

Estudo de Mutações Causadoras de Cardiomiopatia Hipertrófica em um Grupo de Pacientes no Espírito Santo, Brasil

Study of Mutations Causing Hypertrophic Cardiomyopathy in a Group of Patients from Espírito Santo, Brazil

Júlia Daher Carneiro Marsiglia¹, Maria do Carmo Pimentel Batitucci¹, Flávia de Paula¹, Clara Barbirato¹, Edmundo Arteaga², Aloir Queiroz de Araújo¹

Universidade Federal do Espírito Santo¹, Vitória, ES; Universidade de São Paulo², São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: A cardiomiopatia hipertrófica (CH) é a doença cardíaca hereditária mais frequente, causada por mutações nos genes codificadores para proteínas do sarcômero. Embora mais de 430 mutações tenham sido identificadas em vários continentes e países, não há relato de que isso tenha sido estudado no Brasil.

Objetivo: Conduzir um estudo genético para identificar mutações genéticas que causam a CH em um grupo de pacientes no estado do Espírito Santo, Brasil.

Métodos: Usando a técnica SSCP, 12 exons dos três principais genes envolvidos com a CH foram estudados: exons 15, 20, 21, 22 e 23 do gene da cadeia pesada da β -miosina (MYH7), exons 7, 16, 18, 22 e 24 do gene da proteína C ligada à miosina (MYBPC3) e exons 8 e 9 do gene da troponina T (TNNT2).

Resultados: 16 alterações foram encontradas, incluindo duas mutações, uma delas possivelmente patogênica no gene MYBPC3 gene (p. Glu441Lys) e a outra patogênica já descrita no gene TNNT2 (p.Arg92Trp); 8 variações de sequência raras e 6 variações de sequência com frequência alélica maior do que 1% (polimorfismos).

Conclusão: Com esses dados, é possível concluir que a genotipagem dos pacientes é factível em nosso meio. É possível que a variante p.Glu441Lys no exon 16 do gene MYBPC3 seja patogênica, resultando em um fenótipo mais leve do que o encontrado em associação com outras mutações. A variante p.Arg92Trp no exon 9 do gene TNNT2 não resulta em um fenótipo tão homogêneo como descrito anteriormente e pode levar à hipertrofia grave. (Arq Bras Cardiol 2010; 94(1) : 10-17)

Palavras-chave: cardiomiopatia hipertrófica, miosina, proteína C, genes, Espírito Santo, Brasil.

Abstract

Background: Hypertrophic cardiomyopathy (HC) is the most frequent cardiac hereditary disease, caused by mutations in sarcomere protein coding genes. Although more than 430 mutations have been identified in several continents and countries, there have been no reports of mutations in Brazil.

Objective: To carry out a genetic study to identify genetic mutations that cause HC in a group of patients in Espírito Santo, Brazil.

Methods: Using the SSCP technique, 12 exons from the three main genes involved in HC were studied: exons 15, 20, 21, 22 and 23 of the β -myosin heavy chain gene (MYH7), exons 7, 16, 18, 22 and 24 of the myosin binding protein C gene (MYBPC3) and exons 8 and 9 of troponin T gene (TNNT2).

Results: 16 alterations were found, including two mutations, one of them possibly pathogenic in the MYBPC3 gene (p. Glu441Lys) and another pathogenic one, previously described in the TNNT2 gene (p.Arg92Trp), 8 rare sequence variations and 6 sequence variations with allelic frequency higher than 1% (polymorphisms).

Conclusion: These data allow the conclusion that the genotyping of patients is feasible in our country. It is possible that the isolated p.Glu441Lys variant identified in exon 16 of the MYBPC3 gene is pathogenic, promoting a milder phenotype than that found when in association with other mutations. The p.Arg92Trp variant in the exon 9 of TNNT2 gene does not promote such a homogeneous phenotype as previously described and it can lead to severe hypertrophy. (Arq Bras Cardiol 2010;94(1):10-17)

Key words: cardiomyopathy, hypertrophic; myosin; protein C; genes; Espírito Santo; Brazil.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Júlia Daher Carneiro Marsiglia •

Rua da Consolação, 3075 / 1218 - Cerqueira César - 01416-001 - São Paulo, SP, Brasil

E-mail: marsigliajdc@yahoo.com.br

Artigo recebido em 11/05/09; revisado recebido em 24/06/09; aceito em 24/06/09.

Introdução

A cardiomiopatia hipertrófica (CH) é uma doença cardíaca primária, caracterizada por hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), sem dilatação, geralmente assimétrica e principalmente septal, na ausência de qualquer outra doença cardíaca ou sistêmica que possa levar à hipertrofia miocárdica^{1,2}. Além da hipertrofia das fibras miocárdicas, ocorre um desarranjo histológico dessas fibras e variados graus de fibrose intersticial e perivascular, contribuindo para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, isquemia miocárdica, arritmia ventricular e morte súbita³.

CH é a doença cardíaca genética mais comum, mas somente no começo dos anos 90 as mutações genéticas causadoras da doença foram identificadas^{4,5}. Até agora, 13 genes codificadores para proteínas do sarcômero cardíaco foram identificadas, o que leva à definição de CH como sendo uma doença do sarcômero. Entretanto, as mutações encontradas nos genes da cadeia beta de miosina pesada (*MYH7*), da proteína C cardíaca ligada a miosina (*MYBPC3*) e da troponina T cardíaca (*TNNT2*) são responsáveis por 60 a 80% dos casos de CH^{2,6}. O único estudo genético disponível para a CH no Brasil foi conduzido por Tirone e cols.⁷. Foi um estudo pioneiro e a prevalência da CH no Brasil permanece desconhecida; em consequência, sabe-se ainda menos a respeito da prevalência das mutações causadoras da doença. No estado do Espírito Santo, onde a população estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2008 é de aproximadamente 3.500.000 habitantes⁸, e admitindo que a prevalência da CH seja similar à encontrada em outros continentes (1:500), é provável que haja cerca de 7.000 pacientes com CH no estado, o que justifica esforços para identificá-los de forma adequada, bem como os carreadores familiares.

Métodos

Pacientes

Os pacientes incluídos no estudo foram selecionados a partir da revisão dos arquivos do Setor de Ecocardiografia do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes - Universidade Federal do Espírito Santo (HUCAM - UFES). Pacientes com um diagnóstico ecocardiográfico de CH foram contatados e convidados a visitar o hospital, onde receberam informações sobre os objetivos da pesquisa, onde poderiam ser imediatamente incluídos, se assim o desejassem.

Avaliação clínica

Cada indivíduo foi submetido a um exame clínico-cardíaco, incluindo histórico, exame físico e ecocardiografia, conduzido por cardiologistas com experiência em CH.

Ecocardiografia com Doppler

Os ecocardiogramas foram conduzidos por cardiologistas experientes, usando um equipamento modelo Acuson Sequoia 512 (Mountain View, CA, USA), com transdutor de multifrequência (2,0 a 3,5 MHz), segunda harmônica e Doppler tecidual. Os pacientes foram examinados em decúbito lateral

esquerdo e os registros foram gravados em expiração não-forçada. As medidas ecocardiográficas em modo unidimensional foram obtidas durante o exame, bem como as medidas da velocidade e fluxo miocárdicos (Doppler pulsado, Doppler tecidual e Doppler contínuo). O principal critério para o diagnóstico da CH foi o critério ecocardiográfico, através da demonstração inequívoca de espessura miocárdica ≥ 15 mm em qualquer segmento do VE na ausência de outra doença cardíaca ou sistêmica que cause hipertrofia ventricular.

Extração de DNA

O DNA total foi extraído de 2 a 5 ml de sangue periférico, de acordo com a metodologia descrita por Miller e cols.⁹. O DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDropTM® 1000 e diluído até a concentração de uso (10ng/ μ l) em água ultrapurificada.

Reação em cadeia de Polimerase (PCR)

Os exons 15, 20, 21, 22 e 23 do gene *MYH7* (cadeia beta de miosina pesada), 7, 16, 18, 22 e 24 do gene *MYBPC3* (proteína C cardíaca ligada a miosina) e 8 e 9 do gene *TNNT2* (troponina T cardíaca) foram amplificados através de PCR em um termociclador Applied Biosystems, modelo Veriti®, usando primers descritos no banco de dados *CardioGenomics*⁶.

Screening de mutações

Após a amplificação por PCR, o *screening* de mutações foi realizado pela técnica de polimorfismo de conformação de filamento único ou polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP, do inglês "Single Strand Conformation Polymorphism"). Aproximadamente 10 μ l de cada produto da PCR foi misturado com 2 μ l de tampão de carregamento para SSCP. As amostras foram desnaturadas a 94°C por 10 minutos, mantidas no gelo e aplicadas aos géis. Os géis foram submetidos à eletroforese a 6W por 12 a 16 horas. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata, de acordo com a metodologia descrita por Bassam e cols.¹⁰.

Análise de sequenciamento e alterações

Os fragmentos com migração anormal no gel foram sequenciados na plataforma de sequenciamento de DNA da Embrapa – Laboratório Cenargen – em Brasília, DF, Brasil. A análise das alterações foi feita com base na sequência de referência (*MYH7*: NC_007884, *MYBPC3*: NC_007667, *TNNT2*: NC_007556) do banco de dados de sequências gênicas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) disponível online¹¹, e comparadas com as alterações já descritas no banco de dados *Cardio Genomics*, disponível online⁶.

Grupo controle

Foram coletadas amostras de sangue de um grupo controle, composto de 64 voluntários adultos, não-aparentados, com saúde aparentemente normal, nenhum histórico familiar de cardiomiopatias, normotensos, com exame físico normal e eletrocardiograma normal, que foram submetidas ao mesmo processo das amostras de pacientes com CH fenotipicamente demonstrada.

Considerações éticas

Esse estudo foi aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (Protocolo de Pesquisa N 058/07). Todos os pacientes e voluntários do grupo controle receberam informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios do estudo e aqueles que consentiram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Informado, também aprovado pelo Comitê de Ética.

Resultados

O grupo de estudo era composto por 20 pacientes, 10 do sexo masculino, com idade média de 45,7 anos. O grupo controle era composto de 64 pacientes (41 mulheres e 23 homens), com idade média 44,3 anos. As medidas ecocardiográficas obtidas dos pacientes são apresentadas na Tabela 1. Todos os pacientes apresentam hipertrofia septal assimétrica > 15 mm, aumento do átrio esquerdo como resultado da disfunção diastólica do VE (normal até 40 mm), diâmetros ventriculares internos normais (variação 55 mm), exceto em 2 pacientes com dilatação leve e diminuição da fração de ejeção em apenas 1 paciente ($\geq 55\%$ normal). Em repouso, somente 25% dos pacientes apresentavam gradientes > 30 mmHg na via de saída do VE (CH obstrutiva).

Os resultados da análise por SSCP e o sequenciamento mostraram 14 alterações, incluindo duas mutações, 6 variações raras de sequência e 6 polimorfismos. Os exons estudados estão

envolvidos em 139 das 441 mutações descritas para todos os genes, pouco acima de 31%.

No gene *MYH7*, identificamos dois polimorfismos no intron 19, ambos substituições A>G. O primeiro foi identificado na posição c.13615-64 e apresentou uma frequência de 25% nos pacientes e 19,5% nos controles. O segundo polimorfismo foi identificado na posição c.13615-64 e apresentou uma frequência de 100% nos controles e pacientes estudados. No intron 22, uma variação rara de sequência foi identificada, uma substituição T>C na posição c.14663 +32. No exon 22, uma variação rara de sequência também foi encontrada, uma substituição A>C na posição c.14537, que altera o códon de TCC para TCA, ambos serina. No exon 23, dois polimorfismos caracterizados por uma substituição T>C foram encontrados: o primeiro foi identificado na posição c.15355 e modifica o códon GCT para GCC, ambos alanina, e apresentavam uma frequência de 5% nos pacientes e 1,56% nos controles. O segundo, na posição c.15431, altera o códon de CTG para TTG, ambos leucina, e foi identificado com uma frequência de 2,5% em pacientes e 0,78% nos controles.

No gene *MYBPC3*, a mutação G>A do tipo substituição foi identificada em um paciente (Figura 1). A mutação está localizada na posição c.11642 no exon 16 e altera o códon de GAG>AAG, dessa forma alterando o aminoácido, de ácido glutâmico para lisina. Além disso, uma variação rara de sequência e um polimorfismo foram encontrados no intron 22. A alteração foi identificada na posição c.13999+118 e é uma substituição G>

Tabela 1 - Medidas ecocardiográficas dos pacientes

RG	AE (mm)	DDVE (mm)	SIV (mm)	PP (mm)	FEVE (%)	Grad (mmHg)
P1	48,5	43	20,2	11,5	81,4	40
P2	48,6	49,8	20,7	8,9	72,9	12
P3	54	46	16	9	71	0
P4	44	44,7	23,2	12,9	77,4	57
P5	41,8	47,6	21,5	8	71,8	0
P6	48,9	42,4	16,6	12,4	75,6	38
P7	48,2	37,4	24,3	9,3	72,6	10
P8	55,7	48,2	20,7	15,4	60,1	12
P9	41,2	52,6	19	10,3	71,5	0
P10	58,9	58,1	17	10,9	49,6	0
P11	39,1	47,3	16,6	13,8	55	0
P12	41	39,8	25	10,1	66,7	0
P13	52,5	42,3	30,7	13,7	69,7	0
P14	40	43,1	22,7	12,6	69,5	12
P15	65,7	57,2	28,1	15,1	72,6	112
P16	33,2	47	16	7,4	79	0
P17	37,5	42,3	16	9,5	70	0
P18	50	45,7	21,9	11,1	71	0
P19	69	55,1	19	11	69	0
P20	44	52	16	11	63	85

AE - diâmetro diastólico do átrio esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; SIV: espessura do septo interventricular; PP: espessura diastólica da parede posterior; FEVE: fração de ejeção do VE; Grad: gradiente sistólico de pico na via de saída do ventrículo esquerdo.

Artigo Original

A. O polimorfismo foi caracterizado por uma substituição C > G e foi identificado na posição c.15130+19, com uma frequência de 5% em pacientes e 3,125% em controles. Uma mutação do tipo substituição de C > T foi encontrada no exon 9 de um paciente na posição c.8772 do gene *TNNT2* (Figura 2). Essa substituição altera o códon de CCG para TGG, assim mudando o aminoácido de arginina para triptofano. Além da mutação, duas variações raras de sequência foram identificadas no intron 8 e um polimorfismo foi identificado no exon 9. A primeira alteração era uma substituição G > C na posição c.8459+130 e a segunda era uma substituição C > T na posição c.8762-20. O polimorfismo identificado era uma substituição C > T na posição c.8816, que altera o códon de ATC > ATT, ambos isoleucina. O polimorfismo apresentava uma frequência de 69,44% em pacientes e 71,88% nos controles. O resumo dos resultados pode ser visto na Tabela 2.

Discussão

Mutações

Gene MYBPC3, exon 16

A substituição G → A encontrada no exon 16 do gene *MYBPC3* do paciente P4 altera o códon de GAG, que codifica ácido glutâmico, para AAG, que determina lisina. Essa mutação foi inicialmente descrita por Seidman e cols.¹² em heterozigose composta com a mutação p.E258K no exon 7 do gene *MYBPC3*. Olivotto e cols.¹³ também descreveram essa mutação em heterozigose composta com a mutação p.E258K. Embora seja pouco provável que os pacientes dos estudos mencionados acima sejam o mesmo indivíduo, não podemos afirmar que não sejam aparentados (comunicação pessoal). Assim, a mutação p.E441K ainda não foi descrita sozinha, então não está claro se ela é capaz de causar a doença quando expressa isoladamente.

Olivotto e cols.¹³ relatam em seu estudo que os carregadores

da mutação dupla apresentavam um fenótipo mais grave do que aqueles com mutação simples. O paciente do grupo de Seidman tinha 29 anos apresentava fenótipo grave, embora eles não tivessem mais informações detalhadas sobre o caso¹ (comunicação pessoal). O paciente P4 do presente estudo tem hipertrofia moderada, sem histórico familiar de morte súbita, sem relatos de síncope e não apresenta taquicardia ventricular não-sustentada no ECG dinâmico. O paciente se queixava de angina de esforço e a angiografia coronariana mostrou artérias coronárias sem processos obstrutivos.

Niimura e cols.¹⁴ observaram em seu estudo que a sobrevivência de pacientes com mutações no gene *MYBPC3* era maior do que aquela observada com mutações no gene *TNNT2* ou alterações malignas no gene *MYH7*. De forma geral, os dados indicam que as mutações no gene *MYBPC3* estão relacionadas com formas mais leves de CH em muitos pacientes com a doença. Em outro estudo independente com 22 famílias, Richard e cols.¹⁵ relataram que 90% das famílias que apresentavam mutações no gene *MYBPC3* apresentavam prognóstico benigno ou intermediário. Além disso, em seu estudo, eles encontraram alguns pacientes com dupla heterozigose ou homozigose para mutações e em tais casos, o fenótipo era descrito como sendo mais grave. Assim, nessas famílias, a idade do desenvolvimento da doença, o grau de hipertrofia e o prognóstico estavam relacionados ao número de mutações. Assim é improvável que os pacientes dos grupos de Seidman e cols.¹² e Olivotto e cols.¹³ tenham um fenótipo mais grave devido somente à mutação p.E258K. Com base nos dados clínicos, sugerimos que a combinação das duas mutações, a p.E258K e a p.E441K, é responsável pelo fenótipo e ambas, isoladamente, são capazes de causar a doença, mas na sua forma mais leve, como é típico nas mutações do gene *MYBPC3*.

Além das evidências clínicas, alguns dados de estudos moleculares apóiam a hipótese de que a mutação p.E441K é patogênica. Várias substituições de ácido glutâmico por

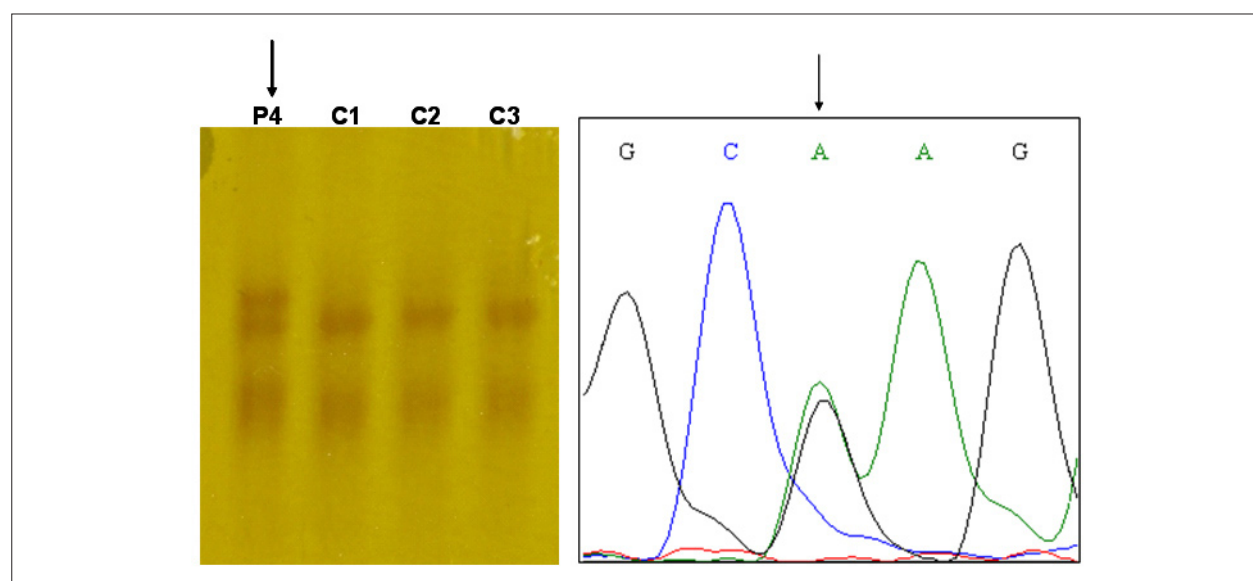


Fig. 1 - Alteração no fragmento contendo o exon 16 do gene *MYBPC3* a) Screening de mutações por SSCP em gel de poliacrilamida a 5%. C1, C2 e C3 com padrão normal e P4 mostrando um padrão diferente b) seqüenciamento do fragmento contendo o exon 16 do gene *MYBPC3* de P4, mostrando uma substituição G → A em heterozigose.

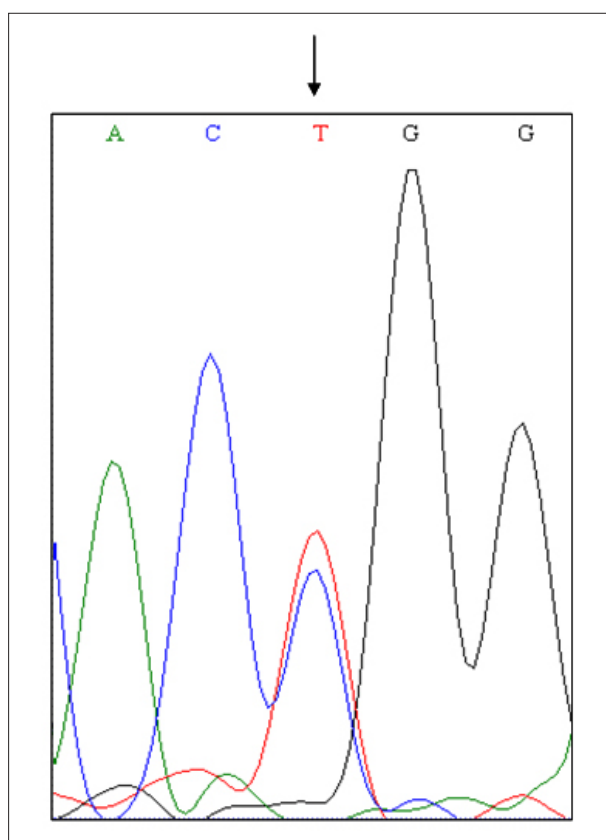


Fig. 2 - Sequenciamento de fragmento contendo o exon 8 e parte do exon 9 do gene P5 TNNT2, mostrando uma substituição C → T em heterozigose.

lisina foram descritas como estando envolvidas na CH e na cardiomiopatia dilatada (CD) no banco de dados do CardioGenomics, disponível online⁶. Somente no gene MYBPC3, há 3 substituições Glu → Lis envolvidas com a doença. No gene MYH7, há 7 dessas substituições envolvidas com CH e uma envolvida com a forma dilatada. Há duas substituições em cada um dos genes TNNT2 e α -tropomiosina, e há uma substituição em cada um dos genes da α -actina, da cadeia leve essencial da miosina e da cadeia leve reguladora da miosina.

Além disso, ao comparar a sequência de aminoácidos da proteína MYBPC3 disponível no banco de dados NCBI¹¹ em vários animais, é evidente que a região onde a substituição ocorreu é bastante conservada no homem (*Homo sapiens*), camundongo (*Mus musculus*), rato (*Rattus norvegicus*), cão (*Canis lupus familiaris*), Boi (*Bos taurus*) e chimpanzé (*Pan troglodytes*), o que sugere que esta é uma região importante da proteína.

Só é possível assegurar que essa mutação, na forma isolada, pode causar a doença se a mutação em outros exons desse gene e outros genes do sarcômero forem descartadas através de estudos familiares. Juntos, os dados clínicos e moleculares sugerem que a mutação p.E441K é patogênica.

Gene TNNT2, exon 9

A substituição C → T encontrada no exon 9 do paciente P5 gera uma alteração de códon de CCG para TGG, alterando o aminoácido de arginina para triptofano. Essa mutação, a

p.Arg92Trp ou a p.R92W, foi primeiro descrita por Moolman e cols.¹⁶, com alta frequência entre os pacientes estudados, sugerindo um efeito fundador. Os dados clínicos de seus pacientes mostraram pequena hipertrofia, frequentemente indetectável, a espessura média máxima da parede dos pacientes estava dentro da variação normal, e isso se refletia na baixa penetrância da doença. Entretanto, o prognóstico associado com a doença era extremamente ruim, particularmente para jovens adolescentes do sexo masculino e jovens adultos. Além disso, dados desse estudo sugerem que as mutações no gene TNNT2 gene levam à insuficiência cardíaca congestiva, a uma frequência mais baixa do que as mutações no gene MYH7.

Em um estudo posterior, Moolman-Smook e cols.¹⁷ investigaram 40 pacientes não-aparentados e novamente a mutação p.Arg92Trp apresentou alta frequência e os dados clínicos eram similares aos do estudo anterior. De acordo com os autores, a redução na expectativa de vida associada com essa mutação e o haplótipo bem preservado em muitas famílias sugere um evento mutacional recente.

Em 2001, Varnava e cols.¹⁸ também publicaram um estudo realizado em Londres, no qual os pacientes com mutações no gene TNNT2 apresentavam maior desarranjo miocárdico, menor fibrose e peso do coração reduzido em comparação com pacientes que tinham mutações em outros genes. O estudo, portanto, sugere que o risco de morte súbita em pacientes com mutações nesse gene deve estar relacionado ao aumento do desarranjo miocárdico, independente do grau de hipertrofia. Entretanto, de acordo com Ackerman e cols.¹⁹, há exceções para todas as associações genótipo-fenótipo e esse é o maior impedimento para utilizar a genotipagem isoladamente como ferramenta clínica e prognóstica para pacientes individuais. Em seu estudo, um paciente com a mutação p.Arg92Trp apresentava hipertrofia extrema e sua mãe, afetada de forma similar, não apresentava hipertrofia, e não havia relatos de morte súbita na família. Os autores mencionam que há ainda muitos fatores que podem confundir o fenótipo, tais como a expressão e a variabilidade fenotípicas dentro de famílias, o pequeno tamanho das famílias estudadas, genes modificadores, o papel dos polimorfismos e outros fatores não-genéticos. Esses fatores combinados podem enfraquecer a premissa de que o risco de morte súbita está associado com uma mutação em particular. Eles acreditam que ainda não há conhecimento suficiente para determinar quais mutações causadoras de CH, combinação de mutações e fatores ambientais podem influenciar o desfecho clínico. Em 2003, Van Driest e cols.²⁰ apresentaram um estudo com mutações no gene TNNT2, no qual os pacientes não apresentavam hipertrofia significativa menor do que pacientes com mutações em outros genes e nenhum deles tinha histórico familiar de morte súbita.

Em nosso paciente P5, a mutação p.Arg92Trp levou à um fenótipo que pode ser considerado grave, pois o paciente é bastante sintomático, apresentando hipertrofia moderada a grave e relatos de recorrência de síncope. Além disso, tivemos acesso ao ecocardiograma de seu filho de 18 anos, que apresenta hipertrofia maciça (33 mm), corroborando os relatos de Ackerman e cols.¹⁹.

Tabela 2 - Alterações encontradas nos pacientes com CH e nos controles

Gene	Exon	Alteração	Posição	Tipo de Alteração	Frequência alélica	
					Pacientes	Controles
MYH7	20	c.13615-64A>G	Íntron 19	Polimorfismo	25%	19,5%
	20	c.13615-64A>G	Íntron 19	Polimorfismo	100%	100%
	22	c.14663+32T>C	Íntron 22	Rara variação de sequência	-	-
	22	c.14537A>C TCC>TCA Ser>Ser	Exon 22	Rara variação de sequência	-	-
	23	c.15355 T>C GCT>GCC Ala>Ala	Exon 23	Polimorfismo	5%	1,56%
	23	c.15431T>C TTG>CTG Leu>Leu	Exon 23	Polimorfismo	2,5%	0,78%
MYBPC3	16	c.11642G>A GAG>AAG Glu>Lys	Exon 23	Mutação	-	-
	22	c.13999+118G>A	Íntron 22	Rara variação de sequência	-	-
	24	c.15130+19C>G	Íntron 22	Polimorfismo	5%	3,125%
TNNT2	8	c.8459+130 G>C	Íntron 8	Rara variação de sequência	-	-
	8/9	c.8762-20C>T	Íntron 8	Rara variação de sequência	-	-
	9	c.8816C>T ATC>ATT Ile>Ile	Exon 9	Polimorfismo	69,44%	71,88%
	9	c.8772C>T CGG>TGG Arg>Trp	Exon 9	Mutação	-	-

Variantes alélicas com frequências < 1%

Cada uma das alterações classificadas como variantes alélicas com frequência menor que 1% foram identificadas em apenas 1 indivíduo (paciente ou controle), dentre os 84 indivíduos analisados. Encontramos 5 alterações, 4 intrônicas e uma exônica do tipo silencioso, que não altera o aminoácido sintetizado.

Alterações nos introns podem ou não afetar a proteína. A fim de corretamente identificar e ligar as sequências de RNA que codificam as proteínas, os exons devem se diferenciar dos introns. Há vários motivos preservados em sequências de nucleotídeos perto dos limites exon-intron que agem como sinais essenciais de *splicing*. Esses sinais estão envolvidos com a excisão de introns de RNA pré-mensageiros e a junção de exons. Elementos adicionais conhecidos como promotores e silenciadores são necessários para permitir um *splicing* normal das sequências exônicas. Esses elementos regulatórios podem estar próximos (até 50-100 pb) ou distantes (milhares de PB) dos sítios de *splicing*²¹.

Entre as mudanças encontradas, duas estavam em regiões próximas ao limite do exon (+32 a -20) e duas estavam em regiões mais distantes (+118 e +130). Somente com as técnicas utilizadas nesse estudo, não há evidência que essas alterações afetem a proteína. Variantes genômicas que afetam o *splicing* (SpaGVs) podem ocorrer em elementos regulatórios exônicos ou intrônicos e são difíceis de serem

definidas somente pela sequência de nucleotídeos. Entretanto, essas alterações podem levar à anormalidades de *splicing* catastróficas. Em particular, SpaGVs podem induzir a exclusão de exons, ativação de sítios alternativos de *splicing*, ou podem alterar o equilíbrio de formas alternativa de *splicing* (isoformas) produzidas e assim, resultar em fenótipos da doença. A importância das variantes genômicas (VG) funcionais que estão localizadas longe dos sítios de *splicing* é ainda mais difícil de ser identificada do que a das adjacentes. Embora não estejam perto de quaisquer sequências regulatórias óbvias, tais variantes podem, por exemplo, causar a ativação de um novo sítio de *splicing*, que define os limites do exon²¹.

As outras variações raras de sequência encontradas eram do tipo silencioso. Tais alterações são geralmente desconsideradas por que não afetam a proteína sintetizada, mas estudos têm mostrado que elas podem ser importantes.

Mutações silenciosas são normalmente classificadas como polimorfismos alélicos e são consideradas neutras. Essas definições podem estar corretas em alguns casos, mas quando não são baseadas na caracterização do nível do mRNA, elas podem levar a erros, por que mutações que afetam a sequência são importantes para a modulação do *splicing* e podem levar a efeitos profundos na tradução do produto. Muitos estudos têm correlacionado mutações de ponto específicas em regiões

codificadoras com a exclusão do exon que contém a mutação. O fato de que as mutações silenciosas teoricamente causam a exclusão de um exon é particularmente significativo, por que essas mutações precisam agir a nível do RNA. Essas mutações provavelmente alteram os elementos regulatórios que são importantes para o *splicing* correto. Ainda assim, é provável que essas mutações sejam sub-relatadas, por que elas podem ser incorretamente percebidas como polimorfismos neutros que não merecem maior caracterização²².

Não é possível afirmar que as variações encontradas aqui são patogênicas, já que estudos de RNA seriam necessários para isso. Entretanto, mesmo com técnicas sensíveis como as de sequenciamento direto e o estudo completo de todos os 13 exons dos genes envolvidos na CH, a detecção de mutações em pacientes é bem sucedida em apenas 70% dos casos^{2,15}. Assim, é possível que algumas mutações de *splicing* em intron ou exon sejam subestimadas e é por isso que acreditamos ser importante estudar essas alterações e publicar os resultados.

Variantes com frequência alélica > 1% (polimorfismos)

Nesse estudo encontramos 6 polimorfismos, 3 na região intrônica e 3 dentro do exon. Recentemente, tem sido sugerido que as causas genéticas da suscetibilidade à doenças complexas podem estar além de mutações *missense* e *nonsense*, as quais são comumente estudadas em distúrbios genéticos simples. Dentro desse espectro, suspeita-se que polimorfismos que alteram a expressão gênica tenham um papel importante²³.

Um estudo avaliou um polimorfismo frequente (mais de 50%), caracterizado por uma deleção de 5pb no intron 3 do gene *TNNT2* gene em hipertrofia cardíaca e descobriu que a frequência do alelo era significativamente mais alta em pessoas com hipertrofia ventricular esquerda do que na população normal²⁴. O estudo também sugere que o genótipo em homozigose para a deleção pode estar associado com maior espessura de parede e aumento da massa ventricular do VE na população com hipertrofia. Entretanto, somente a presença do alelo não parece suficiente para causar a acentuada hipertrofia cardíaca. Os resultados sugerem, portanto, que o genótipo predispõe os indivíduos à hipertrofia cardíaca.

Vários estudos têm mostrado que os polimorfismos em regiões distantes do sítio de *splicing* podem estar relacionados a doenças, afetando elementos regulatórios. Hoogendoorn e cols.²³ estudaram in vitro o efeito dos polimorfismos em promotores de *splicing* e descobriram que uma proporção surpreendentemente alta de polimorfismos, aproximadamente 1/3 em seu estudo, podiam alterar a expressão do gene em 50% dos casos ou mais. A frequência alélica dos polimorfismos identificados nesse estudo entre pacientes e controles não foi estatisticamente significativa. Isso sugere que os polimorfismos não afetam o fenótipo. Além disso, os dados clínicos dos pacientes que tinham ou não tinham polimorfismos eram similares.

Nosso conhecimento dos elementos regulatórios do genoma humano ainda é limitado e os polimorfismos funcionais desses elementos não podem ser distinguidos de forma clara daqueles que não apresentam efeito, somente considerando sua sequência²⁴. Dessa forma, consideramos relevante o estudo e a publicação dos polimorfismos, mesmo que estes estejam em

regiões distantes dos sítios de *splicing*.

Sensibilidade do método

Nesse estudo, mutações foram identificadas em 2 de 20 pacientes, 10% da amostra, portanto. Uma proporção mais alta seria esperada, já que os exons estudados são responsáveis por aproximadamente 31% das mutações já descritas. Várias possibilidades podem ser sugeridas para explicar a sensibilidade abaixo do esperado e entre elas, três merecem atenção.

Primeiramente, o método em si não tem uma sensibilidade de 100% e esta diminui muito com o aumento do tamanho do fragmento²⁵. Estudos sugerem que para fragmentos menores que 200 pares de bases, mais de 90% das variações de sequência serão detectadas. Quando o fragmento aumenta para 300 a 350 nucleotídeos, mais de 80% das mutações serão detectadas. Em nosso estudo, apenas dois fragmentos tinham menos de 350 pb. A técnica de SSCP foi capaz de detectar várias substituições, incluindo os fragmentos maiores, mas a sensibilidade do teste pode ser melhorada ao utilizarem-se fragmentos menores ou variando-se outras condições tais como a concentração de bisacrilamida, glicerol etc.

Segundo, deve-se considerar o tamanho da amostra. No caso de um projeto piloto, com o uso de um método trabalhoso de screening genético, envolvendo várias etapas laboratoriais, o tamanho da amostra foi inicialmente considerado suficiente, dada a logística disponível, mas ele gera um impacto quando a sensibilidade do método é avaliada.

Uma terceira possibilidade é o perfil da população local. A maioria dos estudos de genotipagem em pacientes com CH são do hemisfério norte e as frequências das mutações que causam a doença em países da América do Sul, como o Brasil, são ainda desconhecidas e pouco se sabe sobre sua frequência em países em desenvolvimento. Dada a miscigenação da população brasileira, é esperada alguma similaridade com outras populações mundiais, mas isso é especulação e é possível que a prevalência de genes afetados seja diferente do descrito para outras populações. Em 1999, um estudo na África do Sul mostrou que as mutações descritas como predominantes no mundo eram aparentemente raras no país¹⁷. Um estudo de pacientes espanhóis mostrou que, em comparação à outras populações, as mutações nos genes *MYH7* e *TNNT2* eram raras entre os pacientes estudados²⁶ e uma taxa muito baixa de mutações foi encontrada em um estudo com pacientes na Finlândia²⁷. Esses dados sugerem que cada região pode ter um perfil de mutação único e isso pode ter efeitos importantes na implementação do screening populacional.

Conclusões

Considerando os objetivos do estudo, concluímos que a genotipagem dos pacientes com CH é factível em nosso país. Em relação às mutações, concluímos que é possível que a mutação p.E441K (p.Glu441Lys) no exon 16 do gene *MYBPC3* seja patogênica em sua forma isolada, promovendo um fenótipo menos grave do que quando associada à outra mutação e que a mutação p.R92W (Arg92Trp) no exon 9 do gene *TNNT2* tem um fenótipo que não é tão homogêneo como descrito anteriormente e que pode levar à hipertrofia grave.

Artigo Original

Até onde sabemos, esta é a primeira vez que uma mutação causadora de CH é descrita no Brasil. Dependendo da análise adicional, um dos pacientes nessa amostra populacional pode estar carregando uma nova mutação, quando comparada aos bancos de dados disponíveis.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e à Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Referências

1. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet*. 1997; 350: 127-33.
2. Pascale R, Villard E, Charron P, Isnard R. The genetic bases of cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48 (9): A79-A89.
3. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002; 287: 1308-20.
4. Jarcho JA, McKenna W, Pare JA, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med*. 1989; 321: 372-8.
5. Geisterfer-Lowrance A, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis of familial hypertrophic cardiomyopathy: a β -cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990; 62: 999-1006.
6. Cardiogenomics. Sarcomere protein gene mutation database. [Acesso em 2007 abr. 7]. Disponível em: <<http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/cg3/index.html>>.
7. Tirone AP, Arteaga E, Pereira AC, Krieger JE, Buck PC, Ianni BM, et al. Research of markers for the genes of the heavy chain of cardiac α -myosin and myosin binding protein c in relatives of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84 (6): 467-72.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estimativas populacionais para os municípios brasileiros em 01/07/2008. [Acesso em 2008 dez 28]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008>
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16 (3): 1215.
10. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem*. 1991; 196: 80-3.
11. National Center For Biotechnology Information. [Acesso em 2007 Feb. 10]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.
12. Cardiogenomics. Sarcomere protein gene mutation database. [Acesso em 2008 Feb. 20]. Disponível em: <http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/cg3/muts/MYBPC3_Glu441Lys.html>.
13. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, Stefano N, Martijn BJ, Elisabetta Z, et al. Myofibrillar protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83 (6): 630-8.
14. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, et al. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998; 338 (18): 1248-57.
15. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pela Secretaria de Saúde do Espírito Santo e Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Júlia Daher Carneiro Marsiglia pela Universidade Federal do Espírito Santo.

- mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003; 107 (17): 2227-32.
16. Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, et al. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29 (3): 549-55.
17. Moolman-Smook JC, De Lange WJ, Bruwer EC, Brink PA, Corfield VA. The origins of hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in two South African subpopulations: a unique profile of both independent and founder events. *Am J Hum Genet*. 1999; 65 (5): 1308-20.
18. Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation*. 2001; 104 (12): 1380-4.
19. Ackerman MJ, Van Driest SL, Ommen SR, Will ML, Nishimura RA, Tajik AJ, et al. Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39 (12): 2042-8.
20. Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2003; 108 (4): 445-51.
21. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. 2007; 8: 749-61.
22. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 285-98.
23. Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, et al. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 2003; 12 (18): 2249-54.
24. Komamura K, Iwai N, Kokame K, Kim J, Yamagishi M, Morisaki T, et al. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet*. 2004; 49: 129-33.
25. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*. 1993; 16: 325-32.
26. García-Castro M, Reguero JR, Batalla A, Diaz-Molina B, Gonzalez P, Alvarez V, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: low frequency of mutations in the β -myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin t (TNNT2) genes among spanish patients. *Clin Chem*. 2003; 49 (8): 1279-85.
27. Jaaskelainen P, Soranta M, Miettinen R, Saarinen L, Pihlajamäki J, Silvennoinen K, et al. The cardiac β -myosin heavy chain gene is not the predominant gene for hypertrophic cardiomyopathy in the Finnish population - mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32 (6): 1709-16.