

PATRÍCIA EUGÉNIA NUNES JUSTINIANO

**NOVOS GENES NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE
MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA**

**Orientador: Professora Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos
Fernandes**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Engenharia**

Lisboa

2014

PATRÍCIA EUGÉNIA NUNES JUSTINIANO

**NOVOS GENES NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE
MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biotecnológica no Curso de Mestrado em
Engenharia Biotecnológica conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientador: Prof^ª. Doutora Maria Alexandra Núncio de
Carvalho Ramos Fernandes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2014

À Alice, ainda tão pequena, mas tão importante.

Agradecimentos

Esta etapa conquistada só foi possível com a ajuda de várias pessoas que estiveram presentes de muitas formas de modo a que fosse possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Alexandra Fernandes por me ter recebido e dado a possibilidade de realizar este estudo, proporcionando todas as condições, especialmente pela possibilidade de o poder fazer em regime pós-laboral, agradeço também toda a disponibilidade, todas as palavras de encorajamento.

À Universidade Lusófona e à Universidade Nova de Lisboa pelas condições necessárias para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Silva, Ana Cláudia, Daniel, Marina, e Joana pelo incentivo, críticas, conselhos especialmente pela boa disposição que ajudou a enfrentar com motivação as horas passadas no laboratório após um dia de trabalho. Agradeço em especial à Vanda pelo tempo que despendeu comigo, ficando muitas vezes até tarde para me ajudar e orientar, pelo apoio em todo o processo e pelas críticas e conselhos, sem a sua ajuda não teria sido tão fácil a integração no grupo de trabalho.

A todos os meus amigos, em especial à Inês, à Mafalda, à Patrícia, à Sandra e à Sónia, que ao longo deste percurso, mais longo que o esperado e com tantos acontecimentos importantes pelo meio, nunca me deixaram desistir desta etapa.

Em especial à Inês pelos conselhos, discussões úteis e pela preciosa ajuda, agradeço também o apelo à realidade e a grande muita motivação que me foi dando sempre!

Ao Nuno por TUDO, pelo apoio e companheirismo, pela preciosa ajuda ao longo deste trabalho e da vida que temos partilhado.

Aos meus pais e irmão por todo o apoio e incentivo e principalmente por me terem tornado a pessoa que sou hoje e por serem um exemplo na minha vida.

E por fim à minha filha Alice, que mesmo antes de nascer foi a minha grande motivação para terminar este trabalho.

Resumo

A Miocardiopatia Hipertrófica (MH) é uma doença genética cardiovascular, ocorrendo em 1/500 indivíduos da população em geral. É considerada a principal causa de morte súbita em jovens e jovens atletas.

A MH apresenta um padrão de transmissão autossómica dominante com elevada variabilidade clínica (mesmo no seio da mesma família) e genética (quer ao nível de *locus* quer alélica). Esta variabilidade genética influencia a magnitude da hipertrofia cardíaca e o risco de morte súbita.

A maioria das mutações descritas estão associadas a genes que codificam para proteínas sarcoméricas. No entanto em mais de 40% dos pacientes com MH não se encontram mutações em genes conhecidos. Vários estudos recentes associam outros genes não sarcoméricos a casos de MH, como por exemplo, genes que codificam para proteínas envolvidas na sinalização de cálcio e nas funções auxiliares ao sarcómero cujas mutações podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de MH, quer como genes de susceptibilidade (*ACTN2*, *FHL1*, *GLA*, *RAF1*, *TTR*, *VCL*) quer como genes modificadores (*AGTR1*).

Neste trabalho, pretendeu-se aplicar a técnica de HRM ao diagnóstico genético de MH, analisando um grupo de 58 indivíduos, - 39 indivíduos com diagnóstico de MH sem mutações nos principais genes sarcoméricos previamente identificadas, 9 dos quais são atletas de alta competição e 19 jovens atletas sem diagnóstico de MH. Para tal, foram desenhados, otimizados e testados 14 pares de *primers* para a aplicação em HRM.

Neste trabalho, foi possível detectar as seguintes mutações no gene *ACTN2* (IVS7+34G>A, IVS7+80A>G, IVS8+23G>A) e no gene *AGTR1*, na região 3'UTR 1166A>C, confirmadas por SA.

A técnica de HRM diminuiu drasticamente a necessidade de SA, diminuindo os custos e tempo de espera dos resultados.

Palavras-Chave: Miocardiopatia Hipertrófica, Diagnóstico genético, Desnaturação de Alta Resolução

Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a cardiovascular genetic disorder, that occurs in 1/500 individuals in the general population and is rated as the main common cause of sudden death in young people and young athletes.

HCM has an autosomal dominant pattern of transmission, showing a high clinical variability (even in the same family) and genetics (both at locus or allelic level). This genetic variability affects the magnitude of cardiac hypertrophy and risk of sudden death.

Most of the described mutations are associated with genes encoding sarcomeric proteins. However more than 40% of index patients, no mutation in known genes is identified. Several recent studies have associated non-sarcomeric genes with HCM cases, such as genes encoding proteins implicated in calcium signalling and auxiliary functions to the sarcomere – whose mutations may guide the development of the HCM -, susceptibility genes like (*ACTN2*, *FHL1*, *GLA*, *RAF1*, *TTR*, *VCL*).and modifiers genes such as (*AGTR1*).

The aim of this work was to apply *High Resolution Melting* (HRM) technique in HCM genetic diagnosis, analyzing a group of 58 individuals- 39 with HCM, without previously identified mutations in the key sarcomeric genes, 9 of them young athletes and 19 healthy young athletes Therefore, 14 primer pairs were designed, optimized and tested for their use in HRM.

With this study it was possible to detect the following modifications in the *ACTN2* gene: IVS7+34G>A, IVS7+80A>G, IVS8+23G>A; and in the *AGTR1* gene: 3'UTR 1166A>C of, confirmed by SA.

The HRM technique drastically reduced the need of SA, decreasing both costs and time period for results.

Keywords: Hypertrophic cardiomyopathy, Genetics Diagnosis, High Resolution Melting

Zusammenfassung

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine genetische kardiovaskuläre Erkrankung, die bei 1 von 500 Personen der allgemeinen Bevölkerung auftritt. Sie gilt als häufigste Ursache des plötzlichen Todes bei Jugendlichen und jungen Athleten.

Die HCM weist einen autosomal-dominanten Übertragungsweg auf, mit einer erhöhten klinischen (sogar innerhalb der selben Familie) und genetischen (sowohl auf Locus als auch auf Allel Ebene) Variabilität. Diese genetische Variabilität hat Einfluss auf die Schwere der Hypertrophie und die Höhe des Risikos eines plötzlichen Herztodes.

Die Mehrheit der beschriebenen Mutationen stehen in Verbindung mit Genen, die sarkomerische Proteine kodieren. Dennoch ist bei über 40% der Indexpatienten keine Mutation in bekannten Genen nachgewiesen worden. Mehrere jüngste Studien haben nicht-sarkomerische Gene mit HCM Fällen in Verbindung gebracht, wie z.B. Gene, welche Proteine kodieren, die im Calcium-Signalweg und bei den Hilfsfunktionen des Sarkomers involviert sind und dessen Mutationen wiederum möglicherweise für die Entwicklung des HCM verantwortlich sind, Suszeptilitäts Gene (*ACTN2*, *FHL1*, *GLA*, *RAF1*, *TTR*, *VCL*) oder modifizierende Gene (*AGTR1*).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Anwendung der High Resolution Melting (HRM) Technik in der genetischen Diagnose von HCM, bei der Untersuchung einer HCM Patienten Gruppe ohne pre-diagnostizierte Mutationen in den Schlüsselgenen des Sarkomers. Analysiert eine Gruppe von 58 Personen - 39 Individuos mit MH ohne sarkomerische Mutationen in Schlüsselgenen zuvor identifiziert, von denen 9 Elite-Athleten und 19 junge Sportler ohne eine Diagnose der MH diagnostiziert, Dafür wurden 14 Primer Paare hergestellt und getestet für die Anwendung bei HRM.

Es wurden Veränderungen bei den Genen *ACTN2* (IVS7+34G>A, IVS7+80A>G, IVS8+23G>A), und in der 3'UTR 1166A>C *Gegend des AGTR1* Gens festgestellt, bestätigt durch SA.

Die HRM Technik reduzierte drastisch die Notwendigkeit des Einsatzes von SA, was sowohl die Kosten als auch den Zeitraum bis zum Ergebnis verringerte.

Schlüsselbegriffe: Hypertrophe Kardiomyopathie, Gen-Diagnose, High Resolution Melting (HRM).

Publicações

Parte deste trabalho foi apresentada no Congresso anual da *European Society of Human Genetics*, decorrido em Paris em Junho de 2013, na forma de comunicação em painel

Santos, SIR; Marques, V.; Justiniano, P.; Quintas, J.; Baptista, PV; Fernandes, AR “A novel strategy for identification of Performance Enhancing Polymorphisms in athletes: new determinants that can modify Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) risk.

Lista de Abreviaturas

aa- aminoácido

ACE– Enzima conversora de angiotensina

ACTN2– α -actinina 2

ADP– Adenosina difosfato

AGT- Angiotensinogénio

AGTR1– Receptor de angiotensina do tipo 1

Ala– Alanina

AMP– Adenosina monofosfato

ANG- Angiotensina

Ang II- Angiotensina II

Arg - Arginina

Asn– Asparagina

Asp– Aspartato

ATP– Adenosina trifosfato

β Arr- β -arrestina

C– Citosina

Ca^{2+} – Cálcio

cAMP- adenosina monofosfato ciclica

CK- creatina cinase do inglês *Creatine kinase*

CP– Crossing point

CRK2- receptor de quinase 2 acoplado à proteína G;

GRK5- receptor de quinase 2 acoplado à proteína G

Cys– Cisteína

DAG- diacilglicerol

DGGE– Electroforese em gel de gradiente desnaturante, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electroforesis*

dHPLC- Cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência, do inglês *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*

DNA– Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *desoxyribonucleic acid*

ddNDPs- dideoxynucleotídeos

dNTPs– desoxinucleósidos

ECA1– Enzima conversora da angiotensina-1

ECA2– Enzima conversora da angiotensina-2

EDTA– Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ECG– Electrocardiograma

ECHO– Ecocardiograma

EUA– Estados Unidos da América

FHL1- Do inglês *Four and a half LIM domains protein 1*

G- Guanina

gd-RMC– Ressonância magnética cardíaca com contraste de gadolinium

GLA– α -Galactosidase

Gln– Glutamina

Glu– Glutamato

Gly– Glicina

His– Histidina

HPLC– Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HRM– do inglês *High Resolution Melting*

HVE- Hipertrofia ventricular esquerda

Ile– Isoleucina

IP3- Inositol trifostato

KCNA5 - do inglês Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5

Leu– Leucina

Lys– Lisina

MALDI-TOF- *MatrixAssisted Laser Desorption/Ionization, Time of flight*

MAPK- do inglês *mitogen-activated protein kinase*

MAPKK- cinase da via MAPK

MCH- Miocardiopatia Hipertrofica

Met– Metionina

MgCl₂– Cloreto de magnésio

MH– Miocardiopatia Hipertrofica

mRNA– RNA mensageiro

MYBPC3– Proteína C de ligação à miosina cardíaca

MYH7– Cadeia pesada β da miosina

pb– Pares de bases

PCR– Reacção em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase Chain Reaction

PEP – do inglês *Performance Enhancing Polymorphisms*

PI3K– Fosfoinositol 3-quinase

Phe– Fenilalanina

Pi– Fosfato inorgânico

PIP2– Fosfatidilinositol bifosfato 4,5 –bifosfato

PKA– Proteína cinase A

PKC– Proteína cinase C

PLC– Fosfolipase C

Pro– Prolina

RAF1– Homólogo 1 do oncogene viral da leucemia dos murganhos (v-raf 1)

RAAS– Sistema renina-angiotensina-aldosterona

SA– Sequenciação automatizada

Ser– Serina

SIV– Septo interventricular

SR– Reticulo sarcoplasmático

RNA– Ácido ribonucleico

SAP – Fosfatase alcalina de camarão do inglês *Shrimp alkaline phosphatase*

SNP– Polimorfismo de um único nucleótido, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

T– Timina

Ta– do inglês *annealing temperature*

Thr– Treonina

Tm– do inglês *melting temperature*

TTR– Transtirretina

Val– Valina

VCL– Vinculina

VE– Ventrículo esquerdo

Lista de Unidades

kDa– Kilodalton

min– Minutos

mM– Milimolar

ng– Nanograma

seg– Segundos

μ L– Microlitro

μ M– Micromolar

% (p/v)– Percentagem peso/volume

Índice Geral

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Publicações	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Unidades	xiii
Índice Geral	xiv
Índice de Tabelas	xvii
Índice de Figuras	xviii
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1. Miocardiopatia Hipertrófica	2
1.2. MH e morte súbita em atletas de alta competição	2
1.3. Manifestações Clínicas e Morfológicas	3
1.4. Fisiologia celular dos cardiomiócitos	6
1.5. Mecanismo de contração muscular cardíaco	8
1.6. Tratamento	9
1.7. Genética na MH	10
1.7.1. Novos genes potencialmente associados a MH	10
1.7.1.1. Gene <i>ACTN2</i>	13
1.7.1.2. Gene <i>FHL1</i>	14
1.7.1.3. Gene <i>NEXN</i>	16
1.7.1.4. Gene <i>VCL</i>	16
1.7.1.5. Gene <i>AGTR1</i>	17
1.7.1.6. Gene <i>ACE1</i>	18
1.7.1.7. Gene <i>RAF1</i>	20
1.7.1.8. Gene <i>GLA</i>	20

1.7.1.9. Gene <i>TTR</i>	21
1.8. Diagnóstico Genético de MH.....	21
1.9. Desnaturação de Alta Resolução	22
1.10. Objectivos do Trabalho	26
Capítulo 2	27
Material e Métodos	27
2.1. Amostragem	28
2.2. Extracção e Quantificação de DNA	28
2.3. Desenho de <i>primers</i>	29
2.4. Optimização das Condições Reaccionais para Amplificação das regiões genómicas seleccionadas	30
2.5. Rastreio de alterações por HRM	32
2.6. Sequenciação Automatizada (SA).....	33
2.7. Determinação do polimorfismo (I/D) no gene <i>ACE1</i>	35
Capítulo 3	37
Apresentação de resultados e discussão	37
3.1. Selecção das amostras em estudo	38
3.2. Desenho de <i>primers</i> e optimização da Técnica de HRM	38
3.3. Rastreio de alterações nas amostras por HRM.....	41
3.3.1. Gene <i>ACTN2</i>	41
3.3.1.1. Exão 7	41
3.3.1.2. Exão 8	44
3.3.1.3. Exão 13 e 16	46
3.3.2. Gene <i>AGTR1</i>	47
3.3.2.1. Exão 6	47
3.3.3. Genes <i>FHL1</i> , <i>GLA</i> , <i>RAF1</i> , <i>TTR</i> e <i>VCL</i>	51
Bibliografia	57
Apêndices.....	xx
Apêndice I- Indivíduos em estudo e respectivas informações clínicas.....	xxi

Apêndice II– Região genómica do gene <i>ACE1</i> amplificada por PCR para o estudo do polimorfismo I/D.....	xxiii
Apêndice III- Poster apresentado no Congresso anual da European Society of Human Genetics, decorrido em Paris em Junho de 2013, na forma de comunicação em painel intitulada “A novel strategy for identification of Performance Enhancing Polymorphisms in athletes: new determinants that can modify Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) risk.....	xxiv
Apêndice IV Marcador de Pesos Moleculares – HyperLadder IV (BIOLINE, UK)...	xxv
Apêndice V Primers utilizados nas reacções de HRM e suas características.....	xxvi
Anexos.....	xxviii
Anexo I- High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha versão 16.0 (2008).....	xxix
Anexo II- Kit <i>Jetquick</i> para purificação dos produtos de PCR do gel de agarose; <i>Jetquick, PCR purification spin kit</i> (Genomed GmbH, Löhne, 21 de Abril de 2010).....	xx
Anexo III- Kit <i>Jetquick</i> para extração dos produtos de PCR do gel de agarose, <i>Kit Jetquick, gel extraction spin kit</i> (Genomed GmbH, Löhne, 21 de Abril de 2010)	xxi
Anexo IV Esquema de um ensaio de iPLEX. Adaptado de iPLEX™ Gold Application Guide, 2007.	xxii

Índice de Tabelas

Tabela 1- Variações genéticas associadas à susceptibilidade ou à modificação da MH	12
Tabela 2- Exemplos de variantes no gene <i>ACTN2</i> identificadas num estudo da população australiana com diagnóstico de MH (adap. Chiu <i>et al.</i> , 2010).....	13
Tabela 2- Exemplos de variantes no gene <i>ACTN2</i> identificadas num estudo da população australiana com diagnóstico de MH (adap. Chiu <i>et al.</i> , 2010) cont.....	14
Tabela 4- Condições Reacionais Aplicadas em <i>LightCycler 480</i> ®.....	32
Tabela 6- Programa de PCR utilizado para a amplificação das regiões genómicas a sequenciar.	34
Tabela 6- Condições Reacionais Aplicadas em PCR para a determinação do polimorfismo (I/D) do gene <i>ACE1</i>	35
Tabela 7- Programa de PCR utilizado para a amplificação da região genómica do gene <i>ACE1</i>	36
Tabela 8- Grupos de amostras em estudo	38
Tabela 9- <i>Primers</i> seleccionados para a análise em HRM.....	39
Tabela 10- Condições Reacionais Aplicadas em <i>LightCycler 480</i> ®.....	40
Tabela 11- Resumo da incidência da alteração IVS7+34 G>A na população estudada.....	44
Tabela 12- Resumo da incidência da alteração IVS7+80 A>G na população estudada.....	44
Tabela 13- Resumo da incidência da alteração IVS8+23 G>A na população estudada.....	46
Tabela 14- Resumo da incidência da alteração 3'UTR 1166A>C na população estudada.....	49
Tabela 15- Resultados da determinação do polimorfismo (I/D) do gene <i>ACE1</i>	50
Tabela 16- Compilação das alterações detectadas neste estudo por HRM e confirmadas por SA.	52
Tabela 16- Compilação das alterações detectadas neste estudo por HRM e confirmadas por SA (cont.).	53
Tabela 17- Resumo da incidência das alterações detectadas na população estudada.....	53

Índice de Figuras

Figura 1- Factores de risco de morte súbita em Miocardiopatia Hipertrófica (adaptado de International Olympic Committee Medical Commission, 2004)	3
Figura 2- Características anatómicas e histológicas da MH. (Adaptado de Man-Wei Chung et al., 2003).	4
Figura 3- Representação de diferentes padrões de ECG (Adaptado de Marques, 2010).....	5
Figura 4- Representação esquemática dos componentes proteicos que fazem parte da estrutura de um sarcómero (Adaptado de Mudd e Kass, 2008).	6
Figura 5- Representação esquemática de um sarcómero (Adaptado de Ramírez et al., 2004).....	7
Figura 6- Representação da interação dos filamentos contráteis (Adaptado de Rayment et al., 2011).	9
Figura 7- Representação do papel de FHL1 na sinalização no músculo cardíaco. (Adaptado de Cowling et al., 2011).	15
Figura 8- Representação esquemática do RAAS e dos genes envolvidos na insuficiência cardíaca.(Adaptado de Alves et al., 2010).	18
Figura 9- Efeito dos vários níveis de ECA no sistema renina-angiotensina-aldosterona (adaptado de Mayne, 2006).....	19
Figura 10- Exemplo de um gráfico de curvas de desnaturação (Adaptado de Roche Diagnostics).	24
Figura 11- Etapas de análise até à obtenção do <i>difference plot</i>	25
Figura 12- Exemplo do processo utilizado para a selecção de um par de <i>primers</i> para o exão 8 do gene ACTN2.	40
Figura 13- Ilustração das curvas de melting normalizadas de algumas amostras potencialmente alteradas para o exão 7 do gene ACTN2.....	41
Figura 14- Cromatogramas referentes à alteração IVS7+34G>A no exão 7 do gene ACTN2	42
Figura 15- Alinhamento das sequências obtidas a partir dos cromatogramas apresentados na figura 14 com a sequência wild type (NM_001103).	42
Figura 16- Cromatograma referente à alteração IVS7+80A>G	43
Figura 17- Alinhamento da sequência obtida a partir do cromatograma apresentado na figura 16 com a sequência wild type (NM_001103).	43
Figura 18- Ilustração das curvas de melting normalizadas das amostras potencialmente alteradas para o exão 8 do gene ACTN2.	44

Figura 19- Cromatogramas referentes à alteração IVS8+23G>A.....	45
Figura 20- Alinhamento da sequência obtida a partir dos cromatogramas apresentados na figura 19 com a sequência <i>wild type</i> (NM_001103).....	45
Figura 21- Curvas de melting normalizadas para o exão 13 do gene <i>ACTN2</i>	46
Figura 22- Alterações detectadas por HRM para o gene <i>AGTR1</i>	47
Figura 23- Cromatograma referente à alteração 1166 da Região 3' UTR.....	48
Figura 24- Alinhamento da sequência obtida a partir dos cromatogramas apresentados na figura 23 com a sequência <i>wild type</i> (NM_031850) do gene <i>AGTR1</i> (NCBI, Blastn).....	48
Figura 25– Resultados da electoforese em gel de agarose dos produtos de amplificação em PCR dos polimorfismo do gene <i>ACE1</i>	49
Figura 26– Resultados de HRM para os genes <i>FHL1</i> , <i>GLA</i> , <i>RAF1</i> , <i>TTR</i> e <i>VCL</i>	51

Capítulo 1

Introdução

1.1. Miocardiopatia Hipertrófica

Miocardiopatias são, segundo a *American Heart Association*, "um grupo heterogéneo de doenças do miocárdio associadas à disfunção mecânica e/ou eléctrica que normalmente exibem hipertrofia do ventrículo esquerdo" (Cecchi *et al.*, 2012; Maron *et al.*, 2012).

As miocardiopatias estão actualmente classificadas em cinco categorias de acordo com critérios morfológicos e funcionais: miocardiopatia hipertrófica (MH), miocardiopatia dilatada (MD), miocardiopatia arritmogénica do ventrículo direito (ARVD), miocardiopatia restritiva (MR) e formas menos comuns, "não-classificáveis" (Hershberguer *et al.*, 2009). No caso da MH todos os casos se devem a alterações genéticas (Maron *et al.*, 2006).

A MH é a doença genética mais comum do foro cardiovascular, ocorrendo em 1/500 indivíduos da população em geral (Ho *et al.*, 2010). É também considerada a principal causa de morte súbita em jovens e jovens atletas (Hofman *et al.*, 2013; Cecchi *et al.*, 2012).

1.2. MH e morte súbita em atletas de alta competição

Existem vários estudos relativos à prevalência de eventos de morte súbita em atletas de alta competição com variações entre 0,5% a 8% (McKenna *et al.*, 2010, tais como os verificados nos futebolistas Miklós Fehér, Marc-Vivien Foé e Antonio José Puerta Pérez. Nalgumas situações estes eventos de morte súbita em atletas, podem ser despoletados pela intensa actividade física quando existem doenças cardiovasculares subjacentes (Maron *et al.*, 2012) mas na maioria dos casos é devida a miocardiopatias hereditárias, em que a MH é a mais frequente, sendo responsável por um terço destas mortes (Noronha *et al.*, 2013).

Pensa-se que o esforço físico por si só pode ser a causa de hipertrofia do VE, contudo, há estudos que apontam que os limites superiores de espessura da parede do VE em atletas do sexo feminino raramente ultrapassam os 11 mm, sendo sempre inferiores aos limites compatíveis com a miocardiopatia hipertrófica, isto é, ≥ 13 mm (Gersh *et al.*, 2011). No caso dos atletas do sexo masculino, uma minoria apresenta uma espessura da parede do VE que pode exceder os limites normais superiores, ou seja, 12 mm (Sagiv *et al.*, 2012). Considerando-se que pacientes do sexo masculino e feminino, com MH apresentam uma magnitude similar em termos de espessamento da parede do VE, supõe-se que a espessura

do VE ≥ 13 mm num atleta não seja consequência fisiológica do esforço físico mas a expressão de uma hipertrofia patológica primária, tal como a MH (Saber-Ayad, 2013).

Para melhor avaliar estas características, nos últimos 10 anos, a Sociedade Europeia de Cardiologia em conjunto com o Comité Olímpico Internacional estão a promover, com ECG de rotina, a prática de estratégias para melhorar o *screening* de todos os atletas de alta competição (Corrado *et al.*, 2005; *International Olympic Committee Medical Commission*, 2004).



Figura 1- Factores de risco de morte súbita em Miocardiopatia Hipertrófica (adaptado de International Olympic Committee Medical Commission, 2004)

1.3. Manifestações Clínicas e Morfológicas

Morfológicamente, a MH caracteriza-se pela hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), a qual é tipicamente concêntrica e assimétrica com consequente diminuição do volume da cavidade ventricular conduzindo à sua obstrução (Olivotto *et al.*, 2012), designando-se como hipertrofia do septo interventricular (SIV) (Figura 2A).

A nível histológico, a MH caracteriza-se pela hipertrofia dos cardiomiócitos com desarranjo da arquitectura tecidular -*disarray* -, acompanhada pelo aumento das fibras de tecido conjuntivo – fibrose intersticial - (Ho *et al.*, 2010) (Figura 2B). Esta perturbação no alinhamento normal das células musculares cardíacas leva à incapacidade cardiovascular progressiva (Cecchi *et al.*, 2012).

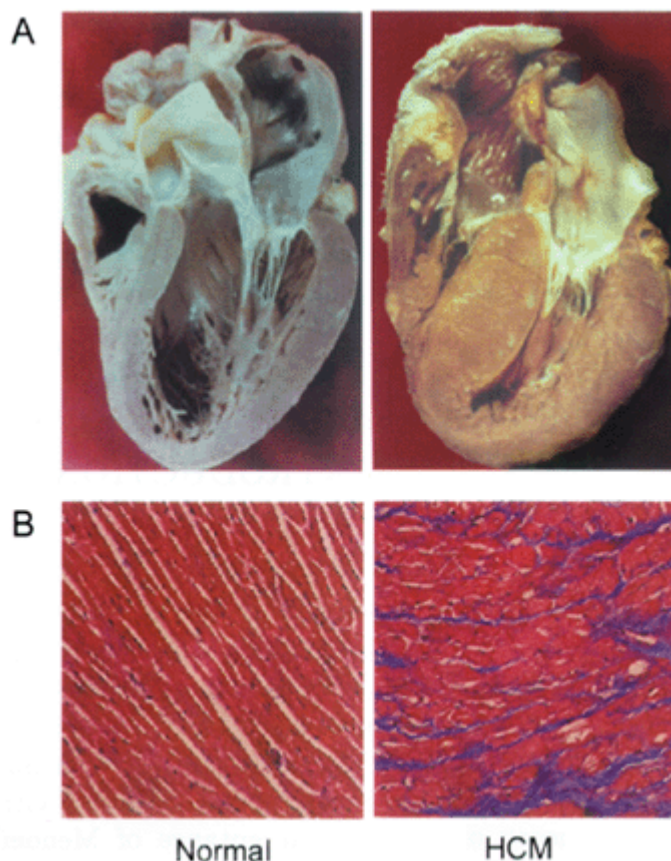


Figura 2- Características anatómicas e histológicas da MH. (Adaptado de Man-Wei Chung et al., 2003).

Legenda: (A) Comparação de um coração saudável (imagem à esquerda) com um *exame post-mortem* de um coração com MH onde se verifica uma *enorme hipertrofia assimétrica do ventrículo esquerdo, com redução da cavidade ventricular* (imagem à direita). (B) Comparação de imagens histológicas entre um coração saudável (imagem à esquerda) e um coração com *fibrose intersticial característico de MH com as secções coradas com tricrómio de Masson mostrando o aumento do tamanho das células do músculo cardíaco, o desarranjo tecidual dos cardiomiócitos e o aumento do tecido fibroso no espaço extracelular.*

Muitos indivíduos com MH são assintomáticos durante a vida ou manifestam sintomas bastante variados (Marian *et al.*, 2010) tais como insuficiência cardíaca com dispneia, palpitações consequentes de batimentos cardíacos irregulares, dor torácica e desfalecimento (Marian *et al.*, 2010). Também a função diastólica é comprometida na MH devido não só à hipertrofia mas também à fibrose intersticial e/ou desarranjo da arquitectura dos cardiomiócitos e pensa-se ser esta a causa mais provável da falha cardíaca e morte súbita em doentes com MH (Ho *et al.*, 2012).

O diagnóstico clínico é usualmente feito com recurso a exames como o electrocardiograma (ECG), a ecocardiografia (ECHO) ou a ressonância magnética com contraste de *gadolinium* (gd-RMC) e pela determinação da espessura da parede ventricular-

no entanto existem outras causas para esse espessamento, tais como a elevação da pressão arterial, hipertensão sistêmica ou estenose da válvula aórtica (Kelly *et al.*, 2007).

O ECG permite avaliar padrões anormais de batimento cardíaco, como alterações da repolarização, ondas T invertidas e ondas Q profundas (Figura 3 A a C). O ECHO possibilita avaliar se ocorre obstrução parcial do fluxo sanguíneo a partir do ventrículo esquerdo (Maron *et al.*, 2012) e visualizar a hipertrofia ao nível da parede do ventrículo esquerdo (VE) e do septo interventricular (SIV) (Ho *et al.*, 2011). A hipertrofia é classificada a partir de valores normais, inferiores a 12 milímetros (mm) (Gersh *et al.*, 2011), podendo considerar-se uma hipertrofia moderada entre 13 a 15 mm, ou severa quando superior a 30 mm; A gd-RMC fornece imagiologia tomográfica tridimensional do ventrículo, possibilitando a detecção do aumento de fibrose e da hipertrofia (Uretsky *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2011). A crescente resolução da ressonância magnética é útil na detecção de uma hipertrofia, ainda que subtil (Ho *et al.*, 2011).

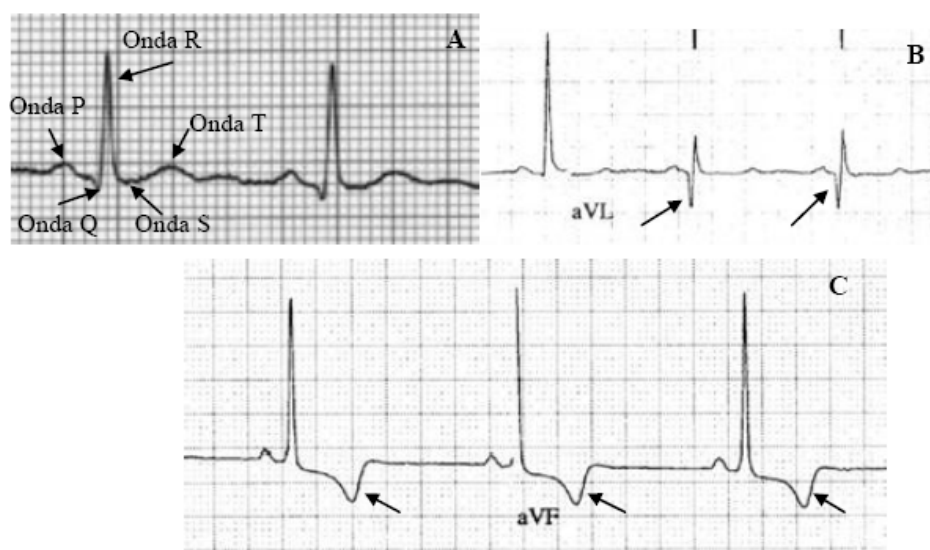


Figura 3- Representação de diferentes padrões de ECG (Adaptado de Marques, 2010).

Legenda: (A) Padrão de ECG normal; (B) Padrão de ECG de paciente com MH com ondas Q profundas; (C) ECG de paciente com MH com inversão das ondas T

Uma vez que se trata de uma doença com um padrão de transmissão autossômico dominante, além da história clínica do paciente, a história familiar é particularmente importante, principalmente em situações de, morte súbita, de episódios de paragem cardíaca, de taquicardia ventricular, de episódios de perda de consciência (sem explicação clara) e de alterações da pressão arterial. Os indivíduos sem doença diagnosticada com história familiar de MH, devem ser vigiados, uma vez que podem ser portadores de uma mutação causadora da doença mas não terem manifestações clínicas (Marian *et al.*, 2010).

1.4. Fisiologia celular dos cardiomiócitos

O tecido cardíaco é formado por cardiomiócitos, que formam uma rede tridimensional designada de miofibrila contrátil. Os cardiomiócitos, células de forma bifurcada, são compostos por unidades estruturais e funcionais, os sarcómeros, constituídos por filamentos grossos e finos intercalados (Frank *et al.*, 2011).

Na figura 4 é evidenciada a interacção e a localização das proteínas dos filamentos finos e grossos e do disco Z e a proteína integrina que faz a ligação à membrana plasmática (Mudd e Kass, 2008).

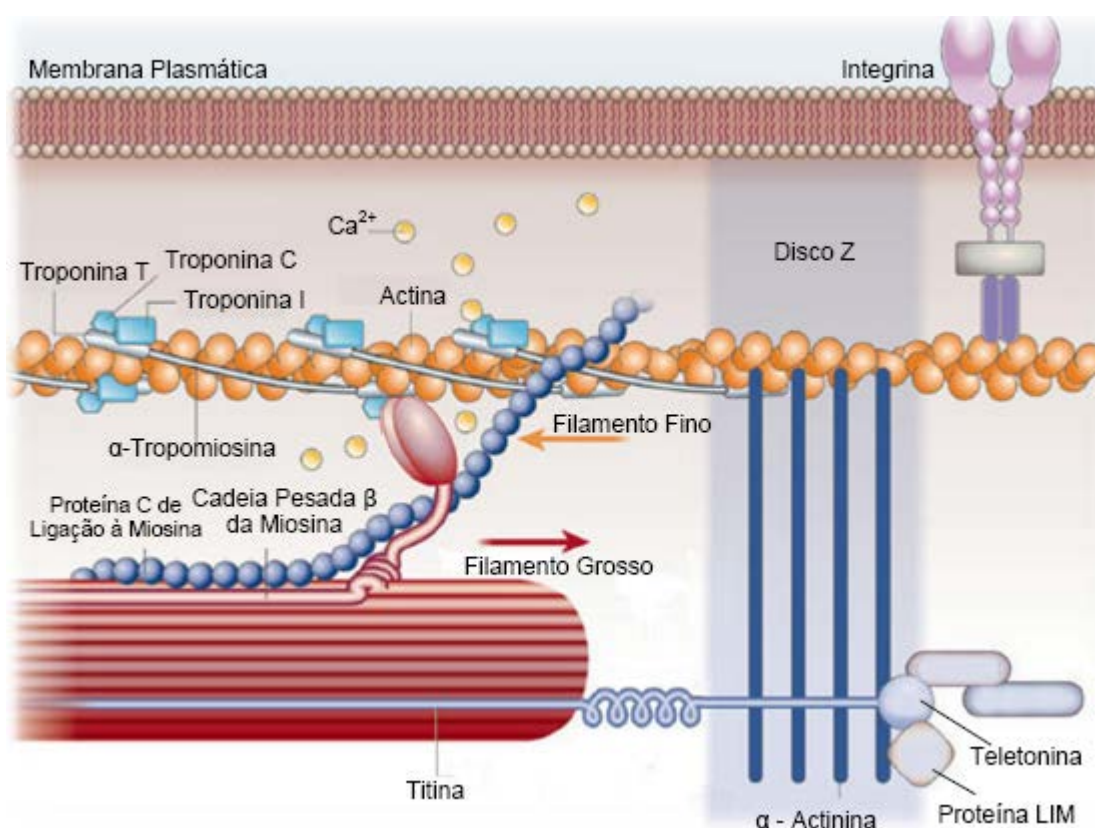


Figura 4- Representação esquemática dos componentes proteicos que fazem parte da estrutura de um sarcómero (Adaptado de Mudd e Kass, 2008).

Os filamentos grossos são compostos por miosina - uma proteína formada por duas cadeias pesadas, α e β , codificadas pelo genes *MYH6* e *MYH7*, duas cadeias leves essenciais, codificadas pelo gene *MYL3* e duas cadeias leves regulatórias codificadas pelo gene *MYL2* - e pela proteína C de ligação à miosina codificada pelo gene *MYBPC3* (Frank *et al.*, 2011) (Figura 4).

Os filamentos finos são compostos por actina cardíaca, codificada pelo gene *ACTC1*, α -tropomiosina codificada pelo gene *TPM1* e pelo complexo de troponinas - subunidades C, I e T, codificadas pelos genes *TNNC1*, *TNNI3* e *TNNT2* respectivamente (Figura 4) (Richard *et al.*, 2010).

Cada sarcómero contém uma banda A (compreendida entre a sobreposição de filamentos finos e espessos), com a linha M central (composta unicamente por filamentos espessos). A flancuar a banda A encontram-se as bandas I (compostas unicamente por filamentos finos) ligadas pela linha ou disco Z (Figura 5) (Fatkin *et al.*, 2012). Este é formado por uma série de proteínas (α -actinina, filamina, nebulina, teletonina e miotilina) cuja função é manter a organização dos miofilamentos através da ligação da titina aos filamentos finos do sarcómero (Figura 4) (Frank *et al.*, 2011).

O citoesqueleto sarcomérico, composto maioritariamente por titina é o suporte estrutural aos filamentos finos e grossos. A titina expande-se desde o disco Z até à linha M, contribui para o arranjo e organização do sarcómero e é um dos maiores determinantes das propriedades elásticas da miofibrila cardíaca (Sequeira *et al.*, 2013).

No músculo cardíaco existem duas isoformas de titina: a isoforma N2B e a isoforma N2BA. A titina N2B funciona como um impulsionador molecular para proporcionar elasticidade às miofibrilas e funciona como um sensor biomecânico gerado após alongamento, que também provoca uma resposta ao stress importante na fase inicial da hipertrofia cardíaca (Castro-Ferreira *et al.*, 2011)

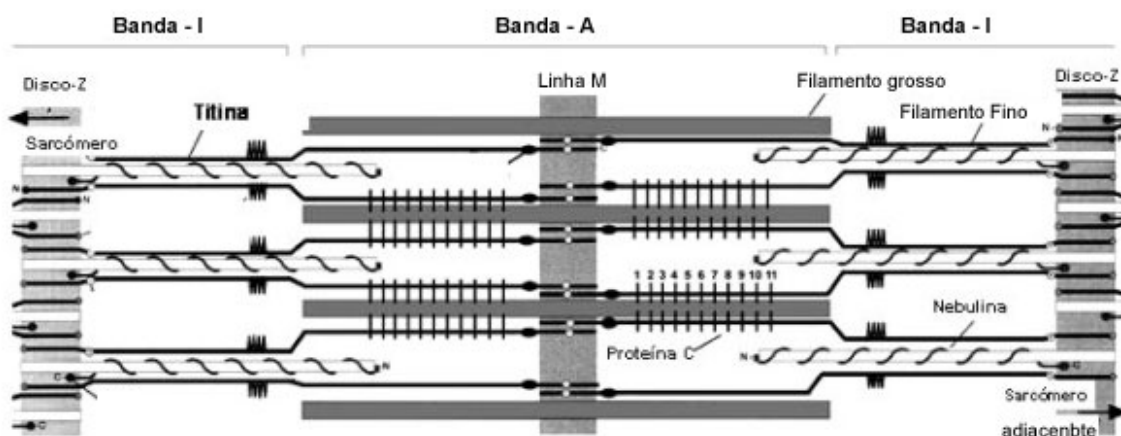


Figura 5- Representação esquemática de um sarcómero (Adaptado de Ramírez *et al.*, 2004)

1.5. Mecanismo de contração muscular cardíaco

As contrações musculares resultam do deslizamento entre os filamentos finos e grossos do sarcómero

Como referido anteriormente, o filamento grosso é composto por miosina, uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas pesadas e quatro leves. As duas cadeias pesadas possuem uma estrutura globular nas suas extremidades, denominada cabeça da miosina, formando uma dupla hélice deixando as cabeças livres na extremidade. As quatro cadeias leves localizam-se na cabeça da miosina, duas em cada cabeça (Morimoto *et al.*, 2007).

Nos filamentos finos, a actina é a molécula central, que quando polimerizada forma uma dupla hélice contendo os locais de ligação com a miosina. A α -tropomiosina liga-se ao filamento de actina bloqueando o local da interação actina/miosina. Por sua vez, o complexo de troponinas é composto pela troponina C (com afinidade ao cálcio), pela troponina T (que interage com a α -tropomiosina) e pela troponina I, proteína inibitória responsável por garantir o bloqueio da contração na ausência de cálcio (Jeong *et al.*, 2008).

Os filamentos de actina e miosina têm uma grande afinidade e ligam-se facilmente na presença de iões Cálcio (Ca^{2+}). O mecanismo de libertação do local de ligação actina/miosina começa com a entrada de iões Ca^{2+} no sarcómero. Estes ligam-se à troponina C, causando-lhe uma mudança conformacional que se reflete na molécula de α -tropomiosina, com a consequente libertação dos centros da actina que estavam bloqueados. A interação actina/miosina dá-se imediatamente desde que haja Adenosina Trifosfato (ATP) e Magnésio (Mg^{2+}) ambos presentes em condições normais (Rayment *et al.*, 2011).

A contração muscular ocorre pelo deslizamento dos filamentos finos sobre os grossos, encurtando o sarcómero. Quando o Ca^{2+} se liga à troponina C induz uma mudança conformacional no complexo de troponinas fazendo com que a troponina I e α -tropomiosina libertem o local de ligação actina/miosina, permitindo a interação entre estas duas moléculas. A ligação entre os filamentos ocorre formando uma ponte cruzada (*crossbridge*) e é gerada força (*power stroke*) como consequência da hidrólise de uma molécula de ATP que se liga à cabeça de miosina.

Com a hidrólise de ATP em Adenosina Difosfato (ADP) e Fosfato inorgânico (Pi), a cabeça de miosina solta-se do filamento de actina, e o sarcómero volta à sua posição original (Figura 6) (Rayment *et al.*, 2011)

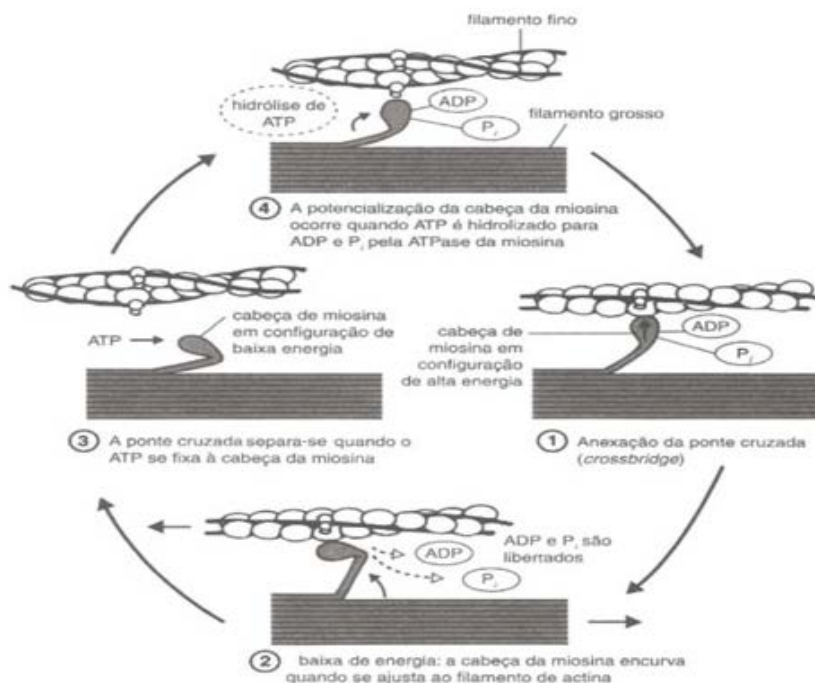


Figura 6- Representação entre a interação dos filamentos contráteis (Adaptado de Rayment *et al.*, 2011).

A hipertrofia cardíaca na MH é provocada principalmente por mutações em genes que codificam proteínas sarcoméricas, afectando a activação de várias vias de sinalização relacionadas com a função mecânica e eléctrica e com a geração de força. Estas mutações influenciam a estrutura das proteínas do sarcómero ou o seu nível de expressão, afectando as funções celulares e moleculares levando a perturbações na geração e transmissão de força, homeostase do Ca²⁺ intracelular e do metabolismo cardíaco (Frey *et al.*, 2012).

1.6. Tratamento

Todos os anos morrem aproximadamente 4% dos indivíduos com diagnóstico de MH. A terapêutica actual é orientada para o melhoramento dos sintomas e redução da resistência do coração durante os batimentos cardíacos, através da administração de beta-bloqueantes e de antagonistas dos canais de cálcio (Marian *et al.*, 2010). Nalguns casos pode haver intervenção cirúrgica eliminando parte do septo interventricular, mas

normalmente só ocorre em doentes que apresentem sintomas incapacitantes, como a dispneia e ortopneia, dor no peito e fadiga. Esta cirurgia melhora os sintomas, mas não reduz o risco de morte súbita (Maron *et al.*, 2012). A opção que tem tido mais sucesso é o implante de um desfibrilhador cardioversor (CDI), capaz de detectar arritmias graves e promovendo a proteção do doente através de estímulos elétricos (Ho *et al.*, 2012).

1.7. Genética na MH

A MH é uma doença genética com padrão de transmissão autossómico dominante sendo a maioria dos indivíduos afectados, heterozigóticos para as mutações causadoras da doença (Girolami *et al.*, 2010)

Nalguns casos podem co-existir duas ou mais mutações num mesmo indivíduo. Assim originam-se situações de heterozigotia composta (duas mutações no mesmo gene), dupla heterozigotia (duas mutações heterozigóticas em dois genes diferentes) ou homozigotia (a mesma mutação nos dois alelos do gene) (Girolami *et al.*, 2010).

A maioria das mutações descritas estão associadas a genes que codificam para proteínas sarcoméricas, com diferentes papéis no ciclo de contracção e relaxamento do músculo cardíaco e que contribuem para o equilíbrio energético do coração (Frey *et al.*, 2012). Foram identificadas mais de 1000 mutações patogénicas dispersas por mais de 50 genes associados a MH (Ho *et al.*, 2010), das quais 60% ocorrem em genes do sarcómero (Brito *et al.*, 2012), suspeitando-se que as restantes 40% ocorram noutros genes (Ho *et al.*, 2010). Já foram descritas alterações em genes que codificam para proteínas envolvidas na sinalização de cálcio e nas funções auxiliares ao sarcómero (Gazzerro *et al.*, 2010) (vd secção 1.7). Para além destas, também foram descritas mutações no genoma mitocondrial, relacionadas com alterações na fosforilação oxidativa mitocondrial (García-Díaz, 2012).

1.7.1. Novos genes potencialmente associados a MH

Diversos estudos contribuíram para a identificação de alterações genéticas directamente envolvidas na fisiopatologia de MH (genes de susceptibilidade) e de variantes genéticas que estão envolvidas na modificação da expressão fenotípica da doença (genes modificadores) (Perkins *et al.*, 2005). Os mais importantes parecem ser os genes envolvidos

no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS, do inglês Renin Angiotensin aldosterone system), tal como é o caso dos genes *ACE1* e do *AGTR1* .

É importante continuar a identificar estas alterações e compreender os seus efeitos nos processos envolvidos no sistema cardíaco e relacioná-los com a MH. Na tabela 1 encontram-se resumidas algumas características dos genes abordados nesta dissertação.

Tabela 1- Variações genéticas associadas à susceptibilidade ou à modificação da MH

Gene	Locus¹	Proteína	Função²	Algumas mutações associadas à MH¹	Doenças associadas¹
<i>ACTN2</i>	1q43	α -actinina 2	Componente do disco Z	T495M; E583A; E628Q; A119T; Q9Arg; S870S; IVS8+23 G>C; IVS7+34 G>A	MH MD
<i>AGTR1</i>	3q24	Receptor tipo 1 da angiotensina II	Receptor na via RAAS	A1166C	MH Degeneração tubular renal, hipertensão.
<i>ACE1</i>	17q23.3	Enzima conversora de angiotensina II	Conversão da Ang I em AngII no sistema RAAS	Repetição de sequência Alu de 287 pb	MH Hipertensão
<i>FHL1</i>	Xq26.3	Four and a half LIM domains	Desenvolvimento muscular	C209R	MH Distrofia muscular
<i>GLA</i>	Xq22.1	α -galactosidase	Processo catabólico glicosídeo	N139S; IVS4+919G>A	MH Doença de Fabry
<i>RAF1</i>	3p25.2	RAF proto-oncogene serina/treonina cinase	Processo de activação da actividade MAPKK	S257L ;T260I; S259A; P261S; L613V; D486N	MH Síndrome de Noonan e Leopard
<i>NEXN</i>	1p31.1	Nexilina	Manutenção do disco Z e integridade sarcómero	Q131E; R279C	MH MD
<i>TTR</i>	18q12.1	Transtirretina	Transporte	V122I; L111M; V30M	MH Amiloidose
<i>VCL</i>	10q22.2	Vinculina	Regulação da migração celular; Componente dos filamentos de actina.	R975W; L277M	MH MD

Legenda:¹Fonte: HGMD e Gene cards– Fevereiro de 2014; ²NCBI, Fevereiro de 2014

1.7.1.1. Gene ACTN2

O gene *ACTN2* codifica para a α -actinina 2, uma proteína de agregação da superfamília de espectrinas. A isoforma presente em ambos os músculos (esquelético e cardíaco) está localizada no disco Z dos sarcómeros e tem a função de ancorar os filamentos de actina a uma variedade de estruturas intracelulares, tendo assim um papel importante na manutenção da integridade estrutural do sarcómero (Jennifer *et al.*, 2010). Algumas mutações neste gene estão associadas a distrofias musculares, doenças neuromusculares, MD e mais recentemente a MH, muitas vezes causando morte súbita (Chiu *et al.*, 2010). Alguns exemplos de mutações descritas como associadas à MH são A119T, T495M, E583A, E628Q, que interferem nos locais de interação com outras proteínas, ou alteraram a sua configuração perdendo assim a sua afinidade com outras proteínas. (Jennifer *et al.*, 2010; Chiu *et al.*, 2010).

Tabela 2- Exemplos de variantes no gene *ACTN2* identificadas num estudo da população australiana com diagnóstico de MH (adap. Chiu *et al.*, 2010).

Variante	Frequência no grupo de MH (%)	Referência
IVS2+33 A>G	0,3	Nova ¹
Ala119Thr	0,3	Nova ¹
Asn126Asn	4,7	rs1341863 ²
IVS4+73 A>G	0,3	rs1341862 ²
Glu161Glu	9,8	Nova ¹
IVS5+10 C>T	0,3	Nova ¹
IVS7+34 G>A	23,9	rs819640 ²
Val235Val	0,3	rs2288599 ²
IVS8+23 G>A	34,7	rs2288600 ²
IVS9-48 G>C	0,3	Nova ¹
IVS9-42 C>T	0,3	Nova ¹
IVS9+41 C>T	1,7	Nova ¹
IVS10-42 C>T>G	16,5	rs7527525 ²
IVS10-8 G>C	9,4	rs2288601 ²
Arg328Gln	0,3	Nova ¹
Phe447Phe	0,3	rs34785693 ²
Thr495Met	0,7	Nova ¹
IVS13+48 T>C	5,7	Nova ¹
IVS13+62 A>G	1,3	rs10925211 ²
IVS15delTTG-28	1,0	Nova ¹

Legenda:1 Chiu *et al.*, 2010; ² *Ensembl Genome Browser*

Tabela 3- Exemplos de variantes no gene *ACTN2* identificadas num estudo da população australiana com diagnóstico de MH (adap. Chiu *et al.*, 2010) cont.

Variante	Frequência no grupo de MH (%)	Referência
Glu583Ala	0,3	Nova ¹
Glu628Gly	0,3	Nova ¹
Ala644Thr	0,3	Nova ¹
Thr713Thr	0,3	Nova ¹
IVS18-30 G>A	1,3	Nova ¹
IVS20+34 A>G	2,7	rs2282366 ²
Ser870Ser	33,3	rs12063382 ²

Legenda: ¹ Chiu *et al.*, 2010; ² *Ensembl Genome Browser*

1.7.1.2. Gene *FHL1*

O gene *FHL1*, do inglês *Four and a half LIM domains 1*, faz parte de uma família de genes com cinco membros identificados: *FHL1* e *FHL2* e *FHL3* e *FHL4* e *ACT*. A proteína codificada designa-se por FHL1 e localiza-se na zona de adesão focal dos núcleos dos mioblastos, estando envolvida no desenvolvimento e diferenciação dos sarcómeros, crescimento muscular e resposta ao stress mecânico (Shathasivam *et al.*, 2010).

Sabe-se que FHL1 tem uma ligação essencial entre o sensor de distensão muscular e a titina na via da proteína quinase activada por mitógenos, MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*) em resposta ao stress biomecânico (Figura 7) (Cowling *et al.*, 2011). A indução crescente deste tipo de stress tem mostrado que esta proteína desempenha um papel central na patofisiologia da MH e pode ser alvo de terapias (Knoblauch *et al.*, 2010).

A proteína FHL1 apresenta-se aumentada em corações de pacientes com MH, supondo-se assim que tenha um papel essencial na hipertrofia induzida por stress biomecânico cardíaco (Friedrich *et al.*, 2012). As mutações vulgarmente descritas no gene *FHL1* estão associadas à hipertrofia dos músculos esqueléticos, à MD e mais recentemente à MH, especificamente as mutações C153R e C224W (Knoblauch *et al.*, 2010).

Dado que a expressão diferencial de FHL1 pode ser detectada antes do início da doença e o seu aumento é continuado ao longo da doença, foi sugerido que FHL1 pudesse participar na transição de fases entre os fenótipos precoces e tardios, e, assim, contribuir para o desenvolvimento de miocardiopatia (Knoblauch *et al.*, 2010).

Em 2012, Friedrich e colaboradores identificaram novas variantes no gene FHL1: p.K45S e, p.C276S, em pacientes com MH. Os autores sugerem que estas variações estão associadas à produção de uma proteína alterada com consequências ao nível da hipertrofia cardíaca, da disfunção diastólica e/ou da contractilidade alterada, tornando a proteína FHL1 num potencial alvo terapêutico.

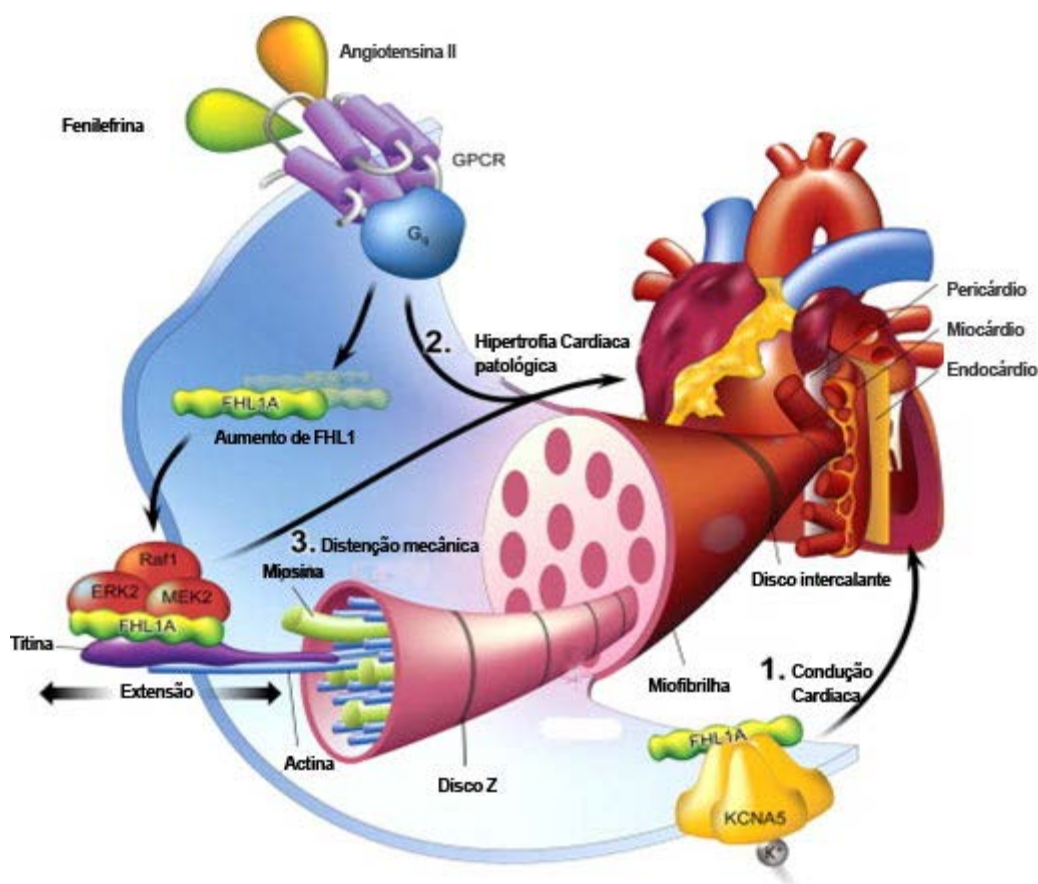


Figura 7- Representação do papel de FHL1 na sinalização no músculo cardíaco. (Adaptado de Cowling *et al.*, 2011).

Legenda: (1) FHL1 encontra-se associada ao canal de potássio KCNA5 do inglês potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5, para modular a condução cardíaca. (2) FHL1 regula a hipertrofia cardíaca através de componentes de ligação da via de sinalização MAPK (3) FHL1 desempenha um papel na distensão mecânica através de interação com a região elástica da titina N2B dentro do sarcómero.

1.7.1.3. Gene NEXN

Este gene codifica para a proteína nexilina, uma proteína de ligação à actina que está envolvida na regulação da migração da actina para o citoesqueleto. Tem um papel essencial na manutenção da estrutura e integridade do disco Z do sarcómero, nomeadamente quando são geradas forças dentro desta estrutura (Wang *et al*, 2010).

Mutações neste gene têm sido associadas com MD, e mais recentemente à MH e ao risco de morte súbita (Wang *et al*, 2010). Em indivíduos com MH familiar, foram identificadas duas mutações (Q131E e R279C, localizadas nos exões 5 e 8 respectivamente), em resíduos de aminoácidos (aa) altamente conservados e localizados em importantes domínios funcionais da nexilina, podendo alterar a sua capacidade de se ligar à actina ou interferir com outros componentes do sarcómero (Wang *et al*, 2010).

1.7.1.4. Gene VCL

O gene *VCL* codifica para a proteína vinculina, que faz parte do citoesqueleto, estando associada a junções célula-célula e célula-matriz, sendo uma das várias proteínas que interage na ancoragem da F-actina à membrana. É também importante na via de sinalização do crescimento vascular endotelial (Janssen *et al.*, 2012). No músculo cardíaco, a vinculina encontra-se localizada nos discos intercalares, onde interage com α -actinina, talina, e γ -actina de modo a formar uma rede de microfilamentos, ligando assim o citoesqueleto e o sarcoplasma (Janssen *et al.*, 2012).

Mutações no gene *VCL* começaram por ser associadas à MD, tendo sido posteriormente também associadas à MH (Vasile *et al.*, 2006).

Várias mutações associadas à MH foram descritas, tais como L277M, A934V, P943A (Thompson *et al.*, 2013) com especial ênfase para alteração R975W situada numa região altamente conservada do exão 19, originando uma isoforma, a metavinculina, causa alterações na organização dos discos intercalados (Janssen *et al.*, 2012). Apesar de não estarem totalmente esclarecidos os mecanismos de acção desta isoforma, estudos sugerem que contribuem para a insuficiência cardíaca (Thompson *et al.*, 2013; Janssen *et al.*, 2012).

1.7.1.5. Gene *AGTR1*

O gene *AGTR1* codifica para o receptor tipo I da angiotensina II, pertencente ao RAAS (<http://www.genecards.org>). Este receptor desempenha um papel importante na mediação dos efeitos da angiotensina II nas células cardiovasculares, renais, endócrinas e neurais, hepáticas, entre outras e na regulação da pressão sanguínea, por regulação da vasoconstrição e da vasodilatação, com efeitos major no sistema cardiovascular (Figura 8) (Li *et al.*, 2012).

Em geral, as mutações descritas neste gene estão associadas à hipertensão ou doenças renais, no entanto, um polimorfismo de nucleótido único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) 1166A>C na região 3'UTR do gene *AGTR1* foi associado a um aumento da massa ventricular esquerda sem hipertensão (Mauro *et al.*, 2010). Verificou-se que este SNP influencia a magnitude de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) em pacientes com MH, dado que esta foi significativamente mais elevada em pacientes portadores de genótipos com alelo C, 1166C, do que em indivíduos com o alelo A, 1166A (Zhang *et al.*, 2012). Deste modo foi proposto que o SNP 1166A>C pode modular a expressão fenotípica de hipertrofia em indivíduos com MH, nomeadamente nos portadores de mutações nos genes *MYBPC3* e *MYH7* (Kolder *et al.*, 2012). Verificou-se ainda que pacientes 1166C têm uma sensibilidade aumentada à Angiotensina II, Ang II, que, em combinação com o genótipo delecção/delecção *DD* do polimorfismo *ECA* inserção/delecção (*I/D*), pode conduzir a um aumento de risco cardiovascular (Tabei *et al.*, 2013). Assim, este SNP pode ser um modificador da extensão da hipertrofia em pacientes (Kolder *et al.*, 2012).

A região 3'UTR está envolvida no *slicing* dos microRNA que regulam negativamente a expressão do gene *AGTR1* (Martin *et al.*, 2007). Os portadores do alelo C têm alterações na ligação de microRNAs resultando no aumento da formação de matriz extracelular e de células de músculo liso, influenciando a migração e a oxidação de colesterol LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*) e a formação de espécies reactivas de oxigénio, eventualmente iniciando o processo de inflamação vascular (Rahimi *et al.*, 2012).

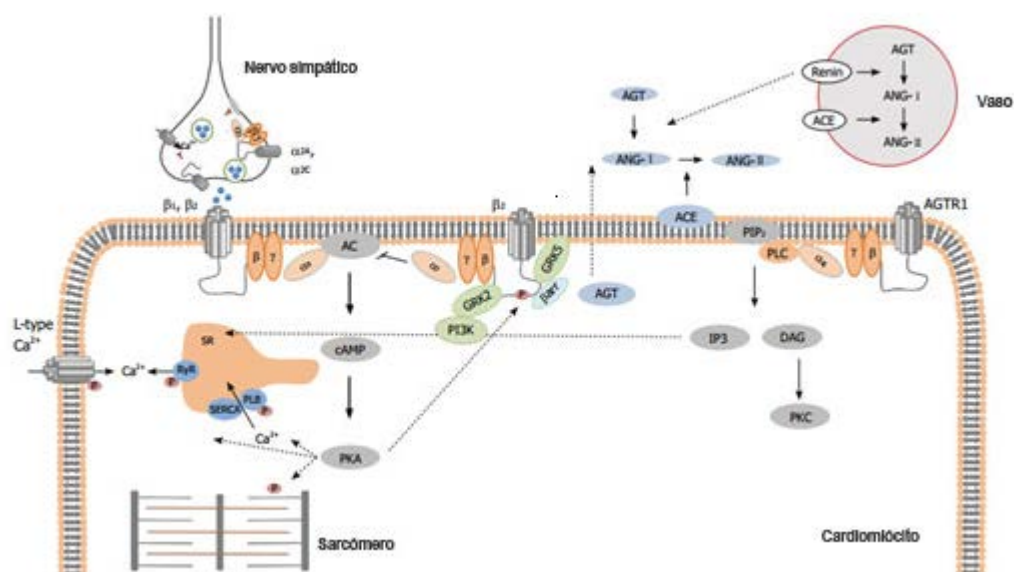


Figura 8- Representação esquemática do RAAS e dos genes envolvidos na insuficiência cardíaca.(Adaptado de Alves *et al.*, 2010).

Legenda: AC - Adenilil Ciclase; ACE - Enzima Conversora de Angiotensina; AGT - Angiotensinogénio; ANG - Angiotensina; cAMP - Adenosina Monofosfato Cíclica ; β Arr – β -arrestina; DAG - Diacilglicerol; CRK2 - Receptor de Quinase 2 acoplado à proteína G; GRK5 - Receptor de Quinase 2 acoplado à proteína G; IP3 - Inositol Trifostato; PI3K - Fosfoinositol 3-Quinase; PIP2 - Fosfatidilinositol Bifosfato 4,5 –bifosfato PKA - Proteína Cinase A; PKC - Proteína Cinase C, PLC - Pospolipase C; SR - Retículo Sarcoplasmático

1.7.1.6. Gene *ACE1*

O gene *ACE1* codifica para a enzima conversora de angiotensina (ECA). A proteína Ace faz parte do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), sendo responsável pela catálise da conversão de angiotensina I em angiotensina II (Kolder *et al.*, 2012). Estudos indicam que o alelo D (delecção), do polimorfismo I/D de uma sequência *Alu* de 287 pares de bases (pb) no intrão 16 do gene *ACE1* está associada a maiores concentrações de ECA e também com o aumento do fluxo sanguíneo levando ao aumento dos níveis de angiotensina II no organismo (Figura 9) (Osterop *et al.*, 2012). Este alelo está associado ao aumento da massa ventricular esquerda (Rahimi *et al.*, 2012).

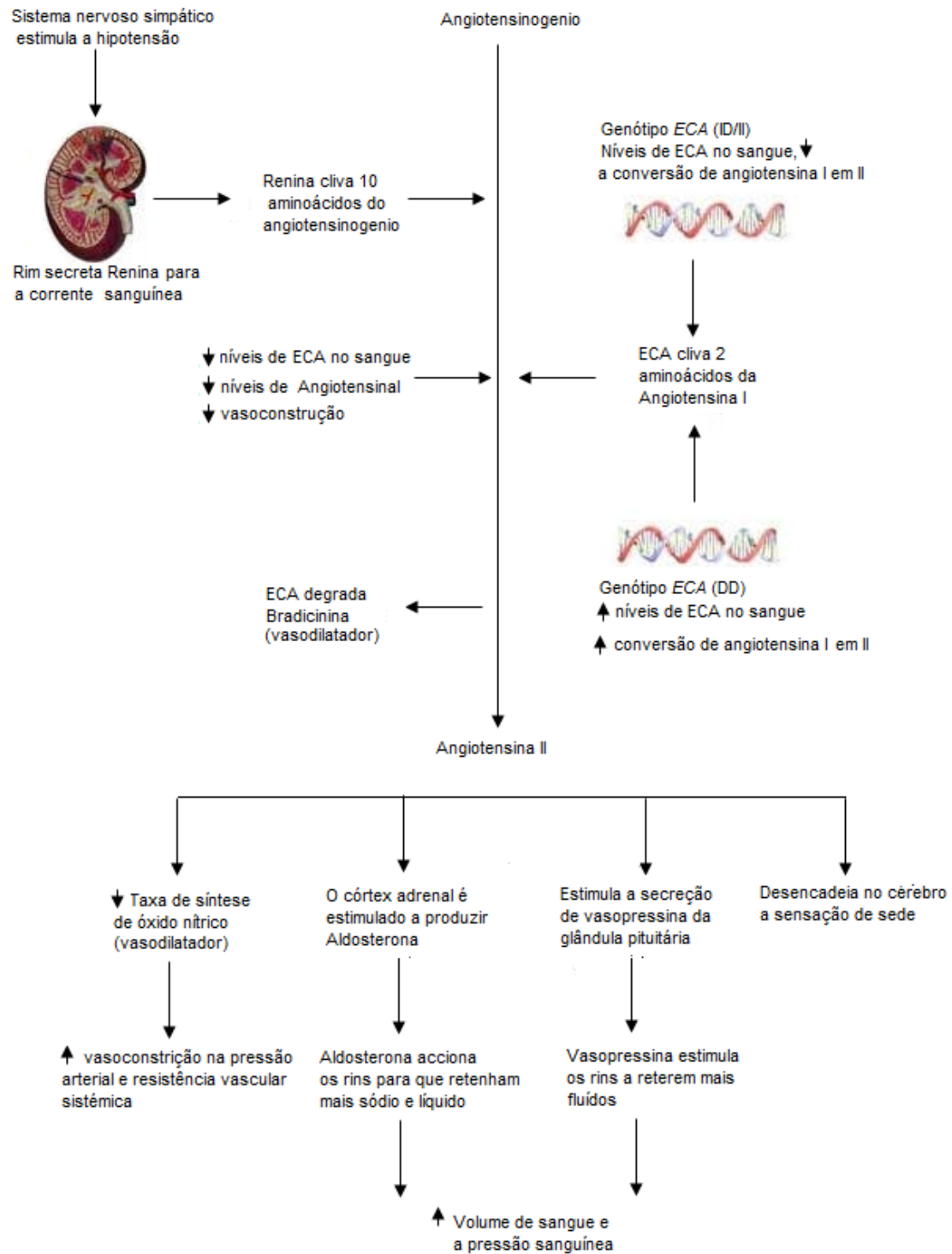


Figura 9- Efeito dos vários níveis de ECA no sistema sistema renina-angiotensina-aldosterona (adaptado de Mayne, 2006)

1.7.1.7. Gene *RAF1*

O gene *RAF1* codifica para a proteína RAF1, homólogo 1 do oncogene viral da leucemia em murganhos (v-raf 1), que se trata de uma proteína cinase envolvida no processo de activação da actividade da cinase da via MAPK (MAPKK), que actua, na regulação da proliferação celular, na regulação da apoptose e ainda no desenvolvimento do coração (Bruce *et al.*, 2011).

As mutações neste gene estão geralmente associadas às síndromes de Noonan e de LEOPARD (Bruce *et al.*, 2011), e muitos destes doentes têm também MH.

Em pacientes com MH foram identificadas alterações *missense* no gene *RAF1*, como por exemplo as alterações T260I, S257L ou P261S na proteína RAF-1 (Pandit *et al.*, 2007). Outras mutações neste gene foram encontradas em indivíduos com MH em associação com a síndrome de Noonan (S257L, P261S, S259F e S612T) e com a síndrome de LEOPARD (L613V) (Pandit *et al.*, 2007; Razzaque *et al.*, 2007).

1.7.1.8. Gene *GLA*

O gene *GLA* codifica para uma glicoproteína homodimérica α -galactosidase, importante no metabolismo dos carboidratos (Schiffmann *et al.*, 2013).

Muitas das alterações neste gene estão associadas à doença de Fabry (Havndrup *et al.*, 2010). Alguns estudos indicam que indivíduos do sexo masculino com a doença de Fabry têm um fenótipo de MH muito severo (Liu *et al.*, 2008). Mutações neste gene afectam a síntese, processamento e estabilidade da enzima α -galactosidase, havendo acumulação de metabolitos e consequentemente hipertrofia cardíaca, em associação com outros defeitos electrofisiológicos (Havndrup *et al.*, 2010). Não há padrões característicos para a diferenciação entre MH causada por mutações nos genes do sarcómero ou pelas mutações que causam a doença de Fabry. O despiste da doença de Fabry deve ser considerado como diagnóstico em pacientes com inexplicada hipertrofia cardíaca (Havndrup *et al.*, 2010). A mutação N139S encontra-se associada a casos de MH e interfere com uma região evolutivamente conservada da α -galactosidase, estando localizada no centro activo da enzima, sugerindo fortemente que possa ser causadora da patologia (Havndrup *et al.*, 2010). Outra alteração descrita em pacientes com MH encontra-se numa região intrónica IVS4+919G>A (Chien *et al.*, 2012).

1.7.1.9. Gene *TTR*

O gene *TTR* codifica para a proteína transtirretina, uma hormona de ligação à tiroide (<http://www.genecards.org>).

A transtirretina é uma proteína homotetramérica sintetizada principalmente no fígado, no cérebro, no epitélio pigmentado da retina e no pâncreas (Benson *et al.*, 2001). A maioria das mutações neste gene está relacionada com o depósito de amiloide, afectando o sistema nervoso periférico e o sistema cardíaco.

Em doentes com MH, susceptíveis de ter amiloidose cardíaca, foram identificadas várias mutações específicas no gene *TTR*, tais como a V122I, particularmente comum nos Afro-americanos e a mutação L111M, descrita numa família dinamarquesa (Schulze *et al.*, 2010). Também a mutação V30M, A45T bem caracterizada na população portuguesa (Saraiva *et al.*, 2001), está entre estas mutações, no entanto no estudo efectuado por Möner *et al.*, (Möner *et al.*, 2005) em doentes com MH, não foi identificada amiloidose cardíaca. O polimorfismo G6S no gene *TTR* apenas foi associado à MH (Rosenzweig *et al.*, 2009).

A análise de mutações no gene *TTR* deve ser considerada em casos que não são explicados por mutações em genes que codifiquem proteínas do sarcómero (Möner *et al.*, 2005).

1.8. Diagnóstico Genético de MH

Uma vez que a MH é uma doença hereditária, nos casos de indivíduos assintomáticos, o diagnóstico genético tem uma grande importância devido ao risco familiar de desenvolver a doença.

Actualmente, o método *gold standard* para o diagnóstico genético da MH é a sequenciação automatizada (SA). Contudo, apenas 5 genes sarcoméricos são analisados por rotina, deixando de fora o estudo dos restantes genes sarcoméricos e não sarcoméricos já associados ao desenvolvimento de MH (Millat *et al.*, 2010). Apesar dos avanços em termos de escala da técnica de SA nas últimas décadas, esta poderá não ser a tecnologia mais indicada para o estudo de uma patologia que envolve dezenas de genes e centenas de mutações, tornando o seu preço impraticável e o tempo muito moroso (Santos *et al.*, 2012). Consequentemente, várias outras técnicas com aplicação em larga escala para a detecção de mutações têm vindo a ser desenvolvidas (Millat *et al.*, 2010).

A análise por iPLEX MassArray e por NGS (do inglês *Next Generation Sequencing*) revela-se uma boa alternativa à SA no diagnóstico genético de MH, uma vez que permite a análise de várias amostras em simultâneo, para um elevado número de mutações, num único ensaio, com uma maior rentabilidade de tempo e recursos (Santos *et al.*, 2011).

A técnica iPLEX MassArray tem como princípio a amplificação por PCR multiplex seguida da reação de plex, onde ocorre a extensão da região em análise resultando em produtos de extensão com diferentes massas, possibilitando assim a análise por MALDI-TOF.

No entanto a técnica de iPLEX MassArray não permite a detecção de novas mutações, devendo aplicar-se uma técnica de rastreio de mutações em larga escala como é exemplo de desnaturação de alta resolução (HRM, do inglês *High Resolution Melting*) (Santos *et al.*, 2011).

A tecnologia de NGS tem como princípio a sequenciação paralela de múltiplos fragmentos de DNA amplificados por técnicas tais como *bridge amplification* ou PCR em emulsão após a construção da biblioteca de DNA. Tipicamente a construção de uma biblioteca de DNA convencional baseia-se em 4 passos: fragmentação do DNA; reparação das extremidades dos fragmentos; ligação das sequências adaptadoras e amplificação selectiva da biblioteca (www.illumina.com).

No caso da análise genética para a MH pode ser aplicado o método *Targeted Resequencing* que permite a sequenciação de várias regiões específicas do genoma ou apenas um subconjunto de genes, possibilitando também sequenciar várias amostras em simultâneo (Meder *et al.*, 2011).

1.9. High Resolution Melting

Desde a sua introdução em 1997, o HRM, é uma técnica usada no rastreio de variações genéticas em genes causadores de doenças, tais como a fibrose quística, fenilcetonúria ou cancro da mama para além da MH (Santos *et al.*, 2012). Adicionalmente à detecção de mutações, a técnica de HRM tem sido aplicada para a detecção de SNP ou análise do estado de metilação de DNA (Santos *et al.*, 2012).

Esta técnica depende das propriedades diferenciais de desnaturação dos fragmentos de DNA. No procedimento experimental, as amostras de DNA em cadeia dupla são inicialmente amplificadas por PCR, tendo a particularidade de se incluir na mistura de amplificação um fluoróforo intercalante e saturante do DNA em cadeia dupla. O produto de

amplificação resultante é rapidamente desnaturado e renaturado, permitindo a formação de duplexes. Se a amostra for heterozigótica formam-se quatro duplexes: dois homoduplexes (híbridos perfeitamente complementares) e dois heteroduplexes (híbridos não totalmente complementares) (Reed *et al.*, 2007). Após a formação dos duplexes de DNA, estes são sujeitos a um aumento constante da temperatura até ocorrer a desnaturação total da dupla cadeia de DNA. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência diminui, reflectindo a passagem das amostras de cadeia dupla para cadeia simples (Reed *et al.*, 2007). Esta desnaturação dá-se a uma determinada temperatura, a temperatura de *melting* (T_m , do inglês *melting* temperature) característica de cada amplicão e dependente do seu conteúdo em GC (guanina+citosina), comprimento e sequência nucleotídica (Reed *et al.*, 2007). Assim, a intensidade relativa da fluorescência de uma amostra de DNA reflete o somatório das T_m de cada cadeia de DNA que a compõe, devido aos diferentes ritmos de desnaturação dos homoduplexes e heteroduplexes (Figura 10). Por fim as curvas de *melting* são analisadas com o *software* adequado como por exemplo *LightCycler 480® Software versão 1.5.0.39 SP3*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Deste modo, quando estes dados são transpostos para um gráfico representativo das curvas de desnaturação, em que a intensidade relativa da fluorescência está representada em função da temperatura, a forma da curva de desnaturação de uma amostra homozigótica será diferente da de uma amostra heterozigótica. Como os heteroduplexes são menos estáveis que os homoduplexes, desnaturam mais rapidamente, influenciando a curva de desnaturação da amostra (Figuras 10 e 11).

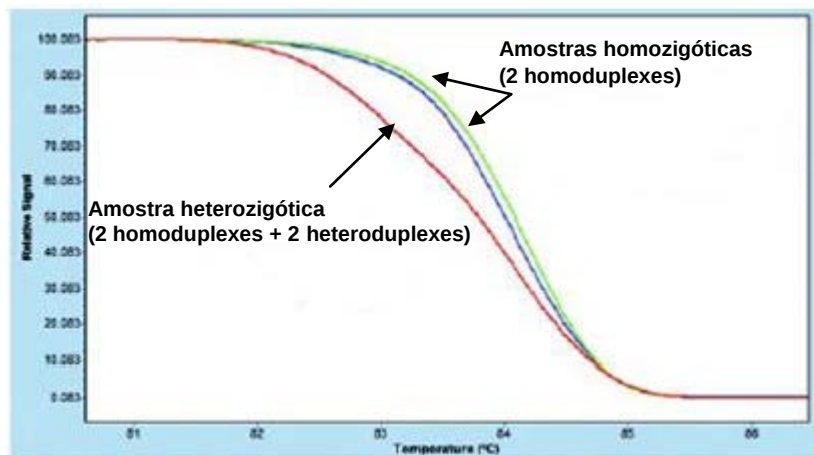


Figura 10- Exemplo de um gráfico de curvas de desnaturação (Adaptado de Roche Diagnostics).

Legenda: Nas amostras heterozigóticas (a vermelho) a forma da curva de desnaturação muda, dado que esta é um compósito dos componentes homoduplexes e heteroduplexes.

As curvas de desnaturação devem depois ser normalizadas de modo a uniformizar todos os dados. De seguida, às curvas normalizadas, é aplicado um desvio (*shift*) ao longo do eixo da temperatura para igualar o ponto em que todas as amostras de DNA em cadeia dupla desnaturam completamente. Por fim, estas curvas normalizadas e *shifted* são subtraídas a uma curva de referência de modo a que as diferenças nas curvas de desnaturação sejam mais claras. Como resultado, obtém-se um gráfico diferencial (*difference plot*) em que as amostras são agrupadas de acordo com perfis de desnaturação semelhantes (Figura 11).

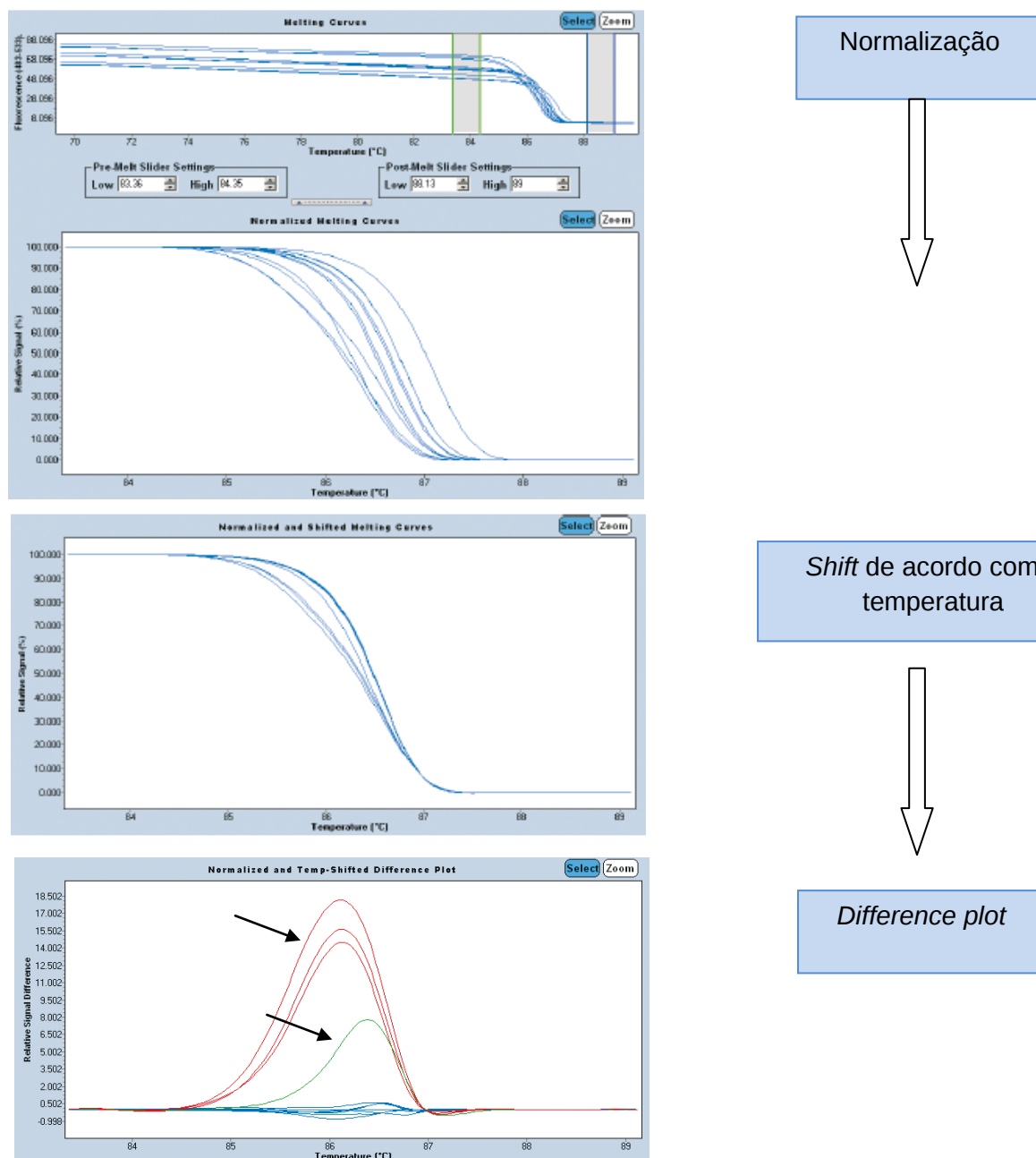


Figura 11- Etapas de análise até à obtenção do *difference plot*.

Legenda: A diferença relativa do sinal de fluorescência das amostras encontra-se em função da temperatura. As setas pretas assinalam exemplos de perfis de desnaturação que podem ser considerados anómalos

Para cada região genómica, as amostras de DNA em análise são comparadas com amostras *wild type* e consideram-se alteradas quando apresentam um perfil de desnaturação diferente (Roche Diagnostics, www.roche-appliedscience.com). No entanto, a técnica de HRM indica apenas se a amostra em estudo é ou não diferente em relação à amostra *wild type* para uma dada região de DNA (Shih *et al.*, 2010). Para determinar exactamente qual a alteração nucleotídica responsável pela alteração no perfil de desnaturação, a técnica de HRM terá de ser aliada à (SA) (Tindall *et al.*, 2009). Desta forma,

sequenciam-se apenas os amplicões que apresentaram alterações, sendo possível a análise de um elevado número de amostras de forma rápida, precisa e muito mais económica (Santos *et al.*, 2012).

Com aproximadamente 100% de sensibilidade e especificidade (Taylor, 2009; Takano *et al.*, 2008) a técnica de HRM é feita inteiramente em tubo fechado, tornando-a uma técnica de fácil aplicação, diminuindo o risco de erros laboratoriais e eliminando a utilização de substâncias nocivas, ao contrário de outras técnicas como SSCP (do inglês *Single Strand Conformational Polymorphism*), DGGE (do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ou dHPLC (do inglês *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*) que requerem a separação das amostras em gel ou noutra matriz, e podem envolver no seu tratamento reacções enzimáticas ou químicas (Taylor *et al.*, 2009).

1.10. Objectivos do Trabalho

O principal objectivo deste trabalho é contribuir para a caracterização da população portuguesa em relação a esta patologia cardíaca, estudando novos genes associados à MH aplicando a técnica de HRM como método de análise das amostras. Foi analisado um conjunto de 58 indivíduos - 39 indivíduos com diagnóstico de MH, 9 dos quais atletas de alta competição e 19 jovens atletas sem diagnóstico de MH-, de modo a poder estabelecer uma associação entre as possíveis alterações encontradas e a doença. A importância de estudar este sector populacional deve-se ao facto de este ser um grupo de risco para eventos de morte súbita cardíaca, tão característicos da MH. Para a aplicação da técnica de HRM na análise dos novos genes associados à MH, foi necessário desenhar *primers* e otimizar as condições reacionais.

O grupo de investigação no qual este trabalho se insere, tem vindo a dedicar-se à aplicação de várias técnicas, nomeadamente o HRM para a genotipagem de pacientes portugueses sendo já analisados cerca de 30 genes tanto sarcoméricos como não sarcoméricos, nos quais já foram identificadas mutações causadoras ou modificadoras da patologia. Contudo nalguns indivíduos não foram detectadas quaisquer mutações nesses genes, por esse motivo, a sua análise foi incluída neste trabalho, fazendo parte dos 58 indivíduos analisados.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1. Amostragem

Para este estudo foram analisados um total de 58 indivíduos, dos quais, 39 são pacientes com MH, 9 deles atletas de alta competição e os restantes 19, são atletas de alta competição, saudáveis (Apêndice I). Como controlos saudáveis, foram usados indivíduos sem qualquer suspeita ou história familiar de MH ou doença cardiovascular

Foram usadas amostras de sangue periférico, conservadas em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e todos os indivíduos assinaram um formulário de consentimento informado autorizando a análise genética.

2.2. Extracção e Quantificação de DNA

Para a extracção de DNA a partir de sangue total utilizou-se o kit *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) segundo as instruções do fabricante (protocolo versão 16.0, Dez 2008) (Anexo I).

O DNA foi posteriormente quantificado por espectrofotometria no NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), tendo como base a equação de Lambert-Beer: (Henry, 2001).

$$A = C \cdot \epsilon \cdot b$$

C = concentração de ácido nucleico em ng/μL

A = absorvância

ϵ = Coeficiente de extinção molar ($\mu\text{L} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), no caso de DNA de dupla cadeia é de $50 \mu\text{L} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (manual de utilização do NanoDrop *ND 1000*).

b = percurso óptico em cm

A pureza do DNA extraído foi calculada a partir das razões 260/280 e 260/230, em que a primeira representa contaminações do DNA por proteínas e RNA enquanto a segunda razão representa a contaminação por solventes orgânicos. Quando ambas as razões são

1,8 considera-se o DNA puro. Consideramos puras as amostras cujos valores se encontravam 1,8 e 2,0 (www.nanodrop.com).

A integridade do DNA foi avaliada através de electroforese unidimensional em gel de agarose (Bioline, London, UK) a 0,8% peso/volume (p/v) contendo 2 µL de *GelRed* (Biotium, Hayward, California) (concentração inicial 10000x; 500 µL) por cada 100 mL de gel, durante 1 hora (h) a 110V (volts).

A posterior visualização dos ácidos nucleicos foi efectuada através de um transiluminador (UVI TEC, Cambridge, UK), acoplado a máquina fotográfica *Kodak* (AlphaDigiDoc, Alpha Innotech) com aquisição de imagem através do *software AlphEaseFC* (AlphaDigiDoc 1000, Alpha Innotech). Para a identificação dos pesos moleculares das amostras em gel de agarose, utilizou-se o marcador de pesos moleculares *Hyperladder IV* (Bioline, London, UK) (apêndice IV)

Todas as amostras de DNA foram diluídas para uma concentração final de 10ng/µL, de forma a manter uma concentração homogênea entre todas as amostras.

2.3. Desenho de *primers*

Foram desenhados *primers* para amplificação por PCR das regiões codificantes dos genes *ACTN2* (NM_001103), *AGTR1* (NM_000685), *FHL1* (NM_001159702), *GLA* (NM_000169), *NEXN* (NM_144573); *RAF1* (NM_002880), *TTR* (NM_000371), *VCL* (NM_014000) de acordo com as especificações para aplicação em HRM (<http://www.genequantification.de/LC480-Technical-Note-01-HRM.pdf>). Os *primers* foram desenhados considerando a localização das mutações anteriormente descritas e de forma a abranger tanto as regiões codificantes como as regiões fronteira exão-intrão. No desenho dos *primers* teve-se em consideração que o dimensão dos amplicões não deveria ser superior a 400 pb, idealmente <250pb de forma a assegurar uma boa eficiência das reacções de HRM. Além de que quanto maior for o amplicão, mais difícil é a detecção de diferenças entre as amostras (*LightCycler® 480 Real-Time PCR System Technical Note No. 1 High Resolution Melting: Optimization Strategies*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

Para a construção dos *primers* foram utilizadas as ferramentas bio-informáticas: *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>) para pesquisa de sequências das regiões alvo; HGMD (<http://www.hgmd.org/>) para pesquisa de mutações descritas nos genes-alvo; Primer-BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e Primer 3 v.0.4.0

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para construção dos *primers* e garantir a sua especificidade com a região alvo; DINAMelt (<http://mfold.rna.albany.edu>) para análise da estrutura secundária e das propriedades termodinâmicas, de forma a teoricamente prever e reduzir a formação de dímeros de *primers* e produtos inespecíficos.

Os *primers* seleccionados (Tabela 3) foram sintetizados e purificados por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), na Metabion (Alemanha).

Tabela 3- Primers usados em HRM em LightCycler 480®

Gene	Exão	Dimensão do amplificação pb)	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'
ACTN2	7	165	CAGGATGACCCCATAGGAAA	TTGCAAGGTCCCAATGTGTA
	8	239	CCCTGGTTTCTCTCCTTCGTCTG	CACACTCAAGTATGCACACACAA
	13	196	GTTCAATTTCTCTCATCATCTGGG	CATGTCAACAAGTGGCTTCAATAC
	15	259	CCACTTGTGTCTCGGGTGTA	CGACGTCAGCTTCAAGAAATG
	16	236	AGCTGGCCTCTAACCCTTGT	GCTGGCTTACCTCCATCTTG
	21(1)	242	GTATTTTTTCCCAGCCATACATCC	CCAGGAAACAACTGTGACTTCCG
AGTR1	3	194	TGAGGTTGAGTGACATGTTCTG	TTGCAAAAAGGAAAGAAAAGC
FHL1	6	250	GGTTGTTGAATCTGAATCCGGTG	CTGGCAGACTTAGCAAGGACTC
GLA	1(1)	162	GCCCAGGTTACCCGCGGAAAT	CGTCCTTGCCAATCCATTGT
	1(2)	155	ACTGGACAATGGATTGGCAAG	CACACCCAAACACATGGAAA
	3(1)	204	CAGCCTGGAATGGTTCTCTC	TACTCCCCAGTCAGCAAAGG
	3(2)	153	CTACGACATTGATGCCGAGA	GCTACCATGGCCTCAAAGTTCT
	4	199	CCCTTATTTTACCCATTGTTTCTC	GGAGACCTTGGTTTCCTTTGTTG
NEXN	5	250	GTAAGAAGCTTGAGGGGTAAATAG	ATACGAACTTAATCTTCAGTGATAC
RAF1	7	250	GAGAGCATTCTTGGGCTTTGTTTCAG	GCTGGCTTCTCCTCCTCCCTGG
TTR	2	219	GGGAAGCTCATTAATTGTCGAC	GTCCTGTGGGAGGGTTCTTTGG
	3	311	GTTGAGGGGAAATGTTCAACA	CCTGGAATGCCAAAAGCAAAAACC
VCL	19	323	CACTGTATCTTTGCTTCCCTC	CAGCCTCTTCCCCGAGTA

2.4. Optimização das Condições Reacionais para Amplificação das regiões genómicas seleccionadas

As condições reacionais, para amplificar por PCR as regiões genómicas seleccionadas, foram optimizadas usando o termociclador *LightCycler 480®* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), usando para o efeito o DNA extraído de sangue de indivíduos saudáveis sem indicações de patologia ou história familiar de MH. As regiões codificantes dos genes *ACTN2*, *AGTR1*, *FHL1*, *GLA*, *NEXN*, *RAF1*, *TTR* e *VCL* destas amostras foram sequenciadas anteriormente na empresa StabVida de modo a identificar

potenciais alterações genéticas, para se poder utilizar posteriormente estas regiões como controlos negativos de mutações (sempre que não apresentassem qualquer polimorfismo ou mutação) e designadas daqui em diante de amostras referência. Este equipamento permite fazer em reacção única o passo de PCR e posterior HRM. Para tal utilizou-se o kit *High Resolution Melting Master* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), que contém uma mistura reaccional que integra a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (1U), os dNTPs (200 µM), o tampão de PCR (1x) e o fluoróforo intercalante de DNA em cadeia dupla, *Resolight Dye*, sendo apenas necessário ajustar a concentração correcta de cloreto de magnésio (MgCl₂) e de *primer* (concentrações que variaram entre 2 e 4mM, e entre 0,2 e 0,5 µM, respectivamente). Em todas as reacções foi utilizada uma concentração fixa de 2ng/uL de DNA. O volume reaccional foi ajustado com água até perfazer um volume total de 10 µL.

As reacções foram efectuadas em placas de 96 poços (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). O programa de PCR-HRM encontra-se descrito na tabela 4. Sumariamente, as amostras foram submetidas a um passo inicial de PCR, com temperatura de *annealing* variáveis, e, seguidamente foram sujeitas ao passo de HRM para a formação de duplexes de DNA e a sua consequente desnaturação. Os picos de desnaturação foram gerados através do software de análise *LightCycler 480® Software versão 1.5.0.39 SP3* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), e validados quando apresentavam um único pico de desnaturação específico. Os produtos de PCR-HRM obtidos foram analisados através de electroforese unidimensional em gel de agarose a 2% (p/v) utilizando o *Hyperladder IV* (Bioline, London, UK) como marcador de pesos moleculares. As condições de amplificação foram consideradas optimizadas sempre que fosse obtida uma banda única de dimensão correspondente ao amplicão.

Tabela 4- Condições Reaccionais Aplicadas em LightCycler 480®

Gene	Exão	Dimensão do amplificação (pb)	[Primer] (μM)	[MgCl ₂] (mM)	Ta (°C)	Touch-down	Tm HRM
ACTN2	7	165	0,5	3	56		80
	8	239	0,5	2,5	56		86
	13	196	0,2	2,5	57	Aplicado	84
	15	259	0,5	2,5	55		89
	16	236	0,5	2,5	56		89
	21(1)	242	0,2	2,5	57	Aplicado	90
AGTR1	3	194	0,5	2,5	55		80
FHL1	6	260	0,5	2,5	55		87
GLA	1(1)	162	0,5	2,5	55		88
	1(2)	155	0,3	2,5	57	Aplicado	86
	3(1)	204	0,5	3	56		83
	3(2)	153	0,5	2,5	56		80
	4	199	0,5	2,5	55		82
NEXN	5	250	0,5	2,5	57	Aplicado	81
RAF1	17	250	0,4	2	58		87
TTR	2	219	0,2	2,5	57	Aplicado	86
	3	311	0,5	2	55	Aplicado	83
VCL	19	323	0,5	2	59		88

2.5. Rastreio de alterações por HRM

As condições reaccionais foram aplicadas para o rastreio de alterações por HRM nos indivíduos em estudo. Foram utilizados como controlo negativo indivíduos saudáveis sem qualquer suspeita ou história familiar de MH (amostras referência) e água em vez de DNA na amplificação como controlo negativo de contaminação.

O rastreio de mutações envolveu a análise de 14 regiões genómicas em 7 genes de interesse. Para tal, foi utilizado o kit *LightCycler 480® High Resolution Melting Master*, contendo o fluoróforo *Resolight Dye* e a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) como descrito anteriormente. Para cada exão aplicaram-se as condições reaccionais descritas na tabela 4.

Os resultados do HRM na análise das amostras foram obtidos com o *software LightCycler 480® Software versão 1.5.0.39 SP3* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

De forma a uniformizar o grupo de amostras em cada análise foram excluídas todas as amostras com amplificação posterior ao ciclo 30, pois, segundo o fabricante, indica que o DNA não está em concentração suficiente, podendo gerar perfis de desnaturação pouco fiáveis e induzir erros na análise, sendo repetidas posteriormente (*Introduction to High Resolution Melt Analysis*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

As curvas de desnaturação obtidas foram posteriormente normalizadas em função da temperatura. De modo a que as amostras fossem directamente comparáveis, a normalização foi representada utilizando como linha de base a variação de fluorescência das curvas para as amostras consideradas normais em função da temperatura (*difference plot*). Assim, foi possível identificar perfis de desnaturação distintos entre as amostras referência e os indivíduos em estudo.

Um amplicão foi considerado como potencialmente alterado sempre que cumprisse três requisitos: apresentar uma curva de desnaturação com uma forma diferente da curva de desnaturação dos controlos; ser colocado pelo *software* de análise num grupo de amostras separado dos controlos e apresentar um valor de diferença relativa fora dos limites de normalidade, considerado entre +2 e – 2.

2.6. Sequenciação Automatizada (SA)

A técnica de SA foi utilizada não só para a validação das amostras a serem utilizadas como referência neste estudo mas também para a identificação das alterações nucleotídicas subjacentes aos produtos de amplificação que apresentaram perfis de desnaturação alterados identificados por HRM nas amostras em estudo.

A região de DNA a ser sequenciada foi amplificada num termociclador (Multigene Gradient, Labnet International, NJ, USA) usando a enzima *Biotaq red DNA polymerase* (Bioline, London, UK). Em cada reacção foram utilizados 4ng de DNA genómico num volume reaccional final de 60µL. A concentração de *primer* utilizada em cada reacção foi de 1,2 µM, e a concentração de Mg²⁺ variou entre 3 e 6 mM. A temperatura de *annealing* variou entre 55 e 59 °C, usando o programa de PCR indicado na tabela 5.

Tabela 5- Programa de PCR utilizado para a amplificação das regiões genómicas a sequenciar.

	Nº de ciclos	Tempo	Temperatura(°C)
Desnaturação inicial	1x	10 min	95
Desnaturação	35x	30 seg.	95
Annealing¹		45 seg.	55– 59
Extensão		45 seg.	72
Extensão final	1x	5 min.	72
Arrefecimento	1x	∞	4

Legenda: 1De acordo com as condições previamente optimizadas para cada amplicão (tabela 4)

Para confirmar a presença do amplicão pretendido, todos os produtos de PCR foram sujeitos a electroforese unidimensional em gel de agarose a 2% (p/v) como descrito *vd* secção 2.2)

Os produtos de PCR foram directamente purificados usando o *kit Jetquick PCR Product Purification Spin* (Genomed GmbH, Löhne, 21 de Abril de 2010) ou, quando necessário, usando o *kit Jetquick, gel extraction spin kit* (Genomed GmbH, Löhne, 21 de Abril de 2010) seguindo sempre as instruções do fabricante (Anexo II e III). Neste último caso, as amostras foram previamente sujeitas a nova electroforese unidimensional a 4% (p/v) de agarose seguindo a metodologia anteriormente descrita, sendo a banda pretendida excisada do gel e purificada.

A SA foi realizada na empresa Stabvida.

A análise dos cromatogramas foi realizada com recurso ao programa de utilização livre *Finch TV version 1.4.0* (Geospiza Inc., 2004-2006 Seattle, EUA). As sequências de DNA dos amplicões foram alinhadas com a sequência *wild type* do genoma Humano através do *software* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permitindo assim a identificação das alterações nucleotídicas detectadas por HRM.

2.7. Determinação do polimorfismo (I/D) no gene ACE1.

O polimorfismo (I/D) localiza-se no intrão 16 do gene *ACE1*, (Osterop *et al.*, 2012), de forma a amplificar esta região, realizou-se uma reacção de PCR, com as condições descritas nas tabelas 6 e 7.

Os *primers* usados (forward 5'-ctggagagccactcccatccttct-3' e Reverse 5'-GACGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3') formaram amplicões de 479 pb no caso do alelo I (inserção) e 192 pb no caso do alelo D (delecção).

O produto de PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose de 2% (p/v), 100 Volts durante 60 minutos e a visualização realizada tal como descrito anteriormente (vd secção 2.2).

Tabela 6- Condições Reaccionais Aplicadas em PCR para a determinação do polimorfismo (I/D) do gene *ACE1*

	Nº de ciclos	Tempo	Temperatura(°C)
Desnaturação inicial	1x	3 min.	94
Desnaturação	35x	45 seg.	94
Annealing		45 seg.	59
Extensão		45 seg.	72
Extensão final	1x	7 min.	72
Arrefecimento	1x	∞	4

Tabela 7- Programa de PCR utilizado para a amplificação da região genómica do gene *ACE1*

	Nº de ciclos	Tempo	Temperatura(°C)
Desnaturação	1x	3 min.	94
Annealing	35x	45 seg.	94
Extensão		45 seg.	59
Extensão final		1 min.	72
Arrefecimento	1x	∞	4

Capítulo 3

Apresentação de resultados e discussão

3.1. Selecção das amostras em estudo

Na tabela 8 encontram-se os grupos seleccionados para o estudo de novos genes directamente associados à fisiopatologia ou envolvidos na modificação da MH. De um total de 58 indivíduos, divididos em dois grupos: os indivíduos com diagnóstico de MH- 39 amostras, 9 deles, atletas de alta competição e as restantes 19 amostras são indivíduos saudáveis, atletas de alta competição (Tabela 8). Estes indivíduos foram seleccionados por serem um grupo de risco para morte súbita associada à MH.

Tabela 8- Grupos de amostras em estudo

Grupos Estudados	Nº de Indivíduos
Doentes MH	39
Saudáveis	19
Total	58

3.2. Desenho de *primers* e optimização da Técnica de HRM

A aplicação da técnica de HRM ao diagnóstico de MH exigiu o planeamento e desenvolvimento de todas as condições dos ensaios experimentais. Estas recaíram na escolha do melhor par de *primers*, na uniformização do método de preparação das amostras, na optimização das condições reaccionais, em particular das condições de amplificação e na aplicação do melhor método de tratamento e análise dos resultados.

Foram desenhados 14 pares de *primers* apresentados na Tabela 9, com recurso a várias ferramentas bioinformáticas descritas anteriormente (vd secção 2.3) para amplificação de exões específicos (incluindo regiões intrónicas) em diferentes genes (Figura 12 (A)). Os genes foram seleccionados pela sua relação com a MH e pelo seu interesse nos estudos já efectuados pelo grupo de trabalho em que se insere este projecto.(Chiu *et al.*, 2010; Friedrich *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2013; Kolder *et al.*, 2012; Osterop *et al.*, 2012; Bruce *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 2010).

Assim, para o gene *ACTN2* (NM_001103) seleccionaram-se *primers* para os exões 7, 8, 13, 15, 16 e 21 para o gene *AGTR1* (NM_000685) o exão 3: para o gene *FHL1* (NM_001159702) exão 6; para o gene *GLA* (NM_000169) exões 1,3 e 4; *NEXN* (NM_144573) exão 5 para o gene *RAF1* (NM_002880) exão 7; para o gene *TTR*

(NM_000371) os exões 2 e 3 e finalmente para o gene *VCL* (NM_014000) o exão 19 (Tabela 10).

Tabela 9- Primers seleccionados para a análise em HRM

Gene	Exão	Dimensão do amplicão (pb)	Primer forward 5'→3'	Primer reverse 5'→3'
<i>ACTN2</i>	7	165	CAGGATGACCCCATAGGAAA	TTGCAAGGTCCCAATGTGTA
	8	239	CCCTGGTTTCTCTCCTTCGTCTG	CACACTCAAGTATGCACACACAA
	13	196	GTTCATTTTCTCTCATCATCTGGG	CATGTCAACAAGTGGCTTCAATAC
	15	259	CCACTTGTGTCTCGGGTGTA	CGACGTCAGCTTCAAGAATG
	16	236	AGCTGGCCTCTAACCCTTGT	GCTGGCTTACCTCCATCTTG
	21(1)	242	GTATTTTTCCAGCCATACATCC	CCAGGAAACAACTGTGACTTCCG
<i>AGTR1</i>	3	194	TGAGGTTGAGTGACATGTTG	TTGCAAAAGGAAAGAAAAGC
<i>FHL1</i>	6	250	GGTTGTTGAATCTGAATCCGGTG	CTGGCAGACTTAGCAAGGACTC
<i>GLA</i>	1(1)	162	GCCCAGGTTACCCGCGGAAAT	CGTCCTTGCCAATCCATTGT
	1(2)	155	ACTGGACAATGGATTGGCAAG	CACACCCAAACACATGGAAA
	3(1)	204	CAGCCTGGAATGGTTCTCTC	TACTCCCCAGTCAGCAAAGG
	3(2)	153	CTACGACATTGATGCCGAGA	GCTACCATGGCCTCAAAGTTCT
	4	199	CCCTTATTTACCCATTGTTTCTC	GGAGACCTTGGTTTCCTTTGTTG
<i>NEXN</i>	5	250	GTAAGAAGCTTGAGGGGTAAATAG	ATACGAACCTAATCTTCAGTGATAC
<i>AF1</i>	17	250	GAGAGCATCTTGGGCTTTGTTTCAG	GCTGGCTTCTCCTCCTCCCTGG
<i>TTR</i>	2	219	GGGAAGCTCATTAAATTGTCGAC	GTCCTGTGGGAGGGTCTTTGG
	3	311	GTTGAGGGGAAATGTTCAACA	CCTGGAATGCCAAAAGCAAAAACC
<i>VCL</i>	19	323	CACTGTATCTTTGCTTCCCTC	CAGCCTCTTTCCCGAGTA

Foram testadas várias condições reaccionais, até se obter o produto de amplificação de interesse (Figura 12 (B)), estando as condições reaccionais finais aplicadas em *LightCycler 480®* para a optimização dos pares de *primers* descritas na tabela 10. Seguiu-se a confirmação do dimensão do amplicão em electroforese de gel de agarose a 2% (Figura 12C).

Tabela 10- Condições Reacionais Aplicadas em *LightCycler 480*®

Gene	Exão	Tamanho amplificação (pb)	[Primer] (μ M)	[MgCl ₂] (mM)	Ta (°C)	Touch-down
ACTN2	7	165	0,5,	3	56	
	8	239	0,5	2,5	56	
	13	196	0,2	2,5	57	Aplicado
	15	259	0,5	2,5	55	
	16	236	0,5	2,5	56	
	21(1)	242	0,2	2,5	57	Aplicado
AGTR1	3	194	0,5	2,5	55	
FHL1	6	250	0,5	2,5	55	
GLA	1(1)	162	0,5	2,5	55	
	1(2)	155	0,3	2,5	57	Aplicado
	3(1)	204	0,5	3	56	
	3(2)	153	0,5	2,5	56	
	4	199	0,5	2,5	55	
NEXN	5	250	0,5	2,5	57	Aplicado
RAF1	17	250	0, 4	2	58	
TTR	2	219	0,2	2,5	57	Aplicado
	3	311	0,5	2	55	Aplicado
VCL	19	323	0,5	2	59	

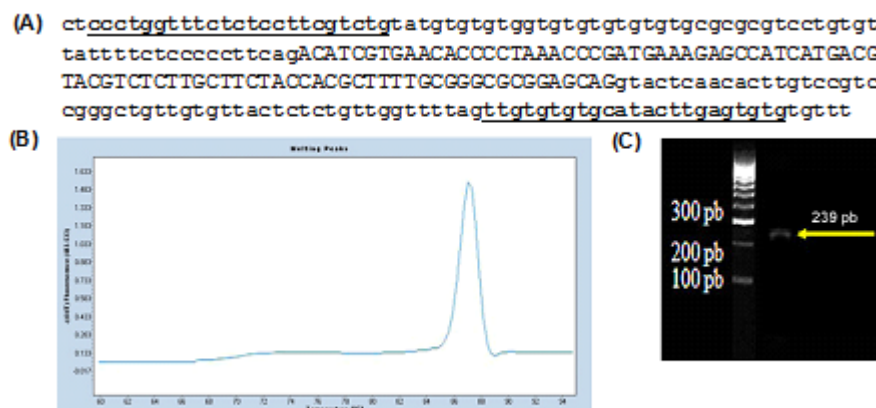


Figura 12- Exemplo do processo utilizado para a selecção de um par de *primers* para o exão 8 do gene ACTN2.

Legenda: (A) Letras maiúsculas - Sequência do exão 8 do gene *ACTN2* (NM_001103); Letras minúsculas - regiões intrônicas adjacentes; Negrito e Sublinhado - par de *primers* seleccionados, formando um amplicão com 239 pb (B) Em PCR-HRM obteve-se um pico de desnaturação específico do amplicão com 239 pb (C) Comprovação de presença de produto de amplificação específico com 239pb em electroforese unidimensional em gel de agarose a 2% quando comparado com o marcador de pesos moleculares *HyperLadder IV*.

3.3. Rastreio de alterações nas amostras por HRM

Os 58 indivíduos em estudo foram rastreados para mutações em 14 regiões genómicas de 7 genes associados a MH.

3.3.1. Gene *ACTN2*

Foram analisados 5 exões do gene *ACTN2* (NM_001103) por HRM, tendo sido detectadas alterações nos exões 7, 8. Nos restantes exões, 13, 15 e 16, não foram detectadas alterações no perfil de desnaturação.

3.3.1.1. Exão 7

Na análise ao exão 7 por HRM, 18 amostras (CMH018, CMH033, CMH047, CMH048, CMH051, CMH053, CMH072, CMH078, CA03, CA04, CA10, CA12, CA14, CA23, CA24, CA26, CA30, CA33) apresentaram alterações de perfil, cujos valores de sinal de diferença relativa de intensidade de fluorescência chegam a ser cerca de -24 (Figura 13)

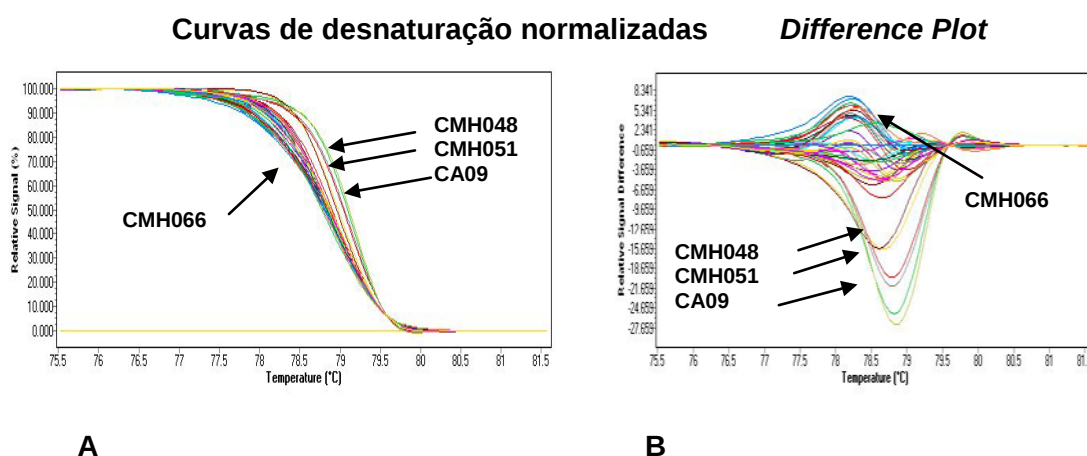


Figura 13- Ilustração das curvas de melting normalizadas de algumas amostras potencialmente alteradas para o exão 7 do gene *ACTN2*.

Legenda: (A) Curvas de desnaturação normalizadas com alterações detectadas por HRM para o exão 7 do gene *ACTN2*. (B) *Difference plot* onde se evidencia as amostras CA09, CMH048, CMH051 com um perfil distinto para o exão 7 do gene *ACTN2* e a amostra CMH066 que foi considerada sem alterações e confirmada por SA.

Na análise dos cromatogramas (Figura 14) verificou-se que todas as amostras apresentaram uma substituição em heterozigotia de uma (G) por uma (A) localizada no intrão 7 excepto a amostra CMH048 que tem a mesma alteração, mas em homozigotia, sendo esta alteração designada por IVS7 +34 G>A (Figuras 14 e 15). Todas estas amostras apresentam também uma substituição em heterozigotia de uma A>G no mesmo intrão, mas na posição +80, designando-se de IVS7+80A>G (Figura 16 e 17)

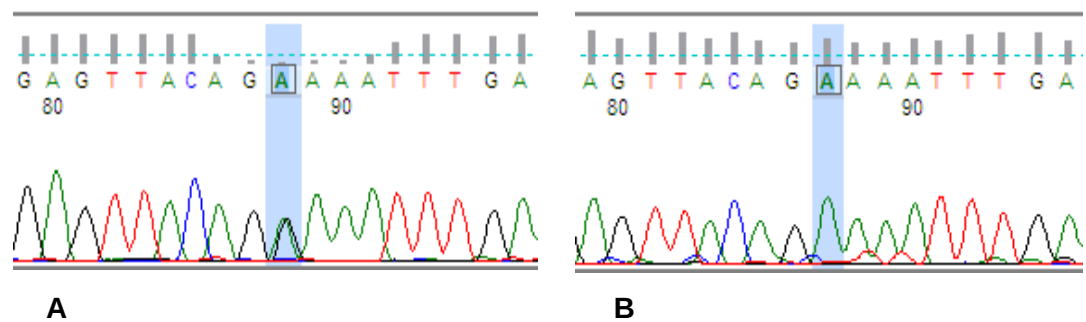


Figura 14- Cromatogramas referentes à alteração IVS7+34G>A no exão 7 do gene ACTN2

Legenda: (A) – Evidência da heterozigotia presente na posição +34 do intrão 7, nas amostras com perfil alterado, onde consta uma adenina em vez de uma guanina característica da sequência wild type (NM_001103). (B) - Parte do cromatograma onde se evidencia a homozigotia presente na posição +34 do intrão 7 na amostra CMH048, apresentando o alelo mutado (adenina) ao invés do alelo wild type (guanina).

Homo sapiens actinin, alpha 2 (ACTN2)

Sequence ID:	ref NG_009081.1	Score	212 bits(234)
Expect	6e-52	Identities	122/124(98%)
		Gaps	1/124(0%)
Query	15	TCGCTGAGA-GCACCTGGATATTCCTAAAATGTTGGATGCTGAAGGTGAGATGAAAATTG	73
Sbjct	49801	TCGCTGAGAAGCACCTGGATATTCCTAAAATGTTGGATGCTGAAGGTGAGATGAAAATTG	49860
Query	74	TGTTTGCTGAGTTACAGAAAATTTGAAGACTACAAATGTTATGGCTACACATTGGGACCT	133
Sbjct	49861	TGTTTGCTGAGTTACAGGAAAATTTGAAGACTACAAATGTTATGGCTACACATTGGGACCT	49920
Query	134	TGCA	137
Sbjct	49921	TGCA	49924

Figura 15- Alinhamento das sequências obtidas a partir dos cromatogramas apresentados na figura 14 com a sequência wild type (NM_001103).

Legenda: (Subject) do gene ACTN2 (NCBI, Blastn) onde evidencia que o alelo mutado tem uma adenina e o alelo wild type uma guanina na posição +34 do intrão 7 para as amostras com perfis alterados.

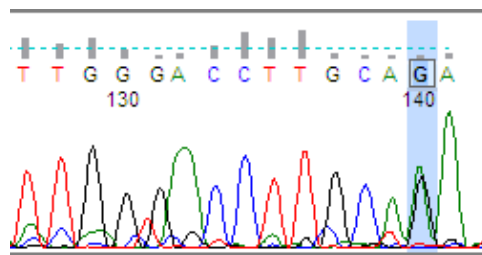


Figura 16- Cromatograma referente à alteração IVS7+80A>G

Legenda: Parte do cromatograma onde se detecta a heterozigotia presente em todas as amostras com perfil alterado na posição +80 do intrão 7, onde o alelo mutado é portador de uma guanina num dos alelos em vez de uma adenina como no wild type (NM_001103).

```
Homo sapiens actinin, alpha 2 (ACTN2)
Sequence ID: ref|NG_009081.1|      Score 221 bits(244)
Expect 1e-54      Identities 124/125(99%)      Gaps0/125(0%)

Query  15      TCGCTGAGAAGCACCTGGATATTCCTAAAATGTTGGATGCTGAAGGTGAGATGAAAATTG  74
      |||
Sbjct  49801    TCGCTGAGAAGCACCTGGATATTCCTAAAATGTTGGATGCTGAAGGTGAGATGAAAATTG  49860

Query  75      TGT TTGCTGAGTTACAGAAAATTTGAAGACTACAAATGTTATGGCTACACATTGGGACCT  134
      |||
Sbjct  49861    TGT TTGCTGAGTTACAGGAAATTTGAAGACTACAAATGTTATGGCTACACATTGGGACCT  49920

Query  135      TGCAA  139
      |||
Sbjct  49921    TGCAA  49925
```

Figura 17- Alinhamento da sequência obtida a partir do cromatograma apresentado na figura 16 com a sequência wild type (NM_001103).

Legenda: (Subject) do gene *ACTN2* (NCBI, Blastn) onde se observa uma guanina num dos alelos em vez de uma adenina como na sequência *Wild type*, na posição +80 do intrão 7.

As alterações descritas não irão afectar a sequência primária nem a estrutura da proteína ACTN2 por se encontrarem numa região intrónica. A alteração IVS7+34G>A já se encontra descrita na base de dados *Ensembl Genome Browser*, com a referência rs819640, com uma frequência de 0,46 na população mundial, esta alteração não está associada a doenças. Esta alteração é referida num estudo da população australiana com MH (adap. Chiu *et al.*, 2010), (Tabela 2) tendo prevalência de 23,9%. A variante IVS7+80A>G, não se encontra descrita na base de dados consultada.

As alterações encontradas no exão 7 não são possíveis de relacionar com MH, uma vez que estavam presentes tanto nas amostras com diagnóstico de MH como nas amostras saudáveis (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11- Resumo da incidência da alteração IVS7+34 G>A na população estudada

Gene	Exão	Alteração	Nº de amostras	Nº de amostras
			MH	Saudáveis
ACTN2	7	IVS7+34 G>A	10	8

Legenda: MH- Indivíduos com diagnóstico de MH (Atletas e não atletas), Saudáveis- Indivíduos saudáveis, atletas de alta competição

Tabela 12- Resumo da incidência da alteração IVS7+80 A>G na população estudada

Gene	Exão	Alteração	Nº de amostras	Nº de amostras
			MH	Saudáveis
ACTN2	7	IVS7+80 A>G	10	8

Legenda: MH- Indivíduos com diagnóstico de MH (Atletas e não atletas), Saudáveis- Indivíduos saudáveis, atletas de alta competição

3.3.1.2. Exão 8

Na análise ao exão 8 foram detectadas por HRM 9 amostras que apresentam alterações de perfil, cujos valores de sinal de diferença relativa de intensidade de fluorescência chegam a ser cerca de +12 (Figura 18 (B)). Nas amostras sequenciadas, foi detectada a variante IVS8+23 G>A.

Curvas de desnaturação normalizadas *Difference Plot*

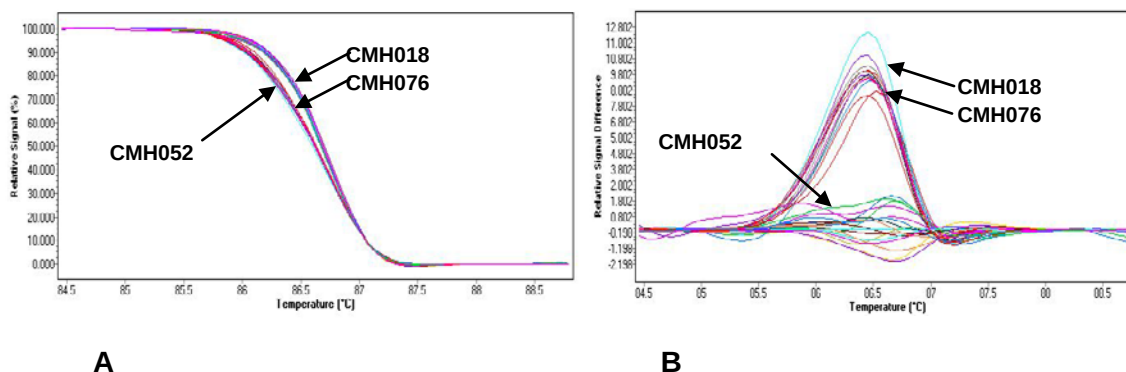


Figura 18- Ilustração das curvas de melting normalizadas das amostras potencialmente alteradas para o exão 8 do gene ACTN2.

Legenda: (A) Alterações detectadas por HRM para o exão 8 do gene ACTN2. (B) *Difference plot* onde se evidencia as amostras, CMH018 e CMH052, CMH076 com um perfil distinto para o exão 8 do gene ACTN2.

Na análise dos cromatogramas verificou-se que a amostra CMH052, não apresenta alterações. As amostras CMH047 CMH048, CMH053, CMH068, CMH070, CMH073,

CMH075 e CMH076 apresentam uma substituição em heterozigotia de uma G>A localizada na posição +23 do intrão 8, sendo esta alteração designada por IVS8 +23 G>A. A amostra CMH018, tem a mesma alteração, mas em homozigotia (Figura 19 e 20).

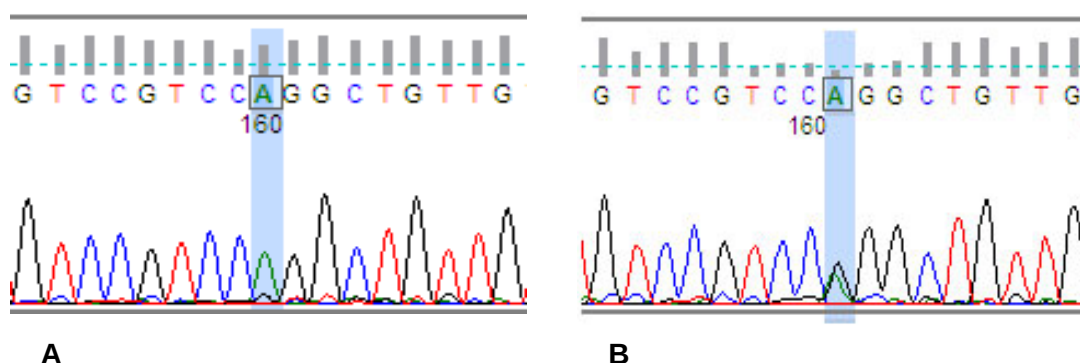


Figura 19- Cromatogramas referentes à alteração IVS8+23G>A

Legenda: Parte do cromatograma onde se evidencia a homozigotia da amostra CMH018 (A) e a heterozigotia das outras amostras cujo perfil era alterado (B), na posição +23 do intrão 8, onde consta uma adenina num dos alelos em vez de uma guanina.

```

Homo sapiens actinin, alpha 2 (ACTN2),
Sequence ID: ref|NG_00908 Score 361 bits(400)
Expect 1e-96      Identities 204/207(99%      Gaps 0/207(0%)

Query   7      GGNGNGTGTGTGTGCGCGCGTCTGTGTTATTTTCTCCCCCTTCAGACATCGTGAACACC 66
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct  54120  GGTGTGTGTGTGTGCGCGCGTCTGTGTTATTTTCTCCCCCTTCAGACATCGTGAACACC 54179

Query   67      CCTAAACCGATGAAAGAGCCATCATGACGTACGTCTCTTGCTTCTACCACGCTTTTGCG 126
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct  54180  CCTAAACCGATGAAAGAGCCATCATGACGTACGTCTCTTGCTTCTACCACGCTTTTGCG 54239

Query   127     GGC GCGGAGCAGGTACTCAACACTTGTCCGTCCAGGCTGTTGTGTTACTCTGTTGGTT 186
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct  54240  GGC GCGGAGCAGGTACTCAACACTTGTCCGTCCGGGCTGTTGTGTTACTCTGTTGGTT 54299

Query   187     TTAGTTGTGTGTGCATACTTGAGTGTG 213
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct  54300  TTAGTTGTGTGTGCATACTTGAGTGTG 54326

```

Figura 20- Alinhamento da sequência obtida a partir dos cromatogramas apresentados na figura 19 com a sequência *wild type* (NM_001103).

Legenda: (Subject) do gene ACTN2 (NCBI, Blastn) onde evidencia que o alelo mutado tem uma adenina e o alelo wild type uma guanina.

A alteração detectada IVS8+23 G>A já se encontra descrita na base de dados Ensembl Genome Browser, com a referência rs2288600, com uma frequência de 0,18 na população mundial, sem significado clínico conhecido. No entanto esta alteração também foi

identificada por Chiu *et al*, já referido (Tabela 2), tendo uma prevalência de 34,7 % no grupo de MH estudado pelo autor.

A alteração IVS8+23 G>A, apenas foi encontrada em amostras de doentes de MH, e poderá relacionar-se com a doença, no entanto terá de se estender o estudo a uma amostragem maior (Tabela 13).

Tabela 13- Resumo da incidência da alteração IVS8+23 G>A na população estudada

Gene	Exão	Alteração	Nº de amostras	Nº de amostras
			MH	Saudáveis
ACTN2	8	IVS8+23 G>A	9	0

Legenda: MH- Indivíduos com diagnóstico de MH (Atletas e não atletas), Saudáveis- Indivíduos saudáveis, atletas de alta competição

3.3.1.3. Exão 13 e 16

Em relação aos exão 13 e ao 16, não foram detectadas quaisquer alterações por HRM uma vez que os perfis das curvas de desnaturação, após normalização e relativização são todos idênticos, como se pode constatar pelo exemplo representado (Figura 21).

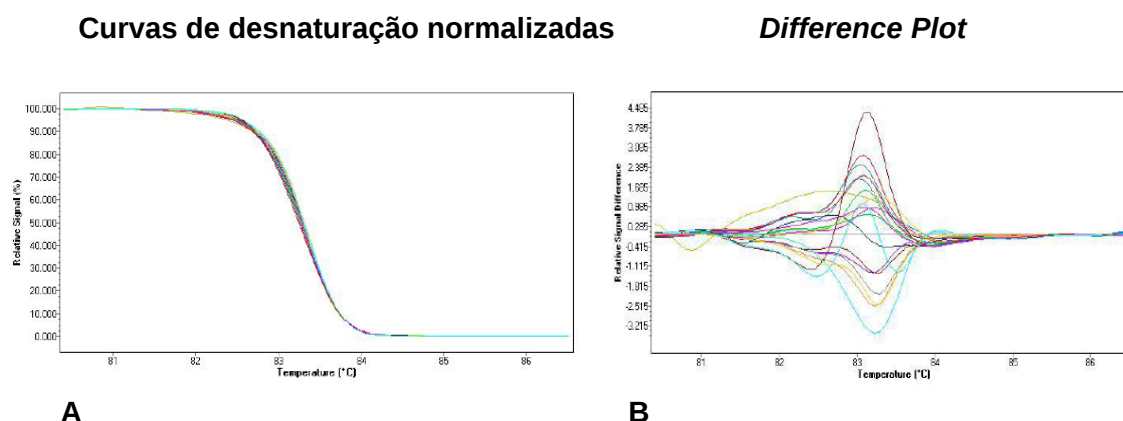


Figura 21- Curvas de melting normalizadas para o exão 13 do gene ACTN2

Legenda: (A) Alterações não detectadas por HRM para o exão 13 do gene ACTN2. (B) *Difference plot* onde não se evidenciam alterações de perfis nas deste género

3.3.2. Gene *AGTR1*

3.3.2.1. Exão 6

As amostras CMH007, CMH009, CMH020, CMH052, CMH067, CMH068, CMH075, CMH076, CMH077, CA03 e CA04 apresentam perfis que se destacam das restantes amostras, apresentando variações de sinal de diferença relativa de intensidade de fluorescência de +13 a +19 no que respeita às amostras referência, assim como o perfil das curvas de *melting* que também apresentam valores de temperatura de *melting* diferentes (Figura 22). As amostras CMH007 e CMH009 têm alteração *AGTR1*, na região 3'UTR 1166A>C em homozigotia e as restantes amostras são heterozigóticas (Figuras 23 e 24).

Curvas de desnaturação normalizadas *Difference Plot*

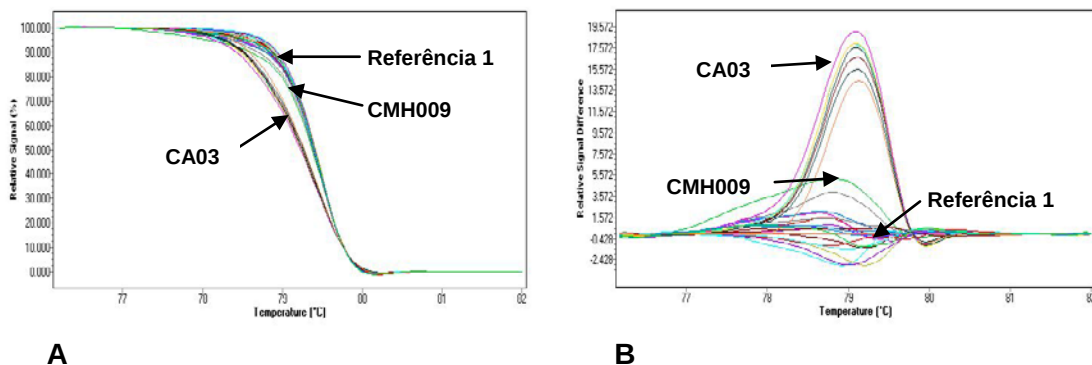


Figura 22- Alterações detectadas por HRM para o gene *AGTR1*.

Legenda: (A) Curvas de desnaturação para o gene *AGTR1*, salientando a amostra CMH009 com alteração em homozigotia, CA03 com uma alteração em heterozigotia e a amostra referência *wild type* (referência 1) (B) Representação dos perfis normalizados e relativizados em função da temperatura para o gene *AGTR1* salientando a amostra CMH009 com alteração em homozigotia, a amostra CA03 com alteração em heterozigotia e amostra controlo considerada a *wild type*.

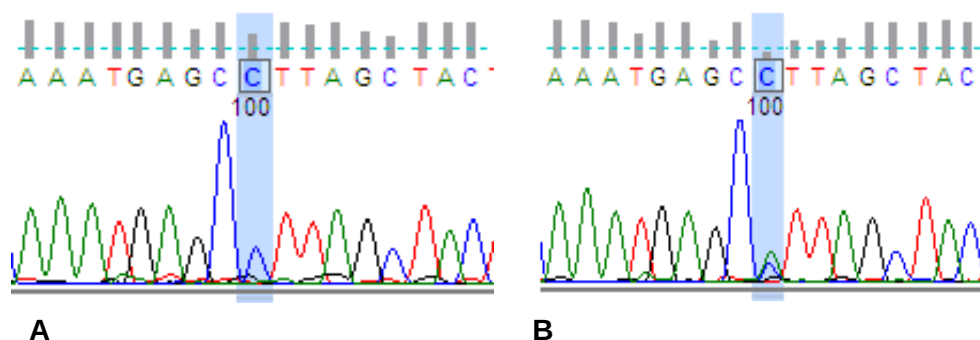


Figura 23- Cromatograma referente à alteração 1166 da Região 3' UTR

Legenda: Cromatograma onde se evidencia a homozigotia da amostra CMH007 e CMH009 (A) e a heterozigotia das restantes amostras que apresentam alteração de perfil de desnaturação (B), ambas localizadas na posição 1166 da Região 3' UTR, onde foi detectada por SA uma citosina num dos alelos em vez de uma adenina.

```
Homo sapiens angiotensin II receptor, type 1 (AGTR1)
Sequence ID: ref|NG_008468.1          Score: 275 bits(304)
Expect 8e-71      Identities 154/155(99%)      Gaps: 0/155(0%)
Query 1          TTGAGGTTGAGTGACATGTTTCGAAACCTGTCCATAAAGTAATTTTGTGAAAGAAGGAGCA 60
                  |||
Sbjct 49232      TTGAGGTTGAGTGACATGTTTCGAAACCTGTCCATAAAGTAATTTTGTGAAAGAAGGAGCA 49291

Query 61          AGAGAACATTCTCTGCAGCACTTCACTACCAAATGAGCC TAGCTACTTTTCAGAATTG 120
                  |||
Sbjct 49292      AGAGAACATTCTCTGCAGCACTTCACTACCAAATGAGCA TAGCTACTTTTCAGAATTG 49351

Query 121         AAGGAGAAAATGCATTATGTGGACTGAACCGACTT 155
                  |||
Sbjct 49352      AAGGAGAAAATGCATTATGTGGACTGAACCGACTT 49386
```

Figura 24- Alinhamento da sequência obtida a partir dos cromatogramas apresentados na figura 23 com a sequência wild type (NM_031850) do gene AGTR1 (NCBI, Blastn)

Legenda: Evidência de que o alelo mutado tem uma adenina e o alelo *wild type* uma citosina

Este SNP já se encontra descrito nas bases de dados consultada com a referência rs5186 (www.ensembl.org; www.ncbi.nih.nlm.gov) Embora este SNP não esteja numa região codificante ou num local de *splicing*, colocou-se a hipótese de poder afectar a estabilidade do mRNA e da transcrição. Este polimorfismo não tem efeito sobre a função do receptor ou a densidade, embora possa alterar a sensibilidade à angiotensina. Os portadores deste polimorfismo com o alelo C têm a sensibilidade aumentada para Ang II, que em combinação com o polimorfismo DD do *ACE1* (I/D), aumenta o risco cardiovascular (Kolder *et al.*, 2012)

Esta alteração não foi encontrada em atletas saudáveis, o que leva a crer que se possa tratar de uma alteração característica de MH (tabela 14), no entanto terá de se estender o estudo a uma amostragem maior.

Tabela 14- Resumo da incidência da alteração 3'UTR 1166A>C na população estudada

Gene	Exão	Alteração	Nº de amostras	Nº de amostras
			MH	Saudáveis
<i>AGTR1</i>	7	3'UTR 1166A>C	11	0

Legenda: MH- Indivíduos com diagnóstico de MH (Atletas e não atletas), Saudáveis- Indivíduos saudáveis, atletas de alta competição

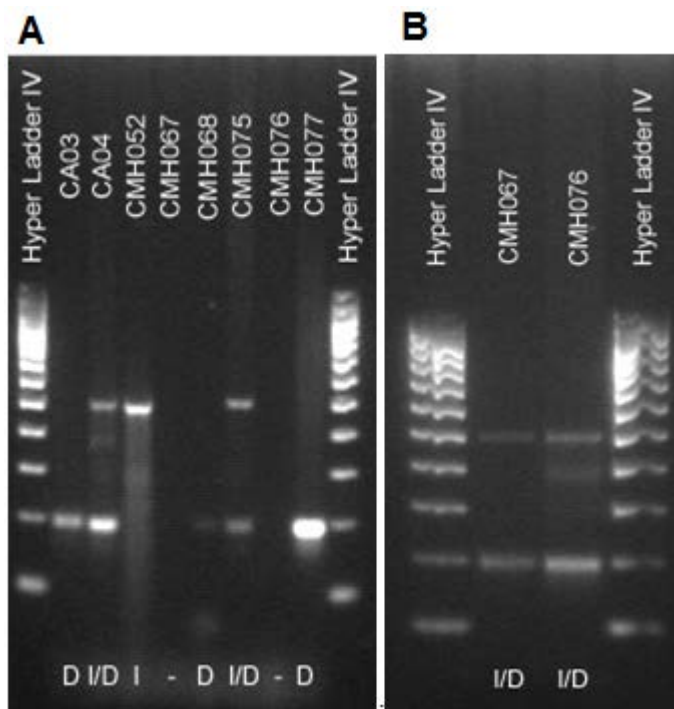


Figura 25– Resultados da electoforese em gel de agarose dos produtos de amplificação em PCR dos polimorfismo do gene ACE1.

Legenda: (A) Estudo dos polimorfismos do gene ACE1 nas amostras com alterações no gene *AGTR1* comparadas com o marcador *Hyper Ladder IV*; D- Delecção/Delecção; I/D- Inserção/Delecção; I- Inserção/Inserção; - - sem amplificação. (B) Repetição das amostras CMH067 e CMH076 (sem amplificação em A), comparadas com o marcador *Hyper Ladder IV*; I/D- Inserção/Delecção.

Foi determinado o polimorfismo (I/D) do gene *ACE1* nas amostras que apresentaram alterações no gene *AGTR1* (Tabela 11). Como interpretação dos resultados representados na figura 25, as amostras com o perfil DD apresentam uma banda de 192 pb; com o perfil I apresentam uma banda de 479pb e com o perfil ID apresentam duas bandas, uma com 192pb e outra com 479pb.As amostras CA03, CMH009, CMH020, CMH068 e CMH077 revelaram um genótipo DD, descrito como o perfil mais grave de MH. Não foi possível ter acesso à informação clínica que permitiria confirmar a maior severidade nestes indivíduos, o paciente com a identificação CMH009 faleceu vítima de MH (Tabela 15).

Tabela 15- Resultados da determinação do polimorfismo (I/D) do gene ACE1.

Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo
CA 03	D	CMH061	D
CA 04	ID	CMH062	Sem amostra
CMH045	D	CMH063	ID
CMH046	D	CMH064	I
CMH047	D	CMH065	D
CMH048	ID	CMH066	I
CMH049	Sem amostra	CMH067	ID
CMH050	ID	CMH068	D
CMH051	D	CMH069	I
CMH052	I	CMH070	D
CMH053	D	CMH071	D
CMH054	I	CMH072	ID
CMH055	ID	CMH073	D
CMH056	D	CMH074	D
CMH057	D	CMH075	ID
CMH058	D	CMH076	ID
CMH059	ID	CMH077	D
CMH060	D	CMH078	ID

Legenda: D- Delecção/Delecção; ID- Inserção/Delecção; I- Inserção/Inserção

3.3.3. Genes *FHL1*, *GLA*, *RAF1*, *TTR* e *VCL*

Não foram detectadas quaisquer alterações por HRM nas regiões analisadas dos genes *FHL1*, *RAF1* e *VCL* uma vez que os perfis de desnaturação, após normalização e relativização, são todos idênticos tal como apresentado na figura 28, onde apenas figura o exão 6 do gene *FHL1* como exemplo de um conjunto de perfis não alterados.

Curvas de desnaturação normalizadas *Difference Plot*

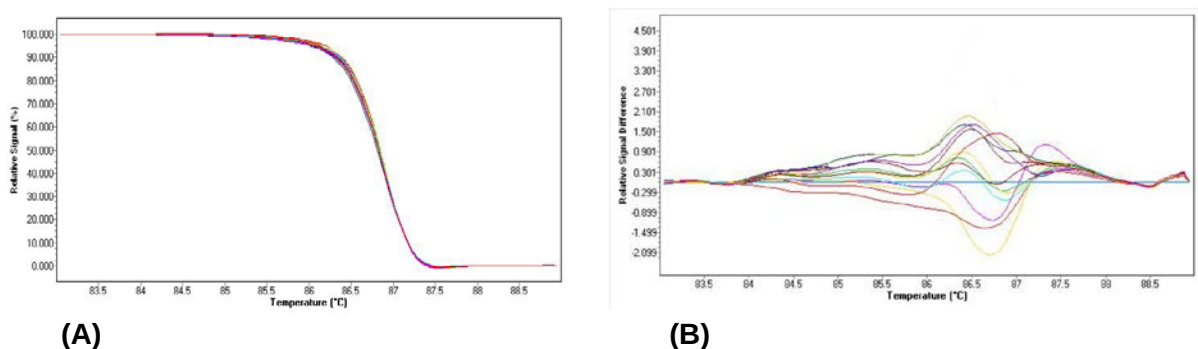


Figura 26– Resultados de HRM para os genes *FHL1*, *GLA*, *RAF1*, *TTR* e *VCL*

Legenda: (A) Curvas de desnaturação sem alterações, aqui representada a curva do exão 6 do gene *FHL1*. (B) Representação dos perfis normalizados e relativizados em função da temperatura para o exão 6 do gene *FHL1*.

Relativamente ao gene *RAF1*, que está relacionado com outras síndromes, Pandit *et al.*, 2007 descreve que 95% de doentes com Síndrome de Leopard estudados apresentavam MH e com o síndrome de Noonan, apenas 18% apresenta MH (Gelb *et al.*, 2011; Pandit *et al.*, 2007). Para os doentes analisados neste trabalho, desconhece-se o diagnóstico de outras doenças que não a MH.

Tabela 16- Compilação das alterações detectadas neste estudo por HRM e confirmadas por SA.

Amostra	Alterações detectadas confirmadas por SA	Tipo	Gene	Referência ¹
CMH009	IVS7+34G>A	Heterozigotia	ACTN2	rs819640
CMH018				
CMH033				
CMH047				
CMH053				
CMH072				
CMH078				
CA04				
CA10				
CA12				
CA14				
CA23				
CA24				
CA26				
CA30				
CA33				
CMH048		Homozigotia		
CMH009	IVS7+80A>G	Heterozigotia	ACTN2	Não descrita
CMH018				
CMH033				
CMH047				
CMH053				
CMH072				
CMH078				
CA04				
CA10				
CA12				
CA14				
CA23				
CA24				
CA26				
CA30				
CA33				
CMH018				

Tabela 17- Compilação das alterações detectadas neste estudo por HRM e confirmadas por SA (cont.).

Amostra	Alterações detectadas confirmadas por SA		Tipo	Gene	Referência ¹
CMH047	IVS8+23 G>A		Heterozigotia	ACTN2	rs2288600
CMH048					
CMH053					
CMH068					
CMH070					
CMH073					
CMH075					
CMH076					
CMH018			Homozigotia		
	Polimorfismo ACE1 (I/D)	3'UTR 1166A>C	Heterozigotia	AGTR1	rs5186
CMH020	D/D				
CMH052	I/I				
CMH067	I/D				
CMH068	D/D				
CMH075	I/D				
CMH076	I/D				
CMH077	D/D				
CA03	D/D				
CA04	I/D				
CMH007	I/D		Homozigotia		
CMH009	D/D				

Legenda 1

Tabela 18- Resumo da incidência das alterações detectadas na população estudada.

Gene	Exão	Alteração	Doentes	Saudáveis
ACTN2	7	IVS7+34 G>A	10	8
	7	IVS7+80 A>G	10	8
	8	IVS8+23 G>A	9	0
AGTR1	6	3'UTR 1166A>C	11	0

Legenda: MH- Indivíduos com diagnóstico de MH (Atletas e não atletas), Saudáveis- Indivíduos saudáveis, atletas de alta competição

Capítulo 4

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A MH é uma doença complexa que envolve um elevado número de genes.

Neste estudo, a utilizou-se da técnica de HRM como uma ferramenta importante para a análise e associação de genes-alvo, para o diagnóstico da MH, facilitando a sua caracterização. Para isso foi necessário desenhar novos *primers* e optimizá-los. Foram analisados por HRM regiões do DNA de 7 genes, alguns dos quais foram recentemente associados à MH (Thompson *et al.*, 2013). Das 58 amostras, apenas 11 apresentaram alterações nos genes sarcoméricos, quando analisadas com técnicas de Iplex MassArray e/ou HRM (Santos *et al.*, 2011, 2012) executadas pelo grupo de trabalho onde foi inserido este estudo.

É de salientar que as amostras com alterações no gene *AGTR1* pertencem ao grupo de doentes de MH (Tabela 15). Destes, apenas 2 amostras foram testadas para os genes *MYBPC3* e *MYH7* e têm alterações determinadas anteriormente pelo grupo de trabalho. Uma vez que este gene é apontado como modificador (Kolder *et al.*, 2012), seria interessante analisar futuramente o gene *AGTR1* em todas as amostras que apresentassem alterações nos genes *MYBPC3* e *MYH7*. Uma vez que a alteração no gene *AGTR1* em combinação com o polimorfismo do gene *ACE1(I/D) DD* está relacionada com o aumento da gravidade do fenótipo seria interessante relacionar os resultados com mais informação fenotípicas. É de salientar que o indivíduo CMH009 portador da alteração no gene *AGTR1* 1166 A>C em homozigotia com polimorfismo do gene *ACE1(I/D) DD*, correspondendo ao perfil mais grave, faleceu vítima de MH. As alterações 1166 A>C no gene *AGTR1* e IVS8+23 G>A no gene *ACTN2* apenas foram detectadas nas amostras com diagnóstico de MH (atletas e não atletas), podendo existir uma relação estre entre estas alterações e a MH, no entanto terá de se estender o estudo a uma amostragem maior.

Algumas das alterações encontradas neste trabalho, já tinham sido descritas noutros estudos (Chiu *et al.*, 2010; Kolder *et al.*, 2012).

A aplicação da técnica de HRM diminui drasticamente a necessidade de SA, uma vez que esta só foi realizada em pacientes que apresentavam diferenças no perfil de desnaturação, diminuindo os custos e o tempo de espera dos resultados.

Pretende-se, no futuro, continuar a optimização da técnica de HRM e incluir a análise de novos genes de interesse de forma ampliar o painel dos genes de diagnóstico para melhorar o diagnóstico e prognóstico da MH, onde o estudo ainda está pouco desenvolvido, incluindo a regiões para as quais foram optimizados *primers* (*ACTN2*, exão

21; *NEXN*, exão 5), mas não foram analisados no grupo de amostras em estudo. Aumentar o número de amostras a analisar também é objectivo.

O HRM não será a técnica mais eficiente para utilização em testes de diagnóstico de rotina, pela difícil normalização das amostras e das condições reaccionais assim como pela análise dos resultados. Em alternativa, surgem as técnicas de iPLEX MassArray ou de NGS que, apesar dos custos inerentes, podem ser mais adequadas para analisar várias regiões e amostras em simultâneo, nomeadamente para utilização em diagnóstico.

Bibliografia

Al-Thihli K, Ebrahim H, Hughes DA, Patel M, Tipple M, Salvarinova R, Gardiner J, Vallance H, Waters PJ. (2012). A variant of unknown significance in the GLA gene causing diagnostic uncertainty in a young female with isolated hypertrophic cardiomyopathy. *Gene*. 497(2):320-322.

Alves A J, Eynon N, Oliveira J, Goldhammer E (2010) RAAS and adrenergic genes in heart failure: Function, predisposition and survival implications. *World J Cardiology*. 26; 2(7): 187–197.

Arad M, Penas-Lado M, Monserrat L, Maron BJ, Sherrid M, Ho C, Barr S, Karim A, Olson T, Mitsuihiro K, Seidman J, Seidman C. (2005). Gene Mutations in Apical Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 112:2805-2811.

Arvanitis DA, Sanoudou D, Kolokathis F, Vafiadaki E, Papalouka V, Kontrogianni-Konstantopoulos A, Theodorakis GN, Paraskevaidis IA, Adamopoulos S, Dorn GW 2nd, Kremastinos DT, Kranias EG. (2008). The Ser96Ala variant in histidine-rich calcium-binding protein is associated with life-threatening ventricular arrhythmias in idiopathic dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal* 29(20):2514–2525.

Bayrak F, Komurcu-Bayrak E, Mutlu B, Kahveci G, Erginel-Unaltuna N. (2008). Genetic analysis of the *Irxa* gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Turkish Society of Cardiology* 36:90–95.

Bille K, Figueiras D, Schamasch P, Kappenberger L, Brenner JI, Meijboom FJ, Meijboom EJ. (2006). Sudden cardiac death in athletes: the Lausanne Recommendations. *The European Journal of Preventive Cardiology* 13(6):859-75.

Bos JM, Ackerman MJ. (2010). Z-Disc Genes in Hypertrophic Cardiomyopathy: Stretching the Cardiomyopathies? *Journal of the American College of Cardiology* 55(11):1136-1138.

Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. (2009). Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 54(3):201–211.

Brito, D; Miltenberger-Miltenyi, G; Pereira, SV; Silva, D; Diogo, AN; Madeira, H (2012) Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: Genetic profile in a Portuguese population *Rev Port Cardiol.* 2012; ; 31 (9): 577-587

Bruneau BG, Bao ZZ, Fatkin D, Xavier-Neto J, Georgakopoulos D, Maguire CT, Berul CI, Kass DA, Kuroski-de Bold ML, de Bold AJ, Conner DA, Rosenthal N, Cepko CL, Seidman CE, Seidman JG (2001) Cardiomyopathy in *lrx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 21:1730–1736.

Cambroner F, Marín F, Roldán V, Hernández-Romero D, Valdés M, Lip GY. (2009). Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *European Heart Journal* 30(2):139-151.

Castro-Ferreira, R; Fontes-Carvalho, R; Falcão-Pires, I; Leite-Moreira, AF (2011) Papel da titina na modulação da função cardíaca e suas implicações fisiopatológicas *Arq. Bras. Cardiol.* 96(4)

Chien YH¹, Lee NC, Chiang SC, Desnick RJ, Hwu WL (2012) Fabry disease: incidence of the common later-onset α -galactosidase A IVS4+919G→A mutation in Taiwanese newborns- -superiority of DNA-based to enzyme-based newborn screening for common mutations. *Molecular Medicine* 18:780-4

Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, Jormakka M, Lind JM, Semsarian C. (2010). Mutations in Alpha-Actinin-2 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy: A Genome-Wide Analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 55(11):1127-35.

Coto E, Palacin M, Martin M, Castro MG, Reguero JR, Garcia C, Berrazueta JR, Moris C, Morales B, Ortega F, Corao AI, Diaz M, Távira B, Alvarez V. (2010) Functional polymorphisms in genes of the Angiotensin and Serotonin systems and risk of hypertrophic cardiomyopathy: AT1R as a potential modifier. *Journal of Translational Medicine* 8:64.

Cowling BS, Cottle DL, Wilding BR, D'Arcy CE, Mitchell CA, McGrath MJ. (2011). *Four and a half LIM protein 1* gene mutations cause four distinct human myopathies: A comprehensive review of the clinical, histological and pathological features. *Neuromuscular Disorders* 21(4):237-251.

Cox L, Umans L, Cornelis F, Huylebroeck D, Zwijsen A. (2008). A broken heart: A stretch too far: An overview of mouse models with mutations in stretch-sensor components. *International Journal of Cardiology* 131(1):33-44.

Daniel J, McKenna WJ. (2011). Genetics of inherited cardiomyopathy. *European Heart Journal* 33(3):296–304.

Daw EW, Lu Y, Marian AJ, Shete S. (2008). Identifying modifier loci in existing genome scan data. *Annals of Human Genetics* 72(Pt 5):670–675.

Di Mauro, M; Izzicupo, P, Santarelli, F; Falone, S; Pennelli, A; Amicarelli, F; Calafiore, AM; Di Baldassarre, A; Gallina, S; (2010) ACE and AGTR1 polymorphisms and left ventricular hypertrophy in endurance athletes *Med Sci Sports Exerc.* 42(5):915-21

Elliott P, Anderson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. (2008). Classification of cardiomyopathies: a position statement from the European working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* 29(2):270–276.

Elliott P, McKenna WJ. (2004). Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 363(9424):1881-91.

Fearnley CJ; Roderick H.L; Bootman MD Calcium Signaling in Cardiac Myocytes (2011) *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 6(2)

Forleo C, Resta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De Luca V, Romito R, Iacoviello M, De Tommasi E, Troisi F, Rizzon B, Guanti G, Rizzon P, Pitzalis MV. (2004). Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *American Journal of Medicine* 117(7):451–458.

Frank D, Frey N. (2011). Cardiac Z-disc Signaling Network. *The Journal of Biological Chemistry* 286(12):9897-9904.

Friedrich FW, Wilding BR, Reischmann S, Crocini C, Lang P, Charron P, Müller OJ, McGrath MJ, Vollert I, Hansen A, Linke WA, Hengstenberg C, Bonne G, Morner S, Wichter T, Madeira H, Arbustini E, Eschenhagen T, Mitchell CA, Isnard R, Carrier L. (2012). Evidence for *FHL1* as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 21(14):3237-3254.

Funada A, Konno T, Fujino N, Muramoto A, Hayashi K, Tsubokawa T, Sakata K, Kawashiri MA, Takeda Y, Ino H, Yamagishi. (2010). Impact of renin-angiotensin system

polymorphisms on development of systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Evidence from a study of genotyped patients. *Circulation Journal* 74(12):2674-80.

García-Díaz L, Coserria F, Antiñolo G. (2013). Hypertrophic Cardiomyopathy due to Mitochondrial Disease: Prenatal Diagnosis, Management, and OutcomeLutgardo. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology* 2013:472356

Gelb, BD; Tartaglia M (2011) RAS signaling pathway mutations and hypertrophic cardiomyopathy: getting into and out of the thick of it *American Society for Clinical Investigation* 121 (3)

Gersh, JB; Maron, BJ; Bonow, RO; Dearani, JA; Fifer, MA; Link, MS; Naidu, SS; Nishimura, RA; Ommen, SR; Rakowski, H; Seidman, CE; Towbin, FA; Udelson, JE; Guideline for the Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy A Report of the American College of Cardiology (2011) *Journal of the American College of Cardiology* 58 (25):212–260

Hassel D, Dahme T, Erdmann J, Meder B, Hugel A, Stoll M, Just S, Hess A, Ehlermann P, Weichenhan D, Grimm M, Liptau H, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V, Fischer C, Nürnberg P, Schunkert H, Katus HA, Rottbauer W. (2009). Nexilin mutations destabilize cardiac Z-disks and lead to dilated cardiomyopathy. *Nature Medicine* 15(11):1281–1288.

Havndrup O, Christiansen M, Stoevring B, Jensen M, Hoffman-Bang J, Andersen PS, Hasholt L, Nørremølle A, Feldt-Rasmussen U, Køber L, Bundgaard H. (2010). Fabry disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy: genetic screening needed for establishing the diagnosis in women. *European Journal of Heart Failure* 12(6):535-40.

Henry, JB (2001) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. (20th edn, pp61-62; pp 660-698) Philadelphia, W.B. Saunders Company

Ho, C Y (2012) Hypertrophic Cardiomyopathy in 2012 *American Heart Association* ;125: 1432-1438

Hofman, N; L, Tan, HL; Alders, M; Kolder, I; Haij, S; Mannens, MM; Lombardi, MP; Ronald Deprez, RHL; van Langen, I; Wilde, A (2013) A of Molecular and Clinical Testing for Arrhythmia Syndromes: Report of 15 Years Experience *American Heart Association* (128) 1513-1521

Hughes, SE; McKenna, WJ (2005) *Heart*. 91(2): 257–264.

Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. (2009). Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Human Mutation* 30(10):1397-405.

Janssen ME, Liu H, Volkmann N, Hanein D. (2012). The C-terminal tail domain of metavinculin, vinculin's splice variant, severs actin filaments. *The Journal of Cell Biology* 197(5):585-593.

Jeong D, Kim JM, Cha H, Oh JG, Park J, Yun SH, Ju ES, Jeon ES, Hajjar RJ, Park WJ. (2008). PICOT Attenuates Cardiac Hypertrophy by Disrupting Calcineurin–NFAT Signaling. *Circulation Research* 102(6):711–719.

Kimura, A. (2010). Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond; *Journal of Human Genetics* 55:81–90.

Knoblauch H, Geier C, Adams S, Budde B, Rudolph A, Zacharias U, Schulz-Menger J, Spuler A, Yaou RB, Nürnberg P, Voit T, Bonne G, Spuler S. (2010). Contractures and hypertrophic cardiomyopathy in a novel FHL1 mutation; *Annals of Neurology* 67(1):136-40.

Kofflard M, Folkert J, Lee C, Domburg R, (2003). Hypertrophic cardiomyopathy in a large community-based population: clinical outcome and identification of risk factors for sudden cardiac death and clinical deterioration. *Journal of the American College of Cardiology* 41(6):987-993.

Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH (1991) Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension, *Annals of Internal Medicine* 114:345–352.

Lek M, Quinlan KG, North KN. (2009) The evolution of skeletal muscle performance: gene duplication and divergence of human sarcomeric alpha-actinins. *Bioessays* 32(1):17-25.

Li, Y; Li, X; Jia, N; Guo, S; Chu, S; Niu; (2013) Meta-analysis of the association between angiotensin II receptor, type 1 gene A1166C polymorphism and coronary artery disease in Chinese populations; *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 14(1) 82–90

Liu, F; Levin, MD; Petrenko, NB; Lu, MM; Wang, T; Yuan, LJ; Stout, AL; Epstein, JA; Patel, VV (2008) Histone-deacetylase inhibition reverses atrial arrhythmia inducibility and fibrosis in cardiachypertrophy independent of angiotensin. *J Mol Cell Cardiol* 45: 715- 723

Luo R, Li X, Wang Y, Li Y, Deng Y, *et al.*, (2013) The Influence of Angiotensin Converting Enzyme and Angiotensinogen Gene Polymorphisms on Hypertrophic Cardiomyopathy. *PLoS ONE* 8(10)

Lyon E, Wittwer C. (2009) LightCycler Technology in Molecular Diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(2):93-101.

Monserat L, Gimeno-Blanes JR, Marín F, Hermida-Prieto M, García-Honrubia A, Pérez I, Fernández , Nicolas R; Morena G, Payá E, Yagüe J, Egido J, (2007)

Prevalence of Fabry Disease in a Cohort of 508 Unrelated Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy *Journal of the American College of Cardiology*; 50(25):2399-2403

McDonagh, EM; Whirl-Carrillo, M, Garten, Y; Altman, RB; Klein TE (2011) From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. *Biomarkers in Medicine* 5(6):795-806.

Maron, BJ; (1997) Hypertrophic cardiomyopathy *Lancet* 350 (9071):127–133.

Maron, BJ; Roberts, WC, (1979) Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy *Circulation* 59:689–706

Maron, BJ; McKenna, WJ; Danielson, GK; Kappenberger, LJ; Kuhn, HJ; Seidman, CE; Shah, PM; Spencer III, WH; Spirito, P; Cate, FJT; Wigle, E.D; Vogel, RA; Abrams, J; Bates, ER; Brodie, BR; *et al.*, (2012) 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 *Journal of the American College of Cardiology*, 59: (4): 434

Maron, BJ; Shirani, J; Poliac, LC; Mathenge, R; Roberts, WC; Mueller, FO, (1996) Sudden death in young competitive athletes, *clinical, demographic, and pathological profiles JAMA*. 276:199–204.

Maron, BJ; Towbin, JA; Thiene, G; Antzelevitch, C; Corrado, D; Arnett, D; Moss, AJ; Seidman, CE; Young, JB (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary

Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113(14):1807–1816.

Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M, Feldman DS, Schmittgen TD, Elton TS. (2007). The Human Angiotensin II Type 1 Receptor 1166 A/C Polymorphism Attenuates MicroRNA-155 Binding. *The Journal of Biological Chemistry* 282(33):24262-24269.

McGrath MJ, Cottle DL, Nguyen MA, Dyson JM, Coghill ID, Robinson PA, Holdsworth M, Cowling BS, Hardeman EC, Mitchell CA, Brown S. (2006). (Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *Journal of Biological Chemistry* 281(11):7666-7683.

Meder, B; Haas, Jan; Keller, A; Heid, C ; Just, S; Borries, A; Boisguerin, V; Scharfenberger-Schmeer, M; Staehler, P; Beier, M; Weichenhan, D; Strom, TM; Pfeufer, A; Korn, B; Katus, HA; Rottbauer, W (2011) Targeted Next-Generation Sequencing for the Molecular Genetic Diagnostics of Cardiomyopathies *Circ Cardiovasc Genet* (4):110-122.

Mills M, Yang N, Weinberger R, Vander Woude D, Beggs A, Eastal S, North K. (2001). Differential expression of the actin-binding proteins, -actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Human Molecular Genetics* 10(13): 1335-1346.

Mörner S, Hellman U, Suhr OB, Kazzam E, Waldenström A. (2005). Amyloid heart disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Internal Medicine* 258(3):225-30.

Moura, C; Leite-Moreira, AF; (2011) Genetic testing strategies for the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy *Rev Port Cardiol* ; 30 (01): 19-23

Noronha, SV; Behr, ER; Papadakis, M; Ohta-Ogo, K; Banya, W; Wells, J; Cox, S; Cox, A; Sharma, S; Sheppard, MN (2013) The importance of specialist cardiac histopathological examination in the investigation of young sudden cardiac deaths *European society of cardiology*, 16(6):899-907

Ogimoto A, Okayama H, Nagai T, Ohtsuka T, Suzuki J, Inoue K, Nishimura K, Saito M, Shigematsu Y, Hamada M, Miki T, Higaki J. (2010). Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and response to cibenzoline in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 55(5):506–510.

Olivotto I, Gistri R, Petrone P, Pedemonte E, Vargiu D, Cecchi F. (2003). Maximum left ventricular thickness and risk of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 41:315–321.

Oudit G, Kassiri Z, Patel M, Chappell M, Butany J, Backx P, Tsushima R,. Scholey J, Khokha R, Penninger J. (2007). Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ECA2 null mice. *Cardiovascular Research* 75(1):29-39.

Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna EA, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A, Bos JM, Ommen SR, Esposito G, Lepri F, Faul C, Mundel P, López Siguero JP, Tenconi R, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Torrente I, Marino B, Digilio MC, Zampino G, Ackerman MJ, Dallapiccola B, Tartaglia M, Gelb BD. (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics* 39(8):1007-1012.

Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ. (2005). Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin–angiotensin–aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal* 26(22):2457–2462.

Plat AW, Wierik MJ, Kroon AA, Schouten HJ, van den Akker M, van Schayck CP, de Leeuw PW, Hajema KJ, Stoffers HE (2005). Regional differences in cardiovascular risk factor profile cannot fully explain differences in cardiovascular morbidity in the Netherlands: a comparison of two urban areas. *Neth J Med* 63:309-15.

Ramirez C, Padron R. (2004). Cardiomiopatía Hipertrófica familiar: Genes, mutaciones y modelos animales. *Investigación Clínica*.45(1):69-100.

Rahimi, Z; Rahimi, Z; Mozafari, H; Parsian, A (2013) Preeclampsia and angiotensin converting enzyme (ACE) I/D and angiotensin II type-1 receptor (AT1R) A1166C polymorphisms: association with ACE I/D polymorphism *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 14: 174

Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet J-P, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 107:2227–2232.

Richard P, Fressart V, Charron P, Hainque B. (2010) Génétique des cardiomyopathies héréditaires *Pathologie Biologie*, 58(5):343-52.

Richard P, Villard E, Charron P, Isnard R. (2006). The Genetic Bases of Cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology* 48(S9):A79-A89.

Richardson P, McKenna WJ, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 9 (5):841–842.

Robinson P, Brown S, McGrath M, Coghill I, Gurung R, Mitchell C. (2003). Skeletal muscle LIM protein 1 regulates integrin-mediated myoblast adhesion, spreading, and migration. *American Journal of Physiology* 284(3):C681-695.

Rosenzweig M, Skinner M, Prokaeva T, Théberge R, Costello C, Drachman BM, Connors LH. (2007). A new transthyretin variant (Glu61Gly) associated with cardiomyopathy. *Amyloid* 14(1):65-71.

Saber-Ayad, M M; Nassar, YS; Latif, IA (2013) Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism affects early cardiac response to professional training in young footballers, *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* (10) 2,

Santos S, Lança V, Oliveira H, Branco P, Silveira L, Marques V, Brito D, Madeira H, Bicho M, Fernandes AR. (2011). Genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry DNA arrays and high resolution melting. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 30(1):7-18.

Santos, S; Marques, V; Pires, M; Silveira, L; Oliveira, H; Lança, V; Brito, D; Madeira, H; Carreira, IM, Gaspar; IM, Monteiro, C; Fernandes, AR (2012) High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy in a Portuguese cohort. *BMC Medical Genetics*, 13-17.

Saraiva, MJM (2001) Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum. Mutat.* 17: 493-503.

Sarkozy A, Windpassinger C, Hudson J, Dougan CF, Lecky B, Hilton-Jones D, Eagle M, Charlton R, Barresi R, Lochmüller H, Bushby K, Straub V. (2011). Phenotypic heterogeneity in British patients with a founder mutation in the *FHL1* gene. *European Journal of Human Genetics* 19(10):1038-44.

Schulze PC, Maurer MS. (2010) Transthyretin Val30Met mutation in an African American with cardiac amyloidosis; *Congest Heart Fail* 16(2):73-6

Seidman C, Seidman J. (2011). In Identifying Sarcomere Gene Mutations in HCM: A Personal History. *Circulation Research* 108(6): 743–750

Sequeira, V; Nijenkamp LM; Regan, JA; Van der Velden Jolanda (2014) The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* (1838), 700–722

Schiffmann R, Ries M, Blankenship D; Nicholls K, Mehta A, Clarke JTR, Steiner RD Beck M, Barshop BA, West MM, Martin R, Amato D, Nair N, Huertas P (2013) Changes in plasma and urine globotriaosylceramide levels do not predict Fabry disease progression over 1 year of agalsidase alfa *Genetics in Medicine* 15,983–989

Sjöblom B, Salmazo A, Djinić-Carugo K. (2008) Alpha-actinin structure and regulation *Cell Mol Life Sci.* 65(17):2688-701

Sen-Chowdhry S, Syrris P, Pantazis A, Quarta G, McKenna WJ, Chambers JC. (2010). Mutational heterogeneity, modifier genes, and environmental influences contribute to phenotypic diversity of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 3(4):323–330.

Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS *et al.*, (2007) Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet*; 81: 405- 413.

Seto, JT; Chan, S; Turner, N; MacArthur, DG; Raftery, JM; Berman, YD; Quinlan, KG; Cooney, GJ; Head, S; Yang, N; North, KN (2011) The effect of α -actinin-3 deficiency on muscle aging *Experimental Gerontology* (46), 292– 302.

Shathasivam T, Kislinger T, Gramolini A. (2010). Genes, proteins and complexes: the multifaceted nature of FHL family proteins in diverse tissues. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (12): 2702- 20.

Sheikh F, Raskin A, Chu PH, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M, Liang X, Zhang T, Yajima T, Gu Y, Dalton ND, Mahata SK, Dorn GW 2nd, Brown JH, Peterson KL, Omens JH, McCulloch AD, Chen J. (2008). An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 118(12):3870-3880.

Spirito P, Bellone P, Harris KM, Bernabo P, Bruzzi P, Maron BJ. (2003). Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 342(24):1778–1785.

Tabei, SMB; Nariman, A; Daliri, K; Roozbeh, J; Khezri, J; Goodarzi, HR; Lotfi, HR; Sefidbakht, S; Entezam, (2013) Simple renal cysts and hypertension are associated with angiotensinogen (AGT) gene variant in Shiraz population *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*

The LightCycler® 480 Real-Time PCR System; Technical Note No. 1 High Resolution Melting: Optimization Strategies (2008) *Roche Applied Science Mannheim, Germany*

The LightCycler® 480 System *Unleash the Potential of Real-Time PCR* (2008) *Roche Applied Science Mannheim, Germany*

Theis JL, Bos JM, Bartleson VB, Will ML, Binder J, Vatta M, Towbin JA, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ. (2006). Echocardiographic-determined septal morphology in Z-disc hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351(4):896–902.

Thompson PM, Tolbert CE, Campbell SL. (2013). Vinculin and metavinculin: Oligomerization and interactions with F-actin. *FEBS letters* 587(8):1220–1229.

Tulpan, D; Andronescu, M; Leger, L (2010) Free energy estimation of short DNA duplex hybridizations *BMC Bioinformatics*;11: 105

Vasile V, Edwards W, Ommen S, Ackerman M. (2006). Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with reduced expression of vinculin in the intercalated disc. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349(2):709-15.

Vasile VC, Ommen SR, Edwards WD, Ackerman MJ. (2006). A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(3):998-1003.

Vasile VC, Will ML, Ommen SR, Edwards WD, Olson TM, Ackerman MJ. (2006). Identification of a metavinculin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Molecular Genetics and Metabolism* 87(2):169-74.

Wang H, Li Z, Wang J, Sun K, Cui Q, Song L, Zou Y, Wang X, Liu X, Hui R, Fan Y. (2010). Mutations in NEXN, a Z-Disc Gene, Are Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics* 87(5):687-693.

Weidemann F, Niemann M. (2010). Screening for Fabry disease using genetic testing. *European Journal of Heart Failure* 12:530-531.

Wilkinson JD, Landy DC, Colan SD, Towbin JA, Sleeper LA, Orav EJ, Cox GF, Canter CE, Hsu DT, Webber SA, Lipshultz SE. (2010). The pediatric cardiomyopathy registry and heart failure: key results from the first 15 years. *Heart Failure Clinics* 6(4):401–413.

Wolf CM, Moskowitz IP, Arno S, Branco DM, Semsarian C, Bernstein SA, Peterson M, Maida M, Morley GE, Fishman G, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG. (2005). Somatic events modify hypertrophic cardiomyopathy pathology and link hypertrophy to arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(50):18123-18128.

Apêndices

Apêndice I- Indivíduos em estudo e respectivas informações clínicas.

Amostras	Género	Idade	Observações Clínicas
CMH007	M	-	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH008	M	-	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH009	F	-	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH018	M	56	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH020	F	35	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH023	F	20	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH033	F	76	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH034	F	78	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH039	F	40	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH040	M	53	Diagnóstico de MHF (Hospital Santa Maria)
CMH045	F	34	Filho de doente com MH (Hospital Santa Maria)
CMH047	M	51	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH048	M	39	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH051	M	45	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH052	M	74	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH053	F	31	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH060	M	41	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH066	M	63	Tem HVE Diagnóstico/excluir mutações associada a hipertrofia na aurícula esquerda (Hospital Santa Maria)
CMH067	F	-	Fenótipo negativo mas pai falecido de morte súbita aos 40 anos com miocardiopatia hipertrófica obstrutiva (Hospital Santa Maria)
CMH068	F	-	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH069	F	31	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH070	M	38	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH071	M	42	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH072	M	31	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH073	F	48	Diagnóstico de MH, com historial de morte súbita familiar pela doença.
CMH074	F	72	Diagnóstico de miocardiopatia hipertrófica obstrutiva familiar com mortalidade significativa (Hospital Santa Maria)
CMH075	M	78	Hipertrofia ventricular esquerda de causa inexplicada (Hospital Santa Maria)
CMH076	F	58	Miocardiopatia dilatada incipiente e história de morte súbita familiar (Hospital Santa Maria)
CMH077	-	-	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CMH078	-	-	Fenótipo de MH (Hospital Santa Maria)
CA01	M	17	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA03	M	16	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA04	M	15	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA06	M	19	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)

Apêndice I- Indivíduos em estudo e respectivas informações clínicas. (cont.)

Amostras	Género	Idade	Observações Clínicas
CA07	M	19	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA08	M	23	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA09	F	17	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA10	M	-	Atleta com fenótipo de MH (confirmado por ecocardiograma) (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA11	F	16	Antecedentes familiares com MH (Centro Medicina Desportiva Lisboa)
CA12	M	21	Atleta saudável
CA13	M	19	Atleta saudável
CA14	M	31	Atleta saudável
CA15	M	36	Atleta saudável
CA16	M	33	Atleta saudável
CA18	M	23	Atleta saudável
CA21	M	20	Atleta saudável
CA22	M	24	Atleta saudável
CA23	M	37	Atleta saudável
CA24	M	22	Atleta saudável
CA25	M	26	Atleta saudável
CA26	M	22	Atleta saudável
CA27	M	22	Atleta saudável
CA28	M	23	Atleta saudável
CA30	M	22	Atleta saudável
CA31	M	22	Atleta saudável
CA32	M	48	Atleta saudável
CA33	M	42	Atleta saudável
CA34	M	21	Atleta saudável

Apêndice II– Região genómica do gene *ACE1* amplificada por PCR para o estudo do polimorfismo I/D

Primer F ctggagagccactcccatcctttct

Primer R GACGTGGCCATCACATTCGTCAGAT

Tgcttgagcctgggaggtcaaggctgcagtgagccgagatggcgccactgcactccagcctgggcaacagagtgagaccctg
tctcagaaaaaaaaaaaaAaaaaaaaggagaggagagagactcaagcacgcccctcacaggactgctgaggccctgca
ggtgtctgcagcatgtggccccaggccggggactctgtaagccactgctggagagccactcccatcctttctccatttctctag
acctgtgcctatacagtcacttttatgtggttcgccaattttattccagctctgaaattctctgagctcccctacaagcagaggtgag
ctaagggtgagctcaaggcattcaaacccctaccagATCTGACGAATGTGATGGCCACGTC CCGGAA
ATATGAAGACCTGTTATGGGCATGGGAGGGCTGGCGAGACAAGGCGGGGAGAGCCAT
CCTCCAGTTTTACCCGAAATACGTGGAACCTCATCAACCAGGCTGCCCGGCTCAATGgtga
gtccctgctccaacatcactggcacttgggtcccttcattttctcaaagaggtgctgtgaaacccaagcctaggaaaaggtag
atccctggaggaggcaggtaatgtggtgtgggagagcctggctgtgtcccctctgtagGCTATGTAGATGCAGGGG
ACTCGTGGAGGTCTATGTACGAGACACCATCCCTGGAGCAAGACCTGGAGCGGCTCTT
CCAGGAGCTGCAGCCACTCTACCTCAACCTGCATGCCTACGTGCGCCGGGCCCTGCAC
CGTCACTACGGGGCCCAGCACATCAACCTGGAGGGGCCCATTCCTGCTCACCTGCTGG
gtaagggcacatgtcgggccttgaggagggtaaagacggaccacagtgtagtgagggtgggacagggctgactagagggg
agggagcaggctggggactgagagactccagccctgtgggggatggtgccaggctggaggggggtgggcgctgggagtg
gggagccccccactgcatctggtgccacattcactgcagatctatgtcgggcaagtcaccatggatgggggaagaagttaataa
tctgtccaggagaccacggcacccatcacaacattgtgtgatcttagagggcgaggaagaggctgtgagtgaggagctgggga
ggctttgcc

Apêndice III - Poster apresentado no Congresso anual da European Society of Human Genetics, decorrido em Paris em Junho de 2013, na forma de comunicação em painel intitulada "A novel strategy for identification of Performance Enhancing Polymorphisms in athletes: new determinants that can modify Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) risk

A novel strategy for identification of Performance Enhancing Polymorphisms in athletes New determinants that can modify Hypertrophic cardiomyopathy risk



Santos, SIR^(1,2,3); Marques, V.^(2,4); Justiniano, P.⁽²⁾; Quintas, J.⁽²⁾; Baptista, PV⁽⁵⁾; Fernandes, AR^(1,2,3)

⁽¹⁾ Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal; ⁽²⁾ Escola de Engenharia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; ⁽³⁾ Departamento Ciências da Vida, FCT, New University of Lisbon, Caparica, Portugal; ⁽⁴⁾ Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; ⁽⁵⁾ CIGMH, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal.



PURPOSE

Endurance and power performance capacities show much interindividual variation, even among well-trained athletes. Research should comprise the relationship between physiology, biochemistry and genetics. In the last years, **performance enhancing polymorphisms (PEPs)** have been described as genetic variants that relevantly influence phenotypic traits related to training adaptation and in last instance athletic performance. PEPs have been identified in over 230 genes, both in nuclear and mitochondrial DNA, coding for proteins involved in metabolic pathways, oxygen transport, muscle biogenesis and blood flow. On the other hand, **Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)**, an autosomal dominant genetic disease, is the primary cause of sudden cardiac death in the young and athletes. Therefore, to truly identify the genetic biomarkers related with the physical performance, it is important to tackle the 1) most relevant genetic features related to physical performance (PEPs) and the 2) genetic alterations that trigger HCM.

MATERIALS AND METHODS

Sample and population: DNA was extracted from peripheral blood from 20 athletes (football players) and 20 HCM patients from the Portuguese population.

Evaluated genes: *ACE*, *ACTN2*, *ACTN3*, *ADRA2A*, *AGTR1*, *BDKRB2*, *CALM3*, *CKM*, *EPAS1*, *FHL1*, *GLA*, *MTDN5*, *NEXN*, *NOS3*, *PPARA*, *PPARGC1A*, *RAF1*, *TTR* and *VCL*

Genotyping using high throughput techniques:

- Targeted gene scanning using High Resolution Melting (HRM) (LightCycler 480[®] Platform, Roche) coupled with automated sequencing (AS)
- Next Generation Sequencing (NGS) (Ion Torrent PGM platform, Life Technologies[®]) for which a specific genomic library was constructed for the selected target genes (316 chip, 200pb amplicons, 100x reads per amplicon, 98% gene coverage)

Physiology and biochemistry impact on physical performance?

Identification of PEPs

NGS + HRM: Thousands of genetic alterations / multiple genes

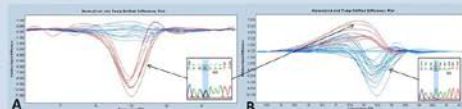
RESULTS AND DISCUSSION

Polymorphisms in intronic regions were found in *ACTN2*

ACTN2 and *ACTN3* genes encode α -actinin 2 and 3 that are responsible for contractile force generation in skeletal muscle fibers. R577X allele in *ACTN3* was the 1st PEP to be associated to skeletal muscle regulation and function. Whenever this PEP is present, α -actinin 3 function may be impaired and α -actinin 2 expression is compensatory. Therefore, polymorphisms in *ACTN2* may influence this compensatory effect.

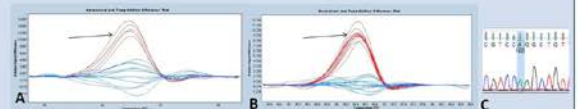
Berman et al, 2009; Yang et al, 2009

IVS7 +33 G>A



In athletes this polymorphism was present only in heterozygosity (Figure A) whereas in HCM patients was present in both heterozygosity and homozygosity (Figure B).

IVS8 +22 G>A



In both athletes (Figure A) and HCM patients (Figure B) this polymorphism was present in homozygosity as shown in the chromatogram (Figure C). Mutants are shown in red curves (black arrows) whereas samples with wild type genotype are in blue.

Polymorphisms in intronic regions may influence exon splicing and promote expression of different protein isoforms.

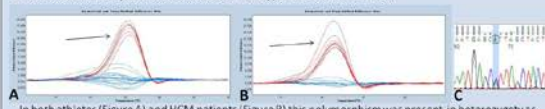
Exon trapping assays will be performed in order to assess differences in splicing. Only further functional studies will allow to know if these polymorphisms correlate with cardiac function and their role in athletes cardiac physiology.

AGTR1: c.*+86 A>C 3'UTR (CR941553)

AGTR1 gene encodes the angiotensin II receptor type 1 that when activated triggers signal transduction pathways and increases sarcoplasmic calcium concentration which in turn favors muscular contraction.

Higuchi et al, 2007

This mutation is reported as associated to hypertension and HCM.



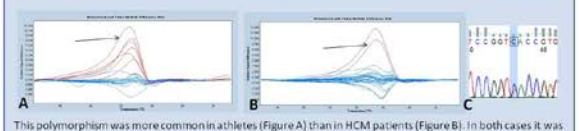
In both athletes (Figure A) and HCM patients (Figure B) this polymorphism was present in heterozygosity as shown in the chromatogram (Figure C). Mutants are shown in red curves (black arrows) whereas samples with wild type genotype are in blue.

Mutations in the 3' region are known to influence the stability of mRNA. Therefore, further studies to assess *AGTR1* mRNA levels will allow to enlighten the role of this substitution in cardiac function and its influence on athletic performance.

GLA: c.-10 C>T 5'UTR (rs2071225)

Mutations in *GLA* gene, that encodes α -galactosidase, are known to affect the synthesis, processing, and stability of this enzyme, causing Fabry disease.

Ishii et al, 2002

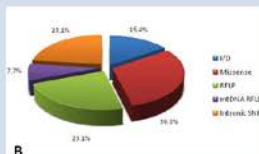
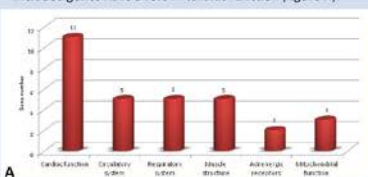


This polymorphism was more common in athletes (Figure A) than in HCM patients (Figure B). In both cases it was always present in heterozygosity as shown in the chromatogram (Figure C). Mutants are shown in red curves (black arrows) whereas samples with wild type genotype are in blue.

Mutations in the 5' region may compromise gene expression. Functional studies regarding the evaluation of mRNA levels will clarify the role of this polymorphism.

NGS Genotyping: Gene function vs genetic changes

In our specifically designed NGS panel, the majority of the included genes have a role in cardiac function (figure A).



Already known PEPs include several types of genetic changes. For our panel, the most common type are missense SNVs, followed by intronic SNVs and RFLP mutations (Figure B) (Cao et al., 2008).

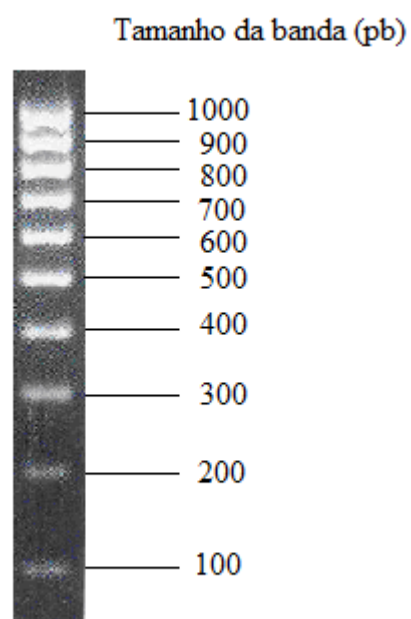
The genetic alterations found through HRM technique were validated by NGS. Other novel variants were found by NGS in regions not targeted by HRM. These are still under validation.

Variant found	Athletes (mean %)	HCM patients (mean %)
Synonymous SNVs	51	55
Non-Synonymous SNVs	15	5
Intronic SNVs	32	37
Others	2	3
Total	100%	100%

CONCLUSION AND FUTURE WORK

NGS is a valuable tool to discover novel genetic variants. However, data analysis is still a challenge due to the large number of variants detected and the intrinsic difficulty in data interpretation. Still, a targeted approach like ours proves to be effective and highly specific. Nevertheless, the difficulty in assigning a definitive role to the variants detected remains. Therefore, functional studies are needed to understand their physiological path. Large databases of variants should be carefully coupled to an accurate phenotypic characterization of the affected individuals in order to link variants to a cardiac pathology risk.

Apêndice IV Marcador de Pesos Moleculares – *HyperLadder IV* (BIOLINE, EUA).



Apêndice V Primers utilizados nas reacções de HRM e suas características.

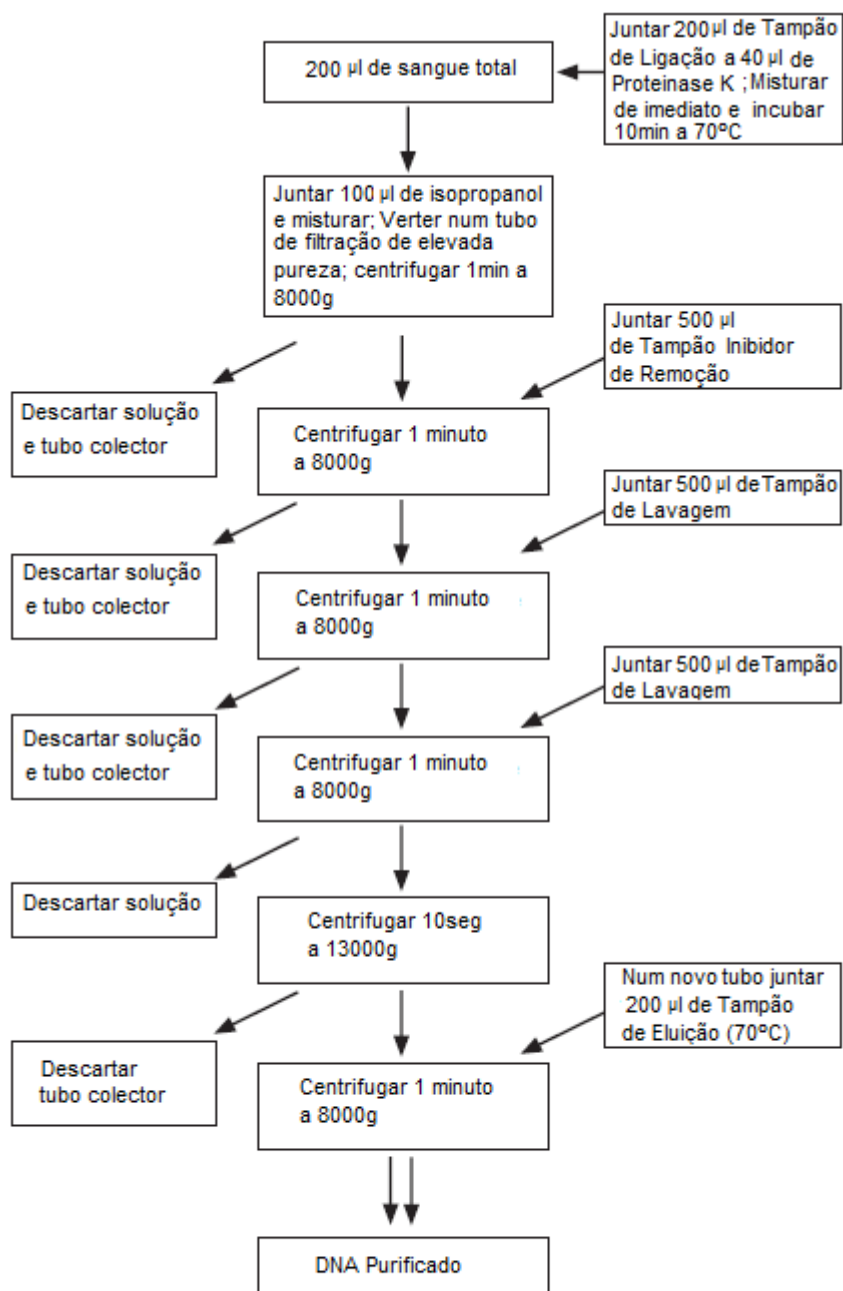
Gene	Exão	Tamanho amplificação (pb)	Sequência (5' --> 3')	Sequência (5' --> 3')	Nº de Bases (pb)	Tm Teórica (°C)	%GC	Tm Teórica (°C)	%GC
ACTN2	7	165	Forword	CAGGATGACCCCATAGGAAA	20	50	50	72	41
			Reverse	TTGCAAGGTCCCAATGTGTA	20	51	45		
	8	239	Forword	CCCTGGTTTCTCTCCTTCGTCTG	23	57	57	68	52
			Reverse	CACACTCAAGTATGCACACACAA	23	54	43		
	13	196	Forword	GTTCATTTTCTCTCATCATCTGGG	24	52	42	71	42
			Reverse	CATGTCAACAAGTGGCTTCAATAC	24	53	42		
	15	259	Forword	CCACTTGTGTCTCGGGTGTA	20	54	55	65	58
			Reverse	CGACGTCAGCTTCAAGAATG	20	52	50		
	16	236	Forword	AGCTGGCCTCTAACCCTTGT	20	55	55	71	60
			Reverse	GCTGGCTTACCTCCATCTTG	20	53	55		
AGTR1	3	194	Forword	TGAGGTTGAGTGACATGTTCTG	21	52	48	72	38
			Reverse	TTGCAAAAGGAAAGAAAAGC	20	48	35		
FHL1	6	250	Forword	GGTTGTTGAATCTGAATCCGGTG	23	54	48	68	51
			Reverse	CTGGCAGACTTAGCAAGGACTC	22	55	55		

Apêndice V- Primers utilizados nas reacções de HRM e suas características (cont.)

Gene	Exão	Tamanho amplificação (pb)	Sequência (5' --> 3')	Sequência (5' --> 3')	Nº de Bases (pb)	Tm Teórica (°C)	%GC	Tm Teórica (°C)	%GC
GLA	1(1)	162	Forword	GCCCAGGTTACCCGCGGAAAT	21	59	61	72	59
			Reverse	CGTCCTTGCCAATCCATTGT	20	53	50		
	1(2)	155	Forword	ACTGGACAATGGATTGGCAAG	21	53	48	72	53
			Reverse	CACACCCAAACACATGGAAA	20	51	45		
	3(1)	204	Forword	CAGCCTGGAATGGTTCTCTC	20	52	55	70	47
			Reverse	TACTCCCCAGTCAGCAAAGG	20	53	55		
	3(2)	153	Forword	CTACGACATTGATGCCCAGA	20	52	50	72	43
			Reverse	GCTACCATGGCCTCAAAGTTCT	22	55	50		
NEXN	5	250	Forword	GTAAGAAGCTTGAGGGGTAAATAG	24	51	42	73	35
			Reverse	ATACGAACTTAATCTTCAGTGATAC	25	49	32		
RAF1	17	250	Forword	GAGAGCATTCTTGGGCTTTGTTTCAG	26	57	46	68	68
			Reverse	GCTGGCTTCTCCTCCTCCCCTGG	23	62	70		
TTR	2	219	Forword	GGGAAGCTCATTAATTGTCGAC	22	52	45	70	45
			Reverse	GTCCTGTGGGAGGGTTCTTTGG	22	57	59		
	3	311	Forword	GTTGAGGGGAAATGTTTCATAACA	23	51	39	70	42
			Reverse	CCTGGAATGCCAAAAGCAAAACC	24	56	46		
VCL	19	323	Forword	CACTGTATCTTTGCTTCCCTC	21	51	48	67	55
			Reverse	CAGCCTCTTTCCCCGAGTA	19	53	59		

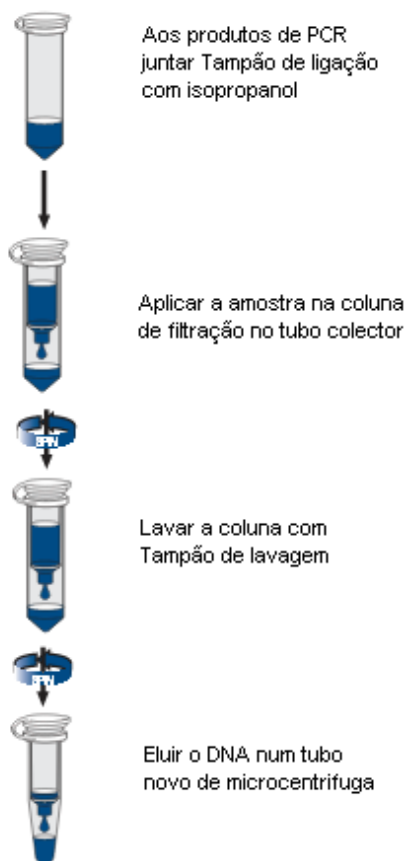
ANEXOS

Anexo I- High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha versão 16.0 (2008)

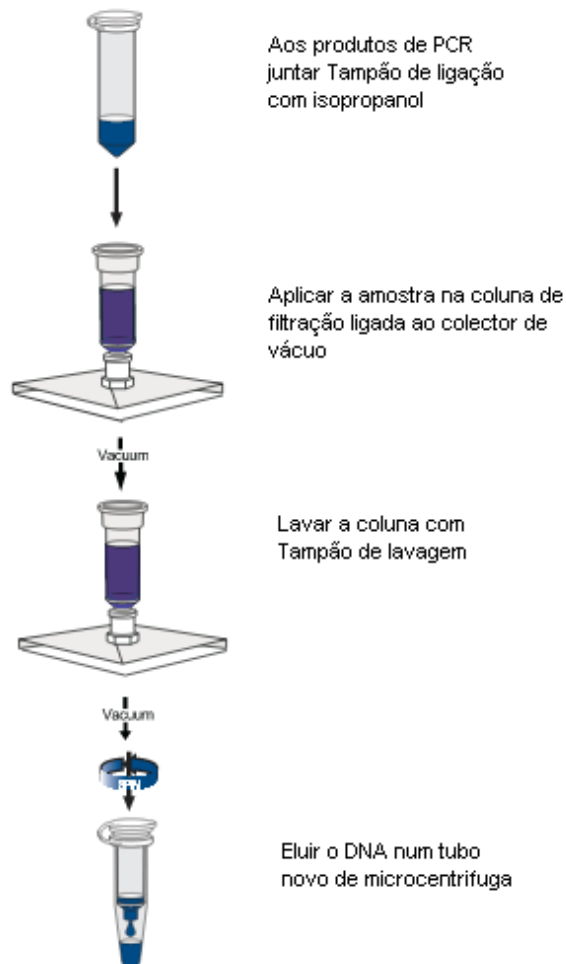


**Anexo II- Kit *Jetquick* para purificação dos produtos de PCR do gel de agarose;
Jetquick, PCR purification spin kit (Genomed GmbH, Löhne, 21 de Abril de 2010)**

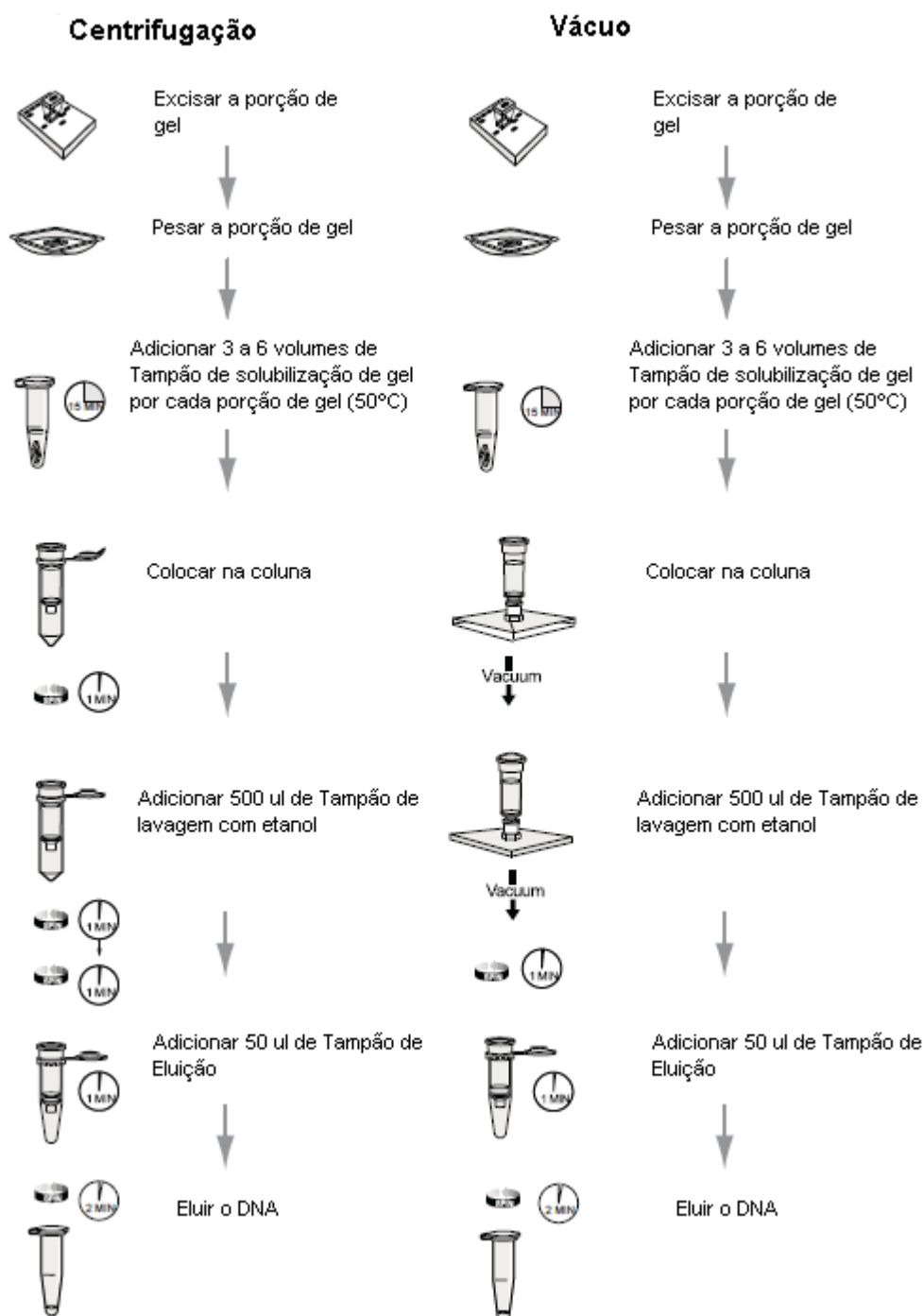
Centrifugação



Vácuo



Anexo III- Kit *Jetquick* para extração dos produtos de PCR do gel de agarose, *Kit Jetquick, gel extraction spin kit* (Genomed GmbH, Löhne, 21 de Abril de 2010)



Anexo IV Esquema de um ensaio de iPLEX. Adaptado de iPLEX™ Gold Application Guide, 2007.

