipamento inicial foi substituído no decorrer do projeto. O procedimento utilizado será descrito a seguir.

As amostras purificadas foram submetidas ao sequenciamento, utilizando-se o equipamento ABI PRISM 377 DNA (PE Applied Biosystems), em conjunto com o kit reagente ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing (PE Applied Biosystems).. Amostras de 1 µl dos DNAs amplificados foram adicionadas aos primers sense e antisense (tabela 2), juntamente com a solução T-Mix contendo

didesoxinucleotídeos marcados com fluorescência (R6G, ROX, R110 e TAMRA), deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dITP, dUTP), DNA polimerase, tampão de reação e água. Em seguida, a mistura de reação foi purificada por precipitação através da adição de 50 µl de etanol gelado (80%), seguida de agitação e incubação em gelo por 30 min. Após a centrifugação (4000 rpm por 45 min a 4°C), o etanol foi desprezado e o processo foi repetido com centrifugação de 15 minutos a 4°C. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 min para completa evaporação do etanol. As amostras de DNA foram denaturadas a 98°C por 2 min no termociclador, ressuspensas em 1,5 µl de tampão de corrida (formamida 80%, Blue Dextran 20%) e colocadas em gelo até o momento da aplicação no gel. A última etapa do sequenciamento foi a eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida (Long Ranger) 5% e uréia 6M, em tampão TBE (1x), por 4h no sequenciador ABI Prism 377.

Para as amostras sequenciadas no equipamento 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), foi realizado o seguinte procedimento: em uma placa de 96 poços, foi aplicado 1 µl do corante fotossensível Big Dye®, 3 µl do Tampão Big Dye®, 2,5 µl do primer (5 pmol/ul), 2,5 µl do produto de PCR de interesse e 1 µl de água. Essa solução foi levada ao termociclador e, após 25 ciclagens das etapas: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, adicionou-se 2,5 µl EDTA, pH 8,0 e 30 µl de etanol 100%. A amostra foi deixada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 4° C por 45 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 100 µl de etanol 75% e

a amostra foi centrifugada a 4° C por 15 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa foi colocada aberta no termociclador a 80° C por 2 min, Para evaporação do etanol restante. O pélete foi ressuspenso com 10 µl Formamida Hi-di® e a placa foi colocada no termociclador a uma temperatura fixa de 96°C por 3 min, para que a denaturação da dupla-fita. No sequenciador, foi feita a leitura através de 24 capilares. Os sinais de fluorescência foram traduzidos pelo programa Sequencing Analyses v5.4 e transformados em arquivos de leitura.

Os arquivos gerados em ambos os tipos de sequenciadores foram analisados pelo programa SeqMan (DNASTar Lasergene 8 – Madson, USA).

2.2.2 Seleção por High Melting Resolution (HRM)

A reação de HRM se trata de uma reação de PCR, acima citada, com o acréscimo de 1,5 uM do reagente SYTO9 (Invitrogen, Carlsbad, USA) e realizada no equipamento Rotor-gene Q (Qiagen, Courtaboeuf, France). O SYTO9 se intercala na dupla fita de DNA (tanto na alça menor quanto na maior) e emite fluorescência.

A análise foi realizada da seguinte maneira: após o PCR, realiza-se o passo HRM, nele ocorre a separação das fitas pelo acréscimo de temperatura de 0,1 em 0,1 grau iniciando em 60°C até 94°C. Conforme o aumento de temperatura, a dupla fita de DNA começa a se abrir e o reagente se desliga da fita deixando de emitir fluorescência, ao final do processo, essa dissociação do SYTO9 gerará uma curva específica para cada amplicom (fragmento amplificado e delimitado pelo par de primers).

A troca de apenas um nucleotídeo é suficiente para se gerar uma curva de dissociação diferente entre mesmos amplicons.

2.2.2.1 *Triagem de pacientes*

Para os éxons que não foram sequenciados diretamente, foi realizado o HRM dos 186 pacientes em discos específicos do aparelho que comportam até 100 amostras. Destas reações, foram selecionadas todas as amostras que apresentaram curva de decaimento diferente da maioria das curvas (que é considerada como o padrão sem alteração) (Figura 3 A). Com essas amostras, foi realizada uma nova reação em duplicata contendo um controle de curva normal (figura 3 B). Somente as amostras que apresentaram novamente um padrão de decaimento diferente do normal foram selecionadas para sequenciamento. Essas amostras foram purificadas e sequenciadas pela mesma metodologia descrita acima. Alternativamente, um gráfico de HRM pode ser demonstrado pelo gráfico da diferença (Figura 3 C). Neste tipo de visualização, a diferença entre os padrões de curva é acentuada. o gráfico da diferença só foi utilizado para os padrões de curva não tão distintos, para melhor compreensão.

Figura 3 - Curvas de decaimento da fluorescência pelo acréscimo da temperatura na reação de HRM. Em A, a reação de 96 amostras, destacando-se em roxo todas as curvas que se diferenciaram da maioria e que foram selecionadas para repetição; em B, reação em duplicata de repetição das amostras selecionadas - controle normal (preto), amostras diferentes na primeira reação, mas que apresentaram padrão normal (azul) e amostras que se mantiveram com curva diferenciada (vermelho); em C, gráfico da diferença, onde uma amostra é selecionada como controle (é deixada como uma linha reta) e acentua-se a diferença das outras curvas em relação à ela.

2.3 Correlação genótipo-fenótipo

Trata-se de um ensaio caso-controle. Neste, foi calculada a frequência alélica das alterações encontradas e comparada com a frequência em um grupo controle sadio. A frequência alélica no grupo sadio foi determinada por de três diferentes maneiras:

2.3.1 HRM

Nos casos em que o reconhecimento da alteração ocorreu pela metodologia do HRM, o grupo controle foi analisado da mesma maneira, utilizando-se os mesmos primers. Nos casos onde o reconhecimento da alteração ocorreu por sequenciamento direto, foi desenhado um novo par de primers que amplificava somente a região com a alteração e que não incluía nenhum outro polimorfismo. Esses primers delimitavam amplicons pequenos, o que facilitava a diferenciação das curvas. As reações realizadas no grupo controle possuíam sempre uma amostra com a alteração (controle positivo). Mesmo se uma amostra do grupo controle exibisse padrão de curva igual ao controle positivo, essa amostra era sequenciada para a confirmação da alteração.

2.3.1.1 *Primers desenhados para verificação de alterações no grupo controle.*

Para as alterações encontradas fez-se necessário o desenho de sete novos primers, listados na tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Sequência de primers desenhados para verificação das alterações no grupo controle.

Gene	Alteração	Sentido	Primer	Amplicon (pb)	Função
<i>ACTC1</i>	c.-48C>T	F	5'- GCCCTCCTGGAGCCAGCCACCCAGA GCCAGC-3'	110 †	Primer degenerado Digestão
<i>FKBP1A</i>	-40C>A -7G>A	F	5'- GAGGTCTCGGGGCTTCTGG -3'	101	HRM grupo controle
		R	5'- CCTCACGCCCAGCCCTG -3'		
	c.-72C>G c.-65C>G	F	5'- CGCCGAGGTACTAGGCAGA -3'	117	HRM grupo controle
		R	5'- GTTCCACCTGCACTCCCAT -3'		
<i>FKBP1B</i>	c.*156C>T	F	5'- TCCATTCTCTCTGCCCAAGT -3'	75	HRM grupo controle
		R	5'- CCGAAGTTTCCTCAAGCAAG -3'		

† Combinado com o primer R utilizado no sequenciamento do grupo de estudo

2.3.2 Restrição enzimática

Foi desenhado um par de primer degenerado para ensaio de restrição enzimática. Foi utilizado o software online gratuito (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) e este novo primer foi combinado com outro complementar já existente. O novo amplicon possuía 110 pares de base (pb) e era digerido na ausência da alteração gerando fragmentos de 81 pb e 29 pb (este último não visualizado no gel). A figura 4 esquematiza o gel esperado para este ensaio.

Figura 4 - Esquema da digestão da alteração rs113178069. PM, peso molecular. Hom, homozigoto para a alteração. Het, heterozigoto para a alteração. N, indivíduo sem a alteração.

2.4 Ferramentas de Bioinformática

Foram realizadas as seguintes análises de bioinformática:

2.4.1 Análise de comparação da sequência de nucleotídeos entre espécies

Para esta análise, foi utilizada a ferramenta VISTA Browser (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>). Esta ferramenta informa quão conservada é a região em que se encontra a alteração entre as espécies.

2.4.2 Confirmação em banco de dados de SNPs

Este passo foi realizado através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>. Com essa informação, podemos ver se a alteração é um SNP já descrito em outras populações, assim como ver sua frequência populacional e alélica, além de encontrar estudos funcionais relacionados com tal alteração.

2.4.3 Avaliação de importância de alterações que não trocam aminoácido

Foram utilizadas duas ferramentas para a análise de alterações que não levavam à mudança de aminoácidos na proteína. O FASTSnip⁵⁷, (http://fastsnip.ibms.sinica.edu.tw/pages/input_novel.jsp), o qual faz análises da alteração com relação aos nucleotídeos adjacentes sem considerar a posição específica do gene. O programa prediz se a alteração afeta sítios de ligação de fatores de transcrição ou então sítios de ligação de proteínas relacionadas ao splicing. Através de uma árvore de decisões, o programa permite ranquear a alteração em 5 níveis de efeitos funcionais, variando de “sem efeito” nenhum à “alto risco”. O segundo programa utilizado, Mutationtaster⁵⁸ (<http://www.mutationtaster.org/>), reúne informações de diversos outros sites de análise a fim de informar uma sentença final sobre a alteração avaliada. Com base nessas diversas ferramentas, o programa lista diretamente se a alteração pode ser considerada como causadora da doença ou uma simples variante rara. O programa também detalha quais foram as características alteradas na descrição dos dados.

2.4.4 Avaliação de importância de alterações que trocam aminoácido

Além da ferramenta Mutationtaster acima citada, foram utilizadas duas outras ferramentas para predição de função protéica. A ferramenta Polyphen2⁵⁹ (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) é baseada em características que compreendem a informação da sequência, filogenia e estrutura gerada pela alteração. A ferramenta SIFT⁶⁰ (<http://sift.jcvi.org/>), é

baseada na homologia das sequências que classifica as substituições de aminoácidos entre “intolerante” e “tolerante” e prediz se tal substituição exibirá algum efeito fenotípico na proteína.

2.4.5 Avaliação de importância de alterações com relação à sítios de microRNA

Foi utilizada a ferramenta TargetScan⁶¹ (<http://www.targetscan.org/>) para análise do sítio de ligação de microRNA (miRNA), . A ferramenta prediz efeitos biológicos dos miRNA pela busca de sequências conservadas que correspondem à região *seed* de cada miRNA.

2.5 Histologia

Segmentos da autópsia do coração foram incluídos em parafina e cortados em secções de 4µm, que foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina e picrossirius para visualização da área celular e de colágeno, respectivamente. As lâminas foram analisadas usando um sistema de aquisição de imagem computadorizado (Leica Imaging Systems, Bannockburn, IL, USA).

2.6 Imunofluorescência confocal

Para as análises de imunofluorescência, segmentos da autópsia foram desidratados em banhos graduais de etanol, submergidos em citrisolv, incorporados em resina paraplast. (Oxford, St Louis, MO, USA) e cortados em secções de 4 µm. Secções de tecidos foram desparafinizadas em citrosolv e reidratadas em diluições seriais de álcool. Anteriormente à

marcação, secções cardíacas foram bloqueadas em 2% de solução de caseína em PBS e depois incubadas com anticorpo primário diluído em solução bloqueadora *overnight* a 4°C em câmara úmida. Anti-CRP3/MLP18 foi gentilmente cedido por Silvia Arber e Pico Caroni da Universidade de Basel, Suíça. O anticorpo secundário fluorescente anti-rabbit conjugado com Alexa 555 (Molecular Probes) e DAPI (Molecular Probes) foram diluídos em PBS e incubados em uma câmara escura à temperatura ambiente por 90 minutos. Lâminas de controle negativo foram incubadas somente com o anticorpo secundário. A imunofluorescência foi detectada usando o sistema confocal Carl Zeiss 510 LMS conectado à um microscópio Axiovert.

2.7 Ética

O projeto (protocolo de pesquisa nº 0783/08) intitulado “Investigação genética em pacientes com Cardiomiopatia Dilatada” foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.8 Estatísticas

Dados foram apresentados pelas médias $\pm$ desvio padrão para as variáveis contínuas e como frequências para as variáveis categóricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo software SPSS 13.0. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W) foi avaliado pelo teste de Chi-quadrado. A comparação das frequências alélicas foi avaliada pelo teste exato de Fisher.

3. RESULTADOS

3.1 Aspectos Gerais

3.1.1 Características da população

A Tabela 4 mostra as principais características dos pacientes com Cardiomiopatia Dilatada Idiopática selecionadas para o estudo.

Tabela 4 – Características demográficas, clínicas e funcionais da população de estudo.

Grupo de estudo	
Dados demográficos e clínicos	
Idade	44,8 ± 12,4
Sexo (Homens/Mulheres)	139 / 47
Etnia (Negros/Mulattos/ Brancos)	27 / 29 / 130
Bioquímicos	
Hemoglobina (mg/dL)	12,7 ± 1,97
Colesterol total (mg/dL)	185 ± 55
Triglicérides (mg/dL)	106 ± 56
HDL (mg/dL)	45,7 ± 17,3
LDL (mg/dL)	116 ± 44
Creatinina (mg/dL)	1,2 ± 0,3
IMC (kg/m ²)	25,08 ± 4,65
Frequência Cardíaca (bpm)	76,35 ± 13,57
Pressão sanguínea diastólica (mmHg)	67,41 ± 14,56
Pressão sanguínea sistólica (mmHg)	104,44 ± 18,9
Dados Ecocardiográficos	
Diâmetro do átrio esquerdo , mm	47,52 ± 8,48
Diâmetro da aorta , mm	32,57 ± 4,26
Diâmetro do ventrículo direito , mm	27,19 ± 6,14

Continua

Conclusão Tabela 4

Grupo de estudo	
Ventrículo Esquerdo	
Septo Intraventricular , mm	8,39 ± 1,48
Espessura da parede posterior , mm	8,31 ± 1,21
Diâmetro diastólico , mm	73,55 ± 10,06
Diâmetro sistólico , mm	64,01 ± 9,58
Fração de ejeção , (%)	35,08 ± 8,9
Massa, g	268,74 ± 77

3.1.2 Variantes genéticas

Dos amostras dos 186 pacientes estudados, 57% foram diretamente sequenciadas e 43% foram pré-selecionadas por HRM. Destas últimas, 0,6% foram sequenciadas por apresentarem curvas diferentes da curva do indivíduo normal. Foram encontradas 9 novas variantes genéticas e 19 polimorfismos já descritos na literatura.

As alterações encontradas serão detalhadas a seguir e separadas por genes.

3.2 Alterações no gene *ACTC1*

Para melhor compreensão, as alterações encontradas foram classificadas em duas categorias: aquelas já descritas na literatura e alterações novas.

3.2.1 Polimorfismos já descritos na literatura:

Os amplicons desenhados para a análise do gene compreendiam 11 SNPs já descritos na literatura (Tabela 5). Destes, apenas três possuíam frequência alélica descrita, sendo que apenas um foi encontrado no grupo de

estudo: o SNP rs2307493, que estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W), apresentou uma frequência alélica dentro da faixa de diferença entre as frequências alélicas da população africana e caucasiana.

Tabela 5 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene *ACTC1* indicando a troca gerada, o local do polimorfismo, suas respectivas frequências alélicas, população onde foi descrito e as frequências nos grupos de estudos.

SNP	Troca	Locus	Frequência alélica nos casos	Frequência alélica nos controles	Frequência dbSNP	Populações dbSNP
rs113178069	A/T	éxon 1	0,056	0,116 α	ND	ND
rs111244139	G/T	íntron 1	-	-	ND	ND
rs7650808	A/C	éxon 3	-	-	0,077 - 0	Afric - Cauc
rs11539837	A/G	éxon 3	-	-	ND	ND
rs112220358	G/T	íntron 3	-	-	ND	ND
rs111904141	C/G	íntron 4	-	-	ND	ND
rs112469845	Ins/del†	éxon 6	-	-	ND	ND
rs2307493	C/T	éxon 6	0,018	-	0,08 - 0	Afric - Cauc
rs113835687	C/G	éxon 7	-	-	ND	ND
rs28730667	C/T	éxon 7	-	-	0,02 - 0	Afric - Cauc
rs3729758	C/T	éxon 7	-	-	ND	ND

ND: Não descrita; † GDB:186852 (alelo de referência); α n=188

O SNP rs113178069 foi descrito recentemente no banco de dados dbSNP pelo projeto 1000 Genomas e não apresenta frequência alélica determinada. Essa alteração foi encontrada em 21 indivíduos do grupo de estudo (um deles em homozigose) por sequenciamento direto, gerando uma frequência alélica de 0,056, em EH-W. Como no momento de sua descoberta a alteração ainda não era descrita, realizou-se uma genotipagem no grupo controle, por ensaio enzimático, através do desenho de um primer degenerado que criava um sítio de restrição para a enzima PvuII e que era

excluído com a alteração (Figura 5). No grupo controle o polimorfismo apresentou uma frequência alélica de 0,116, em EH-W, sendo este o único polimorfismo encontrado com frequência alélica estatisticamente diferente do grupo controle ($p=0,025$).

Figura 5 – Gel de agarose da digestão enzimática do PCR de uma placa de genotipagem do polimorfismo rs113178069. Letras indicam a linha da placa, C+ indica amostra controle da digestão. Na linha A, posição 1, 2 e 3 observam-se exemplos de amostras homozigotas para a alteração, heterozigotas e sem alteração, respectivamente.

3.2.2 Alterações novas:

Foram encontradas duas alterações não descritas na literatura (Figura 6 e Tabela 6). A troca de uma timina por uma citosina (Figura 6 – A) na região 5'UTR do éxon 1 ocorre no nucleotídeo 196 do RNAm com frequência alélica de 0,008. No grupo controle, esta alteração ocorre com uma frequência alélica de 0,013. Esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,54$). A outra alteração se encontra no íntron 2, onde ocorre a troca de uma citosina por uma guanina (Figura 6 – C) a 20 pares de bases do éxon 2 (c.128+20C>G), com frequência alélica de 0,005. Essa alteração foi genotipada no grupo controle por HRM. A Figura 7 mostra a identificação

de uma curva com padrão de 1 indivíduo em duplicata semelhante ao da alteração e que, posteriormente, foi sequenciada e confirmada como sendo a alteração. Logo, a frequência alélica da alteração no grupo controle foi de 0,002 e não houve diferença estatística significativa em relação à frequência do grupo caso.

Figura 6 - Cromatograma evidenciando as alterações em heterozigose no gene *ACTC1*. Em A, a troca de uma citosina por uma timina no éxon 1. Em B, sequência controle do éxon 1. Em C, a troca de uma citosina por uma guanina no íntron 2. Em D, sequência controle do íntron 2.

Tabela 6 – Sumarização dos dados para as alterações novas encontradas no gene *ACTC1*.

Alterações	Posição	Troca	Frequência alélica nos casos	Frequência alélica nos controles	H-W
Éxon 1	c.-48C>T	C/T	0,008	0,004	Sim
Íntron 2	c.128+20C>G	C/G	0,005	0,002	Sim

Figura 7 - Ensaio de HRM da alteração no íntron 2 no gene *ACTC1* (gráfico de diferença). As linhas em preto mostram curvas (duplicata) da amostra caso com alteração e as linhas em preto pontilhadas mostram curvas (duplicata) de um indivíduo da população controle com o mesmo padrão. As linhas azuis são curvas sem normais.

Com estes resultados, não foi encontrada alteração no gene que levasse à troca de aminoácido. As novas alterações encontradas, tanto no éxon não codificante quanto na região intrônica, não apresentam diferença nas frequências alélicas entre casos e controle.

3.3 Alterações no gene *FKBP1A*

3.3.1 Polimorfismos já descritos na literatura:

O gene possui mais de 148 SNPs descritos na literatura, sendo a maioria localizada em um grande íntron, entre os éxons 2 e 3, e também na região 3'UTR, em um éxon da isoforma 2 que não foi analisada. Os primers desenhados para amplificação dos éxons compreendiam apenas os três polimorfismo nos éxons do gene e um na região promotora próxima ao éxon 1. Destes quatro polimorfismos, apenas um apresentava frequência alélica descrita (Tabela 7). No presente estudo, foi encontrado em um paciente o polimorfismo rs6074549 com uma frequência alélica de 0,0026, sendo esta entre os valores de frequência do SNP na população africana e caucasiana.

Tabela 7 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene *FKBP1A* indicando a troca gerada, o local do polimorfismo, suas respectivas frequências alélicas, população onde foi descrito e as frequências nos grupos de estudos.

SNP	Troca	Locus	Frequência alélica nos casos	Frequência alélica nos controles	Frequência dbsnp	Populações dbsnp
rs113341506	A/G	promotor	-	-	ND	ND
rs6041957	C/T	éxon 1	-	-	ND	ND
rs6074549	C/G	éxon 3	0,0026	-	0,008 - 0	Afric - Cauc
rs11550408	C/T	éxon 4	-	-	ND	ND

ND: Não descrita

3.3.2 Alterações novas:

Foram encontradas quatro alterações não descritas na literatura (Tabela 8), em quatro indivíduos distintos. Foram sequenciados 72 indivíduos do grupo controle na busca das variantes, mas apenas a

alteração -40C>A no promotor foi encontrada. Para as outras alterações, foram desenhados novos pares de primers para genotipagem por HRM.

Tabela 8 - Sumarização dos dados para as alterações novas encontradas no gene *FKBP1A*.

Alterações	Posição	Troca	Frequência alélica nos casos	Frequência alélica nos controles	H-W
Promotor	-40C>A	C/A	0,0026	0,013 †	Sim
Promotor	-7G>A	G/A	0,0026	0	Sim
Éxon 1-5'UTR	c.-72G>C	G/C	0,0026	0	Sim
Éxon 1-5'UTR	c.-65C>T	C/T	0,0026	0	Sim

† n= 72 indivíduos

A troca de uma citosina por uma adenina (Figura 8 A) a 40 pares de base do éxon 1 foi encontrada também na população controle. A diferença entre as frequências alélicas não foi estatisticamente significativa ($p=0,58$).

A troca de uma guanina por uma adenina (Figura 8 B) a 7 pares de base do éxon 1 ocorreu em um paciente, gerando uma frequência alélica de 0,0026. A genotipagem no grupo controle foi realizada por HRM e não foi encontrado nenhum indivíduo com a alteração. Como a alteração se encontrava na região promotora, só foi possível a análise de bioinformática pelo programa FastSNP. Através deste, a alteração foi considerada com um risco de baixo a médio de estar associada com a doença, pois gerava uma sequência com sítios de ligação para dois novos fatores de transcrição.

Figura 8 – Cromatograma evidenciando as alterações em heterozigose na região promotora do gene *FKBP1A*. Em A, a troca de uma citosina por uma adenina; em B, a troca de uma guanina por uma adenina. // representa descontinuidade da fita, de forma que a sequência do indivíduo da alteração A age como controle da alteração B e vice-versa.

As outras duas alterações, das quatro encontradas que não estão descritas na literatura, estavam presentes na porção não codificante do éxon 1. A primeira troca ocorreu a 72 pares de bases do início da região codificante e leva a mudança de uma guanina por uma citosina (Figura 9 A). A segunda troca, de uma citosina por uma timina, ocorreu a 65 pares de bases (Figura 9 B). A genotipagem no grupo controle foi realizada por HRM e nenhum destes dois polimorfismos foi encontrado. A análise pelos programas de bioinformática determinou que ambas as alterações deveriam ser simples polimorfismos, pois não interferiam em nenhum dos aspectos analisados.

Figura 9 - Cromatograma evidenciando as alterações em heterozigose na região 5' UTR do gene *FKBP1A*. Em A, a troca de uma guanina por uma citosina; em B, a troca de uma citosina por uma timina.

De forma geral, não foram encontradas alterações nas porções codificantes; as novas alterações encontradas não sugerem relação de causalidade com a doença.

3.4 Alterações no gene *FKBP1B*:

3.4.1 Polimorfismos já descritos na literatura:

Os amplicons desenhados para a análise do gene compreendiam 11 SNPs já descritos na literatura (Tabela 9), sendo que apenas quatro destes possuem frequência alélica descrita. Três deles foram encontrados no grupo de estudo, apresentando frequências alélicas com valores intermediários entre as populações africana e européia.

O SNP rs114658911 foi descrito recentemente no banco de dados dbSNP pelo projeto 1000 Genomas, porém, não apresenta frequência alélica determinada. Essa alteração foi encontrada em 2 indivíduos do grupo de estudo por sequenciamento direto, o que levava a uma frequência alélica de 0,005, em EH-W . Como no momento de sua descoberta a alteração ainda não era descrita, realizou-se uma genotipagem no grupo controle por HRM. Foram encontrados 8 indivíduos com a alteração (Figura 10), gerando uma frequência alélica de 0,014. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,33$)

Tabela 9 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene *FKBP1B* indicando a troca gerada, o local do polimorfismo, suas respectivas frequências alélicas, população onde foi descrito e as frequências nos grupos de estudos.

SNP	Troca	Locus	Frequência alélica nos casos	Frequência alélica nos controles	Frequência dbsnp	Populações dbsnp
rs116520786	C/T	éxon 1	0,14	-	ND	ND
rs111634163	C/T	éxon 1	0,06	-	ND	ND
rs113983907	A/C	éxon 1	-	-	ND	ND
rs116849902	C/T	íntron 3	-	-	ND	ND
rs13016301	A/T	íntron 3	0,07	-	0 - 0,18	Afric - Cauc
rs113411313	C/T	íntron 3	-	-	ND	ND
rs1424344	C/T	íntron 3	0,18	-	0,32 - 0	Afric - Cauc
rs115528581	A/G	éxon 4	-	-	ND	ND
rs77743612	A/C	éxon 4	-	-	0 - 0,014	Afric - Cauc
rs14388	C/T	éxon 4	0,17	-	0,4 – 0,008	Afric - Cauc
rs114658911	C/T	éxon 4	0,005	0,014	ND	ND

ND: não descrito

Figura 10 - Ensaio de HRM do SNP rs114658911 no gene *FKBP1B* em uma placa do grupo controle. Linha roxa pontilhada, controle positivo. Linhas roxas inteiras, curvas do grupo controle com a alteração, e, linhas azuis curvas do grupo controle sem alteração.

3.4.2 Alterações novas:

Foi encontrada apenas uma alteração não descrita na literatura neste gene: a troca de uma guanina por uma adenina (Figura 11), que ocorreu no nucleotídeo 26 da região 3'UTR, com frequência alélica de 0,0026.

Figura 11 - Cromatograma evidenciando a alteração em heterozigose na região 5' UTR do gene *FKBP1B*. Em A, a seta indica a troca de uma guanina por uma adenina; em B, sequência controle.

Esta alteração também foi encontrada no grupo controle com frequência alélica de 0,005. Não houve diferença estatística significativa entre casos e controles ($p=0,55$). Esta alteração também não afetava nenhum sítio de ligação de microRNA.

Neste estudo, não foram encontradas alterações no gene *FKBP1B* que levavam à troca de aminoácidos. A nova alteração encontrada também estava presente no grupo controle.

3.5 Alterações no gene *CSRP3*:

3.5.1 Polimorfismos já descritos na literatura:

Os amplicons desenhados para a análise deste gene compreendiam 26 SNPs já descritos na literatura (Tabela 10). Destes, 11 possuem frequência alélica descrita, sendo que 7 deles também foram encontrados neste estudo, apresentando frequência alélica entre os valores das frequências das populações africana e européia. Dos quatro SNPs já descritos na literatura e não encontrados no presente estudo, dois possuíam frequência muito baixa (0,003 e 0,006), um polimorfismo estava descrito em uma população hispânica e o outro numa população de múltiplas etnias. Tais fatos podem explicar a razão de não terem sido encontrados na população de estudo.

Tabela 10 - Polimorfismos já descritos na literatura para o gene *CSRP3* indicando a troca gerada, o local do polimorfismo, suas respectivas frequências alélicas, população onde foi descrito e as frequências nos grupos de estudos.

SNP	Troca	Locus	Frequência alélica nos casos	Frequência alélica nos controles	Frequência dbsnp	Populações dbsnp
rs45498797	A/C	éxon 1	0,008	-	0 – 0,006	Afric - Cauc
rs112513407	A/T	íntron 1	-	-	ND	ND
rs45531937	A/G	éxon 2	-	-	0 – 0,003	Afric - Cauc
rs45550635	C/T	éxon 2	0,0026	0,0028†	0 – 0,003	Afric - Cauc
rs112884796	A/G	éxon 3	-	-	ND	ND
rs104894205	C/T	éxon 3	-	-	ND	ND
rs112848043	C/T	éxon 3	0,0026	0,0017	ND	ND
rs104894204	G/T	éxon 3	-	-	ND	ND -
rs34075817	C/T	éxon 3	-	-	0,16	múltiplo
rs746207	A/G	éxon 3	-	-	ND	ND
rs45552933	A/G	éxon 3	-	-	ND	ND
rs45476991	C/T	éxon 3	0,0026	-	0 – 0,014	Afric - Cauc
rs7124801	C/T	éxon 3	0,05	-	0,13 - 0	Afric - Cauc
rs45602431	A/G	éxon 3	-	-	0 – 0,006	Afric - Cauc
rs45583799	A/C	éxon 4	-	-	ND	ND
rs45582433	C/G	éxon 4	0,016	-	0,021 – 0	Afric - Cauc
rs13451	A/G	éxon 4	0,06	-	0 – 0,125	Afric - Cauc
rs35210858	-/C	éxon 4	-	-	ND	ND
rs113412482	A/C	éxon 4	-	-	ND	ND
rs45541334	A/C	íntron 4	-	-	ND	ND
rs7103779	A/G	íntron 4	0,016	-	0,034 - 0	Afric - Cauc
rs71486897	G/T	éxon 5	-	-	ND	ND
rs113174709	C/G	íntron 5	-	-	ND	ND
rs111868331	C/G	éxon 6	0,0026	0,0017	ND	ND
rs45607943	A/G	éxon 6	-	-	0,026	Hispanica
rs111525588	A/G	éxon 6	-	-	ND	ND

† n= 525 indivíduos

O SNP rs111868331 foi descrito recentemente no banco de dados dbSNP pelo projeto 1000 Genomas, mas não apresenta frequência alélica determinada. Essa alteração foi encontrada em um indivíduo do grupo de estudo por sequenciamento direto (Figura 12 A). a troca de uma guanina por uma citosina gerava uma frequência alélica de 0,0026 para o novo alelo e estava em EH-W . Como no momento de sua descoberta a alteração ainda não era descrita e levava a troca de aminoácido, realizou-se uma genotipagem no grupo controle por HRM (Figura 13). Foi encontrado um indivíduo com a alteração (Figura 12 B), gerando uma frequência alélica de 0,0017. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=1$). Além disso, a troca de aminoácidos gerada pela alteração (Gly182Arg) foi predita por dois programas como não afetando a função da proteína.

Figura 12 – Em A, cromatograma mostrando a alteração rs11868331 em heterozigose no indivíduo caso. Em B, cromatograma do indivíduo com a alteração da população controle, e sequência normal em C. Alterações indicadas pelas setas.

Figura 13 - Ensaio de HRM do SNP rs11868331 no gene *CSRP3* (gráfico da diferença) em uma placa do grupo controle. Linha azul escuro, controle positivo em duplicata. Linha roxa pontilhada, curva do grupo controle com a alteração, e, linhas azuis claras, curvas do grupo controle sem alteração.

O polimorfismo rs45550635, descrito em alguns estudos relacionada com cardiomiopatias, foi encontrado em um indivíduo do grupo de estudo, gerando uma frequência alélica de 0,0026. Além disso, como esse é um polimorfismo também associado com CH, foram genotipados 116 indivíduos com CH e foi encontrado 1 indivíduo com a alteração, gerando uma frequência alélica de 0,0043. Na genotipagem do grupo controle, foram encontrados 3 indivíduos com a alteração entre os 525 estudados, gerando uma frequência alélica de 0,0028. A diferença entre as frequências alélicas não foi estatisticamente significativa ($p=1$).

3.5.2 Alterações novas:

Foram encontradas duas novas alterações em dois indivíduos distintos (Tabela 11).

Tabela 11 - Sumarização dos dados para as alterações novas encontradas no gene *CSRP3*.

Alterações	Posição	Troca	Frequência alélica nos casos	Frequência alélica nos controles	H-W
éxon 3	c.140C>T	C/T	0,0026	0 α	Sim
íntron 5	c.508+18C>T	C/T	0,0026	0,005 $\dagger$	Sim

$\dagger$ n= 191 indivíduos, α n= 500 indivíduos

A troca de uma citosina por uma timina (Figura 14) ocorre a 18 pares de base do éxon 5 numa frequência alélica de 0,0026. Na genotipagem no grupo controle realizada por HRM (Figura 15), foram identificados dois indivíduos com a alteração, representando uma frequência alélica de 0,005. Esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,25$).

Figura 14 – Em A, cromatograma mostrando a alteração, indicada pela seta, no íntron 5 em heterozigose. Em B, cromatograma do indivíduo normal.

Figura 15 - Ensaio de HRM da alteração c.508+18C>T no gene *CSRP3* (gráfico da diferença) em uma placa do grupo controle. Linha azul escuro, controle positivo. Linha roxa pontilhada, curva do grupo controle com a alteração, e, linhas azuis claras, curvas do grupo controle sem alteração.

A segunda alteração ainda não descrita na literatura encontrada no estudo leva à troca de uma citosina por uma timina (Figura 16) na posição 257 do RNAm (nucleotídeo 140 da sequência codificante). A alteração foi confirmada por re-sequenciamento e por HRM (Figura 17). É importante ressaltar que este amplicom possui um polimorfismo além da alteração Logo, mais de um padrão de curva estava presente, como mostrado na figura 16. Contudo, o padrão da curva da amostra com a alteração c.140C>T é diferente dos demais padrões e de fácil distinção.

A genotipagem na população controle foi realizada por HRM. Como o HRM dessa genotipagem apresentava mais de um padrão de curva e a alteração poderia aparecer combinada com esse polimorfismo, todas as curvas que apresentavam padrão diferente do padrão normal sem alteração (não apenas parecido com o controle positivo da alteração c.140C>T) foram sequenciadas. A Figura 18 mostra a genotipagem de uma placa com a curva da amostra com a mutação e da amostra com o polimorfismo em heterozigose. Nesta se observa que não há indivíduos da população controle que apresentaram curva com padrão semelhante ao da alteração. Este ensaio foi realizado com 500 indivíduos do grupo controle e não foi encontrado nenhum indivíduo com a alteração.

Figura 16 - Em A, cromatograma mostrando a alteração, indicada pela seta, no éxon 3 em heterozigose. Em B, cromatograma do indivíduo normal.

Figura 17 – Curvas de dissociação do éxon 3 do gene *CSRP3* mostrando as 3 curvas dos genótipos do polimorfismo rs7124801 (azul, verde e laranja) e a curva do paciente com a alteração em duplicata (vermelho).

Figura 18 – Ensaio de HRM do éxon 3 do gene *CSRP3* em uma placa do grupo controle. Linha azul escuro, controle positivo; linha laranja, curva do heterozigoto do polimorfismo rs7124801; linhas azuis claras, curvas do grupo controle sem alteração.

A troca c.140C>T ocorre no segundo nucleotídeo do códon e leva à mudança de aminoácido, de uma treonina (Thr) para uma metionina (Met) (p.T47M). A análise em dois programas distintos de predição de alteração de função demonstrou que essa troca afetava a função da proteína. Somado a isso, esta troca ocorre num aminoácido que pertence a uma região altamente conservada entre as espécies e as demais proteínas da família CRP (Figura 19 A). A Figura 19 B representa um esquema da estrutura do domínio LIM1 da proteína MLP/CRP3, onde evidencia-se a região da proteína em que ocorreu a alteração p.T47M.

Figura 19 – Em A, alinhamento de aminoácidos do gene CSRP3 (38 ao 55) entre espécies e entre outras proteínas da família CRP de humanos. Em B, representação esquemática da estrutura do domínio LIM1 da proteína MLP (resíduos 10 a 61). Aminoácidos em cinza representam uma sequência altamente conservada; o aminoácido em cinza escuro representa o resíduo onde a alteração p.T47M ocorre; o aminoácido em preto representa a troca p.T47M. Asteriscos (*) indicam aminoácidos onde já foram descritas alterações relacionadas com cardiomiopatia. Números representam a posição do respectivo aminoácido.

A figura 20 representa os domínios da proteína em relação ao gene e apresenta todas as alterações já descritas na literatura. Nela evidencia-se que a alteração p.T47M ocorre numa região onde está presente a maioria

das alterações claramente associadas com cardiomiopatia, ou seja, no final do domínio LIM1.

Figura 20 – Esquema da proteína MLP e gene *CSRP3*. Em A, Domínios da proteína MLP codificada pelo gene *CSRP3*. TCAP representa o domínio de ligação com a proteína TCAP; LIM1 e LIM2, estruturas conservadas da proteína, o domínio LIM1 é o responsável pela ligação com a proteína actinina; NLS: sinal de localização nuclear. Os números em parênteses determinam a localização dos domínios em relação aos aminoácidos da proteína. Em B, representação exônica da proteína MLP. Em C, localização de todas as mutações já descritas na proteína (fora do retângulo estão alterações descritas previamente na literatura e dentro do retângulo a alteração encontrada neste estudo). Mutações sublinhadas são associadas com Cardiomiopatia Hipertrófica por estudos de segregação⁶²⁻⁶⁴. Círculos (°) indicam que os indivíduos possuem alterações também em outros genes de miofilamentos⁶². A mutação G72R foi dita como associada à Cardiomiopatia Dilatada apenas por estar presente num aminoácido conservado⁶⁵. A mutação K69R ocorre em um indivíduo com Cardiomiopatia Dilatada associada com Fibroelastose do endocárdio e apresenta penetrância incompleta³². A mutação Q91L é inconclusiva⁶². A mutação W4R foi inicialmente associada com a Cardiomiopatia Dilatada, entretanto, este projeto e outros estudos demonstraram nenhuma associação com a doença^{32,62,63,66,67}. A mutação T47M é associada com a Cardiomiopatia Dilatada por este estudo.

Os familiares de 1º grau foram convidados a participar da pesquisa e, após assinarem termo de consentimento livre e esclarecido, sua irmã e sua meia-irmã, ambas saudáveis, aceitaram o convite. A Figura 21 mostra o cromatograma de sua irmã e meia-irmã evidenciando que ambas não carregavam a alteração. As informações sobre os pais do paciente foram

relatadas pelas irmãs e o heredograma da família está representado na Figura 22.

Figura 21 - Em A, cromatograma mostrando a alteração, indicada pela seta, no éxon 3 em heterozigose. Em B, cromatograma da irmã. Em C, cromatograma da meia-irmã.

Figura 22 – Heredograma da família do paciente p.T47M. Quadrados indicam homens; círculos, mulheres. Símbolos abertos indicam indivíduos não afetados; símbolo semi aberto indica o probando; símbolos em cinza indicam indivíduos com morte cardíaca não conhecida; barras inclinadas indicam indivíduos falecidos; C indica indivíduo falecido devido a Doença de Chagas; U indica indivíduo falecido por problema cardíaco não especificado pela família e genótipo desconhecido; seta indica paciente índice.

Foram analisadas lâminas com secções do tecido cardíaco para visualização da ultraestrutura e fibrose (Figura 23). A análise foi comparada com lâminas de outro paciente com a mesma doença, mas sem alteração genética conhecida. A figura demonstra não haver diferença significativa entre as lâminas, tanto em relação à ultraestrutura quanto à fibrose.

Também foi avaliado se a alteração p.T47M estaria relacionada com a migração da proteína para o núcleo. Novamente, a comparação foi realizada contra um coração com a mesma doença, mas sem causa genética conhecida. Apesar de ter sido realizada uma análise semi-quantitativa, podemos visualizar na Figura 24 que não há diferença aparente na proporção núcleo/citoplasma da proteína entre os casos.

Desta forma, na população analisada, foram encontrados 63% dos polimorfismos descritos na literatura com frequência alélica, sendo que estes apresentaram frequências alélicas ou muito próximas a ou entre as frequências alélicas das populações africana e europeia. Foram encontrados dois SNPs que não possuíam frequência alélica descrita na literatura (recentemente descritos pelo projeto 1000 genomas); ambos apresentaram frequências alélicas muito semelhantes às do grupo controle e sem diferença estatisticamente significativa (rs112848043 – $p=1$; RS 111868331 – $p=1$). Por fim, foram encontradas duas alterações ainda não descritas na literatura: uma apresentou mesma frequência alélica no grupo controle e a outra, que levava à mudança de aminoácido, apresentou várias características que sugerem uma forte relação de causalidade com a doença.

Figura 23 – Fenótipo ultraestrutural do paciente p.T47M (A e C) e de um caso com CDI não genética (B e D), demonstrando características típicas da doença. Em A e B, secções coradas com hematoxilina-eosina demonstrando os cardiomiócitos. Em C e D, secções coradas com picrossírius destacando colágeno em vermelho escuro. Barras de escala representam 100µm.

Figura 24 – Localização celular da MLP em segmentos de coração humano de autópsia, observada em microscópio de imunofluorescência confocal. A e B, paciente p.T47M; C e D, paciente com CDI não genética. Em A e C, tecidos foram marcados com anticorpo anti-MLP (vermelho) e o núcleo com DAPI (azul). Em B e D, a avaliação da localização no núcleo e citoplasma num nível mediano foi obtida pelas imagens de fatias usando aparelho óptico no eixo Z. Configurações utilizadas: objetiva x63, tamanho das fatias: 512 x 512 pixels.

3.6 Resumo Geral

Foram encontradas 9 novas variantes genéticas no estudo: uma alteração no gene *FKBP1B*, duas no *ACTC1*, duas no *CSRP3* e quatro alterações no gene *FKBP1A* (Tabela 12).

Tabela 12 – Variantes genéticas novas nos éxons e regiões limítrofes dos genes estudados.

Gene	Localização	Pacientes (%) (n=186)	Referência (DNA codificante)	Mudança de aminoácido	População controle (n=288)
<i>ACTC1</i>	Éxon 1 - 5'UTR	3 (1.16%)	c.-48C>T	-	8 (2.77%)
<i>ACTC1</i>	Íntron 2	1 (0.53%)	c.372+20C>G	-	1 (0.34%)
<i>CSRP3</i>	Éxon 3	1 (0.53%)	c.140C>T	p.T47M	0†
<i>CSRP3</i>	Íntron 5	1 (0.53%)	c.508C>T	-	2 (0.69%)
<i>FKBP1A</i>	Promoter	1 (0.53%)	-40C>A	-	3 (1.04%)
<i>FKBP1A</i>	Promoter	1 (0.53%)	-7G>A	-	0
<i>FKBP1A</i>	Éxon 1 - 5' UTR	1 (0.53%)	c.-72C>G	-	0
<i>FKBP1A</i>	Éxon 1 - 5' UTR	1 (0.53%)	c.-65C>G	-	0
<i>FKBP1B</i>	Éxon 4 - 3'UTR	1 (0.53%)	c.*26G>A	-	1 (0.34%)

Destas alterações, duas estavam presentes em regiões intrônicas e foram encontradas com frequência alélica semelhante no grupo controle. Três estavam presentes na região 5'UTR, sendo que uma delas foi encontrada em um indivíduo do grupo controle com frequência alélica semelhante; e duas não estavam presentes no grupo controle. Duas alterações foram encontradas na região promotora, sendo que uma foi encontrada em um indivíduo do grupo controle, gerando uma frequência

alélica semelhante, e a outra não estava presente no grupo controle. Uma alteração foi encontrada na região 3'UTR e possuía frequência alélica semelhante ao grupo controle. Por fim, foi encontrada uma alteração na região exônica que levava a mudança de aminoácido. Diversos indícios sugerem que esta alteração esteja causando a doença.

4. DISCUSSÃO

O estudo das bases genéticas da Cardiomiopatia Dilatada Idiopática vem sendo amplamente realizado recentemente. Nos últimos 2 anos foram descritas, em humanos, variantes genéticas causadoras da doença em 13 novos genes^{66,68-70}. A identificação de novos genes ocorre principalmente por estudos de linkage ou pela análise de genes candidatos. Neste último caso, genes associados a problemas cardíacos em outras espécies ou associados a outras doenças cardíacas em humanos são estudados em pacientes com CDI.

Modelos animais demonstraram importante relação das proteínas “FKBPs” com a homeostase do cálcio cardíaco e também com a CDI. Além disso, alterações genéticas na região de ligação da rianodina com a FKBP1B levam a doenças cardíacas arritmogênicas⁷¹. Desta maneira, os genes “FKBPs” se apresentam como importantes candidatos no desenvolvimento da CDI.

No presente projeto, não foi encontrada nenhuma alteração em regiões exônicas codificantes dos genes “FKBPs”. Das cinco alterações encontradas e não descritas na literatura, duas foram excluídas como possíveis causadoras, pois também estavam presentes em indivíduos do grupo controle. As outras três alterações não estavam presentes no grupo controle. Contudo, as análises de bioinformática indicaram que duas delas não apresentavam risco de estarem relacionadas com a doença e uma delas possuía risco de muito baixo a médio. Isto porque a nova sequência obtida

pela troca de nucleotídeos gerava um sítio de ligação de dois novos fatores de transcrição (HSF2 e NRF2) e não interferia na ligação do fator de transcrição presente sem a alteração.

O fator de transcrição HSF2 não age em sistemas cardíacos e o fator NRF2 só é liberado no citoplasma em resposta ao estresse oxidativo e necessita da ligação de outros fatores para promover a transcrição (ARE e Maf). Como a região promotora adjacente (5000 bases) não exibia os sítios de ligação dos outros fatores de transcrição, não é provável que apenas a ligação com o fator de transcrição NRF2 leve a uma diferença na taxa de transcrição do gene. Logo, esta alteração foi tomada como não relacionada com o desenvolvimento da doença.

Este foi o primeiro trabalho de investigação genética dos genes *FKBP1A* e *FKBP1B* com a CDI. Apesar das evidências não indicarem uma relação das alterações com a causalidade da doença, isto não pode ser afirmado com certeza, já que não foram realizadas análises funcionais destas alterações. Contudo, foi adotada uma posição conservadora baseada nos dados de bioinformática, e, conseqüentemente, assumiu-se que não há relação de alterações nos genes FKBP's com a CDI na amostra estudada.

O gene *ACTC1*, codificante para a actina cardíaca, foi o primeiro gene a ter uma alteração relacionada com a CDI. No presente estudo, foram encontradas duas alterações que não estavam descritas na literatura, nenhuma delas levava à mudança de aminoácidos. Tanto a alteração no éxon 1, quanto à alteração no íntron 2 foram encontradas também no grupo controle sem diferença entre as frequências alélicas dos dois grupos.

O gene *ACTC1* apresentou um polimorfismo presente na literatura (sem frequência alélica descrita) com frequência alélica diferente entre casos e controles ($p=0,025$), porém, ambos em EH-W. O alelo mutado (T) do polimorfismo rs113178069 apresentou frequência alélica maior no grupo controle do que nos casos ($0,116 \times 0,056$), indicando assim que a diferença entre as frequências não deve estar associada ao desenvolvimento da doença.

Após a descoberta das alterações descritas por Olson e colaboradores¹⁵ em uma população caucasóide, outros grupos não encontram alteração no gene *ACTC1* relacionadas à CDI em diferentes populações (japoneses⁷², sul-africanos⁷³ e indianos⁷⁴). Logo, a ausência de variantes no presente grupo de estudo condiz com a literatura. Além disso, alterações no gene também foram encontradas em indivíduos com doenças cardíacas distintas (ventrículo esquerdo não-compactado e defeitos de septação atrial). Isto indica que alterações no gene *ACTC1* podem levar a diferentes problemas cardíacos e que estas ocorrem de forma rara na CDI.

O gene *CSRP3* possui diversas associações não claras com a CDI. A primeira alteração descrita no gene por Knoll e colaboradores⁹, em 2002, foi encontrada no domínio de interação com a proteína TCAP (região N-terminal -aminoácido 4 – p.W4R), com uma frequência alélica de 0,017 em uma população alemã. Esta alteração, porém, apresentou penetrância incompleta. Mohopatra e colaboradores³², em 2003, encontraram a mesma alteração com uma frequência alélica de 0,003 em uma população britânica. Os autores observaram que a alteração não segregava com a doença na

família do indivíduo afetado. Por outro lado, Geier e colaboradores⁶⁴, também em 2003, não encontraram essa alteração em 400 pacientes com CDI e 520 controles, também em uma população alemã.

Na população do presente estudo, foi encontrado um paciente que carregava a alteração, gerando uma frequência alélica de 0,0026. A alteração também estava presente em 3 indivíduos do grupo controle, gerando uma frequência alélica de 0,0028. Não houve diferença estatística entre as frequências dos dois grupos. Tais informações sugerem que, independentemente da população estudada, esta alteração esteja agindo como um simples polimorfismo.

Além disso, esta mesma alteração foi descrita em outros estudos em pacientes com CH. Nestes casos, a alteração ou não segregava com a doença, e/ou exibia penetrância incompleta e/ou também estava presente no grupo controle^{62-64,67}. Verificou-se, então, a presença desta alteração num grupo de pacientes com CH matriculados no Instituto do Coração. Dentre os 116 analisados, foi encontrado 1 indivíduo carregando a alteração, gerando uma frequência alélica de 0,0043. Esta frequência não foi estatisticamente diferente tanto do grupo com CDI, quanto do grupo controle. Mais uma vez, reforçando a hipótese de a alteração ser um polimorfismo de baixa frequência não relacionado com a doença.

Recentemente, Knoll e colaboradores, 2010⁷⁵, demonstraram que camundongos com a alteração (p.W4R) em hetero e homozigose exibiam CH e, posteriormente, insuficiência cardíaca gene, dosagem, e idade-dependente. Demonstraram também diferença na expressão do gene e na

ligação da MLP com TCAP, sugerindo que a alteração estaria associada tanto com CH (em idades menores), quanto com CDI (em idade mais avançada). Ainda sim, com os dados dos trabalhos citados acima, concordantes com os dados do presente trabalho que sugerindo que a alteração seja um simples polimorfismo, acreditamos que os resultados apresentados pelos autores sejam específicos do modelo animal utilizado.

Outro caso de alteração no gene *CSRP3* relacionada com CDI ocorre no aminoácido 91. A troca de uma Glutamina por uma Leucina é dita como possivelmente associada à doença somente pelo fato de ocorrer em um aminoácido conservado e por estar ausente em 253 indivíduos controle⁶⁵. Interessantemente, esta alteração não está localizada no hotspot do gene (aminoácido 42 ao 72), onde se concentram as alterações tidas como causadoras de doença. No presente estudo, também foi encontrada uma alteração fora deste hotspot. A troca de uma Glicina por uma Arginina na posição 182 ocorre no domínio LIM2 da proteína, cuja função não é descrita. A alteração também foi encontrada em um indivíduo do grupo controle e as frequências alélicas não foram diferentes: 0,0026 nos casos e 0,0017 nos controles ($p=1$). Recentemente, esta alteração foi descrita como um polimorfismo pelo projeto 1000 Genomas, mas sem frequência alélica. Desta maneira, a presença da alteração em indivíduos saudáveis, somado ao fato de que a mesma foi predita como não afetando a função da proteína, indica que esta alteração não deve estar agindo como causadora da doença.

O último caso incerto de relação de alterações no gene com a CDI foi descrito por Mohopatra e colaboradores, 2002³². Neste estudo, os autores

descrevem a alteração p.K69R afetando a interação da MLP com a α -actinina em duas pacientes irmãs com CDI e fibroelastose do endocárdio associada. Apesar da alteração estar presente no sinal de localização nuclear e ter sido demonstrado um acúmulo da proteína mutada na região perinuclear, os autores relataram que a alteração levou a uma mudança na estrutura da proteína, prolongando o domínio de ligação com a α -actinina. Esta seria a razão para a diminuição de sua ligação com a mesma. A mãe das pacientes também carregava a alteração e não apresentava nenhuma das doenças. Os autores justificaram o fato como penetrância incompleta, como ocorre em diversos casos de doenças cardíacas⁷⁶. Por outro lado, o mais frequentemente observado em doenças cardíacas com penetrância incompleta é o fator idade dependente, de forma que a doença é expressa em indivíduos mais idosos. Contudo, o contrário ocorre para esta alteração, o que pode indicar outro fator para este achado. Nesse sentido, os autores excluíram a hipótese de uma segunda alteração herdada do pai nos genes mais comumente associados à CDI, porém, ainda há diversas opções possíveis. Desta maneira, as incertezas tornam improvável que esta alteração seja a causadora da doença.

No presente projeto foi encontrada uma alteração genética que apresenta diversos indícios de ser a causadora da doença.

A alteração p.T47M ocorre no domínio LIM1 da proteína CRP3/MLP. Este domínio possui uma função importante na proteína pois é responsável pela ligação com a α -actinina, que oferece suporte para o ancoramento da proteína no disco Z. Esse domínio é altamente conservado entre as

diferentes proteínas da família CRP CRP1, CRP2 e CRP3/MLP). A alteração no aminoácido 47 ocorre em uma região mais exposta do domínio LIM1^{77,78} (Figura 19 B). Este aminoácido e os três adjacentes para ambos os lados são os mais conservados entre diversas espécies e, principalmente, entre as diferentes proteínas da família (Figura 19 A).

A alteração p.T47M foi predita como afetando a função da proteína por dois programas distintos, sugerindo a sua importância. Através da genotipagem de 500 indivíduos do grupo controle (1000 cromossomos), verificou-se que a alteração era uma variante rara, pois não estava presente neste grupo.

Quando comparada com as mutações já descritas na literatura, percebemos que a alteração p.T47M ocorria na mesma região onde ocorriam as outras mutações (Figura 20 C e 19 A). As evidências para a potencial causa da doença fizeram com que entrássemos em contato com a família para realizar um estudo de segregação (Figura 22). Foram encontradas apenas uma irmã e uma irmã por parte de pai, ambas saudáveis e não possuidoras da alteração. Esta informação não implica na segregação da alteração com a doença, mas reforça a idéia de que a doença no paciente era causada pela alteração. Além disso, foi reportado um histórico familiar por parte do pai de vários falecimentos por problemas cardíacos, incluindo o pai do paciente.

Na tentativa de se compreender como a alteração estaria causando a doença no paciente, foram comparadas biópsias do coração deste paciente com outras de um paciente com a mesma doença, mas sem alteração

genética conhecida. As análises mais comuns descritas na literatura, realizadas em pacientes com CH, são de ultraestrutura e fibrose. Na comparação entre os pacientes, não foi observada diferença significativa em relação a essas características (Figura 23). Desta maneira, evidenciou-se que a alteração estaria levando à doença por modificações diferentes das que ocorrem em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica portadores de mutações neste gene, estas caracterizadas por extensa fibrose miocárdica.

Recentemente, a proteína MLP também tem sido descrita como tendo a função de mensageira de informação para o núcleo⁷⁹⁻⁸¹. Nesse sentido, verificou-se se a alteração estaria interferindo na concentração núcleo/citoplasma da proteína. Para tanto, foi realizada uma comparação idêntica à análise de biópsias anterior. Apesar das limitações da técnica utilizada (análise semi-quantitativa), não pôde ser observada diferença aparente entre os dois pacientes (Figura 24). Entretanto, Boateng e colaboradores⁸², em 2007, demonstraram que corações humanos em falência exibem quase nenhum MLP oligomérico (a forma encontrada no citoplasma) e, nos casos do presente projeto, a proteína estava presente no citoplasma. Esta discrepância pode indicar um passo inicial para futuras análises funcionais.

Desta forma, diversos fatores indicam a alteração p.T47M como causadora da doença, apesar de não ter sido possível a análise de segregação. As análises histológicas realizadas não permitiram a identificação do mecanismo pelo qual a alteração estaria levando à CDI, mas possibilitaram identificá-los como diferentes dos mecanismos pelos quais alterações no gene

levam à CH. São necessários mais estudos funcionais para o completo entendimento destes mecanismos. Estes poderiam ser realizados com modelos animais ou com a análise da alteração em cardiomiócitos maduros derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) .

4.1 Considerações Finais

As doenças genéticas complexas têm sido alvo de diversos estudos ultimamente. Entre as diferentes hipóteses discutidas de como alterações genéticas estariam influenciando estas doenças, a hipótese de que diversas variantes comuns determinam a doença é uma das mais aceitas. Muitos estudos de Genome-Wide Association (GWAS – ou “estudo de associação de genética ampla”) falharam na tentativa de determinar tais variantes ou encontraram variantes que explicavam pouco das doenças. Diversos ajustes para análise dos dados estão sendo aplicados neste tipo de estudo, porém, pouca evolução foi alcançada. Em resposta, hipóteses alternativas ganham mais importância para a compreensão das doenças complexas, como, por exemplo, a de que variantes menos frequentes e/ou alelos raros também possam contribuir para o desenvolvimento de tais doenças.

Neste sentido, o sequenciamento de diversos genes candidatos se apresenta como importante ferramenta, principalmente, para se encontrar variantes raras. A genética se concentrou fortemente nas alterações que causavam a mudança de aminoácidos e, em muitos casos, essas alterações levavam a doença a se apresentar de forma monogênica dentro das famílias em que estavam presentes. Ainda assim, essas alterações explicam muito

pouco dos casos, sendo menos de 20% na CDI⁶⁸. Como pudemos observar no presente projeto, onde quatro genes foram seqüenciados e foi encontrada apenas uma alteração que levava à mudança de aminoácido que possivelmente seja a causa da doença.

Por outro lado, determinar como uma alteração está relacionada com a doença não é tarefa simples. Atualmente, são utilizados modelos animais, mas estes apresentam diversas limitações, principalmente, a de que o sistema estudado dificilmente possui as mesmas características que o humano. Estes problemas estão sendo superados pelos modelos de doença paciente específicos, onde, através da reprogramação de células somáticas em células tronco pluripotentes, com seguinte diferenciação em células do sistema a ser estudado (um cardiomiócito, por exemplo), pode ser avaliado o efeito de uma alteração genética numa célula humana do próprio paciente.

Outro importante aspecto para o entendimento da genética das doenças complexas reside nas alterações em regiões não codificantes, principalmente, relacionadas à expressão gênica. Conforme entendermos melhor como as alterações genéticas que afetam fatores de transcrição e os diferentes RNAs não-codificantes (recentemente descobertos) agem modulando a expressão e modificações pós-transcricionais, maior será o espectro de possibilidades de causas das doenças complexas. No presente projeto, três alterações foram encontradas no grupo caso, mas não estavam presentes no grupo controle, sugerindo estarem envolvidas com a doença. Entretanto, a análise de bioinformática, que levava em consideração a posição da alteração em relação aos sítios de fatores de transcrição, classificou essas alterações com um risco

baixo de associação com a doença. Desta maneira, se houvessem ensaios funcionais mais abrangentes que os atuais (ensaio de luciferase, por exemplo), poderíamos verificar se estas alterações estariam envolvidas em outros aspectos, que não apenas os fatores de transcrição, e verificar com maior certeza sua relação com a doença.

Por fim, os estudos de genética estão sendo modificados com o uso dos sequenciadores de terceira geração. Hoje, por um preço muito menor e com apenas uma única reação se consegue o genoma completo de um indivíduo. Consequentemente, diversas variantes raras serão descobertas com esse novo sistema. Uma mudança já pode ser percebida pelo projeto 1000 Genomas, onde estão sendo sequenciados diversos indivíduos de diferentes populações e estão sendo encontradas muitas novas variantes raras. Essa valiosa informação disponibilizada no decorrer do presente projeto foi importante para a confirmação de que as variantes raras encontradas aqui também ocorrem em outros indivíduos saudáveis, de forma que sua relação com a doença seja, no mínimo, questionável. Além disso, o sequenciamento do genoma completo é vendido como um serviço para qualquer pessoa da população geral. Nos próximos anos, o interesse destes indivíduos em conhecer seu próprio genoma aumentará e, com ele, a necessidade de análises funcionais. Dessa maneira, o aprimoramento dos estudos funcionais de alterações genéticas, codificantes para proteínas ou não, tornando-os mais acessíveis, realizáveis nas células onde o gene age, de rápida análise e maior confiança, torna-se uma das principais necessidades da ciência para o futuro.

5. CONCLUSÃO

Não se encontraram fortes evidências para a associação dos genes *ACTC1*, *FKBP1A* e *FKBP1B* com a Cardiomiopatia Dilatada idiopática na amostra estudada.

Os presentes resultados sugerem que alterações no gene *CSRP3* também são capazes de causar Cardiomiopatia Dilatada Idiopática além da Cardiomiopatia Hipertrófica.

6. REFERÊNCIAS

1. <http://who.int>. vol 2008, p <http://who.int>.
2. <http://americanheart.org>. vol 2008, p <http://americanheart.org>.
3. Richardson P, McKenna W, Bristow M *et al*: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-842.
4. Kushwaha SS, Fallon JT, Fuster V: Restrictive cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1997; 336: 267-276.
5. Corrado D, Basso C, Thiene G *et al*: Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1512-1520.
6. Towbin JA, Bowles NE: The failing heart. *Nature* 2002; 415: 227-233.
7. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd: Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* 1989; 80: 564-572.
8. Franz WM, Muller OJ, Katus HA: Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet* 2001; 358: 1627-1637.
9. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM *et al*: The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002; 111: 943-955.
10. Morimoto S: Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 659-666.
11. Frey N, Katus HA: [Dilated cardiomyopathy as a genetic disease: molecular and clinical aspects.]. *Internist (Berl)* 2008; 49: 43-50.
12. Timerman AP, Onoue H, Xin HB *et al*: Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 20385-20391.
13. Borovikov YS: Conformational changes of contractile proteins and their role in muscle contraction. *Int Rev Cytol* 1999; 189: 267-301.

14. Bers DM: Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res* 2002; 90: 14-17.
15. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT: Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998; 280: 750-752.
16. Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T: Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 5901-5905.
17. Herman IM: Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 48-55.
18. Vandekerckhove J, Bugaisky G, Buckingham M: Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J Biol Chem* 1986; 261: 1838-1843.
19. Lu MH, DiLullo C, Schultheiss T *et al*: The vinculin/sarcomeric- α -actinin/ α -actin nexus in cultured cardiac myocytes. *J Cell Biol* 1992; 117: 1007-1022.
20. Lebart MC, Mejean C, Boyer M, Roustan C, Benyamin Y: Localization of a new α -actinin binding site in the COOH-terminal part of actin sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 120-126.
21. Wong WW, Doyle TC, Cheung P, Olson TM, Reisler E: Functional studies of yeast actin mutants corresponding to human cardiomyopathy mutations. *J Muscle Res Cell Motil* 2001; 22: 665-674.
22. Vang S, Corydon TJ, Borglum AD *et al*: Actin mutations in hypertrophic and dilated cardiomyopathy cause inefficient protein folding and perturbed filament formation. *FEBS J* 2005; 272: 2037-2049.
23. Bookwalter CS, Trybus KM: Functional consequences of a mutation in an expressed human α -cardiac actin at a site implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2006; 281: 16777-16784.
24. Gregorio CC, Trombitas K, Centner T *et al*: The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol* 1998; 143: 1013-1027.
25. Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC: Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18: 637-706.

26. Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr. *et al*: MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997; 88: 393-403.
27. Pashmforoush M, Pomies P, Peterson KL *et al*: Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nat Med* 2001; 7: 591-597.
28. Chien KR: Stress pathways and heart failure. *Cell* 1999; 98: 555-558.
29. Hoshijima M, Chien KR: Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* 2002; 109: 849-855.
30. Hirota H, Chen J, Betz UA *et al*: Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999; 97: 189-198.
31. Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y *et al*: Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest* 2001; 108: 1459-1467.
32. Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH *et al*: Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 207-215.
33. Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R *et al*: Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 1987; 61: 70-76.
34. Zaugg M, Schaub MC: Cellular mechanisms in sympatho-modulation of the heart. *Br J Anaesth* 2004; 93: 34-52.
35. Solaro RJ: Is calcium the 'cure' for dilated cardiomyopathy? *Nat Med* 1999; 5: 1353-1354.
36. Berridge MJ: Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 1997; 499 (Pt 2): 291-306.
37. Carafoli E: Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1115-1122.
38. Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M *et al*: Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 2003; 299: 1410-1413.

39. Marks AR, Tempst P, Hwang KS *et al*: Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8683-8687.
40. Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T *et al*: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 1989; 339: 439-445.
41. Nakai J, Imagawa T, Hakamat Y, Shigekawa M, Takeshima H, Numa S: Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* 1990; 271: 169-177.
42. Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH: Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1990; 265: 13472-13483.
43. Clancy JS, Takeshima H, Hamilton SL, Reid MB: Contractile function is unaltered in diaphragm from mice lacking calcium release channel isoform 3. *Am J Physiol* 1999; 277: R1205-1209.
44. Takeshima H, Yamazawa T, Ikemoto T *et al*: Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *EMBO J* 1995; 14: 2999-3006.
45. Jayaraman T, Brillantes AM, Timerman AP *et al*: FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 1992; 267: 9474-9477.
46. Takeshima H, Komazaki S, Hirose K, Nishi M, Noda T, Iino M: Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J* 1998; 17: 3309-3316.
47. Brillantes AB, Ondrias K, Scott A *et al*: Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 1994; 77: 513-523.
48. Marks AR: Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* 1997; 272: H597-605.
49. Lam E, Martin MM, Timerman AP *et al*: A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 26511-26522.

50. Sewell TJ, Lam E, Martin MM *et al*: Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 21094-21102.
51. Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL *et al*: Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 1998; 391: 489-492.
52. Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS *et al*: Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* 2002; 416: 334-338.
53. McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB: The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 1971; 285: 1441-1446.
54. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44: 672-673.
55. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
56. Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J *et al*: Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest* 1995; 96: 687-692.
57. Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH *et al*: FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: W635-641.
58. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D: MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010; 7: 575-576.
59. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L *et al*: A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7: 248-249.
60. 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: 1073-1081.
61. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.

62. Bos JM, Poley RN, Ny M *et al*: Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab* 2006; 88: 78-85.
63. Geier C, Gehmlich K, Ehler E *et al*: Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2753-2765.
64. Geier C, Perrot A, Ozcelik C *et al*: Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 107: 1390-1395.
65. Hershberger RE, Parks SB, Kushner JD *et al*: Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci* 2008; 1: 21-26.
66. Brauch KM, Karst ML, Herron KJ *et al*: Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 930-941.
67. Newman B, Cescon D, Woo A *et al*: W4R variant in CSRP3 encoding muscle LIM protein in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 2005; 84: 374-375.
68. Fatkin D, Otway R, Richmond Z: Genetics of dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Clin* 2010; 6: 129-140.
69. Moulik M, Vatta M, Witt SH *et al*: ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 325-333.
70. Hassel D, Dahme T, Erdmann J *et al*: Nexilin mutations destabilize cardiac Z-disks and lead to dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2009; 15: 1281-1288.
71. Zissimopoulos S, Thomas NL, Jamaluddin WW, Lai FA: FKBP12.6 binding of ryanodine receptors carrying mutations associated with arrhythmogenic cardiac disease. *Biochem J* 2009; 419: 273-278.
72. Takai E, Akita H, Shiga N *et al*: Mutational analysis of the cardiac actin gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *Am J Med Genet* 1999; 86: 325-327.
73. Mayosi BM, Khogali S, Zhang B, Watkins H: Cardiac and skeletal actin gene mutations are not a common cause of dilated cardiomyopathy. *J Med Genet* 1999; 36: 796-797.

74. Boda U, Vadapalli S, Calambur N, Nallari P: Novel mutations in beta-myosin heavy chain, actin and troponin-I genes associated with dilated cardiomyopathy in Indian population. *J Genet* 2009; 88: 373-377.
75. Knoll R, Kostin S, Klede S *et al*: A common MLP (muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. *Circ Res* 2010; 106: 695-704.
76. Sinagra G, Di Lenarda A, Brodsky GL *et al*: Current perspective new insights into the molecular basis of familial dilated cardiomyopathy. *Ital Heart J* 2001; 2: 280-286.
77. Dawid IB, Breen JJ, Toyama R: LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* 1998; 14: 156-162.
78. Zheng Q, Zhao Y: The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction. *Biol Cell* 2007; 99: 489-502.
79. Campos LC, Miyakawa AA, Barauna VG *et al*: Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 140-147.
80. Gehmlich K, Geier C, Milting H, Furst D, Ehler E: Back to square one: what do we know about the functions of muscle LIM protein in the heart? *J Muscle Res Cell Motil* 2008; 29: 155-158.
81. Gunkel S, Heineke J, Hilfiker-Kleiner D, Knoll R: MLP: a stress sensor goes nuclear. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47: 423-425.
82. Boateng SY, Belin RJ, Geenen DL *et al*: Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H259-269.