LARA REINEL DE CASTRO

**ANÁLISE EXÔMICA EM PACIENTES PORTADORES
DE CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA**

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Entidade Associada à Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Ferraz Sampaio

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Castro, Lara Reinel de

Análise exômica em pacientes portadores de cardiomiopatia hipertrófica / Lara Reinel de Castro. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção
em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

Coorientador: Dr. Marcelo Ferraz Sampaio

Descritores: 1. Cardiomiopatia Hipertrófica. 2. Mutação. 3. Genética Médica. 4. Exoma/genética. 5. Análise de Sequencia de DNA. 6. Sequenciamento de Nucleotídeos de Alto Rendimento. 7. Sequenciamento de Nova Geração.

USP/IDPC/Biblioteca/052/15

Dedico este trabalho:

À minha mãe, minha melhor amiga, o meu maior amor, meu maior exemplo de força e independência. Pelo apoio sempre em qualquer situação. Os seus filhos são o reflexo da mãe perfeita que você sempre foi.

Aos meus irmãos Jan, Iago e Yulo. A maior sorte e beleza que o acaso colocou na minha vida. Só por poder viver a vida com vocês já teria valido a pena. Essa luz basta. E como se não bastasse me deram meus sobrinhos, a felicidade de ser tia, tanto amor que quase não cabe em mim.

A Walle, o melhor companheiro, pela felicidade que sente todos os dias, com a mesma intensidade, só de me ver chegar.

A Ana Lígia, a melhor parte de viver em São Paulo, a pessoa que consegue amenizar a tristeza de estar longe da minha família de lá, porque é minha família daqui.

Ao meu pai Alair Rocha de Castro, meu homem universal (*in memoriam*).

Pai, agora é tempo de jabuticabas...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Mário Hirata, pelo estímulo, pela bondade e honestidade e pelo exemplo de dedicação à ciência e a pesquisa.

Ao Dr. Marcelo Ferraz Sampaio, meu pretense pesquisador preferido, mas que na verdade é muito mais que isso. Mais que um grande amigo é um filho único que tem uma irmã que a vida escolheu. Minha gratidão por todos esses anos divididos de muito trabalho, muitas risadas, e pela torcida ao meu crescimento profissional e individual. À nossa equipe (Sylvia, Jean e Larissa) pela compreensão, apoio e coleguismo.

Agradeço a todos os colaboradores que de alguma forma ajudaram nas análises. À equipe do laboratório da USP, pela ajuda na análise genética desse material. À equipe do Dante Pazzanese do laboratório de investigação molecular em cardiologia (LIMC), por estarem sempre disponíveis pra me ajudar nas minhas dúvidas. Principalmente a Gisele Bastos por me ajudar diretamente no trabalho e por, junto com Juliana Germano terem sido uma excelente companhia no tempo que passamos na Espanha. Às secretárias do 8º andar pela disposição em me ajudar nas minhas pesquisas de prontuário, me recebendo sempre com calma e dedicação. A Valquíria e Janeide, pelas orientações, carinho e por sempre estarem me lembrando das burocracias necessárias que eu com certeza iria esquecer.

À Dra. Edileide de Barros Correia e ao Dr. Abílio Augusto Fragata Filho, responsáveis pelo setor de Miocardiopatias, pela ajuda no processo de inclusão dos pacientes.

À equipe de Santiago de Compostela, principalmente ao Prof. Dr. Angel Carracedo, Maria Brión, Alejandro, Eva e todos os outros que de maneira direta ou indireta me ajudaram neste trabalho no período em que permaneci na Espanha. Aos “entrañables y muy recordados” amigos Soledad, Antonio Parafita e Marina que foram muito além de apenas locadores do apartamento que morei em Compostela, foram um grande exemplo de como um ser humano pode ser bom e receptivo com desconhecidos pelo mais puro amor ao próximo. A cidade de Santiago de Compostela por ter reacendido em mim a percepção de que a vida é muito mais que trabalho, que o tempo que perdemos com as pequenas coisas é o melhor tempo que podemos gastar em nosso mundo particular.

Ao Dr. David Schlesinger da equipe de análise genômica Mendelics, pela paciência e disponibilidade, mesmo com o tempo curto do seu dia, em tirar minhas dúvidas sobre a análise dos dados genéticos. A Tiago Pereira que me ajudou na parte estatística do trabalho

Aos médicos Ana Helena T. Patrus e Leonard Bannet, pela enorme confiança, amizade e cuidado que só as pessoas de coração puro podem demonstrar com tanta clareza. A toda equipe da Clínica Sante.

À equipe do consultório principalmente a Graziela, Marta e Patrícia pelo cuidado e preocupação, estando sempre dispostas a me auxiliar nos momentos mais confusos da minha agenda.

A Bahia, meu lugar preferido, por me proporcionar tanta alegria toda vez que tenho a sorte de voltar.

À cidade de São Paulo, por me ensinar a amar um lugar tão diferente de mim. Por ter me recebido tão bem independente das pessoas menores que ainda acham que a localização geográfica define a qualidade de um ser

humano. Por ter me proporcionado crescimento profissional e me presenteado com grandes amigos e grandes amores.

Aos meus amigos, que por sorte são tantos e tão queridos que seria injusto citar nomes e não escrever mais páginas que a própria tese só sobre vocês.

Aos pacientes do projeto pela participação voluntária e pelo exemplo de que a busca do melhor caminho pela qualidade de vida é uma luz que nunca deve se apagar. Aos meus pacientes por serem minha fonte inesgotável de esperança.

À minhas cunhadas Ludi, Naty e Camila por fazerem parte da minha família e fazerem meus irmãos tão felizes. À Artabam por também já fazer parte disso tudo e pelo cuidado com minha mãe.

A Tina Soares que também é minha família, pelas boas risadas, pelo apoio sempre e ajuda no projeto. Pela amizade de tanto tempo.

À minha família que sempre me apoiou. À minhas avós Odete e Zulmira, meu amor e consideração são tão grandes que eu nunca vou ter palavras para descrever. Aos meus avôs Arivaldo e Osmany (in memoriam).

Agradeço a todos os pesquisadores que foram minhas referências na literatura para este estudo e que contribuem sempre para o avanço inevitável da ciência.

As instituições de apoio financeiro que me ajudaram na bolsa do doutorado e bolsa internacional e no financiamento do projeto: CAPES - CNPQ - Santander.

**“O primeiro passo para aplicar
o método científico consiste em
ser curioso sobre o mundo.”**

LINUS PAULING

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editor's* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade 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. Fredd, Maria F Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviço de biblioteca e documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Unidades

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Cardiomiopatia hipertrófica.....	2
1.1.1 Prevalência, incidência e mortalidade.....	3
1.1.2 História da CMH.....	4
1.1.3 Fisiopatologia e histopatologia.....	5
1.1.4 Apresentação clínica e exame físico.....	6
1.1.5 Tratamento.....	7
1.1.6 Diagnóstico.....	8
1.2 Diagnóstico diferencial.....	11
1.3 Morte súbita.....	12
1.4 Genética da CMH.....	14
1.4.1 Testes genéticos na CMH.....	23
1.5 Sequenciamento de DNA.....	24
1.5.1 História do sequenciamento de DNA	25
1.6 Sequenciamento da Nova Geração (NGS).....	26
2 OBJETIVOS.....	30

2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
3.1	Seleção de pacientes.....	32
3.1.1	Critérios de inclusão.....	35
3.1.2	Critérios de exclusão.....	35
3.2	Avaliação clínica.....	36
3.2.1	Exames complementares realizados.....	36
3.3	Métodos moleculares.....	37
3.3.1	Extração e análise do DNA genômico (gDNA)	39
3.3.2	Sequenciamento em plataforma MiSeq/Brasil	40
3.3.2.1	Preparo da biblioteca de DNA	40
3.3.2.2	Reação Sequenciamento.....	42
3.3.2.3	Análise de Sequenciamento.....	43
3.3.3	Sequenciamento na plataforma Solid / Espanha.....	50
3.3.3.1	Preparo das amostras.....	50
3.3.3.2	Preparo da biblioteca de DNA.....	51
3.3.3.3	Análise dos dados do Sequenciamento.....	52
3.4	Estudo da Correlação genótipo/fenótipo.....	54
3.5	Aspectos éticos.....	55
3.6	Análise estatística dos resultados.....	55
3.6.1	Variáveis estudadas.....	56

4 RESULTADOS	59
4.1 Caracterização clínica e ecocardiográfica (perfil da doença)	59
4.1.1 Fatores de risco	60
4.2 Caracterização genética	63
4.2.1 Grupo de pacientes sequenciados no Miseq/Brasil e Solid/Espanha	69
4.3 Correlação Genótipo-fenótipo	70
5. DISCUSSÃO	73
5.1 Perfil ecocardiográfico	73
5.2 Perfil genético	74
5.3 Correlação genótipo-fenótipo	77
5.4 Comparação do Sequenciamento Miseq/Brasil e Solid/Espanha	79
5.5 Mutações em genes relacionados com outras doenças	80
5.6 Grupos Específicos: Casos de familiares	83
5.7 Vantagens do Sequenciamento de Éxons	93
5.8 Limitações do estudo	94
6.CONCLUSÃO	97
7. ANEXOS	99
8. REFERÊNCIA	114

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTA1	Gene que codifica a Actina α 1, Músculo Esquelético
ACTC1	Gene que codifica a α -Actina Cardíaca
ACTN2	Gene que codifica a α -Actinina 2
AE	Átrio Esquerdo
B2	Segunda Bulha Cardíaca
B4	Quarta Bulha Cardíaca
Ca²⁺	Cálcio
CDI	Cardioversor-Desfibrilador Elétrico
CMD	Cardiomiopatia Dilatada
CMH	Cardiomiopatia Hipertrófica
CSRP3	Gene que codifica a Proteína LIM do Músculo Cardíaco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FA	Fibrilação Atrial
HVE	Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo
I/D	Inserção/Deleção
LAMP2 Lisossoma	Gene que codifica a Proteína de Membrana 2 associada ao Lisossoma
MET	Medida de equivalente metabólico
MS	Morte Súbita
MYBPC3	Gene que codifica a Proteína C de ligação à Miosina Cardíaca
MYH6	Gene que codifica a Cadeia Pesada da α -Miosina
MYH7	Gene que codifica a Cadeia Pesada da β -Miosina
MYL2	Gene que codifica a Cadeia Leve Regulatória da Miosina

MYL3	Gene que codifica a Cadeia Leve Essencial da Miosina
MYLK2	Gene que codifica a Cinase 2 da Cadeia Leve da Miosina
MYO6	Gene que codifica a Miosina VI
MYOZ2	Gene que codifica a Miozenina 2
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PA	Pressão Arterial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRKAG2	Gene que codifica a Subunidade γ -2 da Proteína Cinase Dependente de AMP
RNA	Ácido Ribonucleico
RM	Ressonância Magnética
SAM	Movimento Anterior Sistólico da Valva Mitral
TCAP	Gene que Codifica a Teletonina
TnI	Troponina I
TNNC1	Gene que codifica a Troponina Cardíaca C
TNNI3	Gene que codifica a Troponina Cardíaca I
TNNT2	Gene que codifica a Troponina Cardíaca T
TPM1	Gene que codifica a α -Tropomiosina
TT	Homozigose para o Alelo T
TTN	Gene que codifica a Titina
TVNS	Taquicardia Ventricular não Sustentada
VCL	Gene que codifica a Vinculina
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
VSVE	Via de Saída de Ventrículo Esquerdo

LISTA DE UNIDADES E SÍMBOLOS

Kb	Kilobase
μM	Micromolar ⁻⁶
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mm	milímetros
kg	kilograma
cm	centímetro
mg	miligrama
%	porcento
°C	grau <i>Celsius</i>
p	valor descritivo de probabilidade do teste

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de risco para morte súbita em portadores de CMH	13
Tabela 2 - Genes relacionados às proteínas do sarcômero, localização cromossômica, número de mutações conhecidas – mutações relacionadas à CMH, prevalência na CMH e funções das proteínas.....	20
Tabela 2.1 - Genes do disco Z, localização cromossômica, número de mutações conhecidas – mutações relacionadas à CMH, prevalência na CMH e funções das proteínas.....	21
Tabela 2.2 - Outros genes, localização cromossômica número de mutações conhecidas – mutações relacionadas à CMH, prevalência na CMH e funções das proteínas.....	21
Tabela 3 - Painel de genes selecionados para análise direcionada de éxons.....	38
Tabela 4 - Bancos de dados de genes online.....	45
Tabela 5 - Resumo das principais características clínicas, demográficas e de exames complementares.....	61
Tabela 5.1 - Dados antropométricos e exame físico por pacientes.....	62
Tabela 5.2 – Dados ecocardiográficos por paciente.....	62
Tabela 6 - Genes do painel de sequenciamento nos quais foram identificadas mutações.....	64
Tabela 7 - Lista de mutações encontradas nos três principais genes relacionados à cardiomiopatia hipertrófica, número de pacientes com a mesma mutação, resultados dos testes de predição de patogenicidade e descrição na literatura.....	65

Tabela 7.1 - Lista de mutações descritas em outros genes relacionadas a outras enfermidades, número de pacientes com a mesma mutação, nome da doença associada e descrição na literatura.....66

Tabela 7.2 - Lista de mutações não descritas encontradas em outros genes não sarcoméricos, número de pacientes com a mesma mutação, resultados dos testes de predição de patogenicidade e descrição na literatura.....66

Tabela 8 - Comparação entre as mutações patogênicas encontradas no sequenciamento na plataforma MiSeq e na plataforma Solid.....70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A. Comparação do miocárdio com hipertrofia (esquerda) e um miocárdio normal (direita). B. Histopatologia de cortes transversais do miocárdio demonstrando desarranjo e hipertrofia de cardiomiócitos e ainda fibrose intersticial (esquerda) característicos de MH, comparativamente com a estrutura organizada do miocárdio normal (direita)	6
Figura 2 - Opções de tratamento da CMH.....	7
Figura 3 - Ecocardiografia transtorácica (A- corte paraesternal longitudinal B- Corte transversal) A seta vermelha mostra o septo interventricular que apresenta aumento importante de sua espessura(> 30 mm). Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. José Maria Del Castillo.....	9
Figura 4 - Imagens ecocardiográficas em Doppler colorido. Obtenção da velocidade de fluxo na via de saída do ventrículo esquerdo. A velocidade de pico de fluxo está em torno de 5,0 m/s o que equivale a um gradiente sistólico > 100 mmHg. Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. José Maria Del Castillo.....	9
Figura 5 - Relação entre parede do ventrículo esquerdo e morte súbita. A incidência de morte súbita quase duplicou para cada aumento de 5 mm de espessura de parede. (Adaptado de Spirito et al, 2000).....	13
Figura 6 - Sarcômero cardíaco mostrando a localização dos genes causadores de CMH mais conhecidos.....	15
Figura 7 - Estrutura do DNA e bases nitrogenadas.....	24
Figura 8 - Evolução do Sequenciamento de DNA, De Sanger à NGS.....	28
Figura 9 - Formação dos pacientes sequenciados.....	33
Figura 10 - Critérios estabelecidos para a seleção/ priorização de variantes como possíveis mutações causais de CMH.....	44
Figura 11 - Critérios estabelecidos para a seleção/ priorização de novas variantes como possíveis mutações causais.....	53

Figura 12 - Exemplo da avaliação (predição de patogenicidade) dos programas online Polyphen, Provean, Sift e Mutation Taster, da mutação R453C no gene MYH7, identificada no nosso estudo. Imagens copiadas dos sites específicos sem modificações da predição real. A) Polyphen; B) Provean e SIFT e C) Mutation Taster.....	69
Figura 13 - Heredogramas representando as Famílias 01 e 02.....	83
Figura 13.1 - Heredogramas representando as Famílias 03 e 04.....	86
Figura 13.2 - Heredograma representando a Família 05.....	88

RESUMO

Castro LR. *Análise exômica em pacientes portadores de Cardiomiopatia Hipertrófica* [tese]. São Paulo. Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Entidade Associada à Universidade de São Paulo; 2015.

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é uma doença geneticamente determinada, caracterizada por hipertrofia ventricular primária, com prevalência estimada de 0.2% na população geral. Qualquer portador tem 50% de chance de transmitir esta doença para seus filhos, o que torna cada vez mais relevante a importância do estudo genético dos indivíduos acometidos e de seus familiares. Já foram descritas diversas mutações genéticas causadoras de CMH, a maioria em genes que codificam proteínas do sarcômero, e algumas mutações mais raras em genes não sarcoméricos. O objetivo desse estudo é sequenciar as regiões exônicas de genes candidatos, incluindo os principais envolvidos na hipertrofia miocárdica, utilizando o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*); testar a aplicabilidade e viabilidade deste sistema para identificar mutações já confirmadas e propor as prováveis novas mutações causadoras de CMH. **Métodos e resultados:** 66 pacientes não aparentados portadores de CMH foram estudados e submetidos à coleta de sangue para obtenção do DNA para analisar as regiões exônicas de 82 genes candidatos, utilizando a plataforma *MiSeq* (Illumina). Identificou-se 99 mutações provavelmente patogênicas em 54 pacientes incluídos no estudo (81,8%), relacionadas ou não a CMH, e distribuídas em 42 genes diferentes. Destas mutações 27 já haviam sido publicadas, sendo que 17 delas descritas como causadoras de CMH. Em 28 pacientes (42,4%) identificou-se mutação nos três principais genes sarcoméricos relacionados à CMH (MYH7, MYBPC3, TNNT2). Encontrou-se também um grande número de variantes não sinônimas de efeito clínico incerto e algumas mutações relacionadas a outras enfermidades. **Conclusão:** A análise da sequência dos éxons de genes candidatos, demonstrou ser uma técnica promissora para o diagnóstico genético de CMH de forma mais rápida e sensível. A quantidade de dados gerados é o um fator limitante até o momento, principalmente em doenças geneticamente complexas com envolvimento de diversos genes e com sistema de bioinformática limitado.

Descritores: Cardiomiopatia Hipertrófica. Mutação. Genética Médica. Análise de sequencia de DNA. Exoma./genética. Sequenciamento de Nucleotídeos de Alto Rendimento. Sequenciamento de Nova Geração.

SUMMARY

Castro LR. *Exomic Analysis in Patients with Cardiomyopathy Hypertrophic* [thesis]. São Paulo. Instituto Dante Pazzanese of Cardiology – Associated to the University of Sao Paulo; 2015.

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is a genetically determined disease, characterized by primary ventricular hypertrophy, with an estimated prevalence of 0.2% in the general population. Any of its carriers has 50% likelihood to pass it on to their children, and that makes the genetic study of these individuals and their relatives even more relevant. There have been several studies describing genetic mutations that cause HCM - the vast majority in genes responsible for sarcomere protein coding - and other rarer mutations in non-sarcomeric genes. The aim of this research is study exonic areas of specific genes, including the most important ones related to myocardial hypertrophy, identifying the genetic mutations that have already been documented, and possible new pathogenic mutations, using the high throughput DNA sequencing (NGS); testing the applicability and viability to identify HCM-causing mutations. **Methods and results:** 66 unrelated patients with HCM were studied and subject to blood sample in order to extract their genomic DNA to analyze exomic regions of 82 candidates genes, using the high throughput sequencing technology on *MiSeq (Illumina)* platform. In this study we identified 99 possible damaging mutations in 54 patients (81.8%) that could be related or not to HCM, and distributed in 42 different genes. 27 of this variants have already been published, and 17 of them have been described as HCM causes. 42,4% of the patients (28 individuals) have genetic mutations in the three main sarcomeric genes related to HCM (MYH7, MYBPC3, TNNT2). We also identified a large number of non-synonymous variants of uncertain clinical significance and some mutations related to other diseases.

Conclusion: The exome analysis in candidates genes using NGS has demonstrated to be promising for the genetic diagnosis of HCM, in a short time with sensivity. The amount of data obtained in a short period of time is the main limiting factor, especially for genetically complex diseases that involve multiple genes.

Keywords: Hypertrophic Cardiomyopathy. Mutation. Genetic Medicine. DNA Sequencing Analysis. Exome/Genetics. High Throughput Nucleotide sequencing. Next Generation Sequencing.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cardiomiopatia hipertrófica

A Cardiomiopatia Hipertrófica (CMH) é uma enfermidade cardíaca hereditária primária do miocárdio e a mais comum das doenças cardiovasculares genéticas, sendo clinicamente definida pela presença de um ventrículo esquerdo hipertrofiado, porém não dilatado, na ausência de outras doenças cardiovasculares ou sistêmicas que provoquem estímulo hemodinâmico suficiente para justificar o grau de hipertrofia (Maron, 1997, 2002; Maron et al., 2003, 2009).

É caracterizada baseando-se no Ecocardiograma quando evidenciada hipertrofia ventricular esquerda com espessura de parede ≥ 15 mm na diástole cardíaca. Quando a espessura demonstrada encontra-se entre 13 a 14 mm os indivíduos são considerados limítrofes (*borderline*), principalmente nos casos em que exista história familiar (Gersh et al., 2011). Usualmente a hipertrofia é mais predominante no septo interventricular em relação à parede livre do ventrículo podendo gerar uma obstrução mecânica ao fluxo sanguíneo na via de saída do ventrículo esquerdo (Wigle et al., 1985), porém a hipertrofia pode acometer qualquer segmento do ventrículo esquerdo e mais raramente o ventrículo direito.

As formas conhecidas de CMH são definidas segundo sua distribuição anatômica sendo classificada como septal, apical, concêntrica, médio ventricular e lateral. Podemos classificar a CMH também do ponto de vista hemodinâmico como formas obstrutivas e não obstrutivas.

1.1.1 Prevalência, incidência e mortalidade

A prevalência estimada do fenótipo da CMH, a partir de dados ecocardiográficos, é de um para 500 adultos (0,2%) na população geral e de 0,5% entre os portadores de cardiopatia, sendo considerada subvalorizada por alguns autores (Marian, 2010). Em estudos realizados nos USA, Japão e China, a prevalência na população geral variou entre 0,16 a 0,30% (Hada, 1987; Maron et al., 1995a; Zou et al., 2004; Dimitrus, 2007; Ho, 2010a). Comparando a diferença da frequência estimada na população geral com o que costumamos presenciar na prática de cardiologia, sugere-se que uma parte dos indivíduos afetados permanecem não diagnosticados, provavelmente por serem assintomáticos. Além disso, muitos autores têm alertado para a provável existência de casos não diagnosticados por causa da variedade fenotípica da doença (Ingles J, 2007).

Atinge ampla faixa etária, porém tem maior frequência de ocorrência em indivíduos jovens com menos de 30 anos (Maron et al., 1995a; Roberts; Sigwart, 2005). Um estudo australiano apontou que a incidência anual de hipertrofia ventricular de qualquer etiologia em crianças é de 0,3-0,5:1000 indivíduos e os mesmos autores demonstraram posteriormente, que a CMH é a causa de cerca de 20% destes casos de hipertrofia ventricular (Nugent et al., 2003, 2005).

A mortalidade em pacientes acompanhados em grandes centros terciários como Canadá, Estados Unidos e Grã-Bretanha, é de aproximadamente 3 a 4%, o que caracterizou a doença como uma moléstia

de mau prognóstico, no entanto, a realidade é que a mortalidade global, em pacientes não selecionados, é provavelmente menor que 1% variando de 0,5% a 1% em estudos nacionais, podendo chegar a 2% nos casos de CMH obstrutiva. No geral, a incidência de morte súbita é maior em indivíduos mais jovens principalmente em atletas, os quais na sua maioria, não tem diagnóstico de CMH até o momento do evento fatal (Shah et al., 1974; Spirito et al., 1989; Seiler et al., 1991; Kofflard et al., 2003; Arteaga et al., 2005).

1.1.2 História da CMH

Os primeiros casos isolados foram descritos por Hallopeau e Liouville (1869), Schiminke (1907), Davies (1952), e Brock (1957), este último descrevendo pela primeira vez a obstrução funcional do VE. A caracterização clínica foi determinada, inicialmente, por Goldwin et al (1960) e por Braunwald et al (1964). A primeira descrição que caracterizou a CMH como uma entidade clínica distinta foi reportada em 1958 pelo patologista Donald Teare, que identificou hipertrofia assimétrica em 08 jovens com morte súbita, confirmando depois história de morte súbita na família das vítimas, já citando assim o provável caráter familiar da doença (Teare D, 1958). Pouco mais de 30 anos depois houve a confirmação da etiologia genética da CMH (Jarcho et al, 1989). Logo após, outro grande passo no conhecimento da doença que foi a identificação da primeira mutação, em um gene do sarcômero, o gene da cadeia pesada da beta miosina (Seidman JG et al, 1990).

1.1.3 Fisiopatologia e histopatologia

A variabilidade de sintomas da cardiomiopatia hipertrófica é decorrente da complexa fisiopatologia que inclui redução na reserva coronariana, disfunção diastólica, gradiente na via de saída do ventrículo esquerdo, insuficiência valvar mitral e arritmias.

A disfunção diastólica é a principal e mais importante manifestação clínica e é diretamente dependente da hipertrofia ventricular. A função sistólica na grande maioria dos casos é preservada ou hiperdinâmica com cavidade do ventrículo esquerdo normal ou reduzida (Wigle et al., 1985).

Na maioria dos casos a alteração histopatológica revela sinais de intensa desorganização celular, de miofibrilas e da matriz extracelular, com destruição das fibras elásticas, hipertrofia miocítica e fibrose intersticial (Figura 1). Dessa maneira, os miócitos ficam dispostos em padrões não habituais, em ângulos oblíquos e perpendiculares. Esta desorganização é observada em 95% dos pacientes com CMH, tanto no miocárdio hipertrófico quanto no não hipertrófico, sugerindo que essas alterações possam estar presentes antes do desenvolvimento fenotípico da doença (Maron et al., 1981; Tanaka et al., 1986). Provavelmente esses fatores (padrão arquitetônico desorganizado, substituição cicatricial e fibrose) funcionem como um substrato eletricamente instável favorecendo a ocorrência de arritmia, além de serem os determinantes das propriedades elásticas do VE, resultando em redução do relaxamento ventricular e consequente disfunção diastólica. A redução do débito cardíaco decorrente da disfunção diastólica é o principal mecanismo fisiopatológico envolvido na síncope, além da

presença de obstrução da VSVE e arritmias ventriculares complexas. As arteríolas coronárias intramurais podem ser acometidas, com espessamento parietal e diminuição da luz em 80% dos casos, resultando em isquemia microvascular silenciosa e fibrose, e junto com o aumento excessivo da massa muscular, com conseqüente desequilíbrio entre a oferta e consumo de oxigênio, formam os principais mecanismos etiopatológicos da dor precordial da CMH, podendo levar a infarto agudo do miocárdio na ausência de lesões obstrutivas das artérias coronárias (Maron et al., 1986; Arteaga 1996).

Figura 1: A. Comparação do miocárdio com hipertrofia (esquerda) e um miocárdio normal (direita). B. Histopatologia de cortes transversais do miocárdio demonstrando desarranjo e hipertrofia de cardiomiócitos e ainda fibrose intersticial (esquerda) característicos de MH, comparativamente com a estrutura organizada do miocárdio normal (direita) (Figura de Ho, 2010).

1.1.4 Apresentação clínica e Exame físico

Os portadores de CMH podem evoluir de maneira muito variável em relação às manifestações clínicas, apresentando desde formas assintomáticas até sintomas clássicos de insuficiência cardíaca, como

ortopnéia e edema de membros inferiores. Esta variabilidade de sintomas é causada pela sua grande heterogeneidade fenotípica. Os sintomas mais comuns são dispnéia, angina, palpitação e síncope ou até mesmo morte súbita (Spirito; Belloni, 1994).

As alterações no exame físico são encontradas, geralmente, em pacientes sintomáticos e/ou que apresentem obstrução do fluxo sanguíneo da VSVE. Dentre as mais relevantes temos: ictus propulsivo podendo-se palpar frêmito sistólico na ponta ou borda esternal esquerda baixa; presença de B4; desdobramento paradoxal de B2; presença de onda a no pulso venoso jugular; sopro sistólico (foco mitral, tricúspide e aórtico acessório).

1.1.5 Tratamento

Prescrito quando existe necessidade de controle dos sintomas e para prevenção de morte súbita. Um algoritmo simplificado para escolha do melhor tratamento está descrito na Figura 2.

Figura 2: Opções de tratamento da CMH

O cardioversor-desfibrilador implantável (CDI) tem se revelado eficaz por abortar taquiarritmias ventriculares potencialmente fatais e deve ser considerado para prevenção de morte súbita em pacientes portadores de arritmias ventriculares de alto risco. (Zipes, 2006).

1.1.6 Diagnóstico / Exames complementares

- *Ecocardiograma transtorácico:*

O Ecocardiograma com Doppler colorido é o método de imagem mais utilizado e considerado o exame padrão para o diagnóstico da CMH. Neste exame pode ser demonstrada a morfologia cardíaca (Figura 3), função ventricular, o movimento anterior sistólico da valva mitral (SAM), o grau de regurgitação mitral, e a severidade do gradiente de VSVE (Panza, 1992). O Doppler, por sua vez, auxilia na localização e quantificação da obstrução intraventricular (Figura 4)

Embora o diagnóstico da CMH seja sugerido pelo ecocardiograma quando a espessura máxima do VE for maior ou igual a 15 mm na diástole, correlações entre genótipo-fenótipo têm mostrado que qualquer espessura de parede (incluindo os dentro da faixa normal) pode ser compatível com a presença de doença (Maron et al., 2003).

Figura 3: Ecocardiografia transtorácica (A- corte paraesternal longitudinal B- Corte transversal) A seta vermelha mostra o septo interventricular que apresenta aumento importante de sua espessura(> 30 mm). Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. José Maria Del Castillo.

Figura 4: Imagens ecocardiográficas em Doppler colorido. Obtenção da velocidade de fluxo na via de saída do ventrículo esquerdo. A velocidade de pico de fluxo está em torno de 5,0 m/s o que equivale a um gradiente sistólico > 100 mmHg. Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. José Maria Del Castillo.

Hipertrofia ventricular com espessuras extremas são mais observadas em pacientes jovens e usualmente assintomáticos. O grau de obstrução da via de saída do VE, expresso pelo gradiente intraventricular, associa-se a evolução desfavorável.

- Ressonância magnética:

A utilização da ressonância magnética cardíaca (RM) auxilia no diagnóstico e caracterização do fenótipo, na avaliação de realce tardio, avaliação da função cardíaca, estratificação de risco e como ferramenta de triagem para familiares. Considerada padrão-ouro no estabelecimento do diagnóstico de CMH quando os resultados do ecocardiograma são inconclusivos ou suspeitos de serem falso-negativos, sendo complementar para esclarecer ambiguidades técnicas das espessuras parietais e visualizar áreas de hipertrofia segmentar (parede livre antero lateral), por vezes não bem identificadas, principalmente para delinear a patologia apical do VE, incluindo hipertrofia e formação aneurismática, geralmente não identificada pelo ecocardiograma (Rickers, 2005).

- Eletrocardiograma (ECG) e Holter 24h:

O ECG do portador de CMH pode ser compatível com a normalidade porém, dentre os achados eletrocardiográficos mais comuns, destacam-se as sobrecargas atriais e ventriculares esquerdas, as arritmias atriais e as alterações de repolarização ventricular. Ondas Q patológicas e amputação da onda R na ausência de infarto prévio, ocorrem em até 1/3 dos casos. Prolongamento do intervalo QRS ($\geq 110\text{ms}$) e inversão de onda T em V1-V3 também podem ocorrer. O holter 24h avalia principalmente taquiarritmias supraventriculares (extrassístoles isoladas ou pareadas, taquicardia paroxística supraventricular e fibrilação atrial paroxística) e taquiarritmias

ventriculares (extrassístoles ventriculares isoladas, taquicardia ventricular não sustentada).

- Testes sob estresse:

O teste ergométrico é realizado por estímulo físico com o uso de bicicleta ou, mais habitualmente, a esteira e fornece informações sobre a capacidade funcional do paciente (o consumo de energia medido em MET), presença de sintomas induzidos pelo exercício (dor no peito, dispneia, etc.), positividade elétrica (presença de doença isquêmica associada), alterações na pressão arterial (PA em platô, queda de PA) e arritmias.

A ecocardiografia sob estresse pode ser realizada por estímulo com um fármaco (dobutamina/dipiridamol) ou, preferencialmente no caso da CMH, com bicicleta ergométrica e combina as vantagens de dois testes: ecocardiografia convencional (em repouso) e após estímulo cardíaco. Este tipo de teste permite-nos diagnosticar alterações na contratilidade (excluindo doença isquêmica cardíaca associada) e presença de obstrução induzida da via de saída. A obstrução sob stress pode ser encontrada em até 70% dos pacientes com CMH.

1.2 Diagnóstico diferencial

Nos pacientes com hipertrofia ventricular esquerda, devemos distinguir a cardiomiopatia hipertrófica de outras causas de hipertrofia.

Diversas outras patologias podem ter como manifestação secundária a hipertrofia ventricular, tornando difícil a diferenciação inicial com a cardiomiopatia hipertrófica. A maioria delas se apresentam a hipertrofia na

forma concêntrica como a cardiopatia hipertensiva, estenose aórtica, feocromocitoma e uma importante entidade clínica reconhecida nos dias de hoje pelas suas implicações sociais, profissionais e médicas, o “coração de atleta”.

Temos também algumas patologias que são consideradas indistinguíveis clinicamente da CMH, como por exemplo, a doença de Fabry, amiloidose e Danon.

Estima-se que a incidência de fenocópias em portadores de CMH seja de aproximadamente 10% (Marian, 2010).

1.3 Morte súbita

A estratificação de risco para morte súbita (MS) é pesquisada desde as primeiras descrições da cardiomiopatia hipertrófica, sendo de relevante importância clínica já que é a mais temida complicação e principal causa de óbitos (Elliot et al., 2000; Marian, 2003).

A despeito do conhecimento dos critérios clínicos tradicionais de pior prognóstico e a evolução tecnológica dos métodos diagnósticos incluindo os avanços da genética, a estratificação de risco de morte súbita na CMH continua sendo um desafio para os clínicos (Richard et al., 2003; Ho, 2009). A avaliação das diretrizes atuais é bastante dificultada pela falta de evidências (O'Mahony et al., 2013; Pascal; Alison, 2013). As diretrizes americanas e européias (Maron BJ et al., 2003; Gersh et al., 2011) indicam alguns fatores de risco para morte súbita conforme resumido na Tabela 1.

Tabela 1: Fatores de risco para morte súbita em portadores de CMH

FATORES MAIORES	FATORES POSSÍVEIS
Remanescente de parada cardíaca (FV/TVS)	Fibrilação atrial
História familiar de morte súbita precoce	Isquemia miocárdica
Síncope inexplicada	Obstrução de VSVE
TVNS ao Holter (≥ 120 bpm)	Mutação genética de alto risco
Espessamento de parede de VE ≥ 30 mm	Realce tardio na RM de coração
Resposta anormal da PA no esforço	Aneurisma apical de VE

Adaptado de Europace (2010) 12(3):313-328

Antecedente de MS precoce (abaixo de 45 anos idade) entre parentes de primeiro grau é considerado fator de risco maior de MS e a identificação de dois ou mais casos na família sugere a associação de mutações genéticas de alto risco e indica necessidade de genotipagem (Mckenna; Behr, 2002; Piva e Mattos, 2006). Alguns estudos apontam a hipertrofia ventricular como um marcador prognóstico importante associando maior incidência de mortalidade na presença de espessura de parede maior que 30 mm (Spirito, 2000) (Figura 5).

Figura 5. Relação entre parede do ventrículo esquerdo e morte súbita. A incidência de morte súbita quase duplicou para cada aumento de 5 mm de espessura de parede. (Adaptado de Spirito et al, 2000)

1.4 Genética da CMH

A CMH é uma doença de expressão variável e transmissão autossômica dominante em mais de 60% dos pacientes, com chance de 50% de transmissão da mutação para um dos filhos do portador. No restante dos casos, pode resultar de mutações novas ou de transmissão autossômica recessiva, com penetrância reduzida do gene (Wynne, 1998; Almeida, 2000). Alguns indivíduos portadores podem não apresentar história familiar conhecida de CMH, sendo considerados como casos esporádicos.

Nos últimos 25 anos já foram identificados mais de 20 genes associados com a CMH com milhares de mutações descritas, demonstrando que além da já estabelecida heterogeneidade clínica a CMH também apresenta uma grande heterogeneidade genética. A maioria dos pacientes apresentam mutações em genes que codificam as proteínas contráteis do sarcômero (Watkins, 1994; Wang, 2009; Ho, 2010a,b), afetando diretamente a função destas, estabelecendo assim a base molecular da CMH e a caracterizando como uma doença do sarcômero (Geisterfer, 1990; Rayment., 1995; Watkins, 1995; Lin, 1996; Satoh, 1999; Wheeler, 2009).

Figura 6: Sarcômero cardíaco mostrando a localização dos genes causadores de CMH mais conhecidos. (Adaptado de Wheeler et al, 2009) © Copyright Policy - open-access License.

A maioria das mutações ocorre nos genes MYH7 e MYBPC3 que codificam as proteínas contráteis da cadeia pesada da β -Miosina e proteína C de ligação à miosina respectivamente, sendo estes dois genes juntos, responsáveis por aproximadamente 60-80 % dos casos de CMH. Com menor frequência ocorrem mutações nos genes da troponina T (TNNT2), troponina I (TNNI3), α -tropomiosina (TPM1), actina (ACTC1), cadeia leve essencial da miosina (MYL3) e cadeia leve regulatória da miosina (MYL2).

Outras mutações menos frequentes foram descritas nos últimos anos tanto em proteínas sarcoméricas como também em alguns genes que não codificam proteínas contráteis e são relacionados à proteína Z discal, como as mutações nos genes da proteína muscular LIM (CSRP3), que é um regulador da diferenciação miogênica e contribui para a ligação do aparelho

contrátil com o sarcolema, o gene para proteína teletonina (TCAP), miozenina 2 (MYOZ2) e aos discos intercalados como o da vinculina (VCL), entre outros (Marian, 2001; Geier et al., 2003; Ho, 2010a; Santos et al., 2012). Já foram identificadas também mutações mais raras, em genes envolvidos na via de sinalização do Ca^{2+} (JPH2, PLN, CASQ2, CALR3), genes que codificam as proteínas envolvidas na respiração celular (MYLK2, SLC25A4, COX15) e outros genes que codificam proteínas também associadas ao sarcômero (OBSCN, FXN, MYO6, DES, CAV3, ACTA1) (Bos et al, 2009).

As distintas manifestações clínicas, a histopatologia e os mecanismos da doença dessas diferentes classes de mutações genéticas que causam hipertrofia cardíaca, justificam a razão para cada vez mais se buscar uma classificação molecular mais compreensível (Tabelas 2; 2.1; 2.2).

A literatura atual evidencia que existe uma provável relação entre os genes onde ocorrem as mutações com as manifestações clínicas, fenótipo e prognóstico dos portadores, porém, por ter como característica a já citada heterogeneidade genética com mutações não necessariamente repetidas no mesmo local do gene, esta relação se torna um desafio. De qualquer forma, existem algumas características que se repetem com mais frequência nas mutações de alguns genes, sendo possível tentar estabelecer algumas delas nos genes mais comumente associados à doença, por uma questão estatística, a exemplo dos genes responsáveis pela maioria dos casos de CMH (MYH7, MYBPC3 e TNNT2).

- Mutações do gene da cadeia pesada da β -miosina cardíaca: O

MYH7 codifica a cadeia pesada da β -miosina cardíaca situa-se no cromossoma 14q11.2 e possui 30 Kb de DNA, dispostos em 40 exons, porém a proteína só começa a ser transcrita a partir do terceiro exon.

Estima-se que mutações nesse gene sejam responsáveis por 30 a 50% dos casos de CMH e atualmente já existem mais de 400 mutações relacionada à CMH descritas ao longo desse gene (Dado retirado do site HGMD <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, em março de 2015).

A maioria das mutações situa-se nos primeiros 23 exons que codificam a cabeça globular da molécula de miosina e são do tipo *missense* (codificam um aminoácido diferente do normal) e caracterizadas por alta penetrância. Comparando com mutações em outros genes, está associada a pacientes mais jovens, hipertrofia mais severa e a alta incidência de morte súbita (Bonne et al., 1998; Theopistou et al., 2004).

- Mutações dos genes da proteína C de ligação à miosina: O gene

MYBPC3 codifica a principal proteína de ligação à miosina cardíaca, a proteína C. Está localizado no cromossomo 11p11.2 e têm 35 exons, dispostos em 21 Kb de DNA, dos quais 34 exons codificam a proteína sarcomérica MYBPC de 1274 aminoácidos. A proteína C da ligação da miosina é uma proteína miofibrilar que participa diretamente da contração e compõem os filamentos grossos do sarcômero.

Até o momento supõe-se que aproximadamente 30-40% dos casos de CMH sejam causados por mutações no MYBPC3 e mais de 500 mutações

relacionadas à esta doença já foram descritas neste gene (Dado retirado do site HGMD <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, em março de 2015).

Contrariamente ao observado nos demais genes, onde mutações *missense* são predominantes, estas apenas correspondem a cerca de um terço de todas as mutações em MYBPC3. Na maioria dos casos, as mutações resultam na formação de uma proteína truncada que perde a habilidade de ligação, deste modo, há um acúmulo de miofibrilas desorganizadas resultando na resposta hipertrófica (Bashyam et al., 2003; Taylor et al., 2004).

Aparentemente, as mutações nesse gene são mais benéficas ao paciente por causarem uma menor frequência de morte súbita. Apesar da curva de sobrevida mais favorável do gene MYBPC3 comparada aos outros genes, a mortalidade aumenta proporcionalmente ao aumento da idade e a espessura da parede ventricular (Charron et al., 1998; Yang et al., 1998; Matos, 2006).

Mutações do gene da Troponina T cardíaca: O gene TNNT2 codifica a troponina T, está situado no cromossomo 1q32 e compõe-se de 17 exons distribuídos em 17 Kb de DNA. Sua função é mover o complexo Tn, e juntamente com o gene da beta-miosina, ele é um dos principais causadores de morte súbita em jovens e é responsável por cerca de 4 a 15% dos casos de CMH. A maioria das mutações é do tipo *missense* e deleções. (Bonne et al., 1998; Van Driest et al., 2003; Theopistou et al., 2004).

A hipertrofia, geralmente discreta, pode estar ausente em 1/4 dos casos, porém existe grande desorganização de cardiomiócitos e episódios

de mortes súbitas em jovens são frequentes, tornando o prognóstico comparável ao das mutações mais relacionadas a malignidade como as da cadeia pesada da beta-miosina cardíaca.

A espessura parietal, na maior parte dos casos, é em média de até 16mm, comparada com 24mm nos pacientes com mutações na cadeia pesada da beta miosina cardíaca. Há, portanto, dissociação entre o grau de hipertrofia e a susceptibilidade à morte súbita. A mortalidade tende a ser elevada em jovens do sexo masculino com alta incidência de óbitos de caráter súbito (Watckins et al.,1995; Varnava et al., 2001; Fujino et al., 2002).

Tabela 2: Genes relacionados às proteínas do sarcômero, localização cromossômica, número de mutações conhecidas – mutações relacionadas a CMH, prevalência na CMH e funções das proteínas.

PROTEÍNA ^a	GENE ^a	LOCUS ^a	Nº MUTAÇÕES - MUTAÇÕES CMH ^a / PREVALÊNCIA ^c	FUNÇÃO DA PROTEÍNA ^b
Cadeia pesada da β -miosina	MYH7	14q11.2-q13	600-421 / 30-40%	Contração muscular (filamentos grossos)
Proteína C de ligação à miosina	MYBPC3	11p11.2	580-514 / 30-40%	Contração muscular, estrutural (filamentos grossos)
Troponina T cardíaca	TNNT2	1q32	103-62 / 5%	Subunidade da troponina de ligação à tropomiosina
Troponina I cardíaca	TNNI3	19q13.4	75-53 / 5%	Subunidade inibitória da troponina
Titina	TTN	2q31	92-3 / rara	Extensibilidade do sarcômero, estrutural
α -tropomiosina	TPM1	15q22.1	48-22 / 2%	Regulação da contração dependente de Ca^{2+}
α -actina	ACTC1	15q11-q14	32-17 / 1%	Contração muscular (filamentos finos)
Cadeia leve regulatória da miosina	MYL2	12q23-q24.3	29-26 / 1%	Ligação ao Ca^{2+} e ativação da contração
Cadeia pesada da α -miosina	MYH6	14q12	31-4 / rara	Contração muscular
Troponina C cardíaca	TNNC1	3p21.3-p14.3	14-7 / rara	Impede a ação inibitória da troponina nos filamentos de actina
Cadeia leve essencial da miosina	MYL3	3p21.3-p21.2	23-22 / 1%	Ativação da contração
Obscurina	OBSCN	1q42.13	3-1 / rara	Envolvida na formação de fibras
Desmina	DES	2q35	84-1 / rara	Ligação entre miofibrilas e a membrana plasmática
Caveolina 3	CAV3	3p25	41-1 / rara	Componente da membrana plasmática

Dados segundo: a) “The Human Genome Mutation Database” <http://www.hgmd.org> HGMD professional – último acesso ao site em abril 2015 b) “Gene Cards: The Human Gene Compendium” <http://www.gencards.org> c) Ho Cy, 2010¹¹⁵.

Tabela 2.1: Genes do disco Z, localização cromossômica, número de mutações conhecidas – mutações relacionadas a CMH, prevalência na CMH e funções das proteínas.

PROTEÍNA ^a	GENE ^a	LOCUS ^a	Nº MUTAÇÕES ^a PREVALÊNCIA	FUNÇÃO DA PROTEÍNA ^b
Proteína LIM muscular	CSRP3	11p15.1	15-11 / <1	Reguladora da miogênese
Teletonina	TCAP	17q12-q21.1	18-6 / <1	Medeia a organização antiparalela da titina no disco Z
Vinculina	VCL	10q22.1-q23	14-2 / <1	Adesão celular
Miozenina	MYOZ2	4q26-q27	3-2 / <1	Adesão intracelular das proteínas do disco Z
α-actina 2	ACTN2	1q42-q43	11-5 / <1	Ancoragem da actina

Dados segundo: a) “The Human Genome Mutation Database” <http://www.hgmd.org> b) “Gene Cards: The Human Gene Compendium” <http://www.gencards.org> c) Ho Cy, 2010¹¹⁵.

Tabela 2.2: Outros genes, localização cromossômica número de mutações conhecidas – mutações relacionadas a CMH, prevalência na CMH e funções das proteínas.

PROTEÍNA ^a	GENE ^a	LOCUS ^a	Nº MUTAÇÕES ^a	FUNÇÃO DA PROTEÍNA ^b
Junctofilina 2	JPH2	20q12	7-5	Estabilização das junções celulares da membrana plasmática
Fosfolamban	PLN	6q22.1	16-7	Regulação da atividade da bomba de Ca ⁺ do retículo sarcoplasmático
Cinase 2 das cadeias leves de miosina	MYLK2	20q13.31	3-3	Contração
Calsequestrina 2	CASQ2	1p13.3-p11	25-1	Ligação a Ca ⁺ . Local de armazenamento de Ca ⁺ .
Miosina VI	MYO6	6q13	29-1	Transporte celular
Transportador de solutos da família 25, membro 4	SLC25A4	4q35	9-3	Troca de ADP e ATP através da membrana interna da mitocôndria
Citocromo C oxidase (proteína 15)	COX15	10q24.2	4-2	Biossíntese do grupo hemo A
Proto- oncogene serina/treonina proteína cinase	RAF1	3p25	39-1	Proteína anti-apoptótica
Frataxina	FXN	9q13-q21.1	62-1	Proteína anti-apoptótica
Lisossomo associado a membrana	LAMP2	Xq24-q25	63-1	Metabolismo do glicogênio
Subunidade y regulatória da proteína cinase ativada por AMP	PRKAG2	Xp22.3	18-7	Metabolismo do glicogênio

Dados segundo: a) “The Human Genome Mutation Database” <http://www.hgmd.org> b) “Gene Cards: The Human Gene Compendium” <http://www.gencards.org> c) Ho Cy, 2010¹¹⁵.

1.4.1 Testes genéticos na CMH

A realização de testes genéticos nos pacientes com suspeita ou diagnóstico de CMH é de relevante importância, pois além de ajudar no diagnóstico de casos duvidosos pode ajudar na avaliação de parentes de 1º grau (Gersh et al., 2011).

Atualmente aproximadamente 60-70% dos pacientes com história familiar submetidos a testes genéticos apresentam mutações que podem estar relacionadas à CMH. Nos casos esporádicos apenas 30-40% dos casos são associados a alguma mutação patogênica.

A maior contribuição do uso de testes genéticos na cardiomiopatia hipertrófica é a melhor caracterização da doença, já que a identificação de uma mutação relacionada como patogênica nos pacientes com clínica de CMH confirma o diagnóstico, auxiliando também na elucidação de casos duvidosos, podendo ajudar, por exemplo, nos casos de hipertrofia borderline e na distinção entre CMH e “coração de atleta” (Wheeler M et al, 2009). É importante ressaltar que até 20% dos portadores de CMH não são corretamente diagnosticados por critérios clínicos, o que é particularmente preocupante no caso dos jovens atletas, quando o risco de morte súbita é maior. Os pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS) também podem ser mais difíceis de diagnosticar, dada à prevalência de HAS na população e, portanto, a presença frequente desta patologia em portadores de CMH - o que pode confundir a etiologia da hipertrofia concêntrica/simétrica.

Em relação à triagem de familiares, a presença de uma mutação patogênica em um paciente com cardiomiopatia hipertrófica, auxilia na realização de um estudo na família, já que é mais simples procurar uma mutação já reconhecida. Porém, mesmo quando identificada uma mutação relacionada a doença em familiares de portadores de CMH não significa que estes também apresentarão doença clínica sendo necessário apenas orientação em relação a possibilidade da manifestação fenotípica futura e acompanhamento médico rigoroso na intenção de detectar a doença, caso ocorra, precocemente. Estes indivíduos genótipo positivo (portadores de mutações relacionadas à CMH) com fenótipo negativo (sem hipertrofia manifesta) devem ser considerados portadores de CMH subclínica (Marian,2001; Maron et al., 2011). Se a mutação não é encontrada no familiar, sabemos que ele provavelmente não irá desenvolver a doença. Por outro lado, um paciente sem história familiar de doença porém com critérios clínicos que sugerem a possibilidade de CMH, mesmo que não tenha uma mutação identificada nos testes genéticos, não pode ser considerado não portador (Marsiglia, 2013), já que entendemos atualmente que existem genes ainda não descobertos que podem estar relacionados a doença, mutações não identificadas em genes conhecidos, além de outras limitações dos testes genéticos.

1.5 Sequenciamento de DNA

O DNA (Ácido desoxirribonucleico) foi demonstrado como material genético por Oswald Theodore Avery, em 1944, e sua estrutura de dupla hélice composta por quatro bases nitrogenadas - as púricas, adenina (A) e guanina (G) e as pirimídicas, timina (T) e citosina (C) - foi descrita por James D. Watson e Francis Crick em 1953 (Figura 7).

O sequenciamento de DNA é o processo que tem como finalidade determinar a disposição dos nucleotídeos (composto por uma base nitrogenada, um grupamento fosfato e um glicídio do grupo das pentoses, a desoxirribose) de um fragmento da molécula de DNA.

Figura 7. Estrutura do DNA e bases nitrogenadas

As tecnologias de sequenciamento de DNA podem ajudar profissionais de saúde em diversas áreas, sendo a capacidade de encontrar em genes mutações patogênicas causadoras de determinadas doenças, sua principal utilidade na medicina diagnóstica. Idealmente, as tecnologias de sequenciamento de DNA, devem ser rápidas, de baixo custo e fáceis de operar. Seguindo este princípio, nos últimos anos, estas tecnologias se desenvolveram rapidamente e progrediram com um grande desenvolvimento e maior aplicabilidade na área médica com maior expectativa de obter resultados que poderão ser utilizados na prática clínica.

1.5.1 História do sequenciamento de DNA

Na década de 70, Frederick Sanger desenvolveu uma tecnologia de sequenciamento de DNA baseada no método de terminação de cadeia, revolucionando a biologia desvendando a sequência de genes e genomas (Sanger et al., 1977a; Sanger et al., 1977b). Na mesma época, Walter Gilbert desenvolveu outra tecnologia de sequenciamento com base na modificação química do DNA e subsequente clivagem em bases específicas. Gilbert e Sanger desenvolveram suas metodologias de sequenciamento separadamente em seus laboratórios e foram premiados pelo trabalho pioneiro na determinação da sequência de nucleotídeos, compartilhando o Prêmio Nobel de Química em 1980.

Devido à sua alta eficiência, baixa radioatividade e maior facilidade na interpretação dos dados gerados, o sequenciamento de Sanger foi adotado como a técnica principal na análise de projetos envolvendo o genoma, e é

utilizado até hoje como método “padrão-ouro” para confirmação de resultados. Porém, naquele tempo, o sequenciamento de DNA era trabalhoso e demorado por ser feito de maneira manual. Depois de anos de aperfeiçoamento, em 1986, foi lançado o primeiro sequenciador automático (ABI370), adotando a eletroforese capilar e fazendo com que o sequenciamento se tornasse mais rápido e preciso. Em 1998, surgiram os instrumentos de sequenciamento automático que utilizavam as máquinas de sequenciamento capilar e a tecnologia de sequenciamento de Sanger (ABI3700) associados a softwares de informática, tornando-se a principal ferramenta para a conclusão do Projeto Genoma Humano (PGH) em 2001 (Collins et al). O PGH estimulou consideravelmente o desenvolvimento dos novos e mais poderosos sequenciadores, aumentando a velocidade e precisão e ao mesmo tempo reduzindo custos e mão de obra, acelerando o desenvolvimento da tecnologia atual de ‘Sequenciamento de Nova Geração’ (NGS – do Inglês, *Next Generation Sequencing*).

1.6 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O uso da tecnologia de NGS foi iniciado em 2005 com mudanças em relação ao método de Sanger em diversos aspectos, mas a principal diferença está na característica revolucionária da maior capacidade nas análises de alto rendimento, além da proposta da indiscutível importância de redução de custos. Porém, apesar da tecnologia de NGS ter tornado o sequenciamento genético mais acessível e conveniente, a quantidade de

dados gerados e a complexidade da análise destes dados obtidos ainda são uma grande limitação do método.

Com o avanço das novas tecnologias, em 2008 foi iniciado o projeto 1000 genomas, uma associação de estudos populacionais internacionais, com o objetivo de fazer o sequenciamento completo de pelo menos 1000 indivíduos (<http://www.1000genomes.org>). Em 2010 os primeiros resultados do projeto piloto foram publicados na revista *Nature* (Durbin, 2010), estabelecendo o mais detalhado mapa de variantes genéticas humanas publicado até o momento e em 2012 anunciada na mesma revista a sequencia de 1092 genomas humanos (McVean, 2012). O Projeto 1000 Genomas é o maior recurso público de suporte para pesquisadores nos estudos de variações genéticas que podem ser causadoras de doenças.

O sequenciamento de genomas humanos completos e o projeto 1000 genomas só puderam ser realizados devido às novas tecnologias de sequenciamento em larga-escala.

Figura 8. Evolução do Sequenciamento de DNA, de Sanger à NGS .

Com as novas tecnologias avançamos de maneira transformadora a abordagem dos testes genéticos, evoluindo rapidamente para estratégias de sequenciamento inovadoras: o sequenciamento do exoma completo, o sequenciamento do genoma completo e o sequenciamento de grandes painéis de genes candidatos. Essa rápida evolução causou uma mudança de paradigma, pois apesar de tornar o sequenciamento mais compreensível, a enorme extensão das corridas de sequenciação acrescentou um novo desafio para genética - o processamento de dados gerados, tornando a análise da bioinformática uma das peças fundamentais dos estudos atuais.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Identificar mutações genéticas, em um grupo de pacientes com diagnóstico clínico de CMH no IDPC, utilizando o método de sequenciamento de nova geração (NGS) por estudo de exons em um painel de 82 genes candidatos.

2.2 Objetivos específicos

- Testar a aplicabilidade e viabilidade do sequenciamento de nova geração para identificação de mutações causadoras de CMH;
- Sugerir, a partir dos dados obtidos, um protocolo clínico-genético para a cardiomiopatia hipertrófica, que seja aplicável no aconselhamento familiar;
- Relacionar as mutações e/ou polimorfismos encontrados com as variáveis clínicas estudadas e maior risco de morte súbita;
- Identificar novos genes e/ou novas mutações genéticas que podem estar relacionados a CMH.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes

Foram Incluídos no estudo 74 indivíduos acompanhados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), de diversos estados do Brasil; sendo que 66 eram pacientes não aparentados com diagnóstico de cardiomiopatia hipertrófica estabelecido por ecocardiografia, e oito familiares - quatro deles com suspeita clínica de CMH porém sem critério ecocardiográfico e outros quatro com diagnóstico confirmado. As amostras de DNA destes pacientes foram sequenciadas no Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia (LIMC) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), em busca de mutações já descritas como possíveis causadoras da doença e de novas mutações ainda não descritas. Paralelamente, encaminhamos amostras de DNA de 13 pacientes deste grupo para confirmação das mutações no Centro Nacional de Genotipado (CeGen) em Santiago de Compostela/Espanha.

Figura 9: Formação dos pacientes sequenciados

Os pacientes foram convocados por contato telefônico, a partir do cadastro de aproximadamente 750 pacientes em seguimento por CMH no setor de Miocardiopatias (dados gentilmente fornecidos pela Dra. Edileide de Barros Correia), convidados para realizar a análise genética e orientados a comparecer ao IDPC para avaliação médica. Pacientes e familiares receberam informações de sua condição e sobre detalhes do estudo.

A avaliação inicial foi realizada no ambulatório de Farmacogenômica (sob a coordenação do Dr. Marcelo Ferraz Sampaio), pela doutoranda envolvida no estudo, onde os pacientes foram submetidos a um exame clínico, responderam a um questionário composto de uma anamnese principal incluindo histórico pessoal, antecedentes clínicos, antecedentes familiares, sintomas e fatores de risco. Foram anotadas informações sobre

resultados de exames e tratamentos. As medicações prescritas foram mantidas durante a realização dos exames.

Todos os pacientes receberam informações sobre a pesquisa e após a autorização voluntária e assinatura do consentimento informado do estudo proposto (TCLE) de acordo com o CEP (Comissão de Ética em Pesquisa), submetidos à coleta de sangue periférico para exames laboratoriais e para obtenção do DNA.

Para discutir e propor um algoritmo de aconselhamento familiar, assim como a imediata aplicabilidade clínica, incluíram-se alguns parentes de pacientes selecionados e formamos 05 subgrupos de familiares de 1^o grau:

- Família 01 = pai com diagnóstico de CMH e dois filhos – um com diagnóstico definido e um deles sem diagnóstico ecocardiográfico.

- Família 02 = Pai com diagnóstico de CMH e o filho atleta sem critério ecocardiográfico definido (hipertrofia borderline), mas com alteração eletrocardiográfica.

- Família 03 = Mãe com diagnóstico de CMH e filho sem hipertrofia no ecocardiograma, porém com os mesmos sintomas da mãe.

- Família 04 = Pai e filha com diagnóstico clínico de CMH

- Família 05 = 04 irmãs, sendo que três delas são portadoras de fenótipo de CMH e uma sem diagnóstico clínico, porém com os mesmos sintomas das irmãs, inclusive história de síncope a esclarecer.

Para as análises dos objetivos propostos no projeto e relação genótipo-fenótipo foram incluídos apenas um representante portador de CMH de cada família (caso índice). Os familiares selecionados foram sequenciados e seus

resultados serviram apenas como achados para discussão no projeto, sem validade estatística.

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes de ambos os sexos e qualquer idade, com diagnóstico de CMH confirmado por ecocardiografia, onde conste hipertrofia sem dilatação do VE (≥ 15 mm em qualquer parede do VE).

Pacientes com espessura de parede borderline (entre 13-15 mm), quando excluída cardiopatia hipertensiva.

3.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes portadores de Hipertensão Arterial Sistêmica (pressão sistólica ≥ 140 mmHg e diastólica ≥ 90 mmHg) (Diretriz Brasileira de Hipertensão, 2010) quando associada à cardiopatia hipertensiva; considerando a alta prevalência de HAS e portanto a alta prevalência de portadores de CMH e HAS, usamos os critérios sugeridos nas Diretrizes de 2011 do ACCF/AHA para diagnóstico e tratamento da cardiomiopatia hipertrófica e não foram excluídos os hipertensos com HVE assimétrica ou presença de SAM (Gersh et al., 2011).

Portadores de qualquer outra cardiopatia ou distúrbio hemodinâmico que possa levar a hipertrofia do miocárdio.

Pacientes portadores de insuficiência renal crônica dialítica e doenças infiltrativas.

3.2 Avaliação clínica

Foram considerados sintomas como dispnéia, palpitações, tontura, dor precordial e síncope e os pacientes foram classificados de acordo com os critérios da *New York Heart Association* (CF/NYHA) para avaliação da classe funcional (*The Criteria Committee of the NYHA*, 1994). Os principais sinais considerados ao exame físico foram presença ou não de sopro à ausculta cardíaca (sopro de VSVE e/ou Insuficiência mitral), edema de membros inferiores, congestão pulmonar à ausculta, frequência cardíaca e pressão arterial.

3.2.1 Exames complementares realizados

- **Avaliação ecocardiográfica e eletrocardiográfica:** Os exames foram realizados em equipamentos disponíveis no IDPC por aparelho bidimensional com utilização do modo-M e de Doppler (pulsátil, contínuo e mapeamento de fluxo em cores), de acordo com as normas de recomendação da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Schiller et al., 1989). As variáveis ecocardiográficas consideradas foram: espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo, localização da hipertrofia, diâmetro máximo do átrio esquerdo, diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo, função diastólica, fração de ejeção, presença de gradiente intraventricular máximo na via de saída do ventrículo esquerdo, movimento anterior sistólico mitral (SAM) e regurgitação mitral.

A fração de ejeção foi considerada normal para valores $> 0,60$ e o gradiente na via de saída do ventrículo considerado significativo quando > 30 mmHg. Foi utilizada a técnica de Doppler na detecção, quantificação e cálculos para estimativa de gradientes de pressão intraventricular e utilizados critérios de normalidade previamente estabelecidos para as medidas das dimensões ventriculares.

O eletrocardiograma de repouso foi realizado em todos os pacientes nas 12 derivações clássicas, obedecendo a critérios internacionalmente aceitos segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso, 2003).

- ***Ecocardiografia com stress farmacológico:*** Realizado em casos selecionados para avaliar a presença de obstrução induzida da via de saída do ventrículo esquerdo (o gradiente induzido foi considerado significativo quando > 50 mmHg).

Também foram realizados, em alguns pacientes específicos, teste ergométrico, ressonância magnética e holter 24h.

3.3 Métodos moleculares / Sequenciamento em plataformas NGS

Na busca de possíveis variantes causais de CMH foi realizada a análise direta de éxons, utilizando plataformas de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing, NGS), com as plataformas MiSeq (Illumina) no laboratório LIMC/IDPC e a plataforma SoliD 5500xl (Life Technologies) no Laboratório CeGen na Espanha (sob coordenação do Prof.

Catedrático Angel Carracedo, sob orientação da Dra. Maria Brión). Para isto foi utilizada a técnica de sequenciamento direcionado (*Target Sequencing*) utilizando um painel onde é possível analisar, ao mesmo tempo, diversos genes de interesse. Para a escolha do painel de genes candidatos incluímos todos aqueles que tinham evidência científica de mutações causadoras de cardiomiopatia hipertrófica (sarcoméricos e não sarcoméricos), genes com descrições de mutações mais raras supostamente relacionadas à CMH e outros associados a outras cardiopatias e morte súbita, selecionando dessa maneira um painel de 82 genes candidatos (Tabela 03).

Tabela 03 - Painel de genes selecionados para análise direcionada de éxons

Sarcômero	Disco Z	Outros CMH	Outros genes não sarcoméricos			
MYH7	ACTN2	JPH2	ABCC9	DSP	KCNJ2	RYR2
MYBPC3	CSRP3	PLN	ACTA2	EYA4	KCNJ5	SCN1B
TNNT2	MYOZ2	MYLK2	ACTB	FBN1	KCNJ8	SCN3B
TNNI3	TCAP	CASQ2	AKAP9	FHL1	KCNQ1	SCN4B
TTN	VCL	SLC25A4	ANK2	FKTN	LDB3	SCN5A
TPM1		LAMP2	ANKRD1	GPD1L	LMNA	SDHA
ACTC1		PRKAG2	BAG3	HCN4	NEBL	SGCD
MYL2		GLA	CACNA1C	JUP	NEXN	SNTA1
MYH6			CACNA2D1	KCND3	NOS1AP	TAZ
TNNC1			CACNB2	KCNE1	PKP2	TGFB3
MYL3			CALR3	KCNE1L	PSEN1	TGFBR1
DES			DMD	KCNE2	PSEN2	TGFBR2
CAV3			DSC2	KCNE3	RANGRF	TMEM43
			DSG2	KCNH2	RBM20	TMPO

Cada coluna representa respectivamente: Genes presentes no sarcômero / genes presentes no disco Z / Genes não sarcoméricos já relacionados com CMH / genes não sarcoméricos relacionados com outras cardiopatias

3.3.1 Extração e análise do DNA genômico (gDNA)

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total periférico, pelo *QIAamp® DNA Blood Max Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha), utilizando sistema automatizado *QIAcube* (QIAGEN, GmbH, Alemanha).

A quantidade e pureza dos DNA's obtidos foram determinados em espectrofotômetro *NanoDrop ND1000* (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA). Foram utilizadas somente amostras de DNA que obtiveram relação A260/A280 entre 1,8 e 2,0 e A260/A230 entre 1,8 e 2,2 (SAMBROOK; Russel, 2001).

A integridade das amostras extraídas foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2,0mM pH 8.0) (SAMBROOK; Russel, 2001), em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA). A separação eletroforética foi realizada por 30 minutos a 100V e 60mA, utilizando fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, SP). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, após incorporação do corante *Gel Red™* (Biotium Inc, Hayward, California, EUA) na amostra e foto documentado em sistema de captura de imagem *Bioimagem LumiBIS* (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

3.3.2 Sequenciamento na plataforma MiSeq / Brasil

As 74 amostras analisadas no Brasil foram sequenciadas utilizando o kit MiSeq[®] v2 Reagent 300 ciclos e a plataforma *MiSeq System (Illumina, Inc. San Diego, USA)* disponível no Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (São Paulo, SP).

3.3.2.1 Preparo da biblioteca

O preparo das bibliotecas para o sequenciamento foi conduzido de acordo com os protocolos *NEXTERA[®] Enrichment Sample Preparation*. As amostras que apresentaram relação A260/A280 entre 1,8 e 2,0 e A260/A230 entre 1,8 e 2,2 foram quantificadas pelo método de fluorometria utilizando o *Qubit[®] 2.0 Fluorometer* e o kit *Qubit[®] dsDNA BR Assay (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA)*, e em seguida, diluídas para uma concentração de 5,0ng/uL a 6,5ng/uL.

As amostras de gDNA foram fragmentadas utilizando transposons e em seguida, purificadas utilizando *AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc., CA, EUA)*. A análise dos tamanhos dos fragmentos gerados foi realizada utilizando *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer* e *Agilent High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia EUA)*. De acordo com especificações do kit, os fragmentos devem ter entre 150bp e 1Kb.

Antes da PCR, a escolha e a melhor combinação dos *indexes* foi realizada utilizando o programa *Illumina Experiment Manager*. Após validação dos *indexes*, o DNA tagmentado e purificado foi amplificado pela

PCR. Neste passo foram adicionadas as sequencias do *index* 1 (i7), *index* 2 (i5) e adaptadores comuns (P5 e P7), necessários para geração de *clusters* e o sequenciamento propriamente dito.

Após a amplificação, o DNA tagmentado foi purificado utilizando *AMPure XP beads* (Beckman Coulter Inc., CA, EUA) para eliminação dos fragmentos muito curtos e seleção dos fragmentos de interesse (Entre 150bp e 1Kb e com pico em 300bp). A verificação dos tamanhos dos fragmentos foi realizada em plataforma *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer*, utilizando o kit *DNA 1000 Chip* (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia EUA).

Após quantificação em *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA), aproximadamente, 500ng de cada biblioteca (em um total de 12) com diferentes *indexes* foram combinadas em um volume final de 40uL. Essa mistura foi submetida a duas reações de hibridização com sondas biotiniladas que capturam as regiões que são sequenciadas (éxons). Após a hibridização, utilizaram-se esferas de estreptavidina para seleção das sondas hibridizadas. As bibliotecas provenientes da segunda etapa de hibridização foram eluídas das esferas, purificadas utilizando *AMPure XP beads* (Beckman Coulter Inc., CA, EUA) e amplificadas pela PCR nas condições descritas no protocolo.

As bibliotecas foram validadas e quantificadas pela PCR em tempo real, utilizando o kit *KAPA Library Quantification* (KAPA Biosystems, Inc., Wilmington, EUA) em termociclador ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Antes do sequenciamento as bibliotecas

foram diluídas a concentração final de 4nM com o tampão RSB fornecido no kit NEXTERA[®] Custom Enrichment (Illumina Inc., San Diego, EUA).

3.3.2.2 Reação de Sequenciamento

Desnaturação e diluição da biblioteca e do controle Phix

Cinco microlitros da biblioteca a 4nM foram diluídos com igual volume de NaOH 0,2N. Após agitação em *vórtex*, as amostras foram centrifugadas a 280 x g por 1 minuto, seguida de incubação por cinco minutos a temperatura ambiente, para desnaturação da fita dupla de DNA. Em seguida, a biblioteca.

foi diluída para 20pM em tampão HT1 pré-refrigerado, fornecido no kit MiSeq[®] v2 Reagent 300 ciclos (Illumina Inc., San Diego, EUA). Para o sequenciamento, a biblioteca foi novamente diluída com tampão HT1 para 15pM.

O estoque da biblioteca *Phix* (10nM) foi inicialmente diluída para 4nM em Tampão Tris-Tween (Tris-HCl 10mM, pH 8.5 com 0,1% de Tween 20), seguida de desnaturação. Para a desnaturação, dilui-se a biblioteca *Phix* (4nM) em NaOH 0,2N, obtendo-se uma solução a 2nM. A mistura foi agitada em *vórtex*, centrifugada a 280 x g por 1 minuto, seguida de incubação a temperatura ambiente por 5 minutos para desnaturação em fita simples. Após a desnaturação, a biblioteca foi diluída com o tampão HT1, para a concentração de 20pM. A concentração final do controle *phix* usado no sequenciamento foi de 12,5pM.

Para a reação de sequenciamento, foi feita uma combinação da biblioteca das amostras com o controle *Phix*, como esse último na proporção de 1%.

3.3.2.3 Análise do sequenciamento

A análise primária dos dados gerados durante o sequenciamento na plataforma *MiSeq* (controle de qualidade da reação [Q30, %CG, etc.] e *base calling*) foi realizada utilizando a ferramenta *Real-Time Analysis* (RTA), instalado no próprio computador que controla o equipamento. Enquanto a análise secundária (alinhamento e mapeamento das sequências, eliminação de leituras duplicadas, identificação e anotação das variantes) foi realizada utilizando o programa *CLC Genomic Workbench* (CLC Bio, Massachusetts, EUA).

Com a ajuda do *CLC Genomic Workbench*, as sequências obtidas foram alinhadas contra o genoma de referência de *Homo Sapiens* (*Homo Sapiens hg19*), e as variantes encontradas foram identificadas e anotadas com a ajuda dos bancos de dados *Exome Sequencing Project* (ESP), *dbSNP* e *ClinVar*. Além disso, foi feita uma análise funcional, ou seja, verificou-se se a presença da mutação resultaria em alterações na sequência dos aminoácidos.

Dessas análises foram geradas planilhas em Excel, a partir das quais se procedeu a análise terciária onde as variantes passaram por um filtro para seleção/priorização de variantes com maior probabilidade de serem patogênicas, de acordo com os critérios estabelecidos baseados nas

características do estudo. O filtrado também tinha como objetivo eliminar erros sistemáticos do equipamento e resultados falso-positivo e/ou falso-negativo.

Ao final foram selecionadas/priorizadas aquelas variantes que apresentavam as características a seguir:

Figura 10: Critérios estabelecidos para a seleção/ priorização de variantes como possíveis mutações causais de CMH.

“Balanço das reads F/R” e “Average Quality”: Esses filtrados foram realizados com o objetivo de remover os resultados falsos positivos, eliminando principalmente as variantes do início e final do *amplicon*, visto que estas extremidades, em geral, não são bem cobertas.

Análise das variantes conhecidas

As variantes selecionadas após a priorização e que já foram descritas em algum dos bancos de dados utilizados no CLC Genomic Workbench, foram como classificadas como mutação já descrita, e em seguida, submetidas a uma análise adicional nos bancos de dados online (listados na tabela 4), na busca de informações complementares sobre as variantes e se essas já haviam sido associadas à cardiomiopatia hipertrófica ou a outra enfermidade. Além disso, as publicações sobre as mutações foram acessadas com o objetivo de verificar o tipo de ferramenta de análise utilizada pelo autor, bem como conhecer as características clínicas dos indivíduos portadores da alteração genética para posterior comparação com o perfil dos pacientes, portadores da mesma variante, sequenciados no nosso estudo.

Tabela 4: Bancos de dados de genes online

Genes	Nome	WEB
Todos	NCBI / Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Todos	Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.cf.ac.uk
Genes CMH	Cardiogenomics	http://cardiogenomics.med.harvard.edu

Confirmação das mutações novas - Sequenciamento de Sanger

Todas aquelas variantes que atenderam aos requisitos de qualidade estabelecidos e que não foram descritas nos bancos de dados utilizados no

CLC Genomic Workbench foram selecionadas para a confirmação pelo método convencional de Sanger, que permanece sendo o padrão ouro.

Para confirmação das mutações através do Sequenciamento de Sanger, foi necessária uma amplificação prévia pela PCR, dos éxons (ou regiões destes) que continham a variante. Para isso, foram selecionados oligonucleotídeos iniciadores com o auxílio do programa Primer3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e das sequências disponíveis nos bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Os iniciadores selecionados, bem como as condições de amplificação e tamanho do amplicon estão listados no Anexo A.

- Amplificação pela PCR

A amplificação das regiões de interesse foi realizada utilizando DNA genômico dos pacientes como molde, 1U da enzima *Taq* DNA Polimerase (DNA Express Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1X do tampão de PCR (DNA Express Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 200 μ M de cada dNTP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), e 100nM de cada oligonucleotídeo iniciador (DNA Express Biotecnologia, São Paulo, Brasil), em termociclador Veriti (Applied Biosystems, Massachusetts, USA). A PCR ocorreu nas seguintes condições: Uma desnaturação inicial a 98°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos com uma desnaturação a 95°C por 1min, hibridização por 1min com temperaturas variando de 58 a 65°C (Quadro 01), extensão a 72°C por 1min, e ao término dos ciclos uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram analisados por separação eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2,0Mm pH 8,0), em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc., aithersbur, MD, EUA). A separação foi realizada por 30 minutos a 100V e 60mA, utilizando fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amershan Bioscience do Brasil, São Paulo, SP). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, após incorporação do corante Gel Red TM (Biotium Inc, Hayward, California, EUA) na amostra e fotodocumentado em sistema de captura de imagem Bioimagem LumiBIS (DNR BIO-Imaging Systems, Jerusalem, Israel). Os produtos da PCR que possuíam fragmentos de tamanho esperado e ausência de fragmentos inespecíficos foram purificados utilizando o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band (GE Helthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Os produtos da PCR purificados foram enviados para o sequenciamento.

Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil) utilizando o equipamento *ABI 3730 DNA Analyser* (Life Technologies – Applied Biosystems) e o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). As corridas foram feitas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. Os resultados do sequenciamento foram analisados inicialmente no Instituto de Biociências utilizando o software *Sequencing Analysis 5.3.1*, utilizando o Base Caller KB, e posteriormente,

analisadas no nosso laboratório utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

Análise das variantes novas

As mutações que ainda não tivessem sido descritas na literatura foram submetidas à avaliação de patogenicidade por ferramentas de bioinformática que auxiliam na predição do efeito deletério da mutação sobre a proteína. As ferramentas de predição online escolhidas foram as seguintes:

A) PROVEAN = (do Inglês **P**rotein **V**ariation **E**ffect **A**nalyzer) é uma ferramenta online (http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php) que foi desenvolvida para prever se uma substituição de aminoácido ou uma variação na sequência de proteína tem impacto sobre a função biológica. O servidor é capaz de fornecer predições para qualquer tipo de variação de sequências de proteínas, incluindo as seguintes:

- Substituições de aminoácidos (únicas ou múltiplas)
- Inserções de aminoácidos (únicas ou múltiplas)
- Deleções de aminoácidos (simples ou múltiplas)

Resultados possíveis = *neutral* ou *deleterious* (neutra / deletéria)

B) SIFT = (do inglês **S**orting **I**ntolerant **F**rom **T**olerant). Esta ferramenta prevê se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína. É baseado no grau de conservação dos resíduos de aminoácidos no alinhamento de sequências. O software SIFT pode ser aplicado a polimorfismos não

sinônimos de ocorrência natural ou mutações missense induzidas no laboratório. Através da homepage do programa SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), pode-se submeter uma sequência protéica de interesse, e as posições e substituições de resíduos de aminoácidos que serão avaliadas pelo algoritmo de predição. Resultados possíveis = *Tolerated* ou *Damaging* (tolerada ou deletéria)

C) POLYPHEN = (do Inglês **P**olymorphism **P**henotyping) É uma ferramenta usada na predição dos possíveis impactos funcionais e estruturais de substituições de resíduos de aminoácidos em proteínas (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>).

Resultados possíveis = *Benign* / *possibly damaging* / *probably damaging* (benigna / possivelmente deletéria / provavelmente deletéria)

D) Mutation Taster = (<http://www.mutationtaster.org/>) utiliza uma classificação denominada Bayes para prever o potencial de uma alteração genética causar doença. Este classificador é alimentado com os resultados de todos os testes e com as características das alterações e calcula a probabilidade dessa alteração ser uma mutação causadora da doença ou um polimorfismo inofensivo. Resultados possíveis: *disease causing* (causadora de doença) / polimorfismo (provavelmente inofensivo).

Consideramos como possivelmente patogênicas as mutações que foram consideradas deletérias em pelo menos dois dos programas de predição de patogenicidade

3.3.3 Sequenciamento na plataforma Solid / Espanha

Com o objetivo de validar os resultados das mutações encontradas no sequenciamento realizado no Brasil, o DNA genômico de 13 pacientes foi enviado para a Espanha para o sequenciamento de éxons utilizando a plataforma Solid 5500 (Applied Biosystems). Todas as novas variantes identificadas através do NGS e priorizadas em cada uma das amostras também foram confirmadas mediante sequenciamento de Sanger.

3.3.3.1 Preparo das amostras

As amostras de DNA foram quantificadas utilizando o reagente Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen). A pureza e a integridade do DNA extraído foram avaliadas utilizando o Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA), e pela eletroforese em gel de agarose a 0,8%, respectivamente.

Para o sequenciamento em plataforma Solid, as amostras de DNA deveriam cumprir os seguintes requisitos:

Quantidade: 3µg DNA em 100µL de Tampão TE 1X

Pureza: DO 260nm /280nm: 1.8 – 2.0

DO 260nm /230nm: 1.8 – 2.2

Integridade: Presença de DNA de alto peso molecular

As amostras que possuíam as características acima e se mostraram íntegras no gel de agarose 0,8% foram diluídas para a concentração necessária ao sequenciamento. As outras que não apresentaram uma boa

integridade foram avaliadas através da plataforma Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) para quantificar o nível de degradação.

3.3.3.2 Preparo da biblioteca e reação de sequenciamento

Para o sequenciamento de éxons foi empregada a técnica “*Targeted resequencing*” (resequenciamento direcionado), sendo utilizado o método *SureSelect* e *SureSelect XT* (Agilent Technologies) com painéis de 200 e 500Kb, respectivamente. O método do *SureSelect* é baseado na hibridação em solução com sondas de RNA biotiniladas complementares as regiões de interesse. As sondas utilizadas foram selecionadas para a captura de éxons de genes relacionados com doenças cardiovasculares. A escolha das sondas foi realizada utilizando o programa *SureDesign* da Agilent Technologies (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign>), e dos bancos de Dados: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) e UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

Para o preparo das bibliotecas foi utilizado o protocolo *SureSelectXT Target Enrichment System for SOLiD 5500 Multiplexed Sequencing* (Agilent Technologies). O protocolo iniciou com a fragmentação do DNA genômico mediante sonicação, seguida pela seleção dos fragmentos com tamanhos de aproximadamente 150pb. Procedeu-se então as etapas de reparo, adição de adenina e ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos. Estes foram amplificados pela PCR utilizando iniciadores complementares aos adaptadores adicionados. Antes da hibridização com

as sondas de RNA biotiniladas, o produto da amplificação (biblioteca) foi quantificado pela PCR em tempo real. A hibridização foi realizada com 500ng da biblioteca, em incubação a 65°C durante 24 horas.

Os fragmentos da biblioteca ligados às sondas biotiniladas foram purificados utilizando esferas magnéticas revestidas com estreptavidina, e novamente amplificados. Nesse momento, foram incorporados os códigos de barras, oligonucleotídeos conhecidos, que ajudaram a identificar as amostras sequenciadas simultaneamente (*pool*). Por fim, a biblioteca enriquecida e amplificada foi novamente quantificada pela PCR em tempo real, e 16 bibliotecas em concentrações equimolares foram selecionadas para constituir o *pool*. Cada *pool* foi amplificado através de uma PCR em emulsão seguindo os protocolos: “SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier Getting Started Guide” (4441486E), “SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier Getting Started Guide” (4443494E) e “SOLiD™ EZ Bead™ Enricher Getting Started Guide” (4443496E). O sequenciamento foi realizado na plataforma SOLiD 5500xl (Applied Biosystems) utilizando a estratégia *Pair-end* (75 +25 pb).

3.3.3.3 Análise dos dados do Sequenciamento

Depois de finalizado o processo de sequenciamento, que dura em média três semanas (uma semana para o preparo da biblioteca e duas semanas para a reação de sequenciamento propriamente dita), as análises primária e secundária dos dados gerados foram realizadas pelo bioinformata, que utilizou algoritmos como *Picard*, *GATK*, *LifeScope™* e *ANNOVAR* para mapear as sequencias, eliminar leituras duplicadas,

detectar e anotar as variantes encontradas gerando planilhas em Excel. A partir dessas planilhas, procedeu-se a análise terciária onde as variantes passaram por um filtro para seleção/priorização de variantes com maior probabilidade de serem patogênicas, de acordo com os critérios estabelecidos baseados nas características do estudo. Foram priorizadas as variantes que apresentavam as características a seguir:

Figura 11: Critérios estabelecidos para a seleção/ priorização de novas variantes como possíveis mutações causais.

Além disso, foi feita uma análise *in silico* para avaliar o efeito funcional das variantes, e a conservação destas entre espécies. Portanto, no final foram selecionadas aquelas variantes, cuja presença resultasse em alterações de funcionalidade (troca de aminoácidos) e que foram classificadas como potencialmente patogênicas. Com a ajuda do visor genômico *Integrative Genomics Viewer* (IGV)

(<http://www.broadinstitute.org/igv/>) buscou-se eliminar erros sistemáticos do equipamento e resultados falso-positivo e/ou falso-negativo. Todas aquelas variantes que atenderam aos requisitos de qualidade foram confirmadas pelo método convencional de Sanger, que permanece sendo o padrão ouro.

Para o sequenciamento de Sanger foram selecionados oligonucleotídeos iniciadores com o auxílio do programa *Primer3* v.0.4.0, (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), e o sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems) e o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), como descrito no item 1.2.2.1. Os resultados foram analisados com a ajuda do programa *SeqScape®* (Applied Biosystems).

3.4 Correlação genótipo/fenótipo

Como foi incluído no presente estudo um painel amplo de genes com o objetivo principal de avaliar uma quantidade maior de variantes e associar a CMH, a atual casuística tem um número de indivíduos estatisticamente limitado para uma correlação genótipo/fenótipo precisa. A despeito disso, avaliou-se a relação de todas as variantes genéticas detectadas com cada uma das manifestações clínicas previamente estabelecidas, tentando comparar com os achados descritos na literatura.

3.5 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IDPC conforme expresso pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (nº4008).

Os indivíduos foram informados, pelo investigador principal ou membro da equipe colaboradora designada por ele, sobre os objetivos da pesquisa desenvolvida neste trabalho. Somente participaram do estudo aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O estudo está em conformidade com as seguintes resoluções:

- Resolução CNS 196/96
- Declaração de Helsink
- ICH Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice (1996)

3.6 Análise estatística dos resultados

A associação entre as variantes genéticas e os fenótipos clínicos de interesse foi testada assumindo um modelo genético multiplicativo. Para fenótipos dicotômicos foram empregados modelos de regressão logística múltipla exata. Quando o modelo exato excedeu a capacidade computacional disponível, foram utilizados modelos de regressão logística com o escore Modificado de Firth de acordo com as recomendações de Wang (2014). Para fenótipos contínuos, modelos de regressão linear múltipla foram construídos. Todos os modelos foram ajustados para idade e gênero (1 = homem, 0 = mulher) e foram construídos com duas estruturas para as variáveis preditoras:

Estrutura 1: O efeito da variante é testada isoladamente (incondicional à presença de outras variantes em outros genes)

Estrutura 2: As variantes são somadas, e o número total de alelos mutados é utilizado como variável preditora.

Todas as análises foram bi-caudais (alfa = 5%) e foram realizadas no pacote estatístico Stata 13.0 (Stata Corporation, College Station, TX, Estados Unidos). Resultados com valor de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Optou-se pela não realização de correções para múltipla testagem devido ao relativo baixo tamanho amostral e à natureza exploratória do estudo.

3.6.1 Variáveis estudadas

- Demográficas: gênero, idade, etnia, naturalidade.
- Clínicas: Síncope, morte súbita recuperada, morte súbita familiar, história familiar de CMH, sintomas (dispnéia, palpitações, precordialgia), pressão arterial, frequência cardíaca e IMC; uso de medicações;
- Presença de arritmias (ECG/Holter/CDI): FA, TVNS, TVS e FV;
- Ecocardiográficas: Espessura de septo, tipo, gradiente de VSVE;
- Medidas invasivas: Uso de CDI, miectomia, ablação;
- Presença de fatores de risco para morte súbita: Além dos já citados acima (síncope, morte súbita recuperada, TVNS, história familiar de morte súbita, espessamento de parede ≥ 30 mm, obstrução de VSVE, fibrilação atrial e terapia de redução de septo) serão considerados também: Resposta

anormal da pressão arterial (PA) no esforço, isquemia miocárdica, realce tardio na ressonância magnética e aneurisma apical.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização clínica e ecocardiográfica (perfil da doença)

Na amostra de 66 pacientes não familiares sequenciados, 51,5% eram do sexo masculino 48,5% do sexo feminino, com idades entre 17 e 80 anos (média 49,5 anos), na data da coleta dos exames de sangue.

Destes pacientes 34 eram do estado de São Paulo, 31 (47%) de outros estados brasileiros (BA=11; PE=7; MG=4; AL=3; CE=1; GO=1; RJ=1; RN=1; PI=1) e uma das pacientes natural de Portugal. Em relação à etnia, 40 pacientes eram brancos (60,6%); 19 (28,8%) pardos; seis afrodescendentes e um asiático.

Dos 23 pacientes que realizaram ressonância magnética cardíaca, 22 (95,6%) apresentaram realce tardio. Nove pacientes (13,7%) tinham história de fibrilação atrial em alguma fase da doença.

Na nossa presente casuística os sintomas mais frequentes foram palpitações, presente em alguma fase da doença em 50 pacientes (75,7%) seguido de dispnéia em 48 pacientes (72,7%), e 38 pacientes (57,5%) apresentaram queixa de precordialgia.

Ao estudo ecocardiográfico observamos média de espessura de septo 21,4 mm (13-42), diâmetro do átrio esquerdo 43,85 mm (28-67), ventrículo esquerdo em diástole $45,3 \pm 5,35$ mm (32-58). Todos os pacientes incluídos tinham fração de ejeção normal conforme estabelecido nos critérios de inclusão. A obstrução de VSVE (gradiente de VSVE > 30 mmHg ou 50 mmHg induzido por stress) estava presente em 27 pacientes (41%).

Em relação à morfologia houve, como esperado, predomínio da forma septal assimétrica, com hipertrofia septal em 55 pacientes (83,3%), sendo que a forma septal assimétrica isolada foi encontrada em 46 pacientes (70%) e nos outros casos a forma septal estava associada à hipertrofia em outras paredes: septal + apical (quatro pacientes), apical e lateral (dois pacientes), ventrículo direito (dois pacientes) e médio ventricular (um paciente). Dos 66 pacientes 10 tinham hipertrofia concêntrica (15,2%), sendo sete simétricas e três deles com predominância septal. A hipertrofia de VD estava presente em quatro pacientes, três deles com a forma septal assimétrica e um com hipertrofia concêntrica, e nenhum caso com hipertrofia isolada de VD. A hipertrofia estava presente no ápice de sete pacientes, mas apenas em um deles de maneira isolada, os demais casos apresentavam hipertrofia concomitante em outras paredes.

4.1.1 Fatores de risco

Dos pacientes selecionados, três tinham história pessoal de morte súbita recuperada e 45,4% história de morte súbita familiar precoce (com <40 anos). A maioria dos pacientes (53%) já haviam apresentado pelo menos um episódio de síncope de origem indeterminada. Em 26 pacientes foi observada presença de TVNS no holter, em dez pacientes espessura miocárdica severa > 30 mm e em 21 dos 54 que realizaram teste ergométrico (38,8%) observou-se comportamento anormal da pressão arterial.

Nove pacientes (13,6%) já haviam sido submetidos à redução septal por miectomia e na avaliação do último ecocardiograma realizado a maioria (oito pacientes) permanecia com septo > 20 mm e todos os nove pacientes permaneciam com septo < 30 mm (20-29 mm) após o procedimento.

Um total de 34 pacientes (51,5%) já estava em uso de CDI e dois pacientes tinham indicação e estavam aguardando o implante, o que nos faz observar que a maioria dos pacientes do grupo, mesmo que selecionados aleatoriamente, tinham risco elevado para morte súbita.

As características clínicas, demográficas e de exames complementares do grupo estudado estão resumidas nas tabelas 5, 5.1 e 5.2.

Tabela 5 - Resumo das principais características clínicas, demográficas e de exames complementares.

	N= 66	%
Idade (média ± DP)	49,5 ± 15,4	
Gênero masculino	34	51,5
feminino	32	48,5
ECO: septo em mm (média ± DP)	21,4 ± 6 (13-42)	
parede posterior	12,7 ± 3,5 (7-32)	
AE	43,8 ± 8,56 (28-67)	
DDVD	45,3 ± 5,35 (32-58)	
FE	70,6 ± 4,6 (60-79)	
Espessura septal > 30 mm	10	15,1
CMH obstrutiva	27	41
História fam. MS <40 anos	30	45,4
Síncope indeterminada	35	53
TVNS	26	39,3
CDI	34	51,5
Nº de FR maiores 01	24	36,4
02	18	27,3
03	09	13,6
04	08	12,1
05	01	1,51
Fibrilação atrial	9	13,7
Miectomia	9	13,6
Morte Súbita recuperada	03	4,54

Tabela 5.1: Dados antropométricos (CMH n = 66 pacientes)

	MÉDIA	DP	MEDIANA	PERCENTIS 25	PERCENTIS 75
IDADE	49,47	15,43	51,00	38,50	61,00
PESO	72,07	13,43	70,50	65,00	81,00
ALTURA	1.65	0,09	1.66	1.60	1.70
IMC	26,49	4,32	26,33	23,62	28,99
PAS	114,59	14,03	119,00	102,00	127,50
PAD	73,32	10,77	70	62,50	80
FC	66,36	6,19	66	62	70

Tabela 5.2: Medidas de ecocardiograma (CMH n = 66 pacientes)

	MÉDIA	DP	MEDIANA	PERCENTIS 25	PERCENTIS 75
SEPTO	21,36	6,04	20,0	17	24,75
PP	12,70	3,53	12,0	11	14
AE	43,85	8,56	43,0	38,25	49,00
DDVE	45,32	5,35	45	42	48,75
DSVE	27,52	4,44	27	25	30
FE	70,56	4,56	70	68	73,75

4.2 Caracterização Genética

Após as filtrações e priorizações de todas as variantes encontradas, pelos critérios metodológicos estabelecidos, foram identificadas 99 mutações diferentes provavelmente patogênicas (Tabelas 7, 7.1, 7.2) relacionadas ou não a CMH, distribuídas em 42 genes (Tabela 6). Deste total de mutações, pelo menos uma estava presente em 54 pacientes (81,8%).

Após avaliação de todas essas mutações nos bancos de dados específicos citados anteriormente encontrou-se referência de 27 mutações em publicações (28,1%), e estas estavam presentes em 32 pacientes (59,2%). Desse total de mutações publicadas 17 já haviam sido relacionadas à CMH em 23 pacientes e as 10 restantes eram descritas como causadoras de outras patologias (Cardiomiopatia dilatada, morte súbita inexplicada, Doença de Fabry, Displasia Arritmogênica de VD, Brugada, Distrofia de Duchenne e distrofia muscular Limb-Girdle), e distribuídas nos genes CAV3, GLA, SCN5A, DSG2, DMD, DSP e KCNQ1.

Tabela 6. Genes do painel de sequenciamento nos quais foram identificadas mutações

Genes do sarcômero	Disco Z	Outros CMH	Outros genes não sarcômericos	
MYH7	VCL	CASQ2	AKAP9	KCNQ1
TNNT2	ACTN2	SLC25A4	ANK2	LDB3
TPM1	MYOZ2	PRKAG2	BAG3	NEXN
ACTC1		GLA	CACNA1C	PKP2
MYH6			CALR3	PSEN2
MYL3			DMD	RBM20
DES			DSG2	RYR2
CAV3			DSP	SCN1B
MYBPC3			FBN1	SCN5A
			HCN4	SDHA
			JUP	SNTA1
			KCND3	TMPO
			KCNE2	ACTB

Nos três principais genes (MYH7, MYBPC3 e TNNT2) já associadas à CMH, foram encontradas 23 mutações diferentes em 28 pacientes (42,4%), sendo que 47,8% estavam no gene MYH7 em 17 pacientes, 39,1% no gene MYBPC3 em 10 pacientes e 13% no gene TNNT2 em três pacientes. Dois pacientes apresentavam mutações patogênicas nos dois genes MYH7 e MYBPC3 simultaneamente.

Do total de mutações nestes três genes, 17 já haviam sido publicadas e seis delas ainda não haviam sido descritas até o momento. As mutações mais frequentes em pacientes não aparentados foram Q827fs no gene MYBPC3 presente em dois pacientes, R453C no gene MYH7 também em dois pacientes, V320M no gene MYH7 em três pacientes. As outras mutações encontradas foram exclusivas de cada paciente.

Todas as mutações encontradas, descritas e não descritas, em todos os genes estão apontadas nas tabelas 7, 7.1 e 7.2.

Tabela 7 - Lista de mutações encontradas nos três principais genes relacionados à cardiomiopatia hipertrófica, número de pacientes com a mesma mutação, resultados dos testes de predição de patogenicidade e descrição na literatura.

Gene	Mutação	Nº de Pacientes	Provean	SIFT	Polyphen	Mutation Taster	Descrita
MYH7	p.Lys615Asn K615N	1	Deleterious	Damaging	Possibly damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Ile263Thr I263T	2	Deleterious	Damaging	Possibly damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Arg453Cys R453C	2	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Val320Met V320M	3	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Asp1652Tyr D1652Y	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Arg249Gln R249Q	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Asp382Ala D382A	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	Não descrita
MYH7	p.Tyr266Cys Y266C	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Gly768Arg G768R	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYH7	p.Glu1321Gly E1321G	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	Não descrita
MYH7	p.Arg143Gln R143Q	1	Deleterious	Damaging	Possibly damaging	Disease Causing	SIM
MYBPC3	p.Glu258Lys E258K	1	Neutral	Damaging	Benign	Disease causing	SIM
MYBPC3	p.Asp75Asn D75N	1	Neutral	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYBPC3	p.Ser217Gly S217G	1	Deleterious	Damaging	Possibly damaging	Disease causing	SIM
MYBPC3	p.Arg1002Trp R1002W	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
MYBPC3	p.Gln827fs Q827fs	2	N/a	N/a	#	Disease causing	SIM
MYBPC3	p.Trp792* W792*	1	N/a	N/a	#	Disease causing	Não descrita
MYBPC3	p.Val962Gly V962G	1	Deleterious	Damaging	Possibly damaging	Disease causing	Não descrita
MYBPC3	p.Asn665Lys N665K	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	Não descrita
MYBPC3	p.Val727Met V727M	1	Deleterious	Damaging	Possibly damaging	Disease Causing	Não descrita
TNNT2	p.Asn262Ser N262S	1	Neutral	Tolerated	Probably damaging	Disease causing	SIM
TNNT2	p.Arg92Trp R92W	1	Deleterious	Damaging	Probably damaging	Disease causing	SIM
TNNT2	Trp287Term W287*	1	N/a	N/a	#	Disease causing	SIM

Tabela 7.1 - Lista de mutações descritas em outros genes relacionadas a outras enfermidades, número de pacientes com a mesma mutação, nome da doença associada e descrição na literatura.

Gene	MUTAÇÃO	Nº de pacientes	Doença Associada	Descrita
DMD	p.Tyr274Cys Y274C	01	distrofia muscular de Duchenne	SIM
DSG2	p.Val56Met V56M	02	Displasia arritmogênica de VD / CMD	SIM
DSG2	p.Asn493Ser N493S	01	Displasia arritmogênica de VD	SIM
GLA	p.Arg118Cys R118C	03	Doença de Fabry	SIM
GLA	p.Arg356Trp R356W	01	Doença de Fabry	SIM
SCN5A	p.Ala1698Thr A1698T	01	Brugada	SIM
CAV3	p.Cys72Trp C72W	01	Distrofia Limb-girdle	SIM
KCNQ1	p.Pro99Arg P99R	01	Morte Súbita	SIM
ACTN2	Ala462Ser A462S	01	CMD	SIM
DSP	p.Ala566Thr A566T	03	Displasia arritmogênica de VD	SIM

Legenda: VD= ventrículo direito. CMD= Cardiomiopatia dilatada

Tabela 7.2: Lista de mutações não descritas encontradas em outros genes não sarcoméricos, número de pacientes com a mesma mutação, resultados dos testes de predição de patogenicidade e descrição na literatura.

Gene	Mutação	Nº de Pacientes	Provean	SIFT	Polyphen	Mutation Taster	Descrita
ACTB	p.Glu214Gly E214G	1	Deleterious	N/A	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
ACTB	p.Glu205Gly E205G	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
ACTC1	Ser236Phe S236F	1	Neutral	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
ACTN2	Asp622Asn D622N	1	N/A	N/A	N/A	Disease Causing	Não descrita
AKAP9	Glu3491Lys E3491K	1	Neutral	Damaging	Possibly Damaging	polymorphism	Não descrita
AKAP9	Tyr2531* T2531*	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
AKAP9	Gln2533Lys Q2533K	1	Neutral	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
AKAP9	Glu1732Lys E1732K	1	Neutral	Damaging	Benign	Disease Causing	Não descrita
ANK2	p.Arg1549Trp R1549W	1	Deleterious	Tolerated	Benign	Disease Causing	Não descrita
BAG3	p.Asp300Asn D300N	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
CACNA1C	p.Glu472Lys E472K	1	Deleterious	N/A	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
CACNA1C	p.Thr1982Pro T1982P	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
CACNA1C	p.Thr1870Met T1870M	1	Neutral	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
CALR3	p.Lys55Glu K55E	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita

CASQ2	p.Arg253His R253H	1	neutral	Damaging	Benign	Disease Causing	Não descrita
DES	p.Glu262Val E262V	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
DMD	p.Pro2377Leu P2377L	1	Deleterious	Tolerated	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
DSG2	Phe833Leu F833L	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
FBN1	*56Glu *56E	2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HCN4	p.His798Pro H798P	2	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	p.Leu795Pro L795P	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	p.Thr788Pro T788P	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	p.Val457Gly V457G	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	His798Pro H798P	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	p.His798Pro H798P	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	Leu795Pro L795P	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	p.Thr789Pro T789P	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	p.His798Pro H798P	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
HCN4	p.Thr796Pro T796P	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
JUP	p.val607gly V607G	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
KCND3	p.Gln305Pro Q305P	1	Deleterious	Tolerated	Benign	Disease Causing	Não descrita
KCND3	p.Ser304Pro S304P	2	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
KCND3	p.His303Pro H303P	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
KCNE2	p.Ser70Asn S70N	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
LDB3	His105Pro H105P	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
MYH6	p.Asp1179Gly D1179G	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
MYH6	p.Arg1691His R1691H	2	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
MYH6	p.Ser158Pro S158P	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
MYH6	Ala964Ser A964S	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
MYL3	p.Arg94Cys R94C	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
MYOZ2	Leu163Ser L163S	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
NEXN	p.Glu470Gln E470Q	2	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
PKP2	p.Arg714Gln R714Q	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
PKP2	p.Arg497Ter R497*	1	N/A	N/A	N/A	Disease Causing	Não descrita
PKP2	p.Gln487Arg Q487*	1	N/A	N/A	N/A	Disease Causing	Não descrita
PKP2	Arg497* R497*	2	N/A	N/A	N/A	Disease Causing	Não descrita
PKP2	Arg497* R497*	1	N/A	N/A	N/A	Disease Causing	Não descrita
PKP2	Gln502* Q502*	2	N/A	N/A	N/A	Disease Causing	Não descrita
PRKAG2	p.Val35Gly V35G	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita

PSEN2	p.Ala291Thr A291T	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
RBM20	p.Asp786Gly D786G	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
RBM20	Thr177Ile T177I	1	Neutral	Damaging	Possibly Damaging	Polymorphis m	Não descrita
RYR2	p.Ile1299Thr I1299T	1	Deleterious	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
RYR2	p.Ala266Thr A266T	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
RYR2	Arg3152His R3152H	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
SCN1B	Cys211Tyr C211Y	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
SCN5A	p.Val223Ala V223A	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
SCN5A	p.R800C	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
SDHA	p.Thr87Ile T1582I	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
SDHA	p.Val432Gly V432G	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
SDHA	p.Tyr436Ser Y436S	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
SDHA	p.Val446Ala V446A	2	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Polymorphis m	Não descrita
SDHA	p.Ser161Arg S161R	1	Deleterious	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
SLC25A4	Thr84Pro T84P	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
SNTA1	p.Arg331His R331H	1	Deleterious	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
SNTA1	Gln153His Q153H	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
SNTA1	Glu165Gly E165G	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
SNTA1	Glu165Gly E165G	1	Deleterious	Damaging	Possibly Damaging	Disease Causing	Não descrita
TMPO	p.Ser444Cys S444C	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Polymorphis m	Não descrita
TMPO	p.Ser444Cys S444C	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	polymorphis m	Não descrita
TPM1	p.Ala102Asp A102D	1	Neutral	Damaging	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita
VCL	p.Pro536Thr P536T	1	Deleterious	Tolerated	Probably Damaging	Disease Causing	Não descrita

Como citado anteriormente, todas as mutações foram submetidas à avaliação nas ferramentas de bioinformática disponíveis na internet para verificação da probabilidade de dano a proteína. A figura 12 demonstra a avaliação dos quatro softwares utilizados no protocolo do presente estudo, na mutação R453C, presente no gene MYH7 em dois pacientes do estudo e que foi considerada deletéria nas quatro análises.

Figura 12- Exemplo da avaliação (predição de patogenicidade) dos programas *online* Polyphen, Provean, Sift e Mutation Taster, da mutação R453C no gene MYH7, identificada no nosso estudo. Imagens copiadas dos sites específicos sem modificações da predição real. A) Polyphen; B) Provean e SIFT e C) Mutation Taster

4.2.1 Grupo de pacientes sequenciados no sistema Miseq/Brasil e Solid/Espanha

Apenas duas mutações em dois pacientes sequenciados no laboratório do IDPC não foram encontradas no laboratório da Cegen (Espanha) e três mutações foram descritas lá e não identificadas aqui. Dos 13 pacientes selecionados, em sete foram encontradas exatamente as

mesmas mutações e em dois pacientes não foi encontrada nenhuma mutação patogênica em ambos os laboratórios (tabela 8).

Tabela 8 - Comparação entre as mutações patogênicas encontradas no sequenciamento na plataforma MiSeq e na plataforma Solid.

Paciente	Resultados no Brasil (Gene / Mutação)	Resultados na Espanha (Gene / Mutação)
01	MYH7 / K615N	MYH7 / K615N
02	n.i.m.	n.i.m.
03	KCNE2 / S70N	KCNE2 / S70N
04	SDHA / T1582I	SDHA / T1582I
05	n.i.m.	n.i.m.
06	MYH7 / D382A RYS2 / I299T	MYH7 / D382A RYS2 / I299T
07	RYS2 / A266T	RYS2 / A266T
08	MYBPC3 / V962G	MYBPC3 / V962G
	MYH6 / S158P	MYH6 / S158P
	SDHA / V432G	SDHA / V432G
	KCND3 / S304P	KCND3 / S304P
	HCN4 / T788P	HCN4 / T788P
09	MYBPC3 / D75N	MYBPC3 / D75N
	n.i.m.	FBN1 / T524M
10	MYBPC3 / Q827fs	MYBPC3 / Q827fs
	n.i.m.	PSG2 / D787G
11	SCNE5 / R800C	SCNE5 / R800C
	PKP2 / R497*	n.i.m.
12	MYH7 / R453C	MYH7 / R453C
	PRKAG2 V35G	n.i.m.
	n.i.m.	PKP2 / A546T
13	MYBPC3 / V727M	MYBPC3 / V727M
	MYH7 / R143Q	MYH7 / R143Q

n.i.m: não identificada mutação

4.3 Correlação Genótipo-fenótipo

Na tentativa de realizar uma comparação genótipo-fenótipo, testamos a influência das mutações, separadamente e em conjunto, nas variáveis clínicas.

Associação entre fenótipos clínicos e mutações específicas

Como esperado para nossa casuística composta por um número limitado de indivíduos e um painel amplo de genes, nenhuma variante influenciou de modo significativo os fenótipos quando considerada isoladamente.

Associação entre fenótipos clínicos e mutações nos genes MYH7, MYBCP3 e TNNT2

Entre os 66 pacientes avaliados, 28 (42.4%) apresentaram mutações nestes três genes. Destes, 25 (89%) apresentaram apenas um alelo mutante, enquanto três (11%) pacientes tiveram dois alelos mutantes. Após ajuste para gênero e idade, o número total de alelos mutantes foi um preditor independente da chance de uso de CDI (RC = 3.08, IC de 95% = 1.19 até 7.97).

Do mesmo modo a carga de alelos mutantes estava associada a um número maior de fatores de risco acumulados para morte súbita (IC 95% = 0,06 até 1,04 unidades).

Em relação às outras variáveis não foi encontrada correlação estatisticamente significativa.

4 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Perfil clínico e ecocardiográfico

Em relação ao padrão morfológico o grupo de pacientes avaliado apresentou, como esperado, predomínio absoluto de hipertrofia septal, com 83% dos pacientes apresentando essa morfologia associada ou não a outra parede do ventrículo. A forma septal assimétrica prevaleceu em 70% do grupo estudado. Analisando dados da literatura observou-se a incidência média de 80-90% na forma septal, 5-10% na concêntrica, 3-8% na apical, 1-2% na médio-ventricular e lateral (Wigle, 1985), porém estes dados podem apresentar variações a depender da população estudada. Um estudo de coorte realizado no Rio de Janeiro e conduzido pelo Dr. Albanesi demonstrou uma casuística de 78,6% de pacientes com a forma septal, 2,3% médio-ventricular, 1,7% lateral, 10,9% apical e 6,3% com a forma concêntrica, portanto a maior divergência em relação à casuística foi pelo achado mais frequente de hipertrofia concêntrica nos pacientes aqui estudados (15,2%). Vale ressaltar que neste estudo não incluímos hipertrofia concêntrica com menos de 15 mm de espessura de parede ventricular, sendo a média septal destes pacientes de 18,3 mm e de parede posterior de 17,3 mm; este critério foi estabelecido para não existir dúvida diagnóstica principalmente em relação à cardiopatia hipertensiva.

Em outro estudo nacional foi observada a presença de formas obstrutivas em 53% dos pacientes (Arteaga, 2005) e em nosso trabalho

esse número foi um pouco inferior 41%, porém outros autores citam a forma obstrutiva presente em aproximadamente 30% dos pacientes (Spirito, 2000).

5.2 Perfil genético

A grande maioria das mutações encontradas em todos os genes foram do tipo missense, assim como todas as mutações encontradas no gene MYH7, como esperado. No gene MYBPC3 identificamos duas mutações do tipo sem sentido (nonsense), e foi o único gene estudado que apresentou mutação que gerou proteína truncada, porém não com a frequência esperada de 2/3 das variantes segundo a literatura; as mutações do tipo missense apresentaram uma discreta predominância nesse gene na nossa casuística (Bashyam et al., 2003; Taylor et al., 2004).

Encontrou-se uma mutação sem sentido também no gene TNNT2, e o gene que apresentou maior frequência desse tipo de variante no grupo avaliado foi o PKP2.

Em nosso estudo foram encontradas mutações em genes já associados na literatura com cardiomiopatia hipertrófica em 37 pacientes (56%). Como citado anteriormente, na literatura descreve-se que aproximadamente 60% dos pacientes com história familiar submetidos a testes genéticos apresentam mutações que podem estar relacionadas à CMH e nos casos esporádicos apenas 30-40% dos casos são associados a alguma mutação patogênica (Ho, 2012), o que confirma o encontrado no presente estudo, composto por casos familiares e esporádicos. Porém a

maioria dessas mutações são encontradas nos três principais genes e em alguns trabalhos o percentual de identificação de mutação nestes genes pode chegar a 60%. Na casuística do presente estudo encontrou-se nestes genes mutações consideradas patogênicas em 42,4% dos pacientes estudados, abaixo do valor máximo esperado. Este achado pode ser justificado levando-se em consideração que muito provavelmente os estudos mais antigos consideravam algumas mutações como patogênicas e atualmente as mesmas podem ser tratadas como não deletérias, variantes estas que não seriam consideradas patogênicas neste estudo. Vale ressaltar que o primeiro trabalho brasileiro a caracterizar a epidemiologia molecular da CMH para estes três genes mais importantes, tese defendida pela Dra. Julia Marsiglia em 2013, encontrou mutação em 47% dos casos, mais compatível portanto com o descrito neste presente estudo.

Em relação à identificação de mutações semelhantes encontrou-se uma frequência muito baixa de mutações que se repetem em pacientes não aparentados. Segundo Carolyn Ho a maioria das mutações associadas com CMH são quase exclusivas em uma ou poucas famílias, porém alguns “hot spots” mutacionais (locais em que as mutações ocorrem com maior frequência) vem sendo reconhecidos recorrentemente em um grande número de famílias não relacionadas (Carolyn CY HO et al, 2015). Neste estudo encontrou-se uma dessas mutações recorrentes citadas pela autora, no gene MYH7 (Arg453Cys ou R453C), em dois pacientes jovens, não aparentados, com diagnóstico de CMH concêntrica, porém assimétrica com predominância septal, espessura de septo de 16 e 20 mm, ambos com

evolução clínica grave e alto risco para MS (em uso de CDI), um deles remanescente de morte súbita e o outro com passado de miectomia e ambos com história familiar de CMH além de vários parentes com MS de causa indeterminada, o que nos leva a acreditar que a mutação tenha um comportamento agressivo. Esses achados confirmam as principais características das mutações no gene MYH7, geralmente associadas a pacientes mais jovens e com alta incidência de morte súbita, fugindo a regra apenas o fato de um dos pacientes não apresentar hipertrofia severa.

Foi encontrada outra mutação também citada como recorrente, desta vez no gene TNNT2 (Arg92Trp R92W), em uma paciente de 44 anos, com CMH assimétrica e obstrutiva com um septo de 17 mm, com quatro fatores de risco maiores para morte súbita (já em uso de CDI) incluindo história familiar de MS, e relato de parentes com diagnóstico de CMH. A clínica deste paciente também confirma o que se espera, segundo a literatura, de mutações no gene TNNT2: pacientes com alto risco de morte súbita. Esta mutação exemplifica a dificuldade de se estabelecer características clínicas e prognósticas levando em consideração apenas a mutação individualmente. Diversos estudos ao longo dos últimos anos a descreveram associada com características clínicas e ecocardiográficas divergentes; os dois primeiros estudos (Moolman 1997; 1999) relacionaram essa variante com hipertrofia ventricular discreta, porém alto risco de morte súbita. Em contraposição a esta primeira relação fenotípica, Ackerman e cols (2002) descreveram a mesma alteração em um paciente com hipertrofia severa e sua mãe, apesar de ter a mesma mutação, apresentava hipertrofia discreta. Estes mesmos

aspectos foram discutidos em um trabalho nacional (Marsiglia, 2010), em um paciente com hipertrofia moderada e síncope, apresentação mais concordante com as características clínicas do paciente que apresentou esta mutação como causadora de doença no presente estudo.

5.3 Correlação genótipo-fenótipo

Este estudo foi de alta complexidade pois foi avaliado um painel muito amplo de genes, o que leva a uma quantidade significativa de variantes, relacionadas ou não com a doença, e que mesmo não sendo as principais responsáveis como causadoras podem ter influência na apresentação fenotípica da doença. Isso torna a relação genótipo-fenótipo ainda mais difícil.

No presente estudo não foi encontrada relação entre as mutações isoladamente com qualquer apresentação fenotípica ou relação com história familiar de CMH ou de morte súbita. Apenas com a associação do grupo de pacientes portadores das três mutações sarcoméricas mais importantes, a análise sugere em aumento de três vezes de chance de uso de CDI, possivelmente devido ao fato dos pacientes serem parte do grupo de maior risco, o que se confirma com o achado, no mesmo grupo de pacientes, de maior número de fatores de risco acumulado.

Analizando todas as mutações identificadas neste estudo, principalmente as sarcoméricas, e comparando com os diversos estudos anteriores, apesar de nossa casuística limitada, conclui-se com segurança

que atualmente ainda existe muita dificuldade em se estabelecer características fenotípicas baseados em mutações específicas e ainda não é possível fazer uma correlação genótipo fenótipo com convicção. Além da já conhecida possível contribuição dos genes modificadores, epigenética, entre outros fatores, na apresentação do fenótipo da CMH, a interação de outras mutações e polimorfismos associados à mutação principal pode ter impacto na expressão e no prognóstico da doença. Considerando todos esses dados, acredita-se que a associação, tão questionada e aguardada na prática clínica de cardiologia, das características clínicas com o genótipo, se um dia for definitivamente solucionada, certamente ainda serão necessários alguns anos.

Os maiores fatores limitantes para essa correlação são: a variabilidade de expressão fenotípica entre indivíduos com a mesma mutação considerada causadora; o pequeno número de pacientes com a mesma mutação; a influência provável dos genes modificadores; fenocópias; epigenética e a baixa frequência das mutações encontradas.

Estes fatores supracitados, mesmo não sendo considerados causadores diretos da CMH, são os principais modificadores da expressão fenotípica da doença, fazendo com que indivíduos com mutações idênticas apresentem fenótipos diferentes.

5.4 Comparação do Sequenciamento Miseq/Brasil e Solid/Espanha

Das 19 mutações identificadas no sequenciamento no laboratório LIMC/IDPC apenas duas não foram confirmadas no laboratório CeGen/Espanha, além disso no CeGen foram identificadas três mutações que não havia sido encontrada no sequenciamento realizado no IDPC.

A não confirmação de algumas mutações patogênicas nos dois laboratórios pode ter ocorrido pelo uso de ferramentas de análise diferentes, realizado por outra equipe. A maioria das mutações não descritas encontradas no IDPC foi confirmada no laboratório Cegen, na Espanha, além de todas as mutações que já haviam sido publicadas, o que nos sugere uma provável baixa taxa de resultados falso-positivos. Porém a nossa casuística foi muito limitada não sendo possível confirmar estes dados estatisticamente.

5.5 Mutações em genes relacionados com outras doenças

Mutações no gene GLA são reconhecidamente relacionadas à doença de Fabry. Estas mutações levam a deficiência na produção da enzima Alfa-Galactosidase A (α -Gal A) levando a um acúmulo sistêmico nos lisossomos dos glicosfingolípídios principalmente de Globotriaosilceramida (ceramida tri-hexosídeo), resultando em alterações renais, cardíacas e cerebrovasculares. No coração leva a hipertrofia ventricular esquerda, tipicamente concêntrica e simétrica.

No presente estudo encontramos duas mutações patogênicas diferentes no gene GLA, em quatro pacientes. A mutação R356W, com diversas publicações na literatura relacionando-a como causadora de doença de Fabry (Bernstein, 1989; Ishii (2007); Pasqualim, 2014; Pereira, 2014), foi identificada em um único paciente da nossa casuística, portador de diagnóstico de cardiomiopatia hipertrófica grave, do tipo septal assimétrica obstrutiva, ressonância magnética com realce tardio e septo de 34 mm, em uso de CDI por síncope. Um fenótipo absolutamente divergente do que encontramos na doença de Fabry. Vale ressaltar que neste paciente foi identificada também uma nova mutação patogênica V56M, no gene também não sarcomérico DSG2, sem ter até o momento descrição associada à CMH, mas que não é possível neste momento descartar essa possibilidade.

A outra mutação encontrada no gene GLA foi a R118C. Esta mutação foi descrita em 2014 por um grupo de Coimbra/Portugal (Caetano, 2014),

em um relato de caso no qual um paciente foi diagnosticado ao ecocardiograma com a forma apical de CMH. Foi então conduzida uma avaliação genética no paciente não sendo identificado nenhum gene do sarcômero e sim a mutação R118C no gene GLA, levando os autores a levantar a possibilidade de doença de Fabry. Após investigação, foi documentada redução da atividade da enzima Alfa-galactosidase, e com esse desfecho o grupo concluiu que a doença de Fabry pode apresentar-se com padrões de hipertrofia atípica (não concêntrica/simétrica) e que a mutação R118C do gene GLA é de fato causadora da doença de Fabry.

Na nossa casuística identificamos esta mesma mutação em três pacientes, com apresentação fenotípica variada. Um dos casos com hipertrofia apical, assim como descrito pelo grupo de Portugal, apresentando associada uma mutação no gene sarcomérico MYBPC3 S217G a qual tem descrições divergentes na literatura em relação à associação definitiva com CMH (Lakdawala,2012; Waldmüller, 2011). Esta paciente tem diagnóstico de CMH apical grave, com história de morte súbita recuperada e em uso de CDI por síncope e TVNS no Holter. Em outro paciente com a mesma mutação, a hipertrofia tem apresentação típica de CMH, expressada na forma septal assimétrica (septo 22 mm e parede posterior 11 mm), e o paciente também estava em uso de CDI por síncope e TVNS no Holter. Neste paciente foram identificadas múltiplas mutações em outros genes; uma mutação sem sentido (nonsense) no gene MYBPC3 W792*, além das mutações DSG2-N493S, CASQ2-R253H e a ANK2-R1549W, porém

nenhuma delas ainda descrita na literatura associada a qualquer enfermidade.

Outro paciente, jovem de 18 anos, também apresentava a mutação R118C, e não teve outras mutações patogênicas identificadas. Apesar da confirmação de mutação genética relacionada à doença de Fabry, a apresentação fenotípica deste paciente também é mais típica de CMH, com hipertrofia septal assimétrica obstrutiva (septo de 28 mm), história familiar de CMH e de morte súbita.

Estes casos específicos, apesar da apresentação morfológica da hipertrofia miocárdica típica de CMH, serão reavaliados e submetidos à pesquisa de atividade da enzima α -galactosidase A, além de avaliação de parentes de 1º grau, porém nossa análise preliminar nos leva a questionar a associação de alguns genes ou de algumas mutações específicas a uma única doença.

5.6 Grupos Específicos: Casos de familiares

Selecionou-se, nos grupos de familiares de 1º grau, as mutações com maior chance de serem causadoras de doença após análise de predição de patogenicidade e chegou-se aos seguintes resultados (Figuras 13, 13.1 e 13.2)

FAMÍLIA 01

FAMÍLIA 02

Figura 13 - Heredogramas representando as Famílias 01 e 02

Na família 01 encontrou-se: no pai portador de CMH as mutações K615N no gene MYH7, D1179G no gene MYH6; no filho portador de CMH a mesma mutação K615N no MYH7 e A149V no MYBPC3, patogênica não

descrita. No filho sem fenótipo de CMH não encontramos mutações semelhantes apenas a N1109S no gene DMD, considerada benigna nos critérios de seleção utilizados.

Analisando os critérios estabelecidos de patogenicidade, concluímos que a mutação causadora da doença na família é a K615N do gene MYH7, presente em ambos os pacientes e que já havia sido relacionada à CMH por Nishi e cols em um estudo de 1992 (Nishi, 1992). Vale ressaltar que o estudo realizado por Nishi teve como casuística 96 pacientes japoneses, mesma origem desta família estudada, o que pode sugerir uma relação da mutação com a etnia dos pacientes.

Ambos os pacientes portadores apresentaram mutações em outros genes do sarcômero. Uma mutação no gene MYBPC3-S236G estava presente no pai, apesar de já ter sido citada em alguns estudos como associada à CMH (Andreasen, 2013), foi excluída como patogênica em todos os programas de bioinformática utilizados e foi publicada recentemente no *JAMA*, em uma pesquisa de 2014 realizada por Frederick Dewey, com evidências de tratar-se de uma mutação benigna (Dewey, 2014). Encontrou-se também no pai, a mutação D1179G, no MYH6, gene sarcomérico que já possui quatro publicações no site HGMD relacionando-o com CMH, e que apesar desta mutação específica não estar entre as publicadas, foi considerada deletéria pelos critérios que utilizamos. Apesar destas informações, a mutação MYH6 foi excluída como causadora por não ter sido encontrada no filho portador, porém não se pode afirmar que a mesma não tenha um papel individual na expressão da doença.

No segundo filho, sem hipertrofia ao ecocardiograma, não foi encontrada nenhuma das mutações citadas e nenhuma outra mutação que pudesse ser considerada patogênica nos critérios estabelecidos, portanto pode-se considera-lo como não portador da doença, fenótipo e genótipo negativo. Posteriormente pretende-se fazer um estudo mais amplo nos outros familiares com e sem doença estabelecida.

A família 02 foi composta pelo pai, ex-atleta competitivo, afastado das atividades físicas por diagnóstico de CMH após os 40 anos de idade, e o filho atleta maratonista em atividade até o momento do estudo, com alterações eletrocardiográficas e sobrecarga de ventrículo esquerdo, porém com hipertrofia borderline e simétrica no ecocardiograma, o que pode sugerir “coração de atleta”. Neste caso, não se encontrou mutações patogênicas no pai portador de CMH, e no filho foi encontrada uma mutação no gene DSP, com interpretações conflitantes nos sites de referência e que foi considerada não patogênica, pois além de não preencher os critérios de patogenicidade estabelecidos neste estudo, não estava presente no pai portador da doença. Portanto, não se pode confirmar nesta avaliação, que o filho não seja portador de genótipo positivo por não ter sido identificado ainda uma mutação patogênica no pai. Não obstante, mesmo se após o descondicionamento físico o filho fosse comprovadamente fenótipo negativo, ainda não poderíamos afirmar a ausência de mutação, antes de identifica-la no parente portador, já que não é possível prever a ocorrência de uma mutação com penetrância idade dependente. Neste caso, sugere-se um estudo do exoma completo de ambos para avaliar mutações de outros

genes que possam estar associados com CMH e se não esclarecer após esse exame mais amplo, realizar estudo do genoma completo para avaliar as regiões intrônicas.

FAMÍLIA 03

FAMÍLIA 04

Figura 13.1 - Heredogramas representando as Famílias 03 e 04

No caso da família 03, encontrou-se como mais provavelmente relacionada à CMH a mutação patogênica Q153H no gene *SNTA1*. O gene *SNTA1* codifica a proteína sintrofina alfa-1, a isoforma das sintrofinas mais comum encontrada em tecidos cardíacos, e é uma proteína de membrana periférica associada como componente do complexo de proteínas da distrofina. A sintrofina associa os canais de sódio cardíacos com o óxido

nítrico sintase-PMCA 4b (membrana plasmática Ca-ATPase subtipo 4b) em cardiomiócitos. Este gene é um locus já comprovado de susceptibilidade para a síndrome do QT longo, à morte súbita cardíaca por arritmia e a síndrome da morte súbita infantil, e por esta associação com doenças cardíacas e morte súbita, foi escolhido para o painel de genes deste nosso estudo. Vale ressaltar que a mutação citada foi considerada como deletéria em todos os programas de predição de patogenicidade utilizados, portanto pode-se sugerir ser uma nova mutação causadora de CMH, em um gene ainda não relacionado com a doença na literatura. Para esta confirmação definitiva são necessários mais estudos específicos de associação. A mutação citada foi encontrada na mãe portadora e também no filho que apresenta apenas os sintomas clínicos sem evidência de hipertrofia na ecocardiografia, mas apesar disso não se pode deixar de observar que a doença da mãe foi diagnosticada em idade maior que a do filho. Caso a mutação seja definida como responsável pela CMH o filho deverá ser considerado como fenótipo negativo e genótipo positivo.

A família 04 incluiu dois pacientes portadores de CMH, pai e filha, ambos com expressão clínica e fenotípica grave da doença, o pai com hipertrofia septal assimétrica, com quatro fatores de risco maiores para CMH incluindo septo > 30 mm e síncope e em uso de CDI; a filha com hipertrofia septal assimétrica obstrutiva e septo de 26 mm e também história de síncope. Em ambos os pacientes identificou-se a mutação I236T presente no gene MYH7 e publicada pela primeira vez por Tesson, em 1998, e já nesta época associada como causadora de cardiomiopatia hipertrófica

familiar. Identificou-se também, nestes dois familiares, outra mutação desta vez no gene MYH6, a R1691H, considerada como de alto impacto de patogenicidade nos programas de predição. Apesar de ter-se encontrado a mutação já descrita como causadora no gene MYH7 e dessa última no gene MYH6 nunca ter sido descrita, a princípio não se pode afirmar que a mesma não apresente alguma influência na apresentação fenotípica e evolução da doença.

FAMÍLIA 05

Figura 13.2 - Heredograma representando a Família 05

Para a avaliação da família 05 foram selecionadas quatro irmãs, sendo que uma delas não apresentava alterações ecocardiográficas compatíveis com CMH apesar de referir sintomas sugestivos e história de síncope não esclarecida. Identificou-se uma mutação no gene MYH7, a V320M, já descrita em um estudo específico de triagem do gene da cadeia

pesada da beta-miosina (Havndrup, 2003), e apontada como causadora de cardiomiopatia hipertrófica familiar. Esta mutação foi caracterizada nas três irmãs com fenótipo positivo e ausente na irmã sem hipertrofia ventricular. Sendo assim, pode-se afirmar com mais segurança, não só do ponto de vista clínico como também por critérios genéticos, que a paciente que não tem a mutação identificada nas irmãs genótipo e fenótipo positivos, não é portadora de cardiomiopatia hipertrófica.

Nesta avaliação minuciosa de familiares dos pacientes que haviam sido selecionados inicialmente para este estudo, pode-se perceber a grande complexidade da investigação dos genes associados à CMH, e o enorme senso de responsabilidade que um pesquisador desta área deve ter ao publicar a afirmação de que uma mutação é causadora de doença. Diversas publicações atuais contradizem ou questionam mutações relacionadas anteriormente como responsáveis pela CMH e com a evolução dos métodos de sequenciamento genômico e dos programas de bioinformática preditores de patogenicidade estes questionamentos tendem a aumentar cada vez mais.

Em 2013, Andreassen e cols conduziram uma pesquisa populacional de dados publicados *online*, questionando a patogenicidade de variantes previamente associadas à cardiomiopatias. A fim de identificar possíveis variantes falso-positivas, os autores investigaram em dados recentemente publicados, a prevalência de variantes associadas à cardiomiopatia. Foram procuradas mutações do tipo missense e nonssense (sem sentido) descritas no servidor *NHLBI GO Exome Sequencing Project* (ESP-

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) o qual contém dados de análise de éxons de 6.500 indivíduos. Em conclusão, foi identificada prevalência de genótipo muito maior do que o esperado, considerando a prevalência do fenótipo na população em geral (1:500), sugerindo-se que um número elevado destas variantes não são causas monogênicas de cardiomiopatia.

Encontrou-se neste estudo em alguns familiares, assim como em pacientes não aparentados, mutações patogênicas que podem estar relacionadas com a doença, em genes diferentes no mesmo indivíduo, o que sugere que mais de um gene pode estar diretamente relacionado à CMH ou que alguns genes tenham um efeito modificador na expressão da doença. Ainda serão necessários muitos outros estudos com as tecnologias de sequenciamento de nova geração, e algoritmos adequados na área de bioinformática e dos softwares e servidores atuais de predição de patogenicidade, para se validar e associar corretamente as variantes encontradas até o momento.

Apesar de toda a dificuldade e controvérsias ainda não elucidadas nas análises genéticas, atualmente tem-se como sugerir fluxogramas de aconselhamento e acompanhamento de familiares de pacientes portadores de CMH, e em alguns casos, afirmar com mais segurança se o paciente deverá ou não ser acompanhado como possível candidato a desenvolver a doença ou tranquiliza-lo em relação a não ser portador, e principalmente em relação a insegurança de alguns pais, frequentemente observada na prática clínica, em relação ao prognóstico de seus filhos.

Fluxograma - Acompanhamento e aconselhamento de familiares de 1º.

Os estudos genéticos contribuíram fortemente na caracterização da CMH demonstrando que o prognóstico da doença não está relacionado exclusivamente ao fenótipo, podendo ter relação direta dependente do gene envolvido, do tipo e local da mutação, da associação de múltiplos genes mutados, além da já citada epigenética e características individuais da população.

A população brasileira devido a sua grande heterogeneidade pode apresentar evolução clínica e prognóstico diferentes daqueles observados em outros países, por exemplo, uma mutação pode apresentar alto índice de mortalidade em um determinado país e na população brasileira essa mesma mutação apresenta uma taxa de mortalidade quase nula.

Através do diagnóstico molecular, com a identificação das mutações responsáveis pela CMH, poder-se-á fornecer mais informações relativas ao curso evolutivo e prognóstico da doença, e por ser um diagnóstico possível de ser realizado em qualquer fase da doença, independente da sintomatologia e do fenótipo, poderemos introduzir precocemente medidas terapêuticas efetivas para prevenir progressão da doença e morte súbita.

São necessários novos estudos para identificação de mutações descritas ou novas variantes na população brasileira que possam estar associadas como responsáveis pela CMH, para que cada vez mais seja reforçada a sensibilidade do diagnóstico laboratorial baseado na sequência genômica.

5.7 Vantagens do Sequenciamento de Éxons

O método de Sequenciamento de éxons aliado à tecnologia de Sequenciamento NGS, é visto atualmente por muitos pesquisadores como o melhor e mais inovador método de sequenciamento.

No nosso estudo, a premissa para a escolha deste tipo de sequenciamento é o fato de que 85% das variantes causais, previamente identificadas, localizam-se nos exons (segmento do gene que codifica proteína) ou nas sequências curtas onde ocorrem a junção de exons e introns (*splice junctions*), sendo que os mesmos constituem apenas aproximadamente 1 a 3% do genoma humano. Sendo assim, esse tipo de estudo se concentra na parte do genoma mais factível de ser analisada - os exons dos genes, muito menos extensos que os introns (região que não codifica proteínas diretamente), e que são ideais para a compreensão da variação alélica de alta penetrância e sua relação com o fenótipo.

As maiores vantagens desta técnica de sequenciamento em relação a outros tipos de sequenciamento de alto rendimento, como por exemplo, o estudo do genoma total, é o fato deste método reduzir a complexidade, os custos e o tempo até a conclusão das análises. O exoma equivale a 1/6 do custo e 1/15 dos dados armazenados em relação ao método de sequenciamento do genoma total, tornando o sequenciamento de genoma individual mais acessível para pesquisa e para aplicação clínica.

Usando a técnica de *Target Sequencing* obteve-se neste estudo a análise do exoma apenas dos genes mais prováveis de terem alguma

relação com a doença específica e isso diminui consideravelmente o tempo e o custo para obter os resultados.

5.8 Limitações do estudo

A maior limitação deste trabalho é o pequeno número de amostras sequenciadas, justificável pela opção de um maior painel de genes candidatos para busca de uma maior quantidade de variantes que possam ser relacionados a CMH, porém que inviabiliza uma relação precisa das mutações com o quadro clínico – relação esta já dificultada pelas características próprias da doença.

Outra limitação é o achado de muitas variantes sem significado clínico conhecido, as quais ainda não se tem dados suficientes na literatura para uma interpretação detalhada e relação precisa com a doença estudada.

A grande quantidade de dados gerados pela metodologia escolhida, assim como por todas as atuais que utilizam sequenciamento de alto rendimento, exige uma equipe multiespecializada e atualização constante nos bancos de dados e dos programas de bioinformática.

Apesar da escolha pelo sequenciamento de uma menor área do genoma com comprovada maior frequência de mutações ser mais prática e viável, estudando apenas os éxons e a região de junção exon/intron, as alterações que estiverem fora dessa área não serão capturadas pelo sequenciamento. Além disso, alguns tipos de alterações genéticas não são avaliadas pelo sistema escolhido.

Apesar de todos esses desafios o método de sequenciamento direto de genes candidatos se mostrou eficaz em identificar uma grande quantidade de mutações sabidamente patogênicas e outras variantes não sinônimas com potencial de serem novas mutações patogênicas.

6 CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

1. A análise de éxons de genes candidatos, utilizando plataformas de sequenciamento de NGS, demonstrou ser uma técnica promissora para o diagnóstico genético de CMH pela possibilidade de identificação de uma grande quantidade de variantes em um curto espaço de tempo.
2. A quantidade de dados gerados é um fator limitante, principalmente em doenças geneticamente complexas com envolvimento de diversos genes tornando essencial uma equipe multidisciplinar (médicos, geneticistas e bioinformata).
3. Mesmo apresentando vantagens técnicas o método ainda não foi capaz de estabelecer uma perfeita correlação genótipo-fenótipo.
4. Embora os desafios permaneçam, nossos resultados sugerem que o estudo do exoma de genes por *NGS* pode fornecer informação útil e clinicamente relevante para pacientes individualmente e para o aconselhamento familiar.

5. A análise criteriosa de todos os dados indica que muito provavelmente nem todos os pacientes irão apresentar uma única mutação e/ou um único gene envolvido na expressão fenotípica da doença.
6. O efeito causador de doença das diversas variantes encontradas ainda é bastante duvidoso
7. Este foi o primeiro estudo realizado em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica na população brasileira, utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração.

8. ANEXOS

Anexo A. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação dos éxons das variantes genéticas identificadas no MiSeq (Illumina).

Gene	Transcrito	Éxo	Troca	Iniciador senso	Iniciador antisenso	Tamanho	Temp. de hibridização (°C)	Paciente
ACTC1	ENST00000290378	5	707C>T	ACAGTGTGGGTCTGCTTTCC	CCCTTTAATGAGCCATCAGG	393	60	HCM 65
ACTN2	ENST00000366578	12	1384G>T	AGAATGTGGCTGGCATGAG	TCTCTCCCCTCTCTGTGGAA	283	60	HCM73
AKAP9	ENST00000356239	20	5158G>A	CAATTTTGTGCACAGAGGTTTC	CACAGAAATTGGAAAAGGAGGA	696	60	HCM72
	ENST00000356239	25	6145A>T	TCTCAGCCTTTCATGAACGTAA	CAGTGGTGGCCCATATCTC	688	62	HCM42
	ENST00000356239	31	7175T>G	TCTCTTTGAGGTACTGCCCTAA	CCTTTGCACTAACAGTGCTCTC	680	60	HCM65
	ENST00000356239	8	7882C>A	GGGCAGGACCAACATTTACT	TCAGTTTCGAAGTGGCTGTC	457	60	HCM51
ANK2	ENST00000357077	45	11728T>C	CACCGTGGTAAAGAAGGTATTG	TGAAAGGGAGAAGTGAGGAAA	400	60	HCM11
CACNA1C	ENST00000399655	10	1414G>A	CAGCCTCTCTTTCTGCCAAC	GCCCACTGTGATTTCCAGAT	295	59	HCM28
	ENST00000399655	46	5860A>C	ATACCAGGCAGGTGGAGCTA	CCTGAGAGGGAGGGTCTTTC	595	60	HCM60
CACNA2D1	ENST00000356860	27	2142C>T	CTCCATGTTCAAAATGCACCT	AAGAATGGCTTCCTTAAGCAGT	378	62	HCM70
CACNB2	ENST00000377315	1	18C>G	GCGCAGGGAAGAGAATGTT	CCAAATCAAACCACCCTCTC	500	60	MSC61
CALR3	ENST00000269881	2	163A>G	AGCGAACCTCGAATCCT	TAAAAGCGTTTTGGCTGTGC	289	XXX	HCM37
DMD	ENST00000357033	8	821A>G	TGGAGGACATTCATGGACAA	CAATGAAGCAAAATTGAAAAGG	491	59	HCM09
DSG2	ENST00000261590	12	1478A>G	CTCCACTCCAAATTGGCAAG	GTAGGTTCCAGGACCTCATTTCA	459	XXX	HCM21
	ENST00000261590	15	2499C>A	AAAGCGGCCTCTTACACTGA	ACTGGGAAGCTACTGCCAGA	335	60	HCM60
DSP	ENST00000379802	24	7552G>A	CCTCAGGAAGCGTAGAGTGG	AAACATCATCGCTGACACCA	365	60	HCM24
	ENST00000379802	1	12C>G	CAACACCAACACCCAGCTC	GAGTCTCCCAGTCGTCCAGA	526	60	HCM42 HCM73
	ENST00000379802	24	6247C>T	TGGTAGAGGCCAAGAGAAAGA	AAGCAATCTGGGCTTCCA	300	60	HCM10
EYA4	ENST00000367895	6	347C>T	CATGCCCATGGTAGCTAGAAA	GAGCTTGGATGCTTATGTTGC	281	58	HCM28

FKTN	ENST00000223528	6	711C>G	GCACGCATTAGGTATTTGTCC	CCTTCATCTTACCACCCTCAA	297	60	HCM60
HCN4	ENST00000261917	8	2386A>C 2390A>C	GAGGGCAGGGCTCCTTTAT	GGAGGATGAAGACGGTGTGT	516	62	HCM60
JPH2	ENST00000372980	4	1997T>G	GCTTTACCAGGGCTACCACA	AGGCTATGCTCCCTAATCC	495	60	HCM33
KCND3	ENST00000315987	2	910T>C 908A>C	GCGTGCGTCATGATCTTC	GGTGACACCATCCAAGGTT	494	60	HCM33
KCNE2	ENST00000290310	2	209G>A	TCCCTCCACCTTTACATAGC	TCAACAGAGAGCAAGGAACTCA	584	64	HCM19
KCNQ1	ENST00000155840	1	296C>G	AGCGGGATAGATGACACGAG	CTTCCTTCCCTCCTCTGCTC	933	XXX	HCM65
LMNA	ENST00000448611	13	1699A>C	CTACACCTGGCTGAGGTTCC	GTACACACAGCGACGTCCAC	479	60	HCM38
MYBPC3	ENST00000256993	2	223G>A	ACGTGAGGGGATGCATAGAA	GTGAAAGCACCTCCTGTTCC	473	62	HCM44
	ENST00000256993	22	2373G>A	CTGTGGCGGTTAGTTGGAGT	TCCACCGGTAGCTCTTCTTC	352	60	HCM21
	ENST00000256993	25	2882T>G	CCTATCAGAGGAGTGGGCAGT	CTCCAACCCCTCCTGT	384	60	HCM33
	ENST00000256993	6	772G>A	CCTCCCAAAGTGGGGATTA	GGGTTTCTCTCACACCCTGT	400	60	HCM17
	ENST00000256993	4	446C>T	CTGCGGTCCCAGCTAACTT	TTGTGCCTTCTAGGGCTCTC	557	60	HCM02
MYH6	ENST00000405093	28	3923T>G	AATGGTGGGTGCCCCCTAA	GAGGACTCTTTCCAGCTCCA	300	65	HCM23
	ENST00000405093	26	3612G>C	TTGCCCTAGTTGAGAACCA	GGGAGATGGCAGACAGAGAG	595	60	HCM65
	ENST00000405093	34	5072G>A	GGGTACTGCAGGGACCTCT	GACCCTGGCTAGATGTGCTC	390	60	HCM14 HCM15
MYH7	ENST00000355349	11	958G>A	CCTGTCCTGTGCTCTTCCTC	CCAGCGTCTTAGCTCTGCTT	286	60	HCM59 HCM63 HCM68 HCM69
	ENST00000355349	30	3997C>G	TGATGTTGAGATTGGGGTGA	CTAGCTAAGCATCGCCTGTG	389	60	HCM72
	ENST00000355349	35	4954G>T	CCTCTGCCCTAGGTTACT	GCAGGAAAAGCATTGAGCAT	400	60	HCM67
	ENST00000355349	13	1145A>C	CTGGCCAGCAGTCATCTCTT	AAACTCTCATCCCACCATGC	238	59	HCM27 MSC65
	ENST00000355349	16	1845G>C	GCACCTCCACGAGCAAGTAT	GTGGGGTGTAGCAATTGACC	483	63	HCM02
	ENST00000355349	9	788T>C	GTGAGTGGTCCCTGACCTTG	CACCTAGCCATGCAGAGACA	378	62	HCM14 HCM15

NOS1AP	ENST00000493151	1	37G>A	CTCCTTTTGGCTCCTCCTCT	TAGGTCAGGGGTCCAAGAAA	451	60	HCM62 HCM68 HCM69
PKP2	ENST00000070846	11	2273G>A	AAACATCTTCATCAACCTCTGG	CAGGCCGGTTTATCACCTAC	383	60	HCM16
	ENST00000070846	6	1497G>T 1504C>T	TGCATGAAGCCTAATGTGTTC	CGGTAACCTAGGCTGGAGTG	494	62	HCM 44 HCM47
PRKAG2	ENST00000287878	1	104T>G	TGATTGCCTACGAGGGTTC	CCTGTCCCTCTACCTTTCC	590	60	HCM49
PSEN1	ENST00000324501	10	1101T>A	TGTGGTTTAAGGGCCAGCTA	CAGAGCGAGACTCTGTCTCAA	496	XXX	HCM28
RBM20	ENST00000369519	9	2357A>G	GACAAGAGGGACAGGATGGA	TGTCTTGACAGTGCCTAGC	596	60	HCM28
RYR2	ENST00000366574	31	3896T>C	CGTGATGTGCCTTAGTCATCTT	CTGGACTGTAACCTTCCTCACA	496	60	HCM27 MSC65
SCN5A	ENST00000413689	15	2398C>T	CTGCCACAGCAAGAGTCAAG	GGTACCAAGCAAATGGCTGT	392	60	HCM47
	ENST00000413689	17	3028T>C	GCCTCAGTTTCCCATCATA	GCCTTCTACCCCTACCCACT	659	63	HCM48
SDHA	ENST00000264932	10	1295T>G	AGACACCTGTTGGGGAAG	CTAACGTCCTGCGCCTTCT	300	60	HCM33
	ENST00000264932	3	260C>T	CATGTTTGGCATAGTGGAACA	GGCTGCCAGGTAGAAAGT	290	30	HCM22
SNTA1	ENST00000217381	2	459G>T 494A>G	GGGAAGCCTTCAGAAATAATTG	TTTCAGTCCTGCCACCTC	400	XXX	HCM36 HCM38 HCM60
TNNT2	ENST00000509001	9	274C>T	TGGGTTCAGGCCACAGTTAC	GAAGGCTGTCTGGAGGAGGT	358	60	HCM56
	ENST00000509001	45	785A>G	CTCCTTCTCCTCCTGCACTG	CCAAGGAGGAATGGGATAGC	237	60	HCM37
	ENST00000509001	16	860G>A	CCTCAGGCTGCTGTCTATT	GCTCCTTAGAGCTTGGCAGA	480	60	HCM70
TPM1	ENST00000358278	1	62G>T	TCATATCCACCGTCAACTGG	CGTTTCCCTTCTCTTTCC	568	XXX	HCM33
	ENST00000358278	3	305C>A	CCAGAGTTGATGAGGGCTTG	CCACCAGGGGACTGAAAAAT	392	60	HCM23
	ENST00000589042	46	11008A>T	CAAATTGCAGAAAGCACTGAG	GCCAATGACTTGGCTGACTT	495	60	HCM70
	ENST00000589042	48	13320G>A	GTGCAGGAGGTACAGGGAAG	GTTTTGGCTCCTTGCTGAAT	398	60	HCM76
	ENST00000589042	86	24833G>C	GCTCTGGTGTCTGTCTTAGGTG	GTGAGAAGGCATCCACAACA	496	62	HCM71
	ENST00000589042	93	26935A>C	CCGTCACAAAAGAGCCAAAT	CATCCATGGGATCAGGTTTC	567	59	HCM24

ENST00000589042	94	27124G>A	TGGCTGGTTCTGATGAATGT	GGATCAGGGGTTTTCTTTC	596	59	HCM50
ENST00000589042	99	28529C>A	GCTCGTAGAAGGAGGCTGAA	CCTTCGGAAGCCACATAAT	654	60	HCM76
ENST00000589042	198	38755G>T	CCACAAGAAATTGTGCCAGA	GGGTTATGAAGACCACTGGAA	341	60	MSC63
ENST00000589042	216	40261G>A	TTGCCTTGGATCCTCAAATG	AAACCTAAGAATGAGGCTCACA	488	60	HCM76
ENST00000589042	276	52886A>G	CCAAAACAGCACATGATCCA	TCATGCATTAGCCCATGAAA	499	60	HCM22
ENST00000589042	300	59282A>G	CCACCATCCAAACCAGTCTT	TTGTTCTCTTGCCATGTTGG	593	60	HCM02 HCM05
ENST00000589042	304	61625C>G	CGCATTCTAGCTCGAGTCAAAG	TGGGTTTTCCAAGAAATTG	297	60	HCM50
ENST00000589042	326	70168A>C	GGAGATGGCTCCTGATTTTG	GGCGTGTCCAAGACTCTGA	294	60	HCM28
ENST00000589042	326	70982C>T	GTGCCCTAGAGAAAGCAGA	TCCTTGCTGTTAATGGATAGGG	288	60	MSC21
ENST00000589042	326	77609T>C	GACGTCCTAAGCCAACCATT	TGGCAGCCCCCTGTATATAAT	298	60	HCM73
ENST00000589042	326	81137G>A	TACTGGTGGCTGCCAAATAA	ATGCCATTGCACAAGCATCT	286	60	HCM60
ENST00000589042	339	93805G>A	CACTGGAATTACCAATCAGCTT	TCAATGGGGCCGGTTACT	300	60	HCM60
ENST00000589042	339	93254C>T	GCTACATTGATGTGGGATGC	AGACTGCGGAGGATTTGCTA	298	60	HCM02
ENST00000589042	130	32482C>T	CCTCCACGGCTAAAGGTAT	CACAGGCACACTTATTTCTGG	467	62	HCM10
ENST00000589042	334	89500C>A	TGCTCATACCTGCAGCATCT	AGCCACATCCAGGTCAATCT	541	60	HCM13
ENST00000589042	355	99697G>C	GCATAGCCACCAATGAGGTT	TTCGATCACAATTGGTCCTG	484	62	HCM13

ANEXO B

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

DATA DA ENTRADA: 05 de novembro de 2010.

DATA 1ª AVALIAÇÃO: 16 de novembro de 2010.

DATA DA AVALIAÇÃO FINAL: 23 de novembro de 2010.

CAAE: 0092.0.131.000-10

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4008

(este nº. deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Investigadora Principal: Lara Reinel de Castro

Orientador: Prof. Mario Hiroyuki Hirata

Co-orientador: Dr. Marcelo Ferraz Sampaio

Nº de Sujeitos no Centro: 150

Nº de Sujeitos no Brasil: 150

Nº de Sujeitos Total: 150

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde – Medicina

Área Temática Especial: Genética Humana

Unitermos: Cardiomiopatia hipertrófica, polimorfismos

Fase: Não se aplica

Nível: Não se aplica

Duração do Estudo: 2 anos e 6 meses

Patrocinador: Não se aplica

Grupo: II

Projeto de Pesquisa Clínica/ Tese Doutorado: "Aspectos genéticos e correlação clínica em uma população brasileira portadora de cardiomiopatia hipertrófica".

Considerações/Comentários: O estudo tem como objetivo estudar os genes codificadores das proteínas sarcoméricas da cadeia pesada da B-miosina cardíaca, da proteína C de ligação com a miosina cardíaca, utilizando as técnicas de PCR-RFLP, seqüenciamento e de PCR- tempo real.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

- Protocolo de Pesquisa Clínica/ Tese de Doutorado 2010 – Aprovado com Recomendação (incluir na pág 09 dados que serão coletados no questionário, pois serão vistos outros dados além do anatômico e genético; checar a assinatura do Dr. Jorge Assef, pois difere dos outros já apresentados e confirmar número de pacientes, pois no TCLE refere-se a 150 pacientes e no projeto a 200 pacientes.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Serviço de Cardiologia Intervencionista – Aprovado
- Carta de submissão ao CEP – Entregue
- Orçamento Financeiro Detalhado – Entregue
- Declaração de Propriedade das Informações – Entregue
- Declaração de Manuseio de Material Biológico – Entregue

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

- Publicação dos Resultados da Pesquisa – Entregue
- Declaração de Responsabilidade, Direitos e Obrigações – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Dr. Marcelo Ferraz Sampaio – Entregue
- Forma de Recrutamento – Entregue
- Lista de Centros Participantes – Entregue
- Termo de Compromisso do Investigador – Entregue
- Declaração de Riscos e Benefícios – Entregue
- Declaração de Confidencialidade – Entregue
- Declaração sobre currículo na Plataforma Lattes –
<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4255809A3> –
Entregue
- Folha de Rosto – Entregue

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita que:

- a. Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido
- b. Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.
- c. Elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parcial e final sobre a pesquisa.

Situação: Protocolo Avaliado e Aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em Reunião Extraordinária Realizada no Dia 23 de Novembro de 2010.

São Paulo, 23 de novembro de 2010.

Pedro L. Faraky
Pedro Silvio Faraky
Coordenador CEP
CRM 55073

ANEXO C

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Biologia Molecular – Ambulatório de Farmacogenômica

Projeto de Pesquisa: “Avaliação do perfil genético de uma população portadora de cardiomiopatia hipertrófica em comparação com a hipertrofia dos atletas”

Questionário clínico

Nome do paciente: _____ Data da entrevista: ____/____/____

Registro no IDPC: _____ Número do paciente no projeto: _____

Iniciais: _____ Naturalidade: _____ RG: _____

Sexo: masculino () feminino () Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Raça: Branca () Negra () Parda () Asiática () Outro () _____

Endereço Residencial: _____

Telefones: _____ email: _____

Escolaridade:

Ensino fundamental: completo () incompleto ()

Ensino médio: completo () incompleto ()

Ensino superior: completo () incompleto ()

Filhos: _____

Antecedentes Familiares

Cardiomiopatia hipertrófica: Não () Sim () Parente na lista: _____

Hipertensão arterial: Não () Sim ()

Diabetes: Não () Sim ()

Dislipidemia: Não () Sim ()

AVC: Não () Sim ()

DAC: Não () Sim ()

Obesidade: Não () Sim ()

Morte súbita: Não () Sim ()

Se sim: grau de parentesco: _____ Idade: _____

grau de parentesco: _____ Idade: _____

grau de parentesco: _____ Idade: _____

Antecedentes Pessoais

- Remanescente de Morte Súbita: Não () Sim ()

- Transusão sanguínea prévia: Não () Sim ()

- Usa marcapasso: Não () Sim () Data do Implante: ____/____/____ Tipo: _____

- CDI: Não () Sim () Data do Implante: ____/____/____ Motivo: _____

- Arritmia: Não () Sim ()

“Avaliação do perfil genético de uma população portadora de cardiomiopatia hipertrófica em comparação com a hipertrofia dos atletas”

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Biologia Molecular – Ambulatório de Farmacogenômica

- Hipertensão arterial: Não () Sim ()
- Diabetes: Não () Sim ()
- Dislipidemia: Não () Sim ()
- Obesidade: Não () Sim ()
- AVC/AIT: Não () Sim ()
- Infarto prévio: Não () Sim ()
- Cirurgia cardíaca (ponte de safena): Não () Sim ()
- Angioplastia: Não () Sim ()
- Doença arterial periférica: Não () Sim ()
- **Atividade Física:** Não () Sim () Períodicidade: _____ x semana. Tipo: _____
- Distúrbios do Sono: Não () Sim () Qual: _____
- Ansiedade: Não () Sim ()
- Depressão: Não () Sim ()
- Outras doenças: _____

Hábitos e Vícios

- Tabagismo: Não [nunca fumou] () Sim [fuma atual] () Nº cigarros/dia: _____
Ex tabagista () Fumou últimos seis meses: não () sim ()
- Bebida Alcoólica: não () sim () até 10 doses/semana () Mais de 10 doses/semana ()
Tipo de bebida: vinho () destilados () cerveja ()
Ex alcoolista: não () sim ()
- Drogas ilícitas: Não () Usou no passado não () sim ()
Sim () Tipo de droga: _____

Sintomas (antigos ou atuais)

- Dispnéia: Não () Sim ()
Classe Funcional NYHA: I () II () III () IV ()
- Angina: Não () Sim ()
Classe Funcional CCS: 1 () 2 () 3 () 4 ()
- Palpitações taquicárdicas: Não () Sim ()
- Tonturas: Não () Sim ()
- Síncope: Não () Sim () se SIM – Síncope nos últimos 6 meses: Não () Sim ()
- Edema de membros inferiores: Não () Sim ()
- Outras queixas relevantes: _____

Exame Clínico

- Peso: _____
- Ritmo Cardíaco: _____
- Altura: _____
- Sopro: Não () Sim () _____
- Pressão Art.(mmHg): PAS ____ PAD ____
- Sopro carótidas: não () sim () - Ictus _____
- FC: _____
- Pulmões: limpos () estertores ()
- Mucosas: coradas () descorada () cianose ()
- Edema de MMII: Não () Sim ()

"Avaliação do perfil genético de uma população portadora de cardiomiopatia hipertrófica em comparação com a hipertrofia dos atletas"

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Biologia Molecular – Ambulatório de Farmacogenômica

Exames diagnósticos

Ecocardiograma

DATA DO EXAME: __/__/__

Septo _____ mm Parede posterior: _____ mm Relação S/PP: _____
Se HVE, tipo: ☐ Simétrica ☐ Assimétrica ☐ Septal ☐ Médio-ventricular ☐ Apical ☐ Lateral
FE: _____ VE: _____ AO: _____ AE: _____
Movimento sistólico anterior da valva mitral (SAM): não () sim () Gradiente IV: _____
Disfunção de VD: não () sim () HP: não () sim () PSAP: _____ mmHg
Disfunção diastólica: não () sim () Qual: _____
- Valvopatia: não () sim () Qual: _____
- Alteração segmentar: não () sim () Qual: _____

ECG

DATA DO EXAME: __/__/__

- Ritmo: sinusal () FA () marcapasso () outros ()
- Alterações da repolarização ventricular: não () sim ()
- Bloqueios AV: não () sim ()
Se sim, 1º grau () Mobitz I () Mobitz II () BAVT ()

☐ BDAS ☐ SVE ☐ SAD
☐ BRE ☐ SVD ☐ ESV
☐ BRD ☐ SAE ☐ ESSV

Teste ergométrico

DATA DO EXAME: __/__/__

- Resultado: negativo () positivo () Inconclusivo () Não Realizado ()
Se POSITIVO, Motivo: _____
- Queda da PA no esforço: () não () sim - PA em platô: () não () sim
- Outras arritmias: () FA () TPSV

Holter

DATA DO EXAME: __/__/__

- Frequência Cardíaca: máxima _____ mínima _____ média _____
☐ EV ☐ ESSV ☐ TPSV ☐ Pré excitação
☐ TV ☐ TVNS FC: _____

Cineangiografografia

DATA DO EXAME: __/__/__

Lesão não () sim () Qual: _____
VE normal () HVE () hipo discreta () hipo moderada () hipo severa () aneurisma

Ressonância Magnética

DATA DO EXAME: __/__/__

Conclusão: _____

"Avaliação do perfil genético de uma população portadora de cardiomiopatia hipertrófica em comparação com a hipertrofia dos atletas"

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Biologia Molecular – Ambulatório de Farmacogenômica

Medicamentos em Uso

Paciente sabe referir os medicamentos que usa? () sim () não

1. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
2. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
3. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
4. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
5. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
6. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
7. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
8. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
9. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
10. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
11. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
12. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
13. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
14. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____
15. _____ () mg () mcg / Hora da(s) tomada(s) _____

FATORES DE RISCO PARA MORTE SÚBITA:

Morte súbita recuperada:

Síncope:

TVNS no holter (freq. >120 + de 03 bat):

Hist familiar MS precoce:

Resposta anormal PA esforço:

Espessamento de parede ≥ 30 :

Obstrução VSVE:

Fibrilação atrial:

Isquemia mioc:

Ativ física competitiva:

Realce tardio RM:

Aneurisma apical:

Terapia redução de septo:

ANEXO D

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Comite de Ética em Pesquisa - C.E.P. - Protocolo: 4008 Data: 31/05/2011 Ass: _____</div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> </div>
---	---	--

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Aspectos genéticos e correlação clínica em uma população brasileira portadora de Cardiomiopatia Hipertrófica.

CENTRO: INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA - IDPC

INVESTIGADOR: _____

NÚMERO DO PACIENTE: _____

INICIAIS DO PACIENTE: _____

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado que estamos desenvolvendo com a equipe de médicos da Seção de Biologia Molecular do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Não haverá qualquer benefício direto aos pacientes nesta pesquisa.

Os resultados deste estudo contribuirão para o conhecimento dos genes, que são os códigos que produzem substâncias que controlam todas as funções do nosso corpo, e a partir dos resultados encontrados será estabelecido um perfil de risco clínico e genético na doença que leva ao crescimento do músculo cardíaco (cardiomiopatia hipertrófica).

Para que você participe dessa pesquisa precisarei do seu consentimento e serão necessários suas amostras de sangue para exames laboratoriais e para obtenção de DNA (polimorfismo genético) e de RNA (expressão gênica), e o exame de Ecocardiograma transtorácico, os quais serão realizados respectivamente nos setores de Coleta do Laboratório Clínico do IDPC e no setor de Ecocardiografia por um médico da instituição.

Setor de Biologia Molecular - Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 - Ibirapuera - São Paulo - SP - CEP: 04012-909 - Fone: (11) 5085 6040 - E-mail: lararc.md@gmail.com

1

D. Pazzanese

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 - 5º andar - Torre
Ibirapuera - 04012-909 - São Paulo

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

Será necessário que você compareça em jejum de 12 horas, em um dia marcado pelo seu médico, para coleta de seu sangue para os exames laboratoriais e testes genéticos.

Os participantes deste estudo não terão riscos além das intercorrências inerentes à punção venosa periférica (como formação de hematomas/flebitis) que são raras e sem maiores complicações clínicas. O exame de Ecocardiografia não apresentará nenhum risco a sua saúde.

Além de você, outros pacientes também participarão do estudo. Precisaréi ainda que você responda algumas perguntas sobre doenças familiares, assim como seus hábitos, sintomas e uso de medicamentos.

Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais e exames complementares necessários, sem qualquer custo. Caso seja de seu interesse, também disponibilizaremos os resultados da análise genética no final da pesquisa.

Ressaltamos que nenhum paciente receberá qualquer pagamento por sua participação.

Os dados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros, a menos que sua autorização prévia seja obtida. Sua identidade será mantida em segredo em qualquer posterior publicação ou exposição pública dos resultados.

O material genético extraído de seu sangue será armazenado e ficará sob total responsabilidade do Laboratório de Biologia Molecular. Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas, estas só poderão existir após sua autorização e nova aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Sua participação nesse estudo é totalmente voluntária, podendo dessa forma retirar-se a qualquer momento do estudo levando consigo suas amostras, sem penalidades ou qualquer perda dos benefícios relativos ao seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

Por qualquer motivo, independente de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa poderão encerrar sua participação nos estudos, sendo explicados imediatamente a você os motivos para tal acontecimento.

Ao assinar esse termo você não abre mão de nenhum direito legal. Caso você tenha alguma dúvida em relação aos estudos, ou se ocorrer lesão relacionada à investigação, você poderá entrar em contato com o Prof. Mario Hiroyuki Hirata, Dr. Marcelo Ferraz Sampaio ou Dra. Lara Reinel de Castro no Laboratório de Biologia Molecular ou no Ambulatório de Farmacogenômica (no 8º andar) no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia ou nos telefones (11 5085 6086 - 11 3064 6858 - 11 8203 0299) a qualquer hora do dia.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante voluntário deste estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia pelo telefone 5085-6040.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos do estudo a que serei submetido, os possíveis riscos e desconfortos e os benefícios que poderei apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Data

Assinatura do investigador

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Ackerman MJ, Van Driest SL, Ommen SR, Will ML, Nishimura RA, Tajik AJ, et al. Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the betamyosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39 (12): 2042-8.

Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Zipes DP. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*. 2011;8(8):1308–39.

Almeida DR, Diniz RVZ, Carvalho AS, Viegas RFM, Areosa CM, Carvalho AC et al. Incidence of the hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2000; 4: 431-4.

Andreasen C, Nielsen JB, Refsgaard L et al. New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants. *European Journal of Human Genetics*, 2013;21, 918–928.

Arteaga E, Ianni BM, Fernandes F, Mady C. Benign outcome in a longterm follow-up of patients with hypertrophic cardiomyopathy in Brazil. *Am Heart J*. 2005;149:1099-105.

Bashyam MD, Savithri GR, Kumar MS, Narasimhan C, Nallari P. Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC). *J Hum Genet*. 2003;48:55-64.

Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng CM, Sakuraba H, Desnick RJ. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. *J Clin Invest*. 1989; 83: 1390.

Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res*. 1998;83: 580-93.

Bos, J.M., Towbin, J.A. e Ackerman, M.J. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; 54(3): 201-211.

Braunwald, E.; Lawbrew, C.T.; Rockoff, S.D.; Ross, J.Jr.; Morrow, A.C. Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. 1. A description of the disease

based upon an analysis of 64 patients. *Circulation*. 1964;30(Suppl. IV):IC3-IV119.

Braunwald, E. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. W.B. Saunders Company, 8^a ed., 2008.

Brock, R. Functional obstruction of the ventricle (acquired aortic subvalvular stenosis). *Guy's Hosp Rep*. 1957;106:221-238.

Caetano F, Botelho A, Mota P, Silva J, Leitão Marques A. Fabry disease presenting as apical left ventricular hypertrophy in a patient carrying the missense mutation R118C. *Rev Port Cardiol*. 2014;33(3):183.e1-5

CarolynCY Ho , Philippe Charron , Pascale Richard , Francesca Girolami , Karin Y Van Spaendonck-Zwarts , Yigal Pinto. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovascular Research*. 2015. P. 397-408.

Charron, P, Dubourg, O, Desnos, M, et al. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin binding protein C gene. *Circulation*:1998;97:2230.

Christiaans I, van Engelen K, van Langen IM, et al. Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. *Europace*. 2010 Mar;12(3):313-21.

Collins FS, Morgan M, Patrinos A, "The Human Genome Project: lessons from large-scale biology," *Science*, vol. 300, no. 5617, pp. 286–290, 2003].
 Durbin RM et al. The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-1073.

Davies, L.G. Familial heart disease. *BR Heart J*. 1952;14:206-12.

Dewey (2014) Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. 2014 Mar 12;311(10):1035-45.

Dimitrus Georga Kopoulos, VT. Hypertrophic Cardiomyopathy in children, Teenagers and Young Adults. *Hellenic Journal of Cardiology*. 2007;48:228-33.

Elliott PM, Poloniecki J, Dickie S, et al. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(7):2212-8.

Friedwald WT, Levy RL, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultra centrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18:499-502.

Fujino, N, Shimizu, M, Ino, H, et al. A novel mutation Lys273Glu in the cardiac troponin T gene shows high degree of penetrance and transition from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2002;89:29.

Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, van der Ven PFM, Furst DO, Vornwald A, von Hodenberg E, Numberg P, Scheffold T, Dietz R, Osterziel J. Mutations on the Human Muscle LIM Protein Gene in Families With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2003;107:1390-95.

Geisterfer Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell.* 1990;62:999-1006.

Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, et al. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(25):212–60.

Goodwin, J.F.; Hollman, A.; Cleland, W.P.; Teare, D. Obstructive Cardiomyopathy simulating aortic stenosis. *BR Heart J.* 1960;22:403-14.

Hada Y, Sakamoto T, Amano K, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a population of adult Japanese workers as detected by echocardiographic screening. *Am J Cardiol.* 1987;59:183.

Hallopeau, M. Rétrécissement ventriculo-aortique. *Gazette Med Paris.* 1869;24:683-84.

Havndrup O, Bundgaard H, Andersen PS, Allan Larsen L, Vuust J, Kjeldsen K, Christiansen M. Outcome of clinical versus genetic family screening in hypertrophic cardiomyopathy with focus on cardiac beta-myosin gene mutations. *Cardiovasc Res.* 2003;57(2):347-57.

Ho CY. Hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Fail Clin.* 2010a;6(2):141-59.

Ho CY. Genetics and Clinical Destiny: Improving Care in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2010b;122:2430-40.

Ingles J, Semsarian C. Sudden death in the Young: a clinical genetic approach. *Internal Medicine Journal.* 2007; 37:32-7.

Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, Fan JQ. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of

normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J*. 2007;406(2):285-95.

Jarcho JA, Mackenna W et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med*. 1989;321:1371–8.

Karibe, A, Tobacman, LS, Strand, J, et al. Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel alpha-tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin, abnormal myosin cycling, and poor prognosis. *Circulation*. 2001;103:65.

Kofflard MJM, Folkert JTC, Lee C, Dombourg RT. Hypertrophic cardiomyopathy in a large community based population: clinical outcome and identification of risk factors for sudden cardiac death and clinical deterioration. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:987-93.

Lin, D, Bobkova, A, Homsher, E, et al. Altered cardiac troponin T in vitro function in the presence of a mutation implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1996;97:2842.

Liouville, H. Rétrécissement cardiaque sous aortique. *Gazette Med Paris*. 1869;24:161-3.

McVean GA et al. The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65.

Marian, A.J. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. *European Journal of Clinical Investigation*. 2010;40: 1365-2362

Marian AJ. On genetic and phenotypic variability of Hypertrophic cardiomyopathy: Nature versus nature. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:331-4.

Marian AJ. On predictors of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:994-5.

Maron BJ, Anan TJ, Roberts WC. Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the left ventricular wall of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1981;63: 882-94.

Maron, B.J.; Wolfson, J.K; S.E.; Roberts, W.C. Intramural (“small vessel”) coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1986;8:545-57.

Maron BJ, Gardim JM, Fleck JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study.

Coronary Artery Risk Developments in (Young) Adults. *Circulation*. 1995a;92:785-9.

Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 1997;350:127-33.

Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. A systematic review. *JAMA* 2002;287:1308-20.

Maron BJ, Seidman CE, Ackerman MJ, et al. How should hypertrophic cardiomyopathy be classified? What's in a name? Dilemmas in nomenclature characterizing hypertrophic cardiomyopathy and left ventricular hypertrophy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009a;2:81-5.

Maron, B.J., Doerer, J.J., Haas, T.S., Tierney, D.M., and Mueller, F.O. Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the U.S., 1980–2006. *Circulation*. 2009b; 119: 1085–1092.

Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, et al. American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1687-713.

Maron BJ, Yeates L., Semsarian C.; Clinical challenges of genotype positive (+) phenotype negative (–) family members in hypertrophic cardiomyopathy, *Am J Cardiol*. 2011;107:604-8.

Maron MS, Olivetto I, Betocchi S, et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2003 Jan 348:295.

Marsiglia JDC. Estudo genético de pacientes portadores de Cardiomiopatia Hipertrofica, Ano de Obtenção: 2013.

Marsiglia JDC et al . Estudo de mutações causadoras de cardiomiopatia hipertrofica em um grupo de pacientes no Espírito Santo, Brasil. *Arq. Bras. Cardiol*. 2010: v. 94, n. 1, p. 10-17.

Mattos BP. Estratificação de risco para morte súbita na cardiomiopatia hipertrofica: bases genéticas e clínicas. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87:396-4.

McKenna WJ, Deanfield J, Faruqui A, England D, Oakley C. Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy: role of age, clinical, eletrocardiographic and hemodynamic features. *Am J Cardiol*. 1981;47:532-8.

McKenna WJ, Behr ER. Hypertrophic cardiomyopathy: management, risk stratification, and prevention of sudden death. *Heart*. 2002 Feb;87(2):169-76.

Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, et al. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29 (3): 549-55.

Moolman-Smook JC, De Lange WJ, Bruwer EC, Brink PA, Corfield VA. The origins of hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in two South African subpopulations: a unique profile of both independent and founder events. *Am J Hum Genet.* 1999; 65 (5): 1308-20.

Nishi et al. vel missense mutation in cardiac beta myosin heavy chain gene found in a Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 188: 379

Nugent AW, Daubeney PE, Chondros P, et al. The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia. *N England J Med.* 2003 Apr;348(17):1639-46.

Nugent AW, Daubeney PE, Chondros P, et al. Clinical features and outcomes of childhood hypertrophic cardiomyopathy: results from a national population-based study. *Circulation.* 2005 Aug;112(9):1332-38.

O'Mahony C, Tome-Esteban M, Lambiase P, et al. A validation study of the 2003 American College of Cardiology/European Society of Cardiology and 2011 American College of Cardiology Foundation/American Heart Association risk stratification and treatment algorithms for sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2013(99):53441.

Panza JA; Petrone RK; Fananapazir L; Maron BJ. Utility of continuous wave Doppler echocardiography in the noninvasive assessment of left ventricular outflow tract pressure gradient in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1992 Jan;19(1):91-9.

Pascal P McKeown, Alison Rachel Muir. Risk assessment in hypertrophic cardiomyopathy: contemporary guidelines hampered by insufficient evidence. *Heart.* 2013;99:511-3.

Pasqualim G, Simon L, Sperb-Ludwig F, Burin MG, Michelin-Tirelli K, Giugliani R, Matte U. Fabry disease: a new approach for the screening of females in high-risk groups. *Clin Biochem.* 2014;47(7-8):657-62

Pereira EM, do Monte SJ, do Nascimento FF, de Castro JA, et al. Lysosome-associated protein 1 (LAMP-1) and lysosome-associated protein 2 (LAMP-2) in a larger family carrier of Fabry disease. *Gene.* 2014;536(1):118-22.

Piva e Mattos B. Sudden death risk stratification in hypertrophic cardiomyopathy: genetic and clinical bases. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(3):391-9.

Rayment, I, Holden, HM, Sellers, JR, et al. Structural interpretation of the mutations in the β -cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:3894.

Richard P, Charron P, Carrier L, et al. Hypertrophic cardiomyopathy. Distribution of diseases genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 107:2227-32, 2003.

Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M, et al: Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 112:855, 2005.

Roberts R, Sigwart U. Current concepts of the pathogenesis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. Jul 12 2005;112(2):293-296.

Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 2nd ed. Massachusetts: PWS Publishers 1986; 467-472.

Sambrook J, Russell DW. Rapid isolation of yeast DNA. In J. Sambrook and D.W. Russell (eds.), *Molecular cloning, a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001; p 6.31-6.32.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977(a) Feb 24;265(5596):687-95.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977(b) Dec;74(12):5463-7

Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hirokawa M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 262:411-7, 1999.

Schiller N B, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations For Quantification Of Left Ventricle By Two Dimensional Echocardiography - American Society Of Echocardiography Committee On Standards J. *Am. Soc Echocardiogr*. 1989; V. 2, N. 5, P. 358-67.

Schmincke, A. Ueber linksseitige muskulöse Conusstenosen. *Dtsch Med Wochenschr* 33: 2082, 1907.

Seidman JG, Seidman CE et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990;62:999-1006.

Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uakama K, Kaiahara N, et al. Direct measurement of High Density Lipoprotein Cholesterol in serum with

polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. *Clinical Chemistry* 1995; 41: 717-723.

Shah PM, Adelman AG, Wigle ED, Gobel FL, Burchell HB, Hardarson MD, Curiel MD, Calzada C, Oakley CM, Goodwin JF. The natural (and unnatural) history of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Circ Res* 34 and 35 (Suppl 2):II179-195, 1974.

Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(1 supl.1): 1-51

Spirito P, Chiarella F, Carratino L, Zoni-Berisso M, Bellotti P, Vecchi C. Clinical Course and prognosis of hypertrophic cardiomyopathy in outpatient population. *N Engl J Med* 320: 749-55, 1989.

Spirito P, Belloni P. Natural history of hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 72: S10-S12, 1994.

Spirito P, Bellone P, Harris KM, et al. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000;342:1778–1785

Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu NJ, Hamashima Y, Kaway C. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normal hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 55: 575 – 581, 1986

Taylor MRG, Carniel E, Mestroni L. Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2004;4:99-113.

Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J*. 1958; 20: 1–8.

The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 9th ed. Boston, Mass: Little, Brown & Co; 1994:253-256.

Theopistou A, Anastasakis A, Miliou A, Rigopoulos A, Toutouzas P, Stefanadis C. Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by Arg278Cys missense mutation in the cardiac troponin T gene. *Am J Cardiol* 2004; 94:246–249.

Van Driest, SL, Ellsworth, EG, Ommen, SR, et al. Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 108:445.

Varnava, AM, Elliott, PM, Baboonian, C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin t disease. *Circulation* 2001; 104:1380.

Wang LB, Seidman JG, Seidman CE. Using molecular genetics to guide the diagnoses and treatment of HCM. 2009

Watkins H. Multiple disease gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 72 (Suppl.): S4-S9, 1994.

Watkins, H, Seidman, JG, Seidman, CE. Familial hypertrophic cardiomyopathy: A genetic model of cardiac hypertrophy. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1721.

Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 332:1058-64, 1995.

Wheeler M, Pavlovic A, DeGoma E, Salisbury H, Brown C, Ashley EA. A new era in clinical genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res.* 2009;2:381–91.

Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Rude TD, Fulop J, Racowsky H, Williams WG. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. *Prog Cardiovasc Dis* 28(1):1-83, 1985.

Wynne J, Braunwald E. Miocardiopatias e miocardites. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 1998. p.1417-23.

Yang, Q, Sanbe, A, Osinka, H, et al. A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998; 102:1292.

Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death) developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Europace*. Sep 2006;8(9):746-837.

Zou Y, Song L, Wang Z, Ma A, Liu T, et al. Prevalence of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in China: a population based echocardiographic analysis of 8080 adults. *Am J Med* 116:14-8, 2004