

Leonor de Sousa Dâmaso da Silveira

Licenciada em Biologia Celular e Molecular



**Genética e Mecanismos Moleculares na Miocardiopatia
Hipertrófica: papel dos genes *CSRP3* e *TCAP*.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora: Susana Isabel Rodrigues Santos, Professora Doutora, ULHT

Júri:

Presidente: Prof. Dr. José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutor Nuno Miguel Albuquerque e Castro de Almeida Cardim

Vogal: Prof. Dr. Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

Genética e Mecanismos Moleculares na Miocardiopatia Hipertrófica: papel dos genes *CSRP3* e *TCAP*

Copyright Leonor de Sousa Dâmaso da Silveira, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Parte do trabalho apresentado nesta dissertação encontra-se incluída nos artigos:

Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Branco, P., Silveira, L., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M. e Fernandes, A.F. 2011. *Genetic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy using Mass Spectrometry DNA Arrays and High Resolution Melting*. Revista Portuguesa de Cardiologia 30 (01): 7-18.

Santos, S., Marques, Pires, M., V., Silveira, L., Oliveira, H., V., Lança, Brito, D., Madeira, H., Monteiro, C., Carreira, I.M., Gaspar, I.M. e Fernandes, A.F. *HIGH RESOLUTION MELTING: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort*. Este artigo foi submetido à revista “BMC Medical Genetics” em 2011.

Publicações adicionais:

Comunicação oral: Santos, S., Fernandes, A.R., Freitas A.T., Machado C.M, Branco, P., Silveira, L., Carreira I., Antunes, M., Monteiro C. “*HCM sarcomere gene expression analysis: a machine learning approach*”. *Advances in qPCR European Conference, Select Biosciences*. Dublin, Irlanda, 14-15 Setembro 2010.

Santos, S., Fernandes, A.R., Freitas A.T., Machado C.M, Branco, P., Silveira, L., Carreira I., Antunes, M., Monteiro C. “*Unsupervised analysis of HCM sarcomere gene expression data*”.

Poster: Santos, S., Freitas A.T., Machado C.M., Branco, P., Silveira, L., Carreira I., Antunes, M., Monteiro C, Fernandes, A.R. “*Molecular Strategies for Hypertrophic Cardiomyopathy Genetic Analysis: correlation between Genotyping and expression data*”. *European Society of Human Genetics*. ESGH 12-15 JUN 2010, Gothenburg, Suécia - Junho 12 - 15, 2010.

Ao Leonardo e à Maria

v

Agradecimentos

Quero desde já agradecer a todos aqueles que me ajudaram a completar este projecto.

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Alexandra Fernandes e à Professora Doutora Susana Santos, orientadoras deste trabalho, que me aceitaram no seu laboratório e me apoiaram no desenvolvimento do meu trabalho. O seu apoio foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à Dr^a Isabel Marques e ao João Costa pela disponibilidade dos seus laboratórios de genotipagem no Instituto Gulbenkian de Ciência.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, mais especificamente à Professora Doutora Isabel Carreira e à Ana Santos pelos serviços de sequenciação tão prontamente prestados.

À Universidade Lusófona, pela disponibilização das instalações necessárias para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, João Leite, Luís Raposo e Vanda Marques, pelas trocas de ideias e discussões sempre bem-vindas. Aos meus companheiros Ana Silva, Ana Sousa, Daniel Luís, Helena Oliveira e Patrícia Branco pela constante risota e descontração, apoio e amizade. Um agradecimento especial à Kelly Veiga e à Marina Pires pela ajuda que me deram e pela companhia nas longas horas de trabalho.

À Joana Nabais, a minha amiga das Químicas. Obrigada pelo teu constante apoio e amizade.

À minha família, avós, tios, padrinhos, pelo constante apoio e preocupação com o meu percurso profissional. Aos meus primos e afilhada pelas brincadeiras com póneis e carrinhos que me fazem por momentos voltar à idade da inocência. À Joaninha, a mais recente aquisição da família. És a melhor irmã do mundo. Obrigada pelo teu apoio! Gosto imenso de ti!

Um agradecimento muito especial aos meus Pais e ao meu Irmão, pela paciência para me aturarem que eu bem sei que nem sempre é fácil. Obrigada pelo vosso apoio constante e amor incondicional! Adoro-vos!

Finalmente, ao Pedro, por me manter focada nos meus objectivos e me apoiar quando o desespero se começava a instalar. Pelas suas piadinhas de misturar líquidos em tubinhos para mudarem de cor que sempre me fizeram rir. És o meu pilar. Amo-te!

Resumo

A Miocardiopatia Hipertrófica (MH) é uma doença do miocárdio caracterizada principalmente pela hipertrofia primária do septo interventricular, desarranjo fascicular e fibrose intersticial. É uma doença genética complexa com padrão de transmissão autossómico dominante e prevalência de 1 em 500. Cerca de 60% dos casos de MH são causados por mutações em genes que codificam para proteínas do sarcómero cardíaco. Os restantes casos são causados por mutações em genes que codificam para proteínas não sarcoméricas envolvidas no processo de contracção muscular, como é o caso do gene *CSRP3*, que codifica a proteína LIM muscular e o gene *TCAP*, que codifica a teletonina. Em Portugal, o diagnóstico genético é feito através da análise dos 5 genes principais (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYL2*) por Sequenciação Automática (SA). Este método de diagnóstico é dispendioso e moroso, sendo assim importante a aplicação de técnicas de detecção de mutações em larga escala ao diagnóstico desta doença, tais como o iPLEX *MassArray* e a Desnaturação de Alta Resolução (HRM). Neste trabalho foram detectadas mutações nos genes *CSRP3* e *TCAP* por iPLEX *MassArray* em 35 indivíduos com MH, tendo sido confirmadas por HRM, 14 dessas alterações no gene *CSRP3* e 15 no gene *TCAP*, genes não incluídos no diagnóstico corrente por SA.

No sentido de relacionar o fenótipo dos casos mais severos de MH com o nível de expressão genética do gene *CSRP3*, foi realizada uma análise transcritómica por PCR em tempo real dos tecidos musculares cardíaco e esquelético de indivíduos doentes relativamente a um controlo saudável. Verificou-se aumento da expressão ao nível do septo interventricular e do apêndice auricular nos indivíduos doentes e que desta forma também parece ser afectado pela doença. No tecido esquelético também se verificaram alterações da expressão deste gene, reforçando a teoria de alterações no gene *CSRP3* estarem associadas a miopatias esqueléticas.

Termos-chave: Miocardiopatia Hipertrófica, *CSRP3*, *TCAP*, iPLEX *MassArray*, Desnaturação de Alta Resolução, PCR em tempo real

Abstract

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is a myocardial disease characterized by ventricular hypertrophy, disarray and interstitial fibrosis. It is a complex genetic disorder with an estimated prevalence of 1 in 500. HCM is mainly caused by dominant negative mutations in genes that encode different components of the sarcomere. It is also caused by mutations in other genes implicated in muscular contraction, including *CSRP3* that encodes muscular LIM protein and *TCAP* that encodes telethonin. HCM diagnosis in Portugal, is typically achieved by automated dideoxy-sequencing (AS) of the 5 sarcomere core genes (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* and *MYL2*). AS is an expensive and time consuming technique hence the importance of implementing high-throughput techniques such as iPLEX *MassArray* and High Resolution Melting (HRM) to HCM diagnosis. This coupled strategy allowed the identification of 14 mutations in *CSRP3* and 15 other mutations in *TCAP*, being these genes not included in the current HCM genetic diagnosis.

In order to correlate *CSRP3* gene expression with HCM phenotypic severity, cardiac and skeletal muscle tissues were analyzed by Real Time PCR. *CSRP3* gene expression is upregulated in HCM patients as compared with a healthy control. This upregulation is observed both in the interventricular septum and in auricular cardiac tissue, reinforcing the concept that auricular tissue is also affected in HCM. Moreover, *CSRP3* gene expression is also altered in skeletal muscle, which could be an evidence of skeletal muscle involvement in the affected individuals, suggesting an HCM associated skeletal myopathy.

Key-words: Hypertrophic Cardiomyopathy, *CSRP3*, *TCAP*, iPLEX *MassArray*, High Resolution Melting, Real Time PCR

Índice Geral

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice Geral	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xvii
Lista de abreviaturas	xix
Lista de unidades	xxii
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Músculo estriado cardíaco	1
1.1.1. Estrutura dos sarcómeros	2
1.1.2. Proteínas sarcoméricas	3
1.1.2.1. Filamentos finos	4
1.1.2.2. Filamentos grossos	5
1.1.3. Discos Z	7
1.1.4. Titina	9
1.1.5. Contração muscular	9
1.2. Miocardiopatia Hipertrofica	10
1.2.1. Histopatologia	10
1.2.2. Sintomatologia	11
1.2.3. Genética molecular	12
1.2.3.1. Genes das proteínas do sarcómero	13
1.2.3.2. Genes das proteínas da linha Z	14
1.2.3.3. Outros genes	15
1.2.3.4. Fenocópias	16
1.2.4. Patofisiologia	17
1.2.5. Correlações genótipo-fenótipo	17
1.2.6. Determinantes fenotípicos	18
1.3. Diagnóstico diferencial	19
1.3.1. Diagnóstico clínico	19
1.3.2. Diagnóstico genético	19
1.4. Estudos transcricionais	23
1.5. Trabalho a realizar	24
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	27
2.1. Análise genética	27
	xiii

2.1.1. iPLEX <i>MASSARRAY</i> ®	27
2.1.1.1. Amostra populacional em estudo	27
2.1.1.2. Isolamento e quantificação de DNA de 1mL de sangue total	28
2.1.1.3. iPLEX <i>MASSARRAY</i> ®	29
2.1.1.3.1. Oligonucleótidos de amplificação e de extensão	30
2.1.1.3.2. Amplificação de DNA para genotipagem	31
2.1.1.3.3. Preparação da solução da enzima SAP	31
2.1.1.3.4. Reacção iPLEX Gold	32
2.1.1.3.5. <i>MASSARRAY</i>	33
2.1.1.3.6. Análise de resultados	33
2.1.1.3.7. Reorganização dos <i>plexes</i>	33
2.1.2. Desnaturação de Alta Resolução (HRM)	35
2.1.2.1. Desenho e optimização dos oligonucleótidos	35
2.1.2.2. Preparação do ensaio	35
2.1.2.3. Reacção de PCR	36
2.1.2.4. HRM	36
2.1.2.5. Análise de resultados	36
2.2. Análise transcritómica	37
2.2.1 PCR em tempo real	37
2.2.1.1. Amostra populacional em estudo	38
2.2.1.2. Isolamento de RNA a partir de tecido e síntese de cDNA	39
2.2.1.3. Ensaio de PCR em tempo real	39
2.2.1.4. Análise de resultados	40
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	43
3.1. Análise genética	43
3.2. Análise transcritómica	63
Capítulo 4 - Conclusões e Perspectivas Futuras	73
Capítulo 5 - Referências bibliográficas	77
Capítulo 6 - Anexos	II
6.1. Anexo 1	II
6.2. Anexo 2	IV
6.3. Anexo 3	V
6.4. Anexo 4	VI

Índice de Figuras

Figura 1.1- Microscopia electrónica de uma porção de músculo esquelético.....	2
Figura 1.2 –Imagem em microscopia electrónica da organização estrutural de dois sarcómeros contíguos. Proteínas sarcoméricas e proteínas associadas.	3
Figura 1.3 – Estrutura da actina G e F	4
Figura 1.4 – Estrutura da tropomiosina.....	5
Figura 1.5 – Estrutura da troponina cardíaca no seu estado saturado de Ca^{2+}	5
Figura 1.6 – Estrutura da β -miosina cardíaca	6
Figura 1.7 – Representação da proteína C de ligação à miosina.....	7
Figura 1.8 – Representação da proteína LIM cardíaca.....	8
Figura 1.9 - Representação da α -actinina	8
Figura 1.10 – Interação entre a teletonina e a titina	8
Figura 1.11 – Domínios da titina presentes na banda I.....	9
Figura 1.12 – Histopatologia de cortes transversais do miocárdio.....	10
Figura 1.13 – Comparação de um miocárdio com hipertrofia e um miocárdio normal	11
Figura 1.14 – Zigotia de mutações causais	13
Figura 1.15 – Imagem de microscopia electrónica de fibras do miocárdio, com acumulação de glicogénio, de um doente com uma mutação no gene <i>PRKAG2</i>	17
Figura 1.16 – Ensaio de iPLEX <i>MassArray</i>	21
Figura 1.17 – Modelo teórico de genotipagem em <i>cluster</i>	22
Figura 1.18 – Formação de homoduplexes e heteroduplexes numa amostra de DNA heterozigótica para uma alteração de DNA no fragmento amplificado	23
Figura 2.1 – Organização de placa de iPLEX <i>MassArray</i> com 21 <i>plexes</i>	34
Figura 2.2 – Organização de placa de iPLEX <i>MassArray</i> com 35 <i>plexes</i>	35
Figura 2.3 – Sequência do cDNA do gene <i>CSRP3</i>	40
Figura 3.1– Interface do <i>software Typer Analyser</i> da <i>Sequenom</i>	43
Figura 3.2 – Perfil de HRM relativo ao exão 14 do gene <i>TNNT2</i> na amostra 98	45
Figura 3.3 - Perfil de HRM relativo ao exão 14 do gene <i>TNNT2</i> na amostra 106.	46
Figura 3.4 – Sequências do exão 2 do gene <i>TCAP</i> dos pacientes 8, 23 e 29 com identificação da mutação sinónima c.453 A>C, p.Ala151Ala detectada por HRM	50
Figura 3.5 – Resultados de genotipagem por iPLEX <i>MassArray</i> dos doentes 32 e 30. Perfil de HRM para o exão 3 do gene <i>CSRP3</i>	51
Figura 3.6 – Alinhamento da sequência da proteína LIM muscular na sua forma nativa (<i>wt</i>) e com a alteração p.Ala43Valfs165 (<i>m</i>)	52
Figura 3.7 - Resultados de genotipagem por iPLEX <i>MassArray</i> do doente 1 e o doente 33. Perfil de HRM.....	53

Figura 3.8 –Estrutura molecular da leucina e da prolina. Previsão da severidade da substituição Leu44Pro na estrutura da proteína LIM	54
Figura 3.9 – Análise do exão 2 do gene <i>TCAP</i> . Curva de desnaturação e curvas de diferenças relativas dos doentes 16, 17 e 29.....	55
Figura 3.10 - Estrutura molecular dos aminoácidos arginina e triptofano. Previsão da severidade do dano da substituição Arg70Trp na estrutura da teletonina.....	55
Figura 3.11 - Estrutura molecular dos aminoácidos cisteína e glicina. Previsão da severidade da substituição Cys58Gly na estrutura da proteína LIM.....	57
Figura 3.12 - Resultados de genotipagem por iPLEX <i>MassArray</i> dos doentes 29 e 22. Curvas de desnaturação e curvas de diferenças relativas para o exão 1 do gene <i>TCAP</i>	58
Figura 3.13 - Alinhamento entre a sequência de cDNA do gene <i>rRNA18S</i> e as sequências dos oligonucleótidos e sonda desenhados para detecção dos níveis de expressão do gene <i>CSRP3</i> .	64
Figura 3.14 – Expressão do gene <i>CSRP3</i> no tecido do septo interventricular de doentes com MH.	67
Figura 3.15 - Expressão do gene <i>CSRP3</i> no tecido do apêndice auricular direito de doentes com MH.....	67
Figura 3.16 - Expressão do gene <i>CSRP3</i> no tecido muscular esquelético de doentes com MH	68
Figura 3.17 –Rede de interacção proteica e estrutura do sarcómero.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Genes sarcoméricos e sua localização cromossómica, funções das proteínas correspondentes e número de mutações associadas a MH.	14
Tabela 1.2 – Genes do disco Z e sua localização cromossómica, funções das proteínas correspondentes e número de mutações associadas a MH.	15
Tabela 1.3 – Outros genes e sua localização cromossómica, funções das proteínas correspondentes e número de mutações associadas a MH.	16
Tabela 2.1 – Indivíduos com MH estudados por iPLEX <i>MassArray</i> e informação clínica adicional. Os doentes realçados com sublinhado apresentam diagnóstico clínico de Miocardiopatia Hipertrófica Obstrutiva (MHO), tendo sido sujeitos a cirurgia cardíaca (miectomia).	27
Tabela 2.2– Número de mutações analisadas por iPLEX <i>MassArray</i> em cada um dos genes associados a MH. Retirado de http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php e http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home	29
Tabela 2.3 – Exemplo de sequência utilizada pelo <i>software MASSARRAY Assay Design 3.1</i> . (Sequenom®) para desenho dos oligonucleótidos de amplificação e de extensão para a mutação CM031382 no gene <i>TNNT2</i> . O código CM031382 refere-se a uma mutação <i>missense</i> (HGMD) naquele gene.	30
Tabela 2.4– Componentes da mistura PCR.	31
Tabela 2.5 – Condições de reacção de amplificação de DNA por PCR.	31
Tabela 2.6 – Componentes da solução de enzima SAP.	32
Tabela 2.7 – Condições de reacção de SAP.	32
Tabela 2.8 – Componentes da reacção de extensão iPLEX Gold.	32
Tabela 2.9 – Condições de reacção de iPLEX Gold.	33
Tabela 2.10 – Componentes da mistura de reacção de HRM.	36
Tabela 2.11 – Condições da reacção de amplificação.	36
Tabela 2.12 – Conjunto de doentes em estudo com diagnóstico de MHO e informação clínica adicional.	38
Tabela 2.13 – Sequências dos oligonucleótidos desenhados para o ensaio de PCR em tempo real.	39
Tabela 2.14 – Condições da reacção de PCR em tempo real.	40
Tabela 3.1 – Doentes, genes e mutações detectadas por iPLEX <i>MassArray</i>	44
Tabela 3.2 – Análise de mutações por tecnologia de iPLEX <i>MassArray</i> nos genes <i>CSRP3</i> e <i>TCAP</i> em doentes com MH. Na tabela encontra-se descrito o gene o respectivo exão, a designação do doente (amostra), o código da mutação detectada, as alterações causadas nas sequências nucleotídicas e aminoacídicas, e os resultados das análises feitas por iPLEX	

MassArray (resultados confirmados como falsos positivos marcados a cinzento) e HRM (as amostras não analisadas por falta de DNA estão assinaladas com um traço). G - Guanina; C – Citosina; A – Adenina; T – Timina; Del - deleção..... 48

Tabela 3.3 – Genotipagem por iPLEX *MassArray*, HRM e/ou dos doentes em estudo, incluindo os doentes do estudo de PCR em tempo real (excluindo os doentes: com resultados falsos positivos - 3, 9, 13, 25 e 31; sem mutações detectadas por iPLEX *MassArray* – 41, 42, 46, 58 e 108; e não genotipados – 50 e 53). Alguns destes resultados estão presentes no artigo cujo resumo se apresenta em anexo. 59

Tabela 3.4 – Número de mutações detectadas nos doentes em estudo por gene e percentagens de MH causada por mutação em cada um dos genes. 62

Tabela 3.5 – Resultados das reacções de PCR em tempo real. Valor das médias dos Cps relativamente aos genes *CSRP3* e rRNA18S (Cp) e respectivos desvios padrão (σ). Diferença entre Cp do gene alvo e do gene de controlo endógeno (Δ Cp) e respectivos desvios padrão (σ médio Δ Cp). Razões de expressão relativa de expressão do gene *CSRP3* (2^{Δ Cp}) e erro associado. As células sublinhadas a cinzento indicam os casos em que teve de ser excluído um dos valores de Cp. Resultados de iPLEX *MassArray* e HRM para o gene *CSRP3*. As amostras positivas apresentam alteração em HRM. A amostra CS corresponde ao controlo saudável. V – septo interventricular; A – apêndice auricular direito; E – músculo esquelético. nd – não determinado. 64

Lista de abreviaturas

% (p/v) – Percentagem peso/volume

3'UTR – Região 3' não traduzida, do inglês 3' *untranslated region*

A – Adenina

A/Ala - Alanina

aa – Aminoácido(s)

ACE – Enzima conversora de angiotensina, do inglês *Angiotensin converting enzyme*

ACTA1 – Gene que codifica a actina $\alpha 1$, músculo esquelético

ACTC1 – Gene que codifica a α -actina cardíaca

ACTN2 – Gene que codifica a α -actinina 2

ADP – Adenosina Difosfato, do inglês *Adenosine diphosphate*

AMP – Adenosina Monofosfato, do inglês *Adenosine monophosphate*

ANKRD1 – Gene que codifica o domínio de repetição 1 da anquirina

ATP – Adenosina Trifosfato, do inglês *Adenosine triphosphate*

C – Citosina

C/Cys – Cisteína

Ca²⁺ – Cálcio

CALR3 – Gene que codifica a Calreticulina 3

CASQ2 - Gene que codifica a Calsequestrina 2

CAV3 – Gene que codifica a Caveolina 3

cDNA – DNA complementar, do inglês *Complementary DNA*

COX15 – Gene que codifica a proteína de montagem do citocromo C oxidase

Cp – Do inglês *Crossing point*

CSR3 – Gene que codifica a proteína LIM do músculo cardíaco

D/Asp – Aspartato

DAVD - Displasia Arritmogénica do Ventrículo Direito

ddNTP - Didesoxirribonucleótido trifosfatado, do inglês *Dideoxyribonucleotide triphosphate*

DES – Gene que codifica a Desmina

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

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

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxyribonucleic Acid*

dNDPs - Desoxirribonucleótidos difosfatados, do inglês *Deoxyribonucleotide diphosphate*

dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfatados, do inglês *Deoxyribonucleotide triphosphate*

E/Glu – Glutamato

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*
F/Phe – Fenilalanina
FnIII – Domínio fibronectina
fs – Alteração da grelha de leitura, do inglês *frameshift*
FXN – Gene que codifica a Frataxina
G - Guanina
G/Gly – Glicina
H/His – Histidina
HRM – Desnaturação de alta resolução, do inglês *High Resolution Melting*
I/Ile – Isoleucina
IgI – Domínio imunoglobulina
JPH2 – Gene que codifica a Junctofilina 2
K/Lys – Lisina
K⁺ - Ião potássio
L/Leu – Leucina
LAMP2 – Gene que codifica a proteína de membrana 2 associada ao lisossoma
M/Met – Metionina
MALDI-TOF – Do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*
MD – Miocardiopatia Dilatada
Mg²⁺ - Ião magnésio
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MH – Miocardiopatia Hipertrófica
miRNA – Micro ácido ribonucleico, do inglês *Micro Ribonucleic Acid*
MR – Miocardiopatia Restritiva
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *Messenger Ribonucleic Acid*
MYBPC3 – Gene que codifica a proteína C de ligação à miosina cardíaca
MYH6 – Gene que codifica a cadeia pesada da α -miosina
MYH7 – Gene que codifica a cadeia pesada da β -miosina
MYL2 – Gene que codifica a cadeia leve regulatória da miosina
MYL3 – Gene que codifica a cadeia leve essencial da miosina
MYLK2 – Gene que codifica a cinase 2 da cadeia leve da miosina
MYO6 – Gene que codifica a Miosina VI
MYOZ2 – Gene que codifica a Miozenina 2
N/Asn – Asparagina
Na⁺ - Ião sódio
NCBI – Do inglês, *National Center for Biotechnology Information*
OBSCN – Gene que codifica a Obscurina

P/Pro – Prolina
pb – pares de bases
PCR – Reacção em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
PKA – Proteína cinase A, do inglês *Protein Kinase A*
PLN – Gene que codifica a Fosfolamban
PRKAG2 – Gene que codifica a subunidade γ -2 da proteína cinase dependente de AMP
Q/Gln – Glutamina
R/Arg – Arginina
RAAS – Sistema renina-angiotensina-aldosterona, do inglês *Renin-angiotensin-aldosterone system*
RAF1 – Gene que codifica o Proto-oncogene serina/treonina-proteína cinase
RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*
rRNA – RNA ribossomal, do inglês Ribosomal RNA
S/Ser – Serina
SA – Sequenciação Automática
SAP – Fosfatase alcalina de camarão, do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*
SLC25A4 – Gene que codifica o membro 4 da família 25 de transportadores de solutos
SSCP – Polimorfismo de conformação de filamento único, do inglês *Single Strand Conformational Polymorphism*
T - Timina
T/Thr – Treonina
TCAP – Gene que codifica a Teletonina
TMOD4 - Gene que codifica a Tropomodulina
TNNC1 – Gene que codifica a Troponina cardíaca C
TNNI3 – Gene que codifica a Troponina cardíaca I
TNNT2 – Gene que codifica a Troponina cardíaca T
TPM1 – Gene que codifica a α -tropomiosina
TTN – Gene que codifica a Titina
V/Val – Valina
VCL – Gene que codifica a Vinculina
VE – Ventrículo Esquerdo
W/Trp – Triptofano
Wt – Do inglês *wild type*
Y/Tyr – Tirosina

Lista de unidades

°C – Graus Celsius

Da - Daltons kD – Quilo Dalton MDa - MegaDalton

g – grama: μg – Micrograma (10^{-6} g); ng – Nanograma (10^{-9} g)

L – Litro: ml - Mililitro (10^{-3} L); μl - Microlitro (10^{-6} L)

M – Molar: mM – Milimolar (10^{-3} M); μM – Micromolar (10^{-6} M); nM – Nanomolar (10^{-9} M)

mm - Milímetro

U – Unidades

X - vezes

Capítulo 1 - Introdução

As miocardiopatias são doenças associadas ao miocárdio que têm um impacto negativo na função do músculo cardíaco conduzindo a uma função cardíaca anormal. Podem ser classificadas como miocardiopatias primárias quando apenas afectam o músculo cardíaco, ou secundárias quando afectam o miocárdio como consequência de doenças sistémicas (Richard, *et al*, 2010).

As miocardiopatias primárias podem ser de origem genética e são agrupadas em quatro tipos, dependendo do tipo anatómico e funcional da deficiência: dilatada, hipertrófica, restritiva e displasia arritmogénica do ventrículo direito. A Miocardiopatia Dilatada (MD) é caracterizada pela dilatação das cavidades ventriculares e pela disfunção da sístole ventricular. Pode ser de origem idiopática, viral, imunitária sendo raramente de origem genética. A Miocardiopatia Restritiva (MR) é caracterizada pela redução do volume diastólico de um ou de ambos os ventrículos, com função sistólica e espessura da parede normais. Pode verificar-se aumento da fibrose intersticial. Relativamente à origem, poderá ser idiopática ou poderá estar associada a outra doença. A Displasia Arritmogénica do Ventrículo Direito (DAVD) é caracterizada pela substituição progressiva do músculo cardíaco por tecido fibroso (Richard, *et al*, 2010).

Finalmente, a Miocardiopatia Hipertrófica (MH) sendo a doença monogénica de foro cardíaco mais frequente e muitas vezes associada a um fenótipo clínico grave é o objecto de estudo neste trabalho. Estima-se que 60% dos casos de MH sejam causados por mutações nos genes que codificam as proteínas do sarcómero cardíaco (Ho, e Seidman, 2006). Apresenta grande heterogeneidade clínica e genética no que diz respeito à sua expressão fenotípica, penetrância e prognóstico.

1.1. Músculo estriado cardíaco

O músculo estriado cardíaco, tal como os restantes tipos de músculos, é constituído por células alongadas e ramificadas, os cardiomiócitos. Esta estrutura ramificada permite a propagação do estímulo eléctrico num único plano (Fatkin e Graham, 2002).

Os cardiomiócitos são células cilíndricas com um a dois núcleos de localização central, que comunicam entre si através de membranas especializadas, os discos intercalares. Estas membranas consistem em junções de aderência (N-caderinas, cateninas e vinculina), desmossomas (desmina, desmoplaquina, desmocolina e desmogleína) e junções comunicantes (conexinas) que em conjunto permitem manter a estrutura dos cardiomiócitos intacta durante os movimentos de contracção e relaxamento (Fatkin e Graham, 2002).

Os cardiomiócitos são revestidos por uma membrana, o sarcolema, e no seu interior apresentam conjuntos de miofibrilas, ou seja, miofilamentos de actina e de miosina, que lhes confere o aspecto estriado. As miofibrilas consistem na repetição de uma unidade estrutural e funcional de contracção, o sarcómero (figura 1.1). Esta unidade contráctil é composta por várias proteínas dispostas

de forma organizada que constituem o modelo de deslizamento característico da contracção muscular (Fatkin e Graham, 2002).

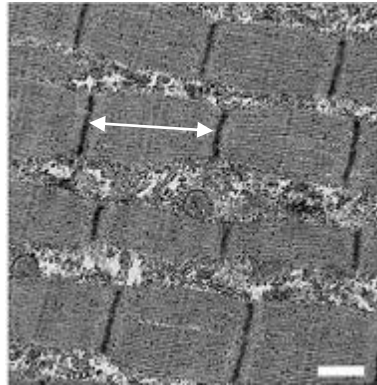


Figura 1.1- Microscopia electrónica de uma porção de músculo esquelético. A seta branca identifica um sarcómero (Imagem adaptada de Potthoff *et al*, 2007).

1.1.1. Estrutura dos sarcómeros

A definição de diferentes zonas ao nível do sarcómero depende de diferenças na dimensão, densidade e distribuição das proteínas que o formam como se verifica na figura 1.2. O sarcómero é delimitado pelas linhas Z (ou discos Z). É este o local onde os filamentos finos estão ancorados às conexinas. Estendendo-se a partir das linhas Z, as bandas I são o local onde se concentram os filamentos finos. A Banda A é a zona central do sarcómero, onde se identificam os filamentos grossos em conjunto com parte dos filamentos finos. Na região mais central da banda A, ou seja na banda M, encontram-se apenas os filamentos grossos. A suportar esta estrutura encontra-se a titina (codificada pelo gene *TTN*), proteína esta que se estende a todo comprimento do sarcómero interagindo com variadas proteínas de todas as regiões mencionadas (figura 1.2) (Boateng e Goldspink, 2008).

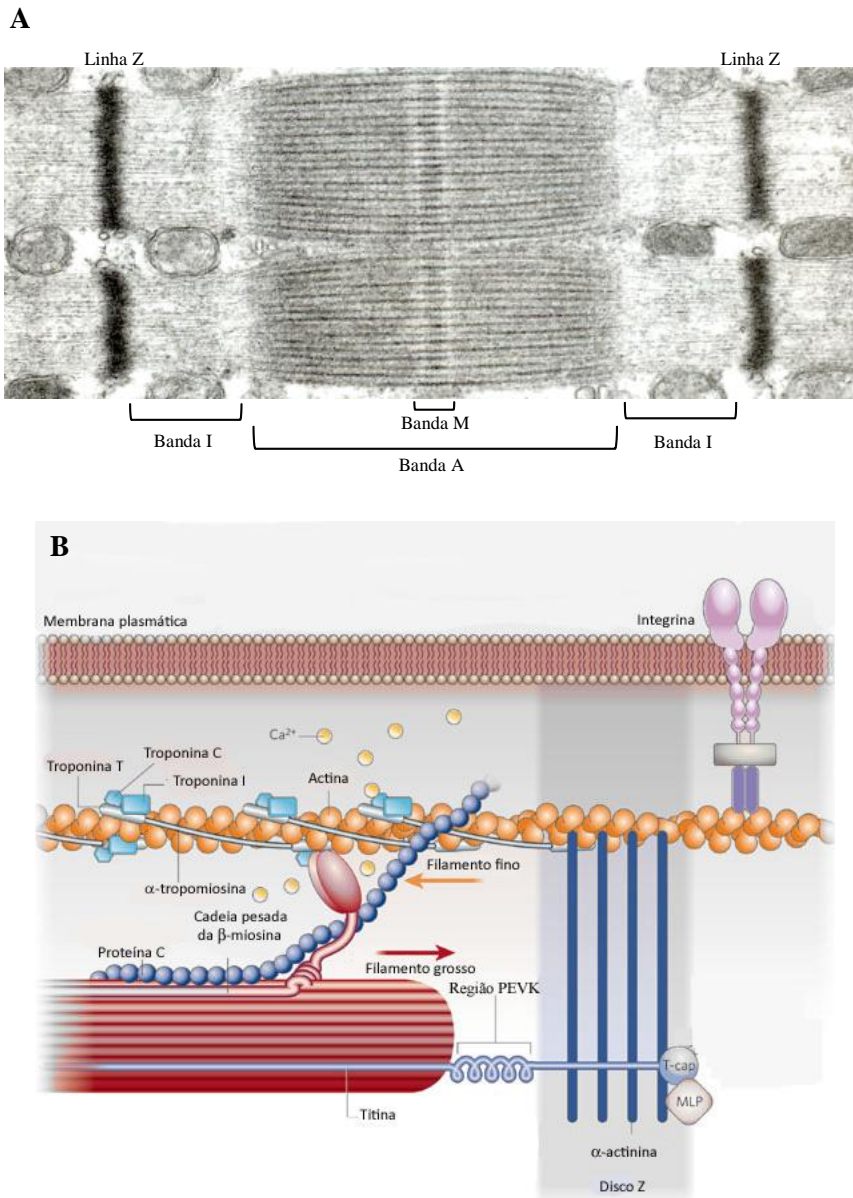


Figura 1.2 – (A) Imagem em microscopia electrónica da organização estrutural de dois sarcómeros contíguos. Os sarcómeros são constituídos por filamentos finos (constituídos maioritariamente por actina), filamentos grossos (constituídos maioritariamente por miosina) e pela titina. Os filamentos finos estão ancorados na linha Z. Na região central do sarcómero encontra-se a banda A, constituída pelos filamentos finos e pelos filamentos grossos. Na banda M encontram-se apenas os filamentos grossos. De cada lado da linha Z estendem-se as bandas I, onde se concentram os filamentos finos (Imagem adaptada de Ottenheim *et al.*, 2008). (B) Proteínas sarcoméricas e proteínas associadas (Imagem adaptada de Mudd e Kass, 2008).

1.1.2. Proteínas sarcoméricas

A interacção entre as proteínas dos filamentos finos e grossos e as proteínas associadas, ilustradas na figura 1.2B, culmina com a contracção dos sarcómeros e, conseqüentemente a contracção muscular cardíaca. É a interacção dependente de ATP entre os filamentos finos e os filamentos grossos que gera a força responsável pelo movimento de deslizamento típico do sarcómero (Mudd e Kass, 2008).

1.1.2.1. Filamentos finos

O principal constituinte dos filamentos finos é a α -actina (codificada pelo gene *ACTC1*), estando também presente a tropomiosina (codificada pelo gene *TPM1*), o complexo troponina (codificado pelos genes *TNNC1*, *TNNT2* e *TNNI3*) a *cap Z* (codificada pelo gene *CAPZ*) e a tropomodulina (codificada pelo gene *TMOD4*) (Clark *et al*, 2002).

A actina apresenta seis isoformas em células de mamíferos, as quais são classificadas em três grupos: α , β e γ . A α -actina é a isoforma expressa no músculo cardíaco. Como se pode verificar na figura 1.3, a actina pode encontrar-se em duas formas: a forma monomérica - actina G, e forma filamento - actina F (Kabsch e Vandekerckhove, 1992). A actina G polimeriza em filamentos que formam duas hélices entrelaçadas, ancoradas ao disco Z pelas proteínas *cap Z* e tropomodulina (Clark *et al*, 2002). Esta proteína é constituída por uma cadeia polipeptídica com cerca de 375 resíduos, contendo locais de ligação a iões bivalentes, a adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP), e a várias proteínas, incluindo a β -miosina cardíaca (codificada pelo gene *MYH7*), troponina e tropomiosina (codificada pelo gene *TPM1*) (Clark *et al*, 2002; Kabsch e Vandekerckhove, 1992).

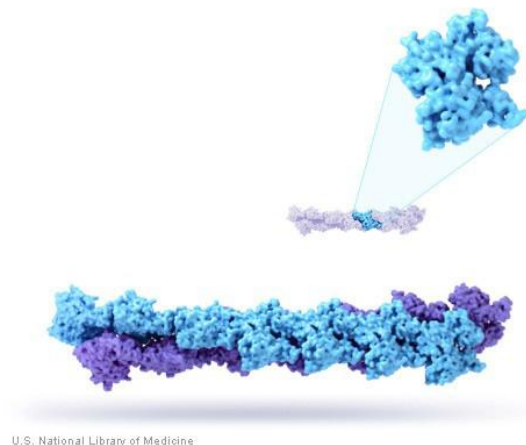


Figura 1.3 – Estrutura da actina G (no topo) e F (Imagem adaptada de <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/actin>, Janeiro 2011).

Tal como a actina, a tropomiosina forma duas hélices que se dispõem ao longo dos sulcos de actina (figura 1.4). Juntamente com o complexo troponina, regula a interação entre a actina e a β -miosina cardíaca, num mecanismo dependente de cálcio (Ca^{2+}). A tropomiosina também é responsável pela estabilização dos filamentos de actina, inibindo a sua fragmentação e diminuindo a despolimerização e polimerização nas extremidades destes filamentos, ao interagir com a tropomodulina (Clark *et al*, 2002).

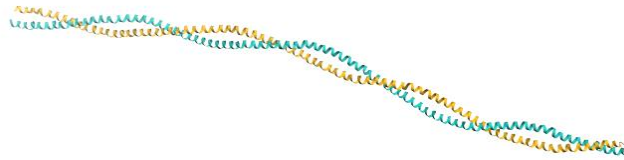


Figura 1.4 – Estrutura da tropomiosina (Imagem adaptada de <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1c1g/pdb>, Janeiro 2011).

O complexo troponina é composto por três proteínas que regulam a interação entre a actina e a β -miosina (figura 1.5): a troponina C cardíaca que apresenta um local de ligação de Ca^{2+} ; a troponina I cardíaca, a subunidade inibitória do complexo; e a troponina T cardíaca, responsável pela transmissão do sinal de Ca^{2+} à tropomiosina. Em repouso, a troponina I encontra-se ligada à troponina C, à troponina T e também à actina. A ligação de Ca^{2+} à troponina C aumenta a afinidade da ligação entre as troponinas, diminuindo assim a afinidade da troponina I para a actina (Sfichi-Duke *et al*, 2010).

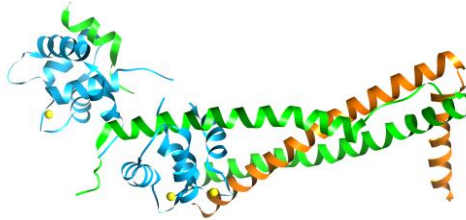


Figura 1.5 – Estrutura da troponina cardíaca no seu estado saturado de Ca^{2+} (amarelo). A troponina cardíaca é um heterotrímero constituído pela troponina C (azul), pela troponina T (laranja) e pela troponina I (verde) (Imagem adaptada de <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1j1d/pdb>, Janeiro 2011).

1.1.2.2. Filamentos grossos

A β -miosina cardíaca, considerada como o motor molecular do sarcómero, é o principal constituinte dos filamentos grossos. Está associada a várias proteínas, sendo a mais relevante a proteína C de ligação à miosina (codificada pelo gene *MYBPC3*).

A miosina apresenta duas isoformas que são expressas no músculo cardíaco: α e β . A β -miosina é a isoforma predominantemente expressa nos ventrículos de mamíferos (Fatkin e Graham, 2002). É composta por duas cadeias pesadas, estando cada uma delas ligada a duas cadeias leves (figura 1.6A). É uma proteína trimérica que se divide em três fragmentos: o fragmento S1 (figura 1.6B), o fragmento S2 (figura 1.6C) e o fragmento LMM. É no fragmento S1 que se encontram os domínios de ligação à actina, ao ATP e às cadeias leves. Os fragmentos S2 e LMM apresentam domínios de ligação à proteína C (Blankenfeldt *et al*, 2006).

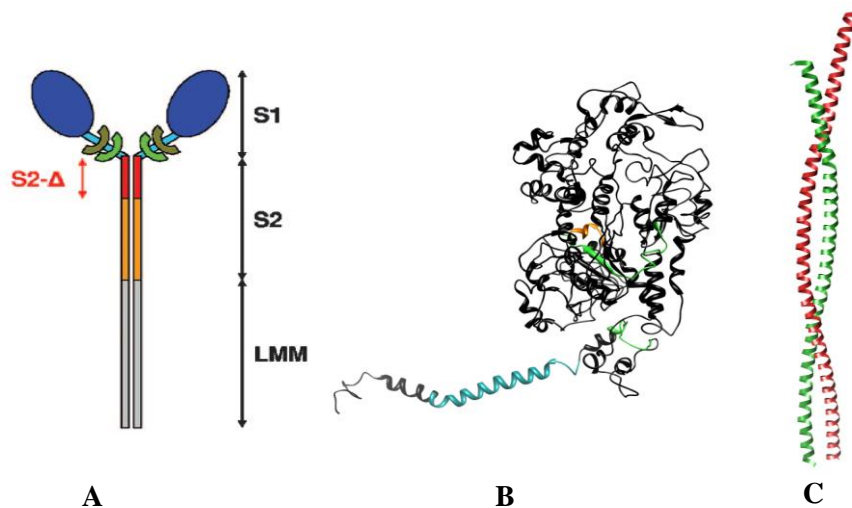


Figura 1.6 – Estrutura da β -miosina cardíaca. A – Fragmentos da miosina; B – Domínio S1. A laranja encontra-se o domínio de ligação a ATP, a azul o domínio de ligação IQ responsável pela ligação das cadeias leves e a verde os domínios de ligação a actina; C – Domínio S2 (Imagem adaptada de Blankenfeldt *et al*, 2006, <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2fxm/pdb> e <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1ik2/pdb>, Janeiro 2011).

Relativamente às cadeias leves estas podem ser essenciais (codificadas pelo gene *MYL3*) ou regulatórias (codificadas pelo gene *MYL2*), e funcionam possivelmente como reguladores da actividade motora e cinética da miosina. Esta função é suportada pela existência de várias isoformas das cadeias leves nos vários tipos de músculos estriados que apresentam diferentes taxas de actividade (Clark *et al*, 2002). As cadeias leves regulatórias apresentam domínios de ligação a Ca^{2+} , tal como a troponina C e a calmodulina. A ligação do Ca^{2+} leva à fosforilação de um resíduo serina das cadeias leves essenciais e será este o mecanismo que leva à regulação da actividade da miosina.

A proteína C de ligação à miosina é um polipéptido modular da família das imunoglobulinas que apresenta três isoformas: duas das isoformas são expressas no músculo esquelético sendo a outra isoforma expressa no músculo cardíaco (Fatkin e Graham, 2002). Apresenta três domínios fibronectina¹ do tipo III (FnIII) e sete domínios do tipo imunoglobulina² (IgI), cuja estrutura secundária é em folha β (figura 1.7). A sua região N-terminal apresenta três domínios Ig, C0, C1 e C2. O domínio C0 é específico da isoforma cardíaca (van Dijk *et al*, 2009). Os domínios C1 e C2 estão ligados por 100 resíduos onde se encontram os locais de fosforilação específicos da isoforma cardíaca. Este domínio poderá ser fosforilado pela cinase dependente de adenosina monofosfato (AMP) cíclico (PKA) ou pela cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina, modulando assim a interacção entre esta proteína e a miosina (Ababou *et al*, 2008). A fosforilação parece regular o ciclo da formação das pontes cruzadas e a polimerização dos filamentos de miosina. Esta proteína apresenta grande afinidade para a miosina, ligando a sua região C- terminal ao fragmento LMM da miosina e a região N- terminal ao subfragmento S2 (figura 1.7). A região C- terminal apresenta também um local de

¹ Os domínios fibronectina de tipo III apresentam locais de ligação a DNA, heparina e à superfície celular.

² Os domínios imunoglobulina estão envolvidos em interacções proteína-proteína e proteína-ligando.

ligação à titina (figura 1.7). Esta proteína terá então um importante papel na manutenção da estrutura do sarcómero (Ababou *et al*, 2008).

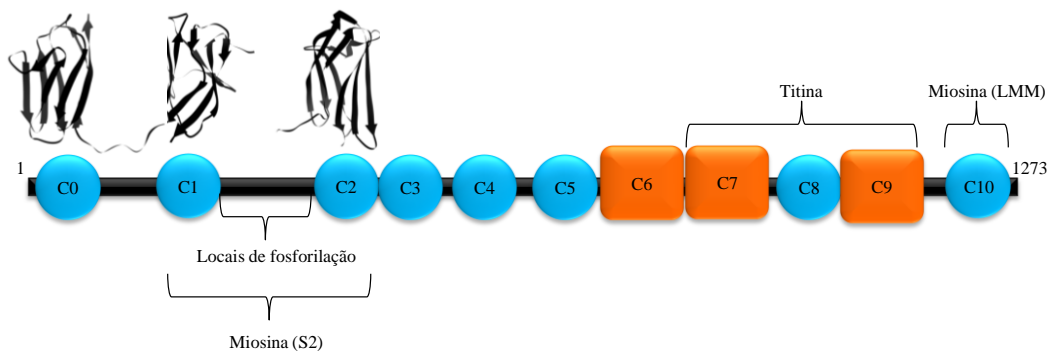


Figura 1.7 – Representação da proteína C de ligação à miosina, onde se identificam os domínios IgI (azul) e FnIII (laranja), com indicação dos domínios de ligação da miosina (S2 e LMM) e da titina e os locais de fosforilação (Imagem adaptada de <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2k1m/pdb>; <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3cx2/pdb>; <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1pd6/pdb>, Janeiro 2011; van Dijk *et al*, 2009).

1.1.3. Discos Z

Os discos Z, como já foi referido (secção 1.1.1), definem as fronteiras dos sarcómeros, sendo o local de ancoragem de várias proteínas, nomeadamente da titina e de proteínas dos filamentos finos. São constituídos por uma rede complexa de proteínas com funções não só estruturais mas também de sinalização celular, tornando possível a resposta a alterações de tensão (Bos e Ackerman, 2010).

Alguns destes componentes parecem transmitir esses sinais a outras localizações subcelulares, como é o caso da proteína LIM muscular, codificada pelo gene *CSRP3*. Esta proteína apresenta dois domínios com a estrutura de dedos de zinco ricos em cisteína (domínios LIM) separados por uma sequência de mais de 50 resíduos e de regiões adjacentes ricas em glicina (figura 1.8). A proteína LIM muscular interage com várias proteínas, incluindo a teletonina (codificada pelo gene *TCAP*) e a α -actinina (codificada pelo gene *ACTN2*) nos discos Z. Para além das suas funções estruturais, esta proteína parece estar envolvida na transdução de sinais em resposta a stress e na sensibilidade a Ca^{2+} (Geier *et al*, 2008; Hoshijima *et al*, 2006). A proteína LIM muscular foi também detectada no núcleo nas etapas iniciais do desenvolvimento embrionário, actuando como reguladora do factor de transcrição MyoD (miogénese) (Schallus *et al*, 2009).

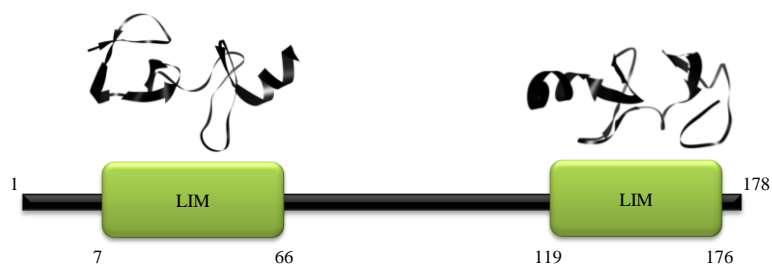


Figura 1.8 – Representação da proteína LIM cardíaca, onde se identificam os domínios LIM (verde) e as suas estruturas tridimensionais (Imagem adaptada de <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2o10/pdb> e <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2o13/pdb>, Fevereiro 2011).

A α -actinina é o componente principal dos discos Z, tendo um papel importante na interacção entre o citosqueleto e a membrana das células musculares, nomeadamente no ancoramento da actina à linha Z. Apresenta um domínio de ligação à actina em cada extremidade, o que permite a ligação de filamentos antipolares de actina de sarcómeros adjacentes (figura 1.9) (Chiu *et al*, 2009).

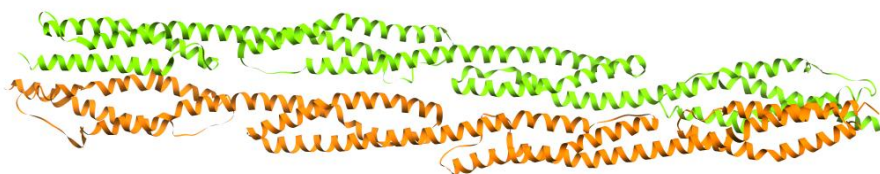


Figura 1.9 - Representação da α -actinina onde se identificam duas cadeias antiparalelas (laranja e verde) (Imagem adaptada de <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1hci/pdb>, Janeiro 2011).

A teletonina é uma proteína de 19 kDa que interage com a titina e com a miozenina (codificada pelo gene *MYOZ2*). A ligação à titina é altamente específica (figura 1.10), localizando-se este domínio de ligação nos primeiros 140 aminoácidos da proteína. A região C-terminal da titina actua como cinase sobre o resíduo 157 de serina da teletonina (Faulkner *et al*, 2001).

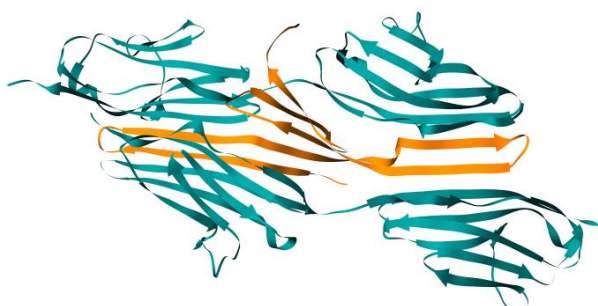


Figura 1.10 – Interação entre a teletonina (laranja) e a titina (azul) (Imagem adaptada de <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2f8v/pdb>, Janeiro 2011).

1.1.4. Titina

A titina é uma proteína de grandes dimensões (3-4 MDa) que abrange todo o comprimento dos sarcómeros, estando a extremidade N- terminal orientada para as linhas Z e a extremidade C- terminal para a linha M. Esta proteína apresenta uma região, representada na figura 1.11, que possui propriedades elásticas conferidas pela presença de um segmento constituído por domínios Ig e de um domínio constituído por resíduos prolina, glutamato, valina e lisina (domínio PEVK). Esta região confere estabilidade à estrutura sarcomérica, compensando a rigidez das miofibrilas durante a contração (Hanft *et al*, 2008).

A sua região não extensível apresenta domínios de ligação a várias proteínas. O seu domínio N- terminal consiste em pequenos motivos repetitivos (de aproximadamente 45 aa) flanqueados por domínios Ig. Este será o local de ligação de diversas proteínas da linha Z, incluindo a teletonina e a α -actinina. Já o domínio C- terminal contém um domínio cinase que poderá estar envolvido na fosforilação da teletonina durante a miogénese (Boateng e Goldspink, 2008).

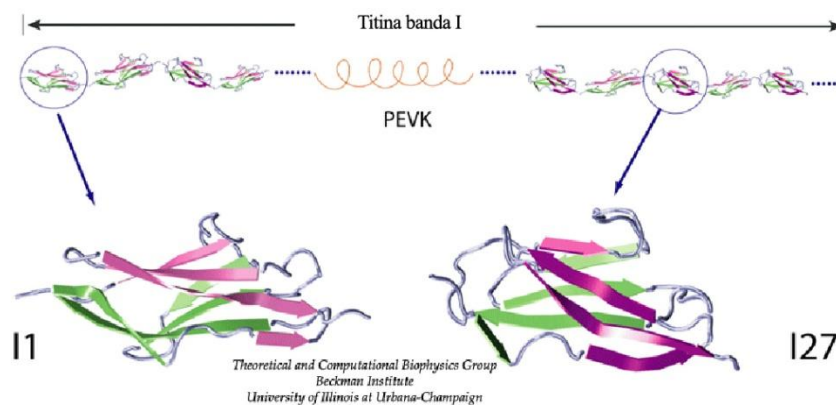


Figura 1.11 – Domínios da titina presentes na banda I (Imagem adaptada de <http://www.ks.uiuc.edu/Research/mechanicals/>, Janeiro 2011).

1.1.5. Contração muscular

Na contração muscular o mecanismo de geração de forças tem como base a interacção entre a actina e a miosina e tem início com a sinalização dos nervos motores. Este sinal leva à geração de um potencial de acção no sarcolema que é propagado ao retículo sarcoplasmático, local de armazenamento de Ca^{2+} no interior dos cardiomiócitos, através dos túbulos transversos. O potencial acciona então a abertura de canais de Ca^{2+} na membrana do retículo, havendo efluxo deste ião para o sarcoplasma (Alberts *et al*, 2002).

Durante a sístole, o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular leva à sua ligação à troponina C, que pode ligar até quatro iões. Esta ligação fortalece a sua interacção com a troponina I, que leva ao enfraquecimento da ligação desta última proteína à actina e consequentemente ao enfraquecimento da função inibitória sobre a ligação actina-miosina. O complexo troponina-

tropomiosina desloca-se nos sulcos dos filamentos de actina expondo os locais de ligação à miosina, que em repouso se encontra ligada a ATP. Quando o ATP é hidrolisado, a cabeça da miosina muda de conformação e liga-se à actina. O ADP e o fosfato inorgânico são libertados, a cabeça da miosina muda novamente de conformação, provocando o *power stroke*. Por sua vez, na diástole a ligação de uma nova molécula de ATP leva à libertação da miosina. Ao mesmo tempo o Ca^{2+} é transportado para o retículo sarcoplasmático por uma bomba dependente de ATP, levando estes factores ao relaxamento do músculo (Alberts *et al*, 2002; Hanft *et al*, 2008).

1.2. Miocardiopatia Hipertrófica

1.2.1. Histopatologia

A MH é uma doença do miocárdio em que a hipertrofia é inadequada e se desenvolve na ausência de factores secundários tais como hipertensão, estenose valvular aórtica, doenças valvulares e de doenças de armazenamento (revistas na secção 1.2.3.4.). É caracterizada pela hipertrofia de qualquer segmento do ventrículo esquerdo (VE), mais frequentemente do septo interventricular, desarranjo miocitário, fibrose intersticial e doença dos pequenos vasos, sem aumento do volume das cavidades (figura 1.12) (Ho, 2010; Varnava *et al*, 2000).

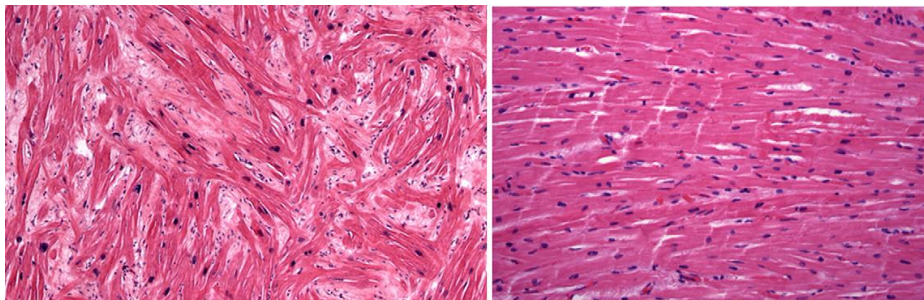


Figura 1.12 – Histopatologia de cortes transversais do miocárdio demonstrando desarranjo e hipertrofia de cardiomiócitos e ainda fibrose intersticial (esquerda) característicos de MH, comparativamente com a estrutura organizada do miocárdio normal (direita) (Figura adaptada de Ho, 2010).

Para o imagiologista cardíaco a expressão “hipertrofia” consiste no aumento de massa cardíaca e/ou da espessura parietal, que na miocardiopatia hipertrófica ocorre geralmente de forma assimétrica. A expressão fenotípica relativa ao local e extensão é bastante variável podendo atingir o ápice, a parede lateral ou a zona central do ventrículo, afectando frequentemente o septo interventricular (Kubo *et al*, 2009). Na figura 1.13 é possível verificar a diferença entre um miocárdio normal (B) e um miocárdio com hipertrofia (A). É visível o aumento da espessura do septo interventricular comparativamente com o miocárdio saudável. A espessura do septo pode variar entre 13 a 60 mm, sendo correlacionado com uma maior severidade clínica acima dos 30 mm (Arad *et al*, 2005).



Figura 1.13 – Comparação de um miocárdio com hipertrofia (esquerda) e um miocárdio normal (direita). (Imagem adaptada de Ho, 2010).

A hipertrofia encontra-se regularmente associada a perturbação da função diastólica e em cerca de 25% dos doentes observa-se, em repouso, obstrução da câmara de saída do VE, que leva ao aumento da mortalidade associada a esta doença ou ao desenvolvimento de sintomas severos, sendo muitas vezes necessário recorrer a intervenções cirúrgicas para solucionar a obstrução (Alcalai *et al*, 2008).

O aumento da massa muscular tem por base a hipertrofia dos cardiomiócitos (aumento de tamanho) e não a hiperplasia (aumento em quantidade), já que estas células se diferenciam logo após o nascimento, não se voltando a dividir. A hipertrofia começa então por ser um efeito compensatório que leva eventualmente a insuficiência cardíaca, arritmia, síncope e que nalguns casos tem como consequência a morte súbita. A fibrose intersticial tem origem no mesmo estímulo que leva a hipertrofia dos cardiomiócitos, e que conduz à proliferação dos fibroblastos (Marian, 2008).

Contudo, o aumento da massa muscular também pode ser causado por doenças de armazenamento, em que a deposição de glicogénio ou polissacáridos e a presença de vacúolos nos cardiomiócitos leva à hipertrofia dos mesmos. Estas doenças designam-se pseudohipertrofias ou fenocópias, uma vez que mimetizam o fenótipo da MH e serão abordadas na secção 1.2.3.4. (Marian, 2008).

1.2.2. Sintomatologia

A MH apresenta uma vasta heterogeneidade de sintomas, mesmo no seio de uma família. A maioria dos doentes é assintomática ou apresenta sintomas menos graves. Os sintomas mais frequentes incluem angor e dispneia de esforço. Esta doença pode ainda conduzir a palpitações, arritmias e síncope (Marian, 2010; Brito, *et al*, 2008).

A sintomatologia manifesta-se muitas vezes tardiamente e nalguns casos indivíduos afectados não apresentam sintomas até ao episódio de síncope cardíaca ou mesmo de morte súbita cardíaca. Esta doença é a causa mais comum de morte súbita em crianças e jovens, incluindo atletas de alta competição, aparentemente saudáveis (Marian, 2010).

1.2.3. Genética molecular

A MH é uma doença genética complexa manifestando hereditariedade autossômica dominante com penetrância incompleta. Contudo alguns indivíduos com sintomatologia evidente não apresentam história familiar, tratando-se então de casos esporádicos. Na população geral estima-se, a partir de dados ecocardiográficos, que apresente uma prevalência de 1 para 500, sendo considerada subvalorizada por alguns autores (Marian, 2010). Em comunicação oral na 13ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Genética Humana, o Dr. Jonathan Seidman (*Genomics of Cardiovascular Development: Adaptation, and Remodeling, Harvard Medical School*) referiu que possivelmente apresentará uma prevalência de 1 para 300 nos Estados Unidos da América.

É uma doença monogénica inicialmente considerada como uma doença do sarcómero, causada por mutações nos genes que codificam as proteínas contrácteis do músculo cardíaco e com outras proteínas relacionadas com o processo de contracção muscular. A maior parte das mutações causais são privadas, sendo raramente recorrentes em famílias diferentes (Ho, 2010).

As mutações causativas de MH acarretam de maneira geral alterações a nível mecânico (cinética entre a actina e a miosina), bioquímico (sensibilidade ao Ca^{2+}) e bioenergético (actividade da ATPase da miosina). Estas alterações promovem a activação de moléculas sinalizadoras que levam à indução da hipertrofia dos cardiomiócitos e fibrose (Marian, 2010). De maneira geral, mutações no gene que codifica a β -miosina levam ao aumento da actividade de ATPase, da geração de força e da velocidade de deslizamento da actina. Analogamente, mutações nos genes que codificam o complexo troponina levam ao aumento da geração de força e da velocidade de deslizamento, para além do aumento da sensibilidade para o Ca^{2+} . Todas estas alterações a nível mecânico, bioquímico e bioenergético têm como consequência a contracção descoordenada dos sarcómeros e o aumento do consumo de energia pelos cardiomiócitos, assim como a alteração do ciclo do Ca^{2+} . Estes efeitos promovem a substituição por tecido fibroso dos cardiomiócitos cuja taxa de sobrevivência diminui substancialmente (Morita *et al*, 2010).

Como foi referido anteriormente a MH apresenta grande heterogeneidade fenotípica, o que torna implícito não só o papel dos factores genéticos (mutações em genes causais e em genes modificadores) como também de factores não genéticos (modificações pós-tradução e factores ambientais) que determinam a sua expressão (Marian, 2010). De facto, desde a identificação da primeira mutação que causa MH pelo grupo da Dra^a. C.E. Seidman e Dr. J. Seidman em 1989 já foram identificadas mais de 1000 mutações, herdadas e *de novo*, que afectam o funcionamento das estruturas contrácteis dos cardiomiócitos (Ho, 2010).

Até há pouco tempo, a maioria da bibliografia consultada, reportava que a maior parte dos indivíduos com MH apenas apresenta uma mutação num gene que codifica para uma das proteínas sarcoméricas atrás referidas (ponto 1.1.2). Porém nos últimos anos foram reportados vários doentes com mutações compostas, isto é, com duas ou mais mutações causais num ou mais genes que

codificam para proteínas sarcoméricas, apresentando estes doentes fenótipos mais severos (Richard *et al*, 2003; Van Driest *et al*, 2004; Ingles *et al*, 2005). Nestes indivíduos as mutações podem afectar os mesmos alelos (homozigotia ou heterozigotia composta *trans* e *cis*) ou alelos diferentes (heterozigotia dupla), formas estas ilustradas na figura 1.14 (Kelly e Semsarian, 2009).

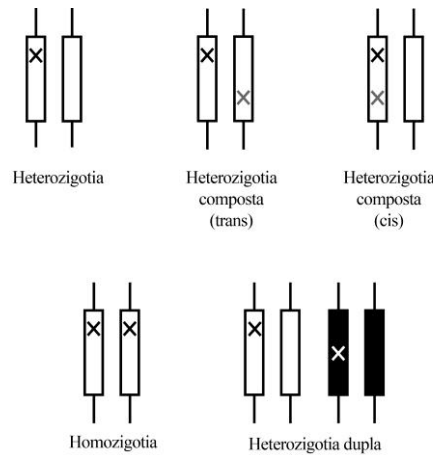


Figura 1.14 – Zigotia de mutações causais. As cruzes indicam as mutações e os rectângulos representam alelos (Imagem adaptada de Kelly e Semsarian, 2009).

Em Abril de 2010 o grupo de Dr. Olivotto, em conjunto com Dr. Ackerman, publicou um estudo em que foram detectadas mutações triplas (nos genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNI3*) em 4 doentes num total de 488 casos *index* analisados. Estes doentes apresentavam sintomas mais severos, sendo que três dos doentes necessitaram de transplantes cardíacos ou de *pacemaker* biventricular para controlo da progressão da doença (Girolami *et al*, 2010).

1.2.3.1. Genes das proteínas do sarcómero

Cerca de 60% das mutações que causam MH estão localizadas em genes que codificam para proteínas sarcoméricas (Morita *et al*, 2010). A primeira mutação a ser identificada (R403Q) foi no gene *MYH7* que codifica a cadeia pesada da β -miosina. Outros dos genes sarcoméricos afectados são os que codificam a cadeia pesada da α -miosina (*MYH6*), a proteína C de ligação à miosina (*MYBPC3*), a troponina T cardíaca (*TNNT2*), a troponina I cardíaca (*TNNI3*), a troponina C cardíaca (*TNNC1*), a α -tropomiosina (*TPMI*), as cadeias leves essencial (*MYL2*) e regulatória (*MYL3*), a titina (*TTN*) e a α -actina (*ACTC1*) (Ingles *et al*, 2005).

Na tabela 1.1 encontram-se os genes que codificam para as proteínas do sarcómero mais frequentemente associados a MH bem como a sua localização cromossómica, a função da proteína por eles codificada e o respectivo número de mutações identificadas até à data.

Tabela 1.1 – Genes sarcoméricos e sua localização cromossômica, funções das proteínas correspondentes e número de mutações associadas a MH.

Proteína ³	Gene ³	Locus ³	Função da proteína ⁴	Mutações ³	% de MH causada por mutações neste gene
Cadeia pesada da β -miosina	<i>MYH7</i>	14q11.2–q12	Constituinte dos filamentos grossos. Contração muscular.	298	$\approx 40^5$
Proteína C de ligação à miosina	<i>MYBPC3</i>	11p11.2	Constituinte dos filamentos grossos. Contração muscular; estrutural.	266	$\approx 40^5$
Troponina T cardíaca	<i>TNNT2</i>	1q32	Subunidade da troponina de ligação à tropomiosina	55	$\approx 5^5$
Troponina I cardíaca	<i>TNNI3</i>	19q13.4	Subunidade inibitória da troponina (inibe a actomiosina ATPase).	43	$\approx 5^5$
Titina	<i>TTN</i>	2q24.3	Estrutural; extensibilidade do sarcómero	24	Raro ⁵
α -tropomiosina	<i>TPM1</i>	15q22.1	Regulação da contração dependente de Ca^{2+} .	21	$\approx 2^5$
α -actina	<i>ACTC1</i>	15q14	Constituinte dos filamentos finos no músculo cardíaco. Contração muscular.	15	$\approx 1^5$
Cadeia leve regulatória da miosina	<i>MYL2</i>	12q23–q24.3	Ligação ao Ca^{2+} e activação da contração.	13	$\approx 1^5$
Cadeia pesada da α -miosina	<i>MYH6</i>	14q11.2–q12	Contração muscular.	13	Raro ⁵
Troponina C cardíaca	<i>TNNC1</i>	3p21.3–p14.3	Subunidade da troponina de ligação ao Ca^{2+} . A ligação de Ca^{2+} impede a acção inibitória da troponina nos filamentos de actina.	11	$\approx 3-5^6$
Cadeia leve essencial da miosina	<i>MYL3</i>	3p21.2–p21.3	Activação da contração.	9	$\approx 1^5$

1.2.3.2. Genes das proteínas da linha Z

Existe alguma controvérsia em relação ao facto de a MH poder ser causada por alterações noutras proteínas que segundo determinados grupos de investigação não são consideradas proteínas sarcoméricas, por serem constituintes da linha Z. São exemplos, a proteína LIM muscular (*CSRP3*), a

³ Dados segundo “The Human Gene Mutation Database” (HGMD) do Instituto de Genética Médica de Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Último acesso em Setembro de 2010.

⁴ Dados segundo “Gene Cards: The Human Gene Compendium” do Instituto da Ciência de Weizmann (www.genecards.org). Último acesso a 5 de Maio de 2010.

⁵ Dados segundo Ho, 2010.

⁶ Dados segundo Marian, 2010.

miosenina 2 (*MYOZ2*), a teletonina (*TCAP*), a α -actinina 2 (*ACTN2*) e a vinculina (*VCL*) (tabela 1.2). Um facto assente é que as proteínas da linha Z desempenham funções estruturais importantes, bem como prováveis funções mecano-sensoriais. Consequentemente, mutações nos seus genes codificantes poderão contribuir para a manifestação de MH ou o seu grau de severidade (Bos *et al*, 2009; Geier *et al*, 2008; Hayashi *et al*, 2004; Alcalai *et al*, 2008; Osio *et al*, 2007).

Tabela 1.2 – Genes do disco Z e sua localização cromossómica, funções das proteínas correspondentes e número de mutações associadas a MH.

Proteína ⁷	Gene ⁷	Locus ⁷	Função da proteína ⁸	Mutações	% de MH causada por mutações neste gene ⁹
Proteína LIM muscular	<i>CSR3</i>	11p15.1	Reguladora da miogénese. Funções estruturais interagindo com a teletonina e a α -actinina. Parece estar envolvida na transdução de sinais em resposta a stress e na sensibilidade a Ca^{2+} .	14 ⁷	<1
Teletonina	<i>TCAP</i>	17q12–q21.1	Medeia a organização antiparalela da titina no disco Z.	14 ⁷	<1
Vinculina	<i>VCL</i>	10q22.1–q23	Adesão celular.	3 ⁷	<1
Miozenina	<i>MYOZ2</i>	4q26–q27	Adesão intracelular das proteínas do disco Z.	2 ⁷	<1
α-actinina 2	<i>ACTN2</i>	1q42–q43	Ancoragem da actina.	8 ⁷	<1
Domínio de repetição 1 da anquirina	<i>ANKRD1</i>	10q23.33	Poderá estar envolvida no mecanismo mecano-sensorial dos sarcómeros.	3 ¹⁰	<1

1.2.3.3. Outros genes

Recentemente têm sido identificadas mutações menos frequentes noutros genes que conduzem a MH, como o caso dos genes envolvidos na via de sinalização do Ca^{2+} (*JPH2*, *PLN*, *CASQ2*, *CALR3*), dos genes que codificam as proteínas envolvidas na respiração celular (*MYLK2*, *SLC25A4*, *COX15*) e outros genes que codificam outras proteínas associadas ao sarcómero (*OBSCN*, *FXN*, *MYO6*, *DES*, *CAV3*, *ACTA1*) (tabela 1.3) (Bos *et al*, 2009).

⁷ Dados segundo “The Human Gene Mutation Database” (HGMD) do Instituto de Genética Médica de Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Último acesso em Setembro de 2010.

⁸ Dados segundo “Gene Cards: The Human Gene Compendium” do Instituto da Ciência de Weizmann (www.genecards.org). Último acesso a 5 de Maio de 2010.

⁹ Dados segundo Bos e Ackerman, 2010.

¹⁰ Dados segundo Arimura *et al*, 2009.

Tabela 1.3 – Outros genes e sua localização cromossômica, funções das proteínas correspondentes e número de mutações associadas a MH.

Proteína ¹¹	Gene ¹¹	Locus ¹¹	Função da proteína ¹²	Mutações
Junctofilina 2	<i>JPH2</i>	20q12	Estabilização das junções celulares da membrana plasmática.	4
Fosfolamban	<i>PLN</i>	6q22.1	Regulação da actividade da bomba de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático.	1 ¹³
Calsequestrina 2	<i>CASQ2</i>	1p13.3-p11	Ligação a Ca ²⁺ . Funciona como local de armazenamento de Ca ²⁺ .	1 ¹⁴
Calreticulina 3	<i>CALR3</i>	19p13.11	Chaperona de ligação a Ca ²⁺ .	2 ¹⁴
Cinase 2 das cadeias leves da miosina	<i>MYLK2</i>	20q13.31	Contração. Fosforila as cadeias leves da miosina.	2
Transportador de solutos da família 25, membro 4	<i>SLC25A4</i>	4q35	Troca de ADP e ATP através da membrana interna da mitocôndria.	1
Componente da citocromo c oxidase	<i>COX15</i>	10q24.2	Biossíntese do grupo hemo A.	4
Obscurina	<i>OBSCN</i>	1q42.13	Envolvida na formação de fibras.	1 ¹⁵
Frataxina	<i>FXN</i>	9q13-q21.1	Proteína anti-apoptótica.	1
Miosina VI	<i>MYO6</i>	6q13	Transporte celular.	1
Desmina	<i>DES</i>	2q35	Ligação entre miofibrilas e à membrana plasmática.	1
Caveolina 3	<i>CAV3</i>	3p25.3	Componente da membrana plasmática.	1
α-actina do músculo esquelético	<i>ACTA1</i>	1q42.13-q42.2	Envolvida no transporte celular, na estrutura e integridade das células do músculo esquelético.	1
Proto-oncogene serina/treonina-proteína cinase	<i>RAF1</i>	3p25	Proteína anti-apoptótica.	1

1.2.3.4. Fenocópias

Em doentes com hipertrofia do VE sem mutações identificadas ao nível dos genes sarcoméricos ou nos genes relacionados com o sarcómero, foram identificadas mutações em genes associados a outras doenças. Destas fazem parte as doenças de armazenamento, síndromes de repetição de tripletos ou doenças mitocondriais, que são consideradas fenocópias de MH na medida em que apresentam um fenótipo semelhante a nível macroscópico e ecocardiográfico, mas não a nível microscópico e electrofisiológico (Arad *et al*, 2005; Ho e Seidman, 2006).

As fenocópias de MH mais estudadas envolvem anomalias no metabolismo do glicogénio. Tais doentes apresentam mutações no gene que codifica a subunidade γ regulatória da proteína cinase activa por AMP (*PRKAG2*) ou no gene *LAMP2* no cromossoma X que codifica para a proteína de membrana associada aos lisossomas. A sua histopatologia é caracterizada pela acumulação de

¹¹ Dados segundo “The Human Gene Mutation Database” (HGMD) do Instituto de Genética Médica de Cardiff. Último acesso em Setembro de 2010.

¹² Dados segundo “Gene Cards: The Human Gene Compendium” do Instituto da Ciência de Weizmann (www.genecards.org). Último acesso a 5 de Maio de 2010.

¹³ Dados segundo Medin *et al*, 2007.

¹⁴ Dados segundo Chiu *et al*, 2007.

¹⁵ Dados segundo Arimura *et al*, 2007.

glicogénio e amilopectina e pela presença de vacúolos respectivamente, e pela ausência de desarranjo fascicular e fibrose. Na figura 1.15 é visível a destruição das estruturas sarcoméricas pela acumulação de glicogénio, como consequência da mutação R531Q no gene *PRKAG2* (Ho e Seidman, 2006).

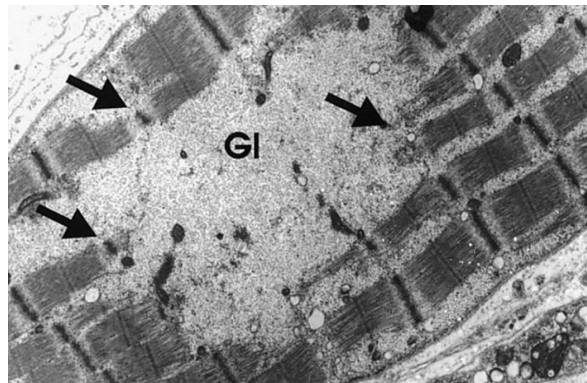


Figura 1.15 – Imagem de microscopia electrónica de fibras do miocárdio, com acumulação de glicogénio, de um doente com uma mutação no gene *PRKAG2*. A estrutura dos sarcómeros delimitada pelas setas encontra-se destruída (Imagem adaptada de Burwinkel *et al*, 2005).

1.2.4. Patofisiologia

A maioria das mutações associadas a MH, identificadas até à data, é do tipo *missense* (levam à substituição de um aminoácido por outro ao nível da sequência da proteína). As proteínas resultantes são geralmente estáveis, sendo incorporadas nos sarcómeros e afectando a função da proteína normal - efeito dominante negativo. Outros tipos de mutações detectadas em MH são as pequenas inserções e/ou deleções que resultam na alteração da grelha de leitura se o nucleótido alterado não for múltiplo de 3 (*frameshift*). Este tipo de mutações destabiliza o ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e em consequência a quantidade de proteína incorporada no sarcómero diminui (haploinsuficiência) (Morita *et al*, 2010). Foram ainda identificadas mutações de *splicing* que poderão afectar a ligação do spliceossoma ao mRNA originando proteínas truncadas ou de maiores dimensões (Xin *et al*, 2007), grandes deleções (Waldmüller *et al*, 2003) e grandes inserções (Richard *et al*, 2003).

1.2.5. Correlações genótipo-fenótipo

Até à data não foi possível estabelecer correlações concretas de genótipo-fenótipo em MH devido à heterogeneidade clínica e genética da doença. De maneira geral, mutações no gene *MYH7* levam ao aparecimento de hipertrofia a partir dos 20 anos de idade (Ho, 2010). Relativamente a mutações no gene *MYBPC3* existe alguma variabilidade no que diz respeito à idade na qual os sintomas começam a surgir. O aparecimento de hipertrofia devido a deleções e inserções parece ser mais frequente em indivíduos com mais de 40 anos de idade. Existe a possibilidade destas mutações afectarem a estrutura e *folding* da proteína de maneira tal que esta é marcada para degradação. Uma vez que o sistema ubiquitina-proteossoma perde eficiência ao longo do tempo, indivíduos de idade mais avançada não terão a capacidade de degradar a proteína mutante o que poderá levar ao

aparecimento de sintomas. Pelo contrário, mutações *missense* poderão escapar ao sistema de degradação proteica, sendo a proteína incorporada no sarcómero e exercendo efeitos nefastos no seu funcionamento. Este tipo de mutações parece ser comum em crianças com MH (Ho, 2010, Morita *et al*, 2010).

Apesar de terem sido reportadas algumas exceções, mutações no gene *TNNT2* parecem estar associadas ao aumento de risco de morte súbita com padrão de hipertrofia moderado (Ho, 2010).

1.2.6. Determinantes fenotípicos

As mutações nos genes causais não são o único factor que determina o fenótipo de MH. Tal facto é comprovado pela variabilidade fenotípica em indivíduos com a mesma mutação, mesmo que pertençam ao agregado familiar. Esses factores poderão ser genes modificadores, factores epigenéticos, micro ácidos ribonucleicos (miRNAs), modificações pós-traducionais e factores ambientais (Marian, 2008).

Os genes modificadores são genes que por si só não causam doenças mas que influenciam a expressão do fenótipo (Marian, 2008). Um exemplo de genes modificadores associados a MH são os que codificam as proteínas do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). A enzima conversora da angiotensina (ACE) é responsável pela conversão de angiotensina I em angiotensina II, tendo a angiotensina actividade de vasoconstricção (Coto *et al*, 2010). Uma deleção de 287 pares de bases (pb) no intrão 16 do gene *ACE1* foi associada à sobreexpressão da enzima ACE, em particular em doentes homozigóticos (alelos DD). Estes indivíduos apresentam níveis elevados de angiotensina II o que leva ao aumento da pressão arterial, hipertrofia e fibrose do tecido cardíaco (Funada *et al*, 2010; McLeod *et al*, 2009).

Os miRNAs são pequenos ácidos ribonucleicos (RNAs) não codificantes com cerca de 22 nucleótidos, que foram recentemente identificados como reguladores pós-transcricionais da expressão genética com extrema importância na função cardíaca. A sua interacção com a região não traduzida em 3' (3'-UTR) regula negativamente a estabilidade ou a tradução dos genes, levando assim a hipertrofia e eventualmente a insuficiência cardíaca (Ikeda *et al*, 2007; Sucharov *et al*, 2008). Os miRNAs regulam variados processos desde regulação da diferenciação de células estaminais, neurogénese, hematopoiese, secreção de hormonas, resposta imunitária a desenvolvimento e funcionalidade dos músculos esquelético e cardíaco. A hipertrofia cardíaca é inicialmente considerada um efeito compensatório que permite manter o débito cardíaco e que eventualmente, com a exposição prolongada ao estímulo que a despoletou, leva a insuficiência cardíaca. Alguns miRNAs foram associados a este processo de alteração da expressão genética que acompanha a hipertrofia cardíaca e disfunção contráctil. Os miRNAs 23a, 23b, 24, 195 e 214 encontram-se sobreexpressos durante a hipertrofia cardíaca, enquanto os miRNAs 1, 133, 150 e 181b se encontram subexpressos. Durante falha cardíaca foi detectada sobre-expressão dos miRNAs 24, 125b, 195, 199a e 214 (Thum *et al*, 2008).

Factores ambientais tais como a dieta, o estilo de vida, a hipertensão arterial e a prática de exercício também influenciam o fenótipo de MH, tal como comprovado em diversos estudos (Alcalai *et al*, 2008; Ho, 2010).

1.3. Diagnóstico diferencial

A MH é tipicamente diagnosticada através da identificação de hipertrofia cardíaca inadequada por ecocardiograma e electrocardiograma. Contudo, como foi referido, a primeira manifestação desta doença poderá ser morte súbita. Neste caso, deverá ser feita a triagem dos familiares do doente *index*, o que envolverá exames ecocardiográficos e electrocardiográficos. Nestes casos é realizado um teste genético sendo pesquisada a mutação previamente identificada no caso *index* por Sequenciação Automática (SA) (Marian, 2009).

1.3.1. Diagnóstico clínico

Como foi mencionado, a MH é tipicamente diagnosticada por presença de hipertrofia do VE na ecocardiografia bidimensional, por vezes com obstrução do fluxo sanguíneo. Em doentes assintomáticos ou com sintomas leves é essencial a avaliação de risco de morte súbita cardíaca de maneira a determinar o acompanhamento indicado para cada caso. Em casos menos graves é apenas necessário a realização de exames físicos periódicos que podem incluir electrocardiografia, ecocardiografia bidimensional ou Doppler e electrocardiograma de Holter 48 horas (Marian, 2009).

É importante fazer uma avaliação de risco tendo em conta os antecedentes do doente e da sua família de maneira a prevenir ocorrência de morte súbita. Doentes com história de “morte súbita ressuscitada”, síncope, taquicardia ventricular não mantida, resposta tensional anormal ao esforço, hipertrofia severa e história familiar de morte cardíaca são considerados de risco elevado e poderão necessitar de implantação de um cardiodesfibrilhador (Marian, 2010).

1.3.2. Diagnóstico genético

O diagnóstico genético em Portugal é feito através da identificação de mutações nos exões e regiões fronteira exão-intrão e intrão-exão dos principais genes causais (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYL2*) por SA. Existem ainda outras técnicas muito utilizadas no rastreio de doenças genéticas tais como *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), electroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e cromatografia líquida desnaturante a alta pressão (dHPLC) (Fokstuen *et al*, 2008; Santos *et al*, 2011).

O elevado número de genes associados a MH e a heterogeneidade alélica desta doença torna o diagnóstico genético por SA dispendioso (600€/gene) e moroso, ficando cerca de 1/3 dos doentes por diagnosticar uma vez que apenas são sequenciados 5 genes causais. Torna-se então essencial a validação de técnicas alternativas de detecção de MH, como será o caso de técnicas baseadas em *microarrays* de ácido desoxirribonucleico (DNA). Tais técnicas permitem a análise simultânea de

vários genes, o que diminui a duração e custos de cada ensaio (Fokstuen, S. *et al*, 2008; Santos *et al*, 2011). Todavia apenas detectam alterações já descritas, sendo então necessário recorrer a técnicas de rastreio rápido de sequências nos casos em que não é identificada nenhuma mutação (Santos *et al*, 2011, Millat *et al*, 2010).

Uma técnica de *microarrays* de DNA recentemente caracterizada é a técnica de iPLEX® *MassArray matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) desenvolvida pela *Sequenom*® (Hamburgo, Alemanha) em 2005. Esta técnica permite a detecção de *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNPs) e mutações no DNA (substituições, pequenas inserções e deleções), através de uma reacção *multiplex* numa placa de 384 poços que gera produtos alélicos com diferentes massas. Esta plataforma permite a detecção em larga escala de SNP/mutações (até 40 por reacção *multiplex*) em vários genes simultaneamente, o que reduz o tempo e custo do diagnóstico (Gabriel *et al*, 2009). Tem vindo a ser aplicada à detecção de mutações de numerosas doenças genéticas, incluindo a Hipercolesterolemia Familiar, tendo sido identificadas neste caso 56 mutações causais em 150 amostras positivas com uma taxa de sensibilidade de 75% (Wright *et al*, 2008). Outros exemplos de genotipagem por iPLEX incluem detecção de estirpes do Vírus do Papiloma Humano (Söderlund-Strand *et al*, 2008), pesquisa de marcadores associados a Diabetes Mellitus (Chakkerla *et al*, 2009), determinação da influência de variações em determinados genes e a susceptibilidade a Doença de Alzheimer (Carson *et al*, 2009), entre outros.

A preparação de um ensaio tem início com o desenho automático dos oligonucleótidos de amplificação e de extensão, pelo *software* “*MassArray Designer*” da *Sequenom*®. A técnica de iPLEX *MassArray* apresenta especificidade de *locus* que é atingida a dois níveis, com uma reacção em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleótidos que amplificam as regiões genómicas que se sabe conterem mutações (por pesquisa em base de dados), seguida de uma reacção de extensão de uma única base a partir de um oligonucleótido complementar à região adjacente ao local a genotipar (Gabriel *et al*, 2009; Santos *et al*, 2011). Estas reacções geram então fragmentos de massa específica para cada genótipo dependendo da sequência do DNA, que são posteriormente identificados por espectrometria de massa (Santos *et al*, 2011).

O primeiro passo consiste, como já foi referido, na amplificação por PCR *multiplex* das regiões a estudar a partir de DNA extraído de sangue periférico de cada amostra. Segue-se o tratamento dos produtos amplificados com a fosfatase alcalina de camarão (*Pandalus borealis*), que se designa de tratamento SAP, com o objectivo de neutralizar desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) que não foram incorporados nos produtos de amplificação. Esta enzima cliva o fosfato da região 5' dos dNTPs não incorporados, convertendo-os em desoxirribonucleótidos difosfatados (dNDPs), inutilizando-os assim para o passo de reacção de extensão.

Seguidamente dá-se a reacção enzimática designada de iPLEX na qual nucleótidos modificados – didesoxirribonucleótidos trifosfatados (ddNTP) - são adicionados a uma mistura contendo o produto de amplificação, a DNA polimerase e um oligonucleótido de extensão adjacente à

base a genotipar. Nesta reacção, a polimerase adiciona ao oligonucleótido um ddNTP complementar à base a genotipar e que poderá ser o nucleótido normal ou um nucleótido alterado. Esta reacção origina então produtos de diferentes massas que serão posteriormente analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF, sendo assim diferenciados os genótipos com base na massa dos alelos (Oeth *et al*, 2005; Gabriel *et al*, 2009; Wright *et al*, 2008).

No entanto, antes da análise por espectrometria de massa é necessário remover os sais (Na^+ , K^+ e Mg^{2+}), de forma a evitar a formação de aductos iónicos que poderiam causar ruído de fundo no espectro de massa. Esta remoção é realizada com recurso a uma resina catiónica. Os produtos de extensão são então transferidos para um *chip* que é colocado no espectrómetro de massa. As moléculas de DNA são irradiadas por laser, o que induz a sua dessorção (libertação da superfície do *chip*) e ionização. As moléculas passam então por um tubo ligado a um detector de massa, ocorrendo a sua separação por tempos de deslocação, proporcionais às massas das moléculas (Ragoussis *et al*, 2006).

A figura 1.16 ilustra um ensaio de iPLEX *MASSARRAY*®, que se resume nos quatro passos já descritos: amplificação da sequência de interesse, tratamento com a fosfatase alcalina de camarão, extensão de uma única base dos oligonucleótidos e espectrometria de massa dos produtos de extensão (Oeth *et al*, 2005).

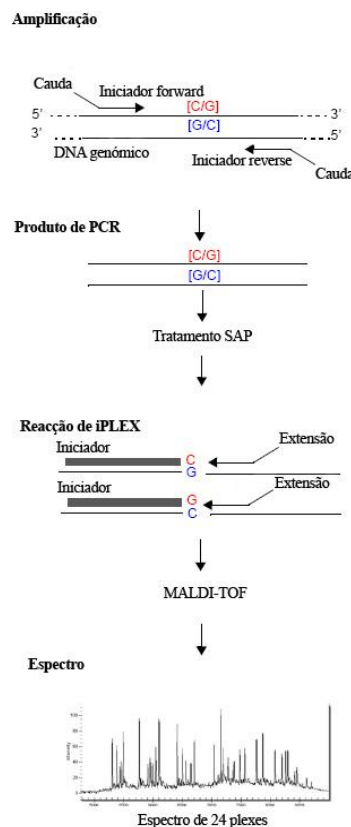


Figura 1.16 – Ensaio de iPLEX *MassArray* (Imagem adaptada de Oeth, P., *et al*, 2005).

Os resultados da espectrometria de massa são armazenados automaticamente numa base de dados e são analisados a partir do *software Typer 4.0*. Este *software* permite dispor os resultados em

tabelas ou gráficos e aplicar uma análise de *cluster*. Os *clusters* consistem no agrupamento dos resultados em três tipos, conforme a intensidade dos picos das duas formas alélicas: heterozigóticos, homozigóticos de massa baixa e homozigóticos de massa alta. Na figura 1.17 encontra-se um modelo ilustrativo do agrupamento dos dados de genotipagem por iPLEX *MassArray*.

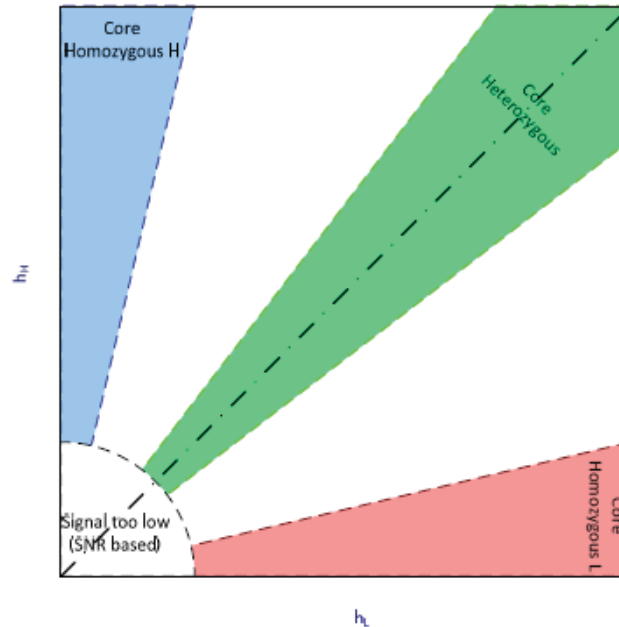


Figura 1.17 – Modelo teórico de genotipagem em *cluster* (Imagem adaptada de Typer 4.0 User's Guide).

Sendo este um modelo teórico todos os dados se encontram em ângulos ideais. Uma vez que o mesmo não se verifica na prática, o *software* modifica o modelo, aplicando um algoritmo de distribuição gaussiana a cada região de maneira a permitir a chamada de dados que se encontrem fora das regiões ideais (*cluster call*) (Typer 4.0 User's Guide, Sequenom).

Uma das vantagens deste método de genotipagem relativamente a outras técnicas de *microarrays* de DNA é a capacidade de detecção de *indels* (inserções-deleções). No entanto a técnica de iPLEX *MassArray* não permite a detecção de novas mutações. Nas amostras onde não se detecta nenhuma alteração por iPLEX MASSARRAY® deve aplicar-se uma técnica de rastreio de mutações em larga escala como é exemplo a Desnaturação de Alta Resolução (HRM) (Santos *et al*, 2011).

A técnica de HRM permite a detecção de alterações, nomeadamente substituições de uma base e pequenos *indels* por rastreio de sequências de DNA em larga escala. É uma técnica de execução relativamente simples na medida em que se baseia na técnica de PCR sendo adicionalmente introduzido na mistura de reacção, um fluoróforo saturante que intercala o DNA em cadeia dupla. Após a amplificação das regiões de DNA de interesse é realizado um passo de desnaturação por aumento rápido da temperatura, seguida de renaturação por decréscimo rápido da temperatura (Millat *et al*, 2010). Como podemos observar na figura 1.18, na fase de renaturação, se o indivíduo for heterozigótico para uma alteração no fragmento de DNA amplificado vão formar-se quer homoduplexes de cadeias de DNA 100% complementares, quer heteroduplexes, cadeias de DNA não

totalmente complementares. Finalmente dá-se uma etapa final que engloba um aumento gradual da temperatura com monitorização de fluorescência contínua, levando à desnaturação das cadeias de DNA e à libertação do fluoróforo intercalante. Como consequência verifica-se uma diminuição gradual da fluorescência sendo gerados diferentes perfis de desnaturação de acordo com a estabilidade térmica das sequências (Ishikawa *et al*, 2010).

Sendo uma técnica de rastreio de sequências permite a detecção de novas variações no DNA, contrariamente à técnica de iPLEX *MassArray* (Lin *et al*, 2010).

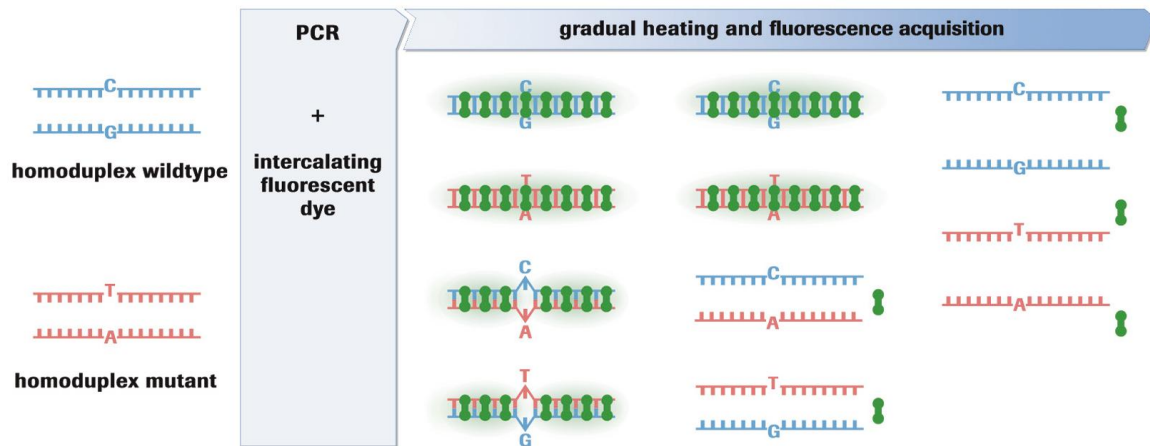


Figura 1.18 – Formação de homoduplexes e heteroduplexes numa amostra de DNA heterozigótica para uma alteração de DNA no fragmento amplificado (Imagem adaptada de LightCycler® 480 Real-Time PCR System - Technical Note No. 1).

Porém esta técnica de HRM apenas indica se a sequência de DNA amplificada apresenta ou não uma variação tendo, no caso de existir alteração de perfil de desnaturação, de ser aliada à sequenciação dessa região para determinar exactamente o tipo de alteração (Tindall *et al*, 2009).

1.4. Estudos transcricionais

Como foi referido na secção 1.2.6., a heterogeneidade genética e os diferentes graus de severidade clínica são uma característica da MH. Neste contexto, ainda não foi possível estabelecer boas correlações genótipo-fenótipo ou seja, a relação entre a presença de uma mutação num determinado gene e o prognóstico para esse doente. Com base neste facto, os estudos de transcritómica poderão ser indicadores dos mecanismos moleculares subjacentes à MH. Uma vez que a expressão de genes resulta quer de estímulos patológicos quer fisiológicos (genes modificadores, exercício), a identificação de marcadores moleculares transcritómicos associados à remodelação cardíaca resultante de MH poderão contribuir para explicar a referida heterogeneidade clínica.

Em comunicação oral na conferência da *Select Biosciences* de Setembro de 2010, “*Advances in qPCR European Conference*”, foi apresentado o trabalho do nosso grupo nesta área de investigação com o título: “*HCM sarcomere gene expression analysis: a machine learning approach*” (anexo 4). O objectivo do trabalho visa compreender o perfil transcritómico inerente ao tecido cardíaco, tentando no

limite estabelecer uma relação entre o perfil genético, o perfil transcritómico e o perfil clínico. Ainda numa nova abordagem pretende-se compreender se o padrão de expressão de genes sarcoméricos ao nível do músculo cardíaco pode ser extrapolado a partir de resultados de expressão desses genes no músculo esquelético. No sentido de concretizar ambos os objectivos foi analisada a expressão dos genes com maior contribuição na MH, designadamente os genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* por PCR em tempo real de 40 doentes com MH diagnosticada (resultados não publicados; apresentados nos anexos 2, 3 e 4). Esta análise foi realizada a partir de DNA complementar (cDNA) sintetizado a partir de RNA de biopsias (i) do septo interventricular, (ii) do apêndice auricular direito (que serviria como controlo) e (iii) de tecido esquelético proveniente da zona do tórax. Foi aplicado o método de quantificação relativo através do cálculo de ΔC_p , sendo que a expressão dos genes alvo foi comparada com um gene de controlo endógeno de expressão basal, (gene que codifica para a subunidade 18S do ribossoma (*rRNA18S*)). No que respeita ao tecido cardíaco, a expressão dos genes sarcoméricos foi comparada entre os tecidos do septo interventricular e do apêndice auricular direito, este último inicialmente considerado como saudável (resultados não publicados; apresentados nos anexos 2, 3 e 4).

A análise estatística (*cluster* hierárquico) dos resultados de expressão permitiu identificar cinco padrões de expressão genética distintos nos 40 doentes estudados (resultados não publicados; apresentados nos anexos 2 e 3). Estas diferenças poderão dever-se aos diferentes genótipos e fenótipos dos doentes. Adicionalmente e contrariamente ao que era esperado, os dados indicam que a expressão ao nível do apêndice auricular é alterada, sendo que este será também um tecido afectado pela doença, apesar de tal alteração não ser expressa fenotipicamente por hipertrofia e desarranjo fascicular (resultados não publicados; apresentados nos anexos 2 e 3). Ainda, a análise estatística revelou uma forte correlação entre o padrão de expressão genética de tecido muscular cardíaco e esquelético relativamente aos genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNI3* (resultados não publicados; apresentados nos anexos 2 e 3). O facto de se poder comprovar a existência de marcadores moleculares para MH, em conjunto com a análise de genotipagem poderia facilitar o prognóstico e diagnóstico de doentes com MH, a partir de biopsias de tecido esquelético, biopsias estas de mais fácil acesso que as biopsias cardíacas. Este trabalho encontra-se submetido para publicação em revista internacional (resumos apresentados nos anexos 2 e 3).

1.5. Trabalho a realizar

O grupo de investigação no qual este trabalho se insere encontra-se em fase de validação de duas técnicas de detecção de alterações genéticas em larga escala para diagnóstico genético de MH. Um dos objectivos deste trabalho foi a optimização da técnica de *iPLEX MassArray*, sendo então realizada a caracterização genética de doentes portugueses com MH, e em particular o estudo de mutações nos genes já mencionados, cuja etiologia no prognóstico é ainda desconhecida. Para tal recorreu-se à análise de DNA extraído do sangue de doentes com pré-diagnóstico ou suspeita desta

doença através da técnica de iPLEX *MASSARRAY*® a partir de DNA. A técnica de HRM foi aplicada posteriormente com o objectivo de confirmar as mutações detectadas ou então descartar possíveis falsos positivos. Com esta análise de genotipagem pretendeu-se compreender melhor as interacções genéticas e a distribuição desta doença na população Portuguesa.

Para além de estudos de genotipagem, um outro objectivo deste trabalho foi a análise da expressão do gene *CSRP3*, considerado de interesse por se terem identificado mutações neste gene na população portuguesa. Estes estudos foram realizados por PCR em tempo real, a partir de amostras de músculos cardíaco e esquelético, obtidos de um grupo de doentes com MH Obstrutiva (MHO) e submetidos a cirurgia cardíaca. A expressão do gene *CSRP3* foi avaliada após a síntese de cDNA a partir do RNA extraído dos tecidos musculares ventricular, apêndice auricular e esquelético dos doentes, procurando elucidar a relação entre a existência de mutações neste gene e a expressão da doença.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1. Análise genética

2.1.1. iPLEX MASSARRAY®

2.1.1.1. Amostra populacional em estudo

Foram colhidos e conservados em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a -20 graus centígrados (°C) (Terumo®, *Terumo Medical Corporation*, EUA), 6 mililitros (mL) de sangue periférico de 61 doentes portugueses com diagnóstico clínico ou suspeita de MH. Foram igualmente colhidas amostras de sangue periférico de 50 indivíduos sem suspeita ou história familiar de MH, para controlo negativo de mutações. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa e todos os sujeitos de estudo assinaram um consentimento informado.

Tabela 2.1 – Indivíduos com MH em estudo e informação clínica adicional. Os doentes realçados com sublinhado apresentam diagnóstico clínico de MHO, tendo sido sujeitos a cirurgia cardíaca (miectomia).

Amostra	Informação clínica adicional	Amostra	Informação clínica
1	Implantação de cardiodesfibrilhador	33	-
2	-	<u>41</u>	Estenose aórtica
3	-	<u>42</u>	Estenose aórtica
4	Implantação de cardiodesfibrilhador	<u>43</u>	Estenose aórtica
5	-	<u>46</u>	Estenose aórtica
6	-	<u>47</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica, angina de peito
7	-	<u>49</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica, angina de peito
8	Implantação de cardiodesfibrilhador	<u>50</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica
9	Estenose aórtica, angina de peito	<u>53</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica
<u>10</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, angina de peito	<u>54</u>	Estenose aórtica, angina de peito
<u>11</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica	<u>56</u>	Estenose aórtica, angina de peito
<u>12</u>	Estenose aórtica	<u>58</u>	Estenose aórtica
13	Insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica, angina de peito	<u>59</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, estenose aórtica, angina de peito
<u>14</u>	-	<u>62</u>	-
<u>15</u>	Estenose aórtica, síncope cardíaca	<u>79</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, síncope cardíaca, angina de peito
<u>16</u>	Estenose aórtica, angina de peito, síncope cardíaca	92	-

17	Insuficiência cardíaca congestiva	93	-
<u>18</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, angina de peito	94	-
<u>19</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, cardiodesfibrilhador, angina de peito	95	-
<u>20</u>	Angina de peito	96	-
<u>21</u>	-	98	-
<u>22</u>	Insuficiência cardíaca congestiva, angina de peito	100	-
<u>23</u>	Angina de peito	101	-
<u>24</u>	-	102	-
25	-	103	-
26	-	104	-
28	-	105	-
29	-	106	-
30	-	107	-
31	-	108	Estenose aórtica
32	-		

2.1.1.2. Isolamento e quantificação de DNA de 1mL de sangue total

O DNA foi isolado e purificado a partir de 1 mL de sangue total pelo kit *DNA Isolation Kit for Mammalian Blood* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. O DNA isolado foi quantificado no equipamento Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*, Wilmington, U.S.A), confirmando-se também a sua pureza, através das razões entre a absorvância a 260 nm (A_{260}) e a absorvância a 280 nm (A_{280}) e entre a A_{260} e a absorvância a 230 nm (A_{230}). O pico de absorvância dos ácidos nucleicos é 260 nm, das proteínas 280 nm e de contaminantes como sais e compostos orgânicos 230 nm. Estas razões permitem então avaliar a contaminação de proteínas (razão inferior a 1,8) e de outros compostos (razão inferior a 2).

A expressão da qual deriva a concentração de DNA (ng/ μ L) de cada amostra é a seguinte:

$$[DNA] = \frac{Abs_{260}}{b \times \epsilon}$$

, em que ϵ corresponde ao coeficiente de extinção molar (μ L. ng^{-1} . cm^{-1}) e b ao percurso óptico (cm).

A integridade do DNA foi avaliada através de electroforese unidimensional em gel de agarose a 0,8 % (peso/volume; p/v) contendo *GelRed* (Biotarget, representante da Biotium, Portugal; 500 μ L de solução 10.000x concentrada) numa concentração de 2 μ l por cada 100 mL de gel.

2.1.1.3. iPLEX MASSARRAY®

As amostras de DNA extraídas no ponto 2.1.1.2 foram analisadas para 541 mutações em 33 genes associados a MH pela técnica de iPLEX MASSARRAY® (*Sequenom*®) (tabela 2.2). As 541 mutações estudadas foram previamente obtidas a partir da consulta de bases de dados de mutações tais como “*The Human Gene Mutation Database*” do Instituto de Genética Médica de Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) e “*Harvard Sarcomere Mutation Database*” (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>).

Tabela 2.2– Número de mutações analisadas por iPLEX MASSARRAY® em cada um dos genes associados a MH. Retirado de <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> e <http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>.

Gene	Número de mutações analisadas por iPLEX MassArray	Gene	Número de mutações analisadas por iPLEX MassArray
<i>MYH7</i>	205	<i>FXN</i>	2
<i>MYBPC3</i>	173	<i>MYOZ2</i>	2
<i>TNNT2</i>	35	<i>SLC25A4</i>	2
<i>TNNI3</i>	27	<i>TTN</i>	2
<i>TPM1</i>	13	<i>ACTA1</i>	1
<i>TCAP</i>	10	<i>CASQ2</i>	1
<i>MYL2</i>	9	<i>CAV3</i>	1
<i>PRKAG2</i>	8	<i>LAMP2</i>	1
<i>ACTC1</i>	7	<i>MTTG</i>	1
<i>CSRP3</i>	7	<i>MTTI</i>	1
<i>JPH2</i>	7	<i>MYO6</i>	1
<i>MYL3</i>	6	<i>OBSCN</i>	1
<i>MYLK2</i>	4	<i>PLN</i>	1
<i>MTCYB</i>	3	<i>RAF1</i>	1
<i>MYH6</i>	3	<i>TNNC1</i>	1
<i>COX15</i>	2	<i>VCL</i>	1
<i>DES</i>	2		

O desenho dos oligonucleótidos para análise das 541 mutações causativas de MH foi realizado recorrendo ao *software MASSARRAY Assay Design 3.1* (*Sequenom*®). Este *software* permite desenhar os oligonucleótidos de amplificação e de extensão para cada mutação, a partir de um fragmento que engloba a mutação flanqueada para cada lado de cerca de 50 a 100 nucleótidos (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Exemplo de sequência utilizada pelo *software MASSARRAY Assay Design 3.1. (Sequenom®)* para desenho dos oligonucleótidos de amplificação e de extensão para a mutação CM031382 no gene *TNNT2*. O código CM031382 refere-se a uma mutação *missense* (HGMD) naquele gene.

Mutação (gene_código HGMD)	Sequência
TNNT2_CM031382	GATTCTCTAGGAAGGATCAGGGCCCTGCCTGCCTGGACACCCTCAGTCCCTGGGTCC AGAATGGGGCTGATGCTGACTATTCCTCTCTCCAACAGGTCG[T/C]TCATGCCCAACTT GGTGCTCCCAAGATCCCCGATGGAGAGAGAGTGGACTTTGATGTAAGCGGTGGCTG TGGGTTGAGTAGGCCTGGGCTGGGGATAGT

Desta forma são necessários 3 oligonucleótidos para a detecção de cada mutação: dois de amplificação e um de extensão. O *software* permite ainda a alocação das mutações a estudar em *plexes*, sendo cada *plex* composto por um conjunto de no máximo 40 mutações e em que cada *plex* corresponde a um poço da placa (384 poços no total) (Santos *et al.*, 2011). Relativamente às mutações em estudo o *software* organizou as 541 mutações em 21 *plexes*.

Consequentemente, num dado *plex* serão amplificadas numa reacção *multiplex* várias regiões genómicas contendo as mutações. No desenho dos oligonucleótidos e sua organização por *plex* teve-se em conta alguns parâmetros importantes de forma a evitar a formação de dímeros e hibridação não específica dos oligonucleótidos. Estes parâmetros são importantes pois os oligonucleótidos podem ligar-se a regiões genómicas semelhantes (não específicas) e logo causar reacções inespecíficas que interferem na análise. Uma das grandes vantagens deste *software* é que caso existam mutações muito próximas numa dada região, para que não haja interferência da detecção de uma nas outras, cada uma destas mutações “vizinhas” será alocada a um *plex* distinto.

Estes ensaios foram realizados no Serviço de Genotipagem do Grupo de Genómica do Instituto Gulbenkian da Ciência, Oeiras, tendo por base o estabelecimento de um protocolo de colaboração com aquela unidade e mediante o pagamento de um valor simbólico por cada utilização.

Os oligonucleótidos obtidos, bem como o ficheiro com os fragmentos que flanqueiam as mutações que deram origem aos vários oligonucleótidos (exemplo na Tabela 2.3) não serão apresentados nesta tese por serem considerados “*trade secret*” da empresa de diagnóstico genético DUONAR, LDA.

2.1.1.3.1. Oligonucleótidos de amplificação e de extensão

Os oligonucleótidos utilizados para a amplificação das regiões a estudar (amplicões de dimensões entre 80 a 120 pb) apresentam uma cauda de 10 nucleótidos na extremidade 5’ (5’-ACGTTGGATG-3’) que permite a sua distinção no espectro de massa dos oligonucleótidos de extensão. Os oligonucleótidos de extensão foram desenhados na região imediatamente adjacente ao local da alteração, devendo ter uma dimensão entre 15 a 30 nucleótidos (entre 4500 e 9000 Da) e temperaturas de desnaturação iguais ou superiores a 60°C. Todos os oligonucleótidos de extensão e

seus produtos de amplificação devem ter massas distintas, de maneira a serem distinguidos por espectrometria de massa (Oeth *et al*, 2005).

2.1.1.3.2. Amplificação de DNA para genotipagem

Foi preparada uma mistura de oligonucleótidos para cada *plex* e os DNAs foram diluídos para uma concentração final de 10 ng/μL. A mistura de reacção de PCR foi preparada de acordo com a tabela 2.4, sendo os volumes incrementados em 10% de forma a garantir um volume final correcto (compensar possíveis erros de pipetagens).

Tabela 2.4– Componentes da mistura PCR.

Reagente	Concentração em 5μL	Volume/poço
Água Nanopure	-	1,8 μL
Tampão PCR 10x	1x	0,5 μL
MgCl ₂	2mM	0,4 μL
dNTPs	500μM	0,1 μL
Mistura de oligonucleótidos	100nM	1,0 μL
Enzima de PCR	1U/poço	0,2 μL
Volume total	4 μL	4,0 μL

Foram adicionados 4 μL da mistura de reacção de PCR e 1 μL de DNA a cada poço da placa de 384 poços e selou-se a placa. Foram igualmente incorporados em cada *chip* um controlo negativo (1 μL de água bi-destilada estéril em vez do DNA) e um controlo relativo a DNA sem mutações. Foi realizada a reacção de amplificação nas condições indicadas na tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Condições de reacção de amplificação de DNA por PCR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°	4'	1 Ciclo
94°	20''	45 Ciclos
56°	30''	
72°	1'	
72°	3'	1 Ciclo
4°	5'	1 Ciclo
15°	∞	

2.1.1.3.3. Preparação da solução da enzima SAP

Foi preparada a solução de enzima SAP de acordo com a tabela 2.6, sendo os volumes incrementados em 10% para compensar possíveis erros de pipetagem.

Tabela 2.6 – Componentes da solução de enzima SAP.

Reagente	Volume/poço
Água Nanopure	1,53 µL
Tampão SAP	0,17 µL
SAP	0,30 µL
Volume total	2,00 µL

Foi adicionada a solução de enzima SAP (2 µL) a cada um dos poços e foi realizada a reacção de amplificação tal como se encontra na tabela 2.7.

Tabela 2.7 – Condições de reacção de SAP.

Temperatura	Tempo	Ciclos
37°	20'	1 Ciclo
85°	5'	1 Ciclo
4°	∞	

2.1.1.3.4. Reacção iPLEX Gold

Finalmente procedeu-se à preparação das reacções de extensão usando o kit iPLEX Gold. Os oligonucleótidos de extensão foram agrupados conforme as suas massas, sendo formados quatro grupos: massa baixa (a 625 nM), massa média baixa (a 830 nM), massa média alta (a 1,04 µM) e massa alta (a 1,25 µM), num volume final de 9 µL. O ajuste da concentração dos oligonucleótidos de extensão permite contornar o problema imposto pela relação inversa entre a intensidade dos picos e a massa dos produtos de extensão, que gera picos de maior massa menos intensos que os picos de massa baixa. Evitam-se assim erros de genotipagem devido à leitura errónea dos sinais e do ruído.

Foi preparada a mistura de reacção de extensão iPLEX Gold (*Sequenom*®) para cada um dos *plexes*, (contendo a respectiva mistura de oligonucleótidos de extensão), sendo o volume aumentado novamente em 10% (tabela 2.8):

Tabela 2.8 – Componentes da reacção de extensão iPLEX Gold.

Reagente	Volume/poço
Água Nanopure	0,619 µL
Tampão iPLEX Plus	0,200 µL
Mistura de terminadores	0,200 µL
Mistura de oligonucleótidos	0,940 µL
Enzima iPLEX	0,041 µL
Volume total	2,000 µL

A mistura de reacção (2 µL) foi adicionada a cada um dos poços de cada *plex* e prosseguiu-se com a reacção de extensão num termociclador segundo o programa descrito na tabela 2.9:

Tabela 2.9 – Condições de reacção de iPLEX Gold.

Temperatura	Tempo	Ciclos	Ciclos
94°	30''		
94°	5''		40
52°	5''	5	
80°	5''		
72°	3'		
4°	∞		

2.1.1.3.5. MASSARRAY

Após terminada a reacção de extensão, os produtos desta reacção têm de passar por um processo de limpeza para otimizar a análise por espectrometria de massa. Este processo consiste na adição de uma resina (*Clean Resin, Sequenom®*) à placa, de forma a remover sais que possam interferir na análise. De seguida os produtos de extensão são impressos no *SpectroCHIP (Sequenom®)* com o auxílio do *MASSARRAY Nanodispenser (Sequenom®)* e submetidos a espectrometria de massa.

2.1.1.3.6. Análise de resultados

A análise dos dados foi realizada no *software Typer 4.0 (Sequenom®)*. As mutações identificadas nas amostras em estudo foram confirmadas por sequenciação. As regiões genómicas contendo as mutações foram dessa forma, amplificadas por PCR (*BIOTAQ™DNA Polymerase* da *Bioline*) e o produto de PCR purificado pelo kit *JETQUICK Spin Column Technique Gel Extraction* (Genomed, Diagnósticos de Medicina Molecular SA, Portugal). A sequenciação foi realizada com base numa colaboração estabelecida com o Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A análise dos cromatogramas foi realizada no programa *FinchTV versão 1.4.0* da *Geopiza Inc.* Para identificação de mutações *missense*, *splicing* e deleções ou inserções foi feito o alinhamento das sequências utilizando o *software Blastn* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.1.1.3.7. Reorganização dos *plexes*

Apesar de se ter conseguido detectar mutações em todos os doentes analisados numa primeira fase, constatou-se pela análise dos resultados que nalguns *plexes* para um pequeno número de

mutações não foi possível determinar os respectivos alelos nas amostras em estudo (“no call”). Como essas amostras amplificaram noutros *plexes*, descartou-se qualquer problema relativo à qualidade do DNA (previamente verificada no Nanodrop) e colocou-se a hipótese de o problema poder residir no desenho dos oligonucleótidos ou no facto dos oligonucleótidos poderem interferir entre si no mesmo *plex*. Desta forma, decidiu-se reorganizar o *chip* relativamente às mutações em causa. Assim, as mutações em que sistematicamente não se verificou amplificação ou em que a extensão era baixa, foram colocadas em novos *plexes* (22 ao 35), reorganizados pelo *software* da *Sequenom*. Esta alteração implicou uma redução no número de amostras a analisar de 16 para 10, mantendo-se uma amostra adicional sem mutações (controlo). As figuras 2.1 e 2.2 correspondem ao desenho das placas com 21 e 35 *plexes* respectivamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	1	17	vazio
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	2	18	vazio
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	3	19	vazio
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	4	20	vazio
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	5	21	vazio
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	6	vazio	vazio
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	7	vazio	vazio
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	8	vazio	vazio
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	9	vazio	vazio
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	10	vazio	vazio
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	11	vazio	vazio
L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	12	vazio	vazio
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	13	vazio	vazio
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	14	vazio	vazio
O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	15	vazio	vazio
P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	16	vazio	vazio

Figura 2.1 – Organização de placa de iPLEX *MassArray* com 21 *plexes*. Os *plexes* estão dispostos em colunas (1 a 23), sendo identificados pela numeração (1 a 21) e coloração. Em cada linha (A a P) é analisada uma amostra de um doente com MH, correspondendo uma das linhas ao controlo sem mutações. As colunas 22 e 23 correspondem ao controlo negativo (água) para detecção de mutações.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	35	22	23	24
L	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	30	21	21
M	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	26	31	21	21
N	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	27	32	21	21
O	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	28	33	21	21
P	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	29	34	21	21

Figura 2.2 – Organização de placa de iPLEX *MassArray* com 35 *plexes*. Cada linha, de A a K, corresponde a uma amostra de um doente com MH, correspondendo uma das linhas ao controlo sem mutações. Os *plexes* estão identificados pela numeração (1 a 35) e coloração.

Após as referidas alterações de desenho e organização dos *plexes* foram analisados 27 *chips* em iPLEX *MassArray* incluindo as amostras presentes neste trabalho.

2.1.2. Desnaturação de Alta Resolução (HRM)

2.1.2.1. Desenho e optimização dos oligonucleótidos

Todos os oligonucleótidos utilizados para a amplificação das regiões a estudar por HRM foram previamente desenhados e optimizados na tese de Mestrado intitulada “Desnaturação de Alta Resolução Aplicada ao Diagnóstico Genético de Miocardiopatia Hipertrófica” (Marques, 2010).

2.1.2.2. Preparação do ensaio

No contexto deste trabalho, utilizou-se a metodologia de HRM para validar os resultados provenientes de iPLEX MASSARRAY®. Os DNAs foram diluídos a 10 ng/μL, e foram incluídos DNAs de indivíduos sem história familiar de MH como controlos negativos.

Foi preparada uma mistura de reacção presente na tabela 2.10 com o kit *LightCycler 480*® *High Resolution Melting Master* do qual faz parte o fluoróforo *Resolight Dye* e a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* da *Roche Diagnostics*. A mistura de reacção foi distribuída numa placa de 96 poços nos quais foram adicionados previamente os DNAs a analisar.

Tabela 2.10 – Componentes da mistura de reacção de HRM.

Reagente	Volume
Master Mix	5,0 µL
Mistura de oligonucleótidos 0,5 µM	0,5 µL
MgCl ₂ 2,5 µM	1 µL
Volume total	10,0 µL

2.1.2.3. Reacção de PCR

A reacção de amplificação foi realizada no aparelho *LightCycler 480*[®] da *Roche Diagnostics* segundo o programa descrito na tabela 2.11. A temperatura de *annealing* (Ta) utilizada dependeu da sequência dos oligonucleótidos, sendo de 55°C para o exão 3 do gene *CSRP3*, de 58°C para o exão 1 do gene *TCAP* e de 56°C para o exão 2 do gene *TCAP*.

Tabela 2.11 – Condições da reacção de amplificação.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°	10'	1
95°	10''	35
Ta	10''	
72°	20''	

2.1.2.4. HRM

Após a amplificação, as amostras foram sujeitas a aquecimento gradual durante um minuto até aos 95°C sendo posteriormente arrefecidas até aos 40°C, formando-se neste passo, os homoduplexes e heteroduplexes.

Seguiu-se então o passo de HRM sendo as amostras sujeitas a um aumento gradual de temperatura com aquisição contínua de fluorescência dos 60°C até aos 95°C (1°C/segundo).

2.1.2.5. Análise de resultados

Os resultados foram analisados através do programa *LightCycler 480*[®] *Software* versão 1.5.0.39 SP3 da *Roche Diagnostics*. Foram excluídas da análise as amostras que não amplificaram e as amostras com amplificação a partir do ciclo 30. Na análise foram incluídas no mesmo grupo amostras cujos *crossing points* (Cp) não diferissem em mais de 3 ciclos. Por Cp entende-se o número de ciclos acima do nível de *threshold* em que se verifica o primeiro aumento significativo da fluorescência.

Foram gerados picos de desnaturação a partir da primeira derivada das curvas de desnaturação. Os picos de desnaturação permitem avaliar as condições da experiência, sendo observável a existência de produtos inespecíficos ou dímeros de oligonucleótidos.

As curvas de desnaturação são depois normalizadas segundo a temperatura e são representadas como a variação (decréscimo) da fluorescência em função da temperatura. Este gráfico (*difference plot*) permite observar as diferenças relativas entre as amostras. Uma amostra é considerada alterada sempre que apresente um valor de diferença relativa fora dos limites de normalidade (fora do intervalo [-2, +2]) e uma curva de desnaturação diferente dos controlos (indivíduos sem indicações de doença ou história familiar de MH).

2.2. Análise transcritómica

2.2.1 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real permite a análise quantitativa de cDNA ao longo da reacção de amplificação, através da utilização de fluoróforos intercalantes ou de sondas marcadas que se ligam à cadeia de cDNA. A utilização de fluoróforos permite a geração de curvas sigmoidais de fluorescência *versus* número de ciclos que indicam a quantidade de cDNA em cada ciclo da reacção de amplificação. Estas curvas dividem-se em três fases: a fase inicial, em que se verifica fluorescência de fundo, a fase exponencial, que se caracteriza pelo aumento de fluorescência que acompanha o aumento exponencial da quantidade de DNA, e finalmente a fase *plateau* em que a acumulação de cDNA vai diminuindo (*LightCycler® Real-Time PCR systems Application Manual, Roche Diagnostics*).

Como foi previamente mencionado, existem vários métodos de detecção de produtos de amplificação. Nestes ensaios foi utilizada uma sonda de hidrólise (ensaio *TaqMan®*; *Applied Biosystems*, EUA), que consiste numa sonda que apresenta dois fluoróforos em cada extremidade, o *quencher* (extremidade 3') e o *reporter* (extremidade 5'). Enquanto a sonda está intacta o *quencher* reprime a fluorescência do *reporter*. Na fase de desnaturação das cadeias de cDNA, a sonda liga-se às cadeias. Na fase de extensão a polimerase com actividade 5' nucleasa cliva a sonda, libertando o *reporter* que assim emite fluorescência (*LightCycler® Real-Time PCR systems Application Manual, Roche Diagnostics*).

O nível de expressão do gene em estudo foi detectado através do método de quantificação relativo que consiste na expressão dos seus níveis de mRNA relativamente a mRNA de um gene de expressão basal. Na análise de dados é utilizado o valor de *crossing point* (Cp), que consiste no ponto a partir do qual a amplificação é detectada. Este é o ponto inicial da fase exponencial que se correlaciona com a quantidade de cDNA, uma vez que quanto maior é a sua quantidade inicial, mais cedo se detecta um aumento significativo da fluorescência (Cp mais baixo) (*LightCycler® Real-Time PCR systems Application Manual, Roche Diagnostics*). A partir deste valor é possível obter as razões de expressão relativa ($2^{\Delta C_p}$) que indicam os níveis de expressão do gene em estudo.

2.2.1.1. Amostra populacional em estudo

Em 24 dos 61 doentes portugueses (tabela 2.12) com diagnóstico clínico de MHO, foi recolhido tecido muscular cardíaco (apêndice auricular direito e septo interventricular) e tecido muscular esquelético (região torácica) em RNA *later* (Ambion, Applied Biosystems, EUA), obtidos na altura de cirurgia cardíaca para remoção de septo interventricular espessado (miectomia). Foi também colhido sangue periférico para a pesquisa de mutações no DNA (secção 2.1).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Coimbra e todos os indivíduos assinaram um consentimento informado, pré-cirurgia.

Tabela 2.12 – Conjunto de doentes em estudo com diagnóstico de MHO e informação clínica adicional.

Amostras	Informação clínica adicional	Amostras	Informação clínica adicional
10	Insuficiência cardíaca congestiva, angina de peito	46	Estenose aórtica
12	Estenose aórtica	47	Insuficiência cardíaca congestiva, stenose aórtica, angina de peito
14	-	49	Insuficiência cardíaca congestiva, stenose aórtica, angina de peito
15	Síncope cardíaca, stenose aórtica	50	Insuficiência cardíaca congestiva, stenose aórtica
18	Insuficiência cardíaca congestiva, angina de peito	53	Insuficiência cardíaca congestiva, stenose aórtica
20	Angina de peito	54	Estenose aórtica, angina de peito
21	-	56	Estenose aórtica, angina de peito
23	Angina de peito	58	Estenose aórtica
24	-	59	Insuficiência cardíaca congestiva, stenose aórtica, angina de peito
41	Estenose aórtica	62	-
42	Estenose aórtica	79	Insuficiência cardíaca congestiva, síncope cardíaca, angina de peito
43	Estenose aórtica	108	Estenose aórtica

2.2.1.2. Isolamento de RNA a partir de tecido e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir dos três tecidos recolhidos de cada doente com o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Promega Corporation, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O RNA extraído foi conservado a -80°C. Foi sintetizado cDNA a partir do RNA total extraído anteriormente com o kit *cDNA synthesis kit* (Bioline GmbH, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

2.2.1.3. Ensaio de PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados incluindo como controlo amostras comerciais de RNA de cada um dos tecidos (septo interventricular, apêndice auricular e músculo esquelético, designadas por CS) (*Ambion, Applied Biosystems*, EUA) a partir dos quais foi sintetizado cDNA para análise do nível de expressão genética basal (controlos para cada tipo de tecido).

Os oligonucleótidos e a sonda de hidrólise modificada (5'-6-carboxifluoresceína (6-FAM) e 3'-tetrametilrodamina (TAMRA)) usados para a detecção dos níveis de expressão do gene *CSRP3* foram obtidos a partir da respectiva sequência de mRNA e encomendados à empresa *Thermo Scientific*. Apresentam-se as suas sequências na tabela 2.13 e na figura 2.3.

Tabela 2.13 – Sequências dos oligonucleótidos desenhados para o ensaio de PCR em tempo real.

Oligonucleótido	Sequência
<i>Forward</i>	5'ATGTGGCAAGTCAGTCTATGCT3'
<i>Reverse</i>	5'ACTCCAGACTCTTCCCACAGAT3'
<i>Sonda</i>	5'GGCAAGCCTTGGCACAAGACCT3'

5' -
 CAGGCCAAGGCTGGTGACAGCCTTCATATATTTAAAGAGGACAAGAGCCCCTCAGACTCAGTTGAGCTGAACGGAG
 TCCACACAGGCAGACTTGACCTTGACCAGATAGTCTTCAAGATGCCAAACTGGGGCGGAGGCGCAAATGTGGAGC
 CTGTGAAAAGACCGTCTACCATGCAGAAGAAATCCAGTGAATGGAAGGAGTTTCCACAAGACGTGTTTCCACTGC
 ATGGCCTGCAGGAAGGCTCTTGACAGCAGCAGTCCGCGGCTCATGAGTCGGAGATCTACTGCAAGGTGTGCTATG
 GGCGCAGATATGGCCCCAAAGGGATCGGGTATGGACAAGGCGCTGGCTGTCTCAGCACAGACACGGGCGAGCATCT
 CGGCCTGCAGTTCCAACAGTCCCCAAAGCCGGCAGCTCAGTTACCACCAGCAACCCCTTCCAAATTCAGTGGGAAG
 TTTGGAGAGTCCGAGAAGTGCCCTCGATGTGGCAAGTCAGTCTATGCTGCTGAGAAGGTTATGGGAGGTGGCAAGC
 CTTGGCACAGACCTGTTTCCGCTGTGCCATCTGTGGGAAGAGTCTGGAGTCCACAAATGTCACTGACAAAGATGG
 GAACTTTATTGCAAAGTTTGCTATGCCAAAAATTTGGCCCCACGGGTATTGGGTTTGGAGGCCATTACACACAA
 GTGGAAAAGAAAAGAAATGAAGAGGTGCGCCGTTTCTCAGATTTTTTGCAGCCTAAAACACTTGCCAAGTAATCCTG
 CACAGATCGATACCTTTCCCAAATAGCCTCTCCTTTGTAGTCGTACATTATGTGTTTTCTCCTCAGAAGTGATCAG
 GTCTTTACTGAATGTTAGAAGAGGCCTTTGGAAAGAAAATTTATGTAAAGTTTAAATCTATAACAAATGCTTTATATT
 TATAATGCTTGAATGGGAGAGGCAATAAATAAATGTTTTAGTGCTATCTTGATGGCTCTAGATCTTTTCTTTGA
 GATAGAAAATTTCAAAAACATAAAGCTAGTTCAAAAAACGAGTTGCAGAGCATATAATAAATTTGGATGTCAACTG
 AGAAAGGAGTGAGAAGGAAGAAACAATGCCCAAAGGAAAGCAGTCTTTCAGAATCTGTCAGCCAAGTGTCTTTCTA
 GTTACTGCTAATGGAGAAGAAAACAGGGGGTCTGGGAGAAAATAGAGAACATGATAGCAAAATCTAAAAGGAAAAT
 CAAAATAATAAATTTGCTGAAGAGTTGATCCCTTTGTCTATCGTGGGGCTTTGTAATGTTACACATCTCGTGAA
 AACTCAGAAATGACAATAAAGCGTGGCATTTCCTCTGTATTATAAATG-3'

Figura 2.3 – Sequência do cDNA do gene *CSRP3*, com indicação das sequências dos oligonucleótidos *forward* (sublinhado azul), *reverse* (sequência complementar do oligonucleótido *reverse*) (sublinhado verde) e sonda (sublinhado vermelho) usados nas reacções de PCR em tempo real.

Como controlo endógeno de expressão, para monitorização da integridade do RNA extraído de tecido cardíaco e esquelético, analisou-se a expressão constitutiva do gene *rRNA 18S*. Para tal foi utilizada uma mistura comercial de oligonucleótidos de amplificação e sonda de hidrólise modificada (5'- VIC e 3'-TAMRA) (*Applied Biosystems*, EUA).

As misturas de reacção de amplificação foram preparadas de acordo com o kit comercial *iTaq™ Supermix with ROX* (*Bio-Rad*, EUA). As misturas de reacção continham os oligonucleótidos e sondas para a detecção simultânea de ambos os transcritos *CSRP3* e *rRNA 18S*. As reacções de PCR em tempo real foram realizadas, em triplicado para cada tecido, em placas de 96 poços (*Roche Diagnostics*, Alemanha) no *LightCycler® 480* da *Roche Diagnostics*, com o programa seguinte (Tabela 2.14):

Tabela 2.14 – Condições da reacção de PCR em tempo real.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°	2'30'	1
95°	15''	45
60°	40''	

2.2.1.4. Análise de resultados

O nível de expressão foi determinado a partir do método de ΔC_p , que consiste na diferença de valores entre C_p do gene em estudo, neste caso *CSRP3*, e C_p do gene de controlo endógeno, *rRNA 18S*. O cálculo das médias dos C_p s e os respectivos desvios padrão foi realizado em folha de cálculo do Excel (*Microsoft Office, Microsoft Corporation*, EUA). A fórmula do desvio padrão é a seguinte:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

, onde \bar{x} é média de amostra e n é o tamanho da amostra. Nos casos em que o desvio padrão para o triplicado deu superior a 0,35, um dos valores foi excluído.

Os valores de ΔC_p permitiram o cálculo das razões de expressão relativa, dado pela fórmula $2^{\Delta C_p}$, sendo o erro associado dado por:

$$\text{erro associado} = 2^{\Delta C_p} \times \text{erro } \Delta C_p$$

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1. Análise genética

O diagnóstico genético de MH é actualmente um procedimento dispendioso e moroso uma vez que se baseia na análise dos 5 genes mais frequentemente associados a MH, com recurso à técnica convencional de SA. Neste contexto, surgiu no âmbito desta tese, a possibilidade de acoplar duas técnicas de detecção de mutações, o iPLEX *MassArray* e o HRM, que em conjunto permitem um diagnóstico preciso, rápido e económico (Santos *et al*, 2011). Tal como referido no capítulo dos materiais e métodos (secção 2.1.1.3) o desenho dos oligonucleótidos permitiu, numa primeira fase, alocar as 541 mutações em 21 *plexes* o que permitiu a análise de 15 amostras de indivíduos com MH (Tabela 3.1), e uma amostra de um indivíduo controlo sem MH (sem mutações) num *chip* de 384 poços. Na figura 3.1 apresenta-se um exemplo da detecção da mutação DB04 (c.1727 G>A; p.Trp576ter) no gene *MYBPC3*, detectada num dos indivíduos mencionados na tabela 2.1 da secção 2.1.1.1 (indivíduo 101).

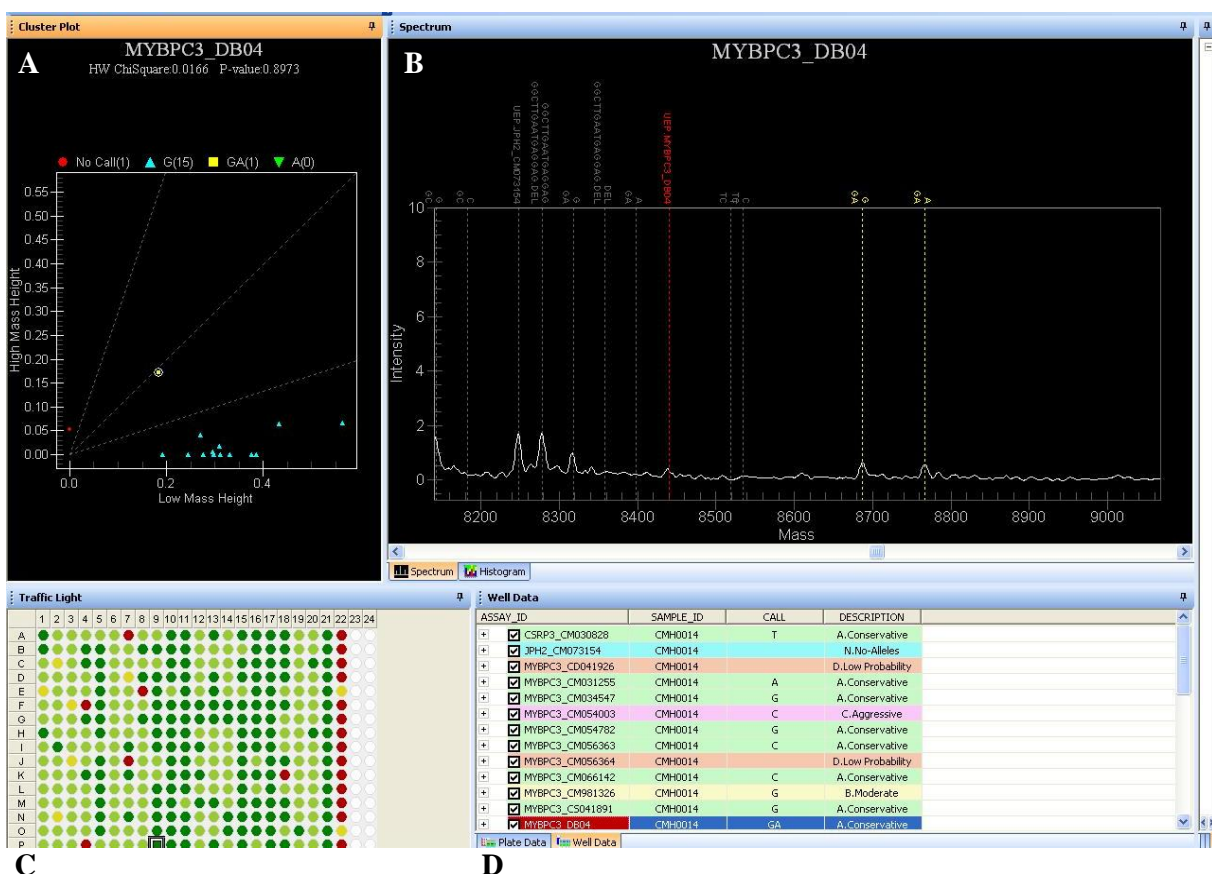


Figura 3.1– Interface do *software Typer Analyser* da *Sequenom*®. São apresentados 4 painéis de resultados: (A) Gráfico (*cluster plot*), (B) espectro (*spectrum*), (C) *traffic light* e (D) mutações por poço (*well data*). O gráfico corresponde à mutação *MYBPC3_DB04* e apresenta os resultados de genotipagem de cada uma das amostras analisadas.

Na figura 3.1A é possível verificar que a cada alelo corresponde um símbolo e uma cor e que os símbolos são dispostos conforme a massa dos alelos. No espectro, figura 3.1B, é possível verificar os picos de sinal dos alelos e também dos oligonucleótidos. Picos relativos aos oligonucleótidos com grande intensidade de sinal indicam que estes não foram consumidos na reacção. Já a figura 3.1C indica o desempenho do ensaio ao nível da placa através de uma gradação de cores: (i) poços com mais de 85% de *calls* - é possível determinar todos os alelos - apresentam uma coloração verde escura, (ii) poços com uma determinação de alelos entre os 50 e os 84% apresentam uma coloração verde clara, (iii) poços com uma determinação de alelos entre os 15 e os 49% de sucesso apresentam uma coloração amarela, e finalmente (iv) poços com percentagens de identificação de alelos inferior a 14% apresentam uma coloração vermelha (*no calls*) (figura 3.1C). Na coluna 22 do *traffic light* encontra-se o controlo com água (controlo negativo de contaminações nas amostras) que, tal como esperado, apresenta na sua grande maioria coloração vermelha, indicando a inexistência de amplificações/contaminações para a maior parte das amostras. Relativamente aos dados de cada poço (figura 3.1D), é possível verificar quais as mutações e as amostras analisadas em cada poço, o resultado de genotipagem e a sua descrição (A. Conservativo, B. Moderado, C. Agressivo, D. Baixa probabilidade, E. *Call* do utilizador, G. Conflito, H. Mau ensaio, I. Espectro de má qualidade, J. Polimórfico, K. Não polimórfico, L. Baixa frequência, M. Incerto, N. Sem alelos, O. Genótipo desconhecido).

A análise de iPLEX MASSARRAY® dos 15 indivíduos iniciais permitiu-nos identificar 15 mutações em 15 cada um dos indivíduos, cujos resultados se apresentam na tabela 3.1 (Santos *et al.*, 2011).

Tabela 3.1 – Doentes, genes e mutações detectadas por iPLEX MassArray.

Amostra	Diagnóstico molecular por iPLEX MassArray
32	<i>CSRP3_CD062135</i> (c.128delC, p.Ala43Valfs165)
92	<i>MYBPC3_CM992932</i> (c. 2693G>A, p.Val896Met)
93	<i>MYH7_CM920494</i> (c.2770G>A, p.Glu924Lys)
94	<i>MYH7_CM050712</i> (c.4472C>G, p.Ser1491Cys)
95	<i>MYBPC3_CM032959</i> (c.2824C>T, p.Arg943 ter)
96	<i>MYBPC3_CM032959</i> (c.2824C>T, p.Arg943 ter)
98	<i>TNNT2_CM034583</i> (c.779A>G, p.Lys260Arg)
100	<i>MYBPC3_CM981329</i> (c.788T>C, p.Ile263Thr)
101	<i>MYBPC3_DB04</i> (c.1727G>A, p.Trp576ter)
102	<i>MYBPC3_CM032959</i> (c.2824C>T, p.Arg943 ter)
103	<i>TNNT2_CM031384</i> (c.833A>T, p.Asn278Ile)
104	<i>MYBPC3_CM992932</i> (c.2683G>A, p.Val895Met)
105	<i>MYH7_CM033923</i> (c.958G>A, p.Val320Met)
106	<i>TNNT2_CM034583</i> (c.779A>G, p.Lys260Arg)
107	<i>MYH7_CM981329</i> (c.788T>C, p.Ile263Thr)

Estes resultados foram todos confirmados por HRM e os resultados que se apresentaram positivos por ambas as metodologias, foram posteriormente confirmados por sequenciação (Santos *et al*, 2011) (Figuras 3.2 e 3.3 e resultados não apresentados). A tecnologia de HRM permite a identificação de alterações genéticas com cerca de 100% de sensibilidade e especificidade, segundo resultados comprovados pelo nosso grupo de investigação (Santos *et al.*, 2011). As figuras 3.2 e 3.3 exemplificam os resultados de HRM e de SA obtidos para algumas das amostras acima citadas (Tabela 3.1). Em cada reacção de HRM foi incluído um controlo negativo de amplificação (H₂O bi-destilada) e pelo menos um controlo negativo de mutação (indivíduo cujo DNA foi previamente sequenciado e sem mutações nesse exão).

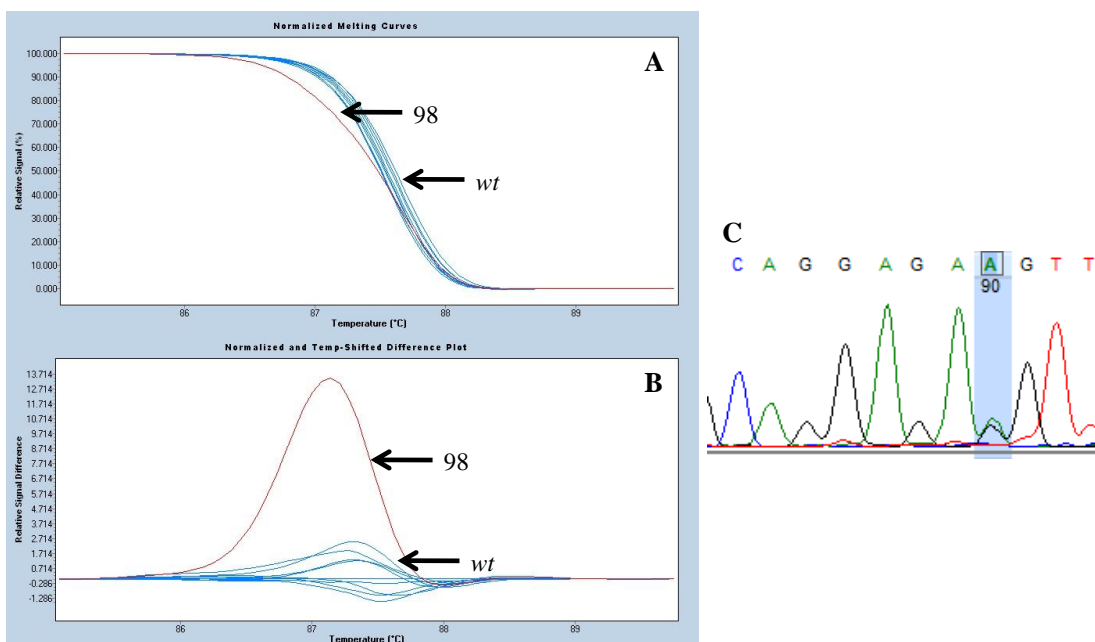


Figura 3.2 – Perfil de HRM relativo ao exão 14 do gene *TNNT2* na amostra 98. (A) Curva de desnaturação. (B) Gráfico de diferenças relativas. (C) Cromatograma obtido por SA, assinalando a alteração em heterozigotia c.779A>G (p.Lys260Arg).

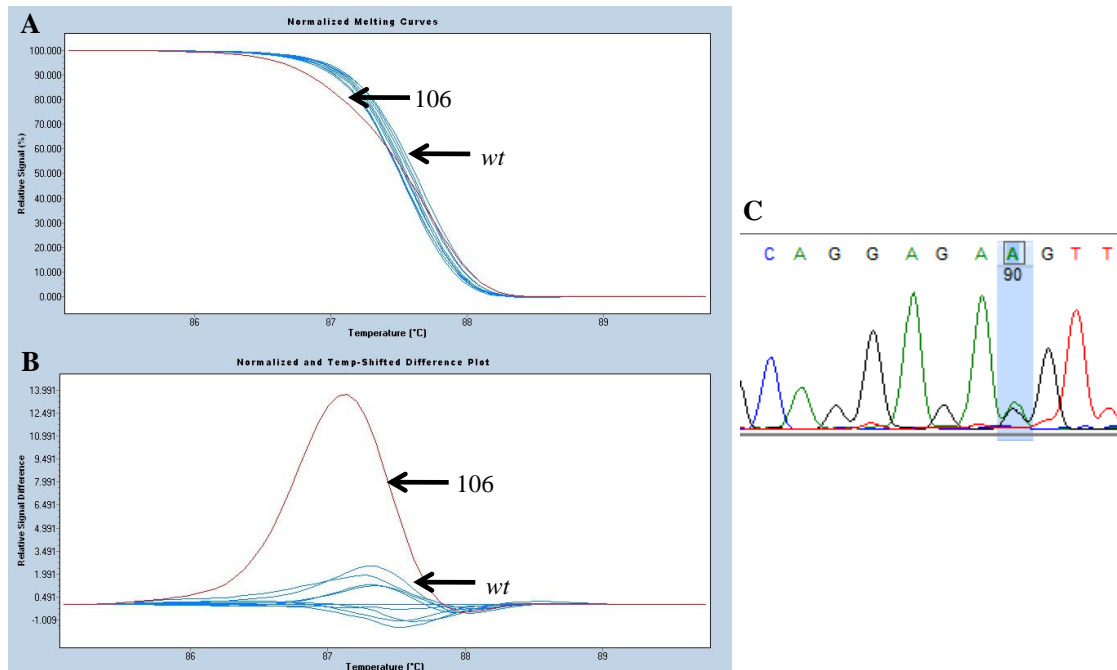


Figura 3.3 - Perfil de HRM relativo ao exão 14 do gene *TNNT2* na amostra 106. (A) Curva de desnaturação. (B) Gráfico de diferenças relativas. (C) Cromatograma obtido por SA, assinalando a alteração em heterozigotia c.779A>G (p.Lys260Arg).

Esta análise permitiu a identificação de 7 mutações no gene *MYBPC3* (87,5%), 4 mutações no gene *MYH7* (50%), 3 mutações no gene *TNNT2* (37,5%), e 1 mutação no gene *CSRP3* (12,5%). Verifica-se, à semelhança de outras populações, que os genes *MYBPC3* e *MYH7* apresentam a maior percentagem de mutações. No entanto, esta análise preliminar foi realizada numa população pequena de 15 indivíduos com MH (Tabela 3.1) pelo que para se poder inferir qualquer correlação, estudos envolvendo maiores amostragens são necessários. É interessante denotar no entanto, que a nossa estratégia permitiu a identificação de uma mutação no gene *CSRP3* num doente com MH, um gene não analisado correntemente nos laboratórios de diagnóstico que realizam o teste genético de MH com a técnica de SA. Com base nestes resultados, decidiu-se centrar o restante trabalho desta tese na análise de genes correntemente não estudados pelas metodologias actuais de diagnóstico (SA), o gene *CSRP3* e o gene *TCAP*, ambos codificando proteínas da linha Z. Um dos objectivos da inclusão do estudo destes genes nesta tese prendeu-se com o facto de que, não estando incluídos no diagnóstico genético da MH por SA, não se conhece a sua importância no desenvolvimento de MH na população portuguesa.

Pelo facto de termos tido, nesta primeira análise por iPLEX MASSARRAY®, uma taxa de *no calls* um pouco elevada decidiu-se reorganizar o *chip*, colocando essas mutações noutras *plexes* (22 ao 30), de forma a tentar perceber se efectivamente seria um problema de interferências entre oligonucleótidos ou o seu desenho incorrecto. Realizou-se assim a análise dos restantes 46 doentes por iPLEX MASSARRAY®, tendo sido seleccionados os resultados positivos para as mutações nos genes

CSRP3 e *TCAP*, dado o objectivo desta tese se centrar na caracterização das mutações nestes genes na nossa população.

No *chip* de iPLEX MASSARRAY® estão incluídas 7 mutações no gene *CSRP3* (5 *missense*, 1 deleção e 1 complexa) e 10 mutações no gene *TCAP* (1 deleção e 4 *missense*, repetidas em dois *plexes* diferentes). Na tabela 3.2 encontra-se a listagem das mutações detectadas por iPLEX MASSARRAY® nos genes *CSRP3* e *TCAP* para cada doente.

Tabela 3.2 – Análise de mutações por tecnologia de iPLEX *MassArray* nos genes *CSRP3* e *TCAP* em doentes com MH. Na tabela encontra-se descrito o gene, o respectivo exão, a designação do doente (amostra), o código da mutação detectada, as alterações causadas nas sequências nucleotídicas e aminoacídicas, e os resultados das análises feitas por iPLEX *MassArray* (resultados confirmados como falsos positivos marcados a cinzento) e HRM (as amostras não analisadas por falta de DNA estão assinaladas com um traço). G - Guanina; C – Citosina; A – Adenina; T – Timina; Del - deleção

Gene_Exão	Amostra	Código mutações ¹⁶	Alteração Tradução ¹⁶	Alteração nucleotídica ¹⁶	Resultado iPLEX <i>MassArray</i> (Call, Cluster Call)	Resultado de HRM
Exão 3 do gene <i>CSRP3</i>	1	CM030827	Leu44Pro	CTT-CCT	No call, CT	Positivo
	3	CM061692	Gln91Leu	CAG-CTG	No call, TA	Negativo
	5	CM061693	Arg64Cys	gCGC-TGC	T,T	Positivo
	10	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	No call, GT	Positivo
	11	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	No call, GT	Positivo
	12	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	No call, GT	Positivo
	13	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	No call, GT	Negativo
	14	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	Positivo
	15	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	Negativo
	18	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	Positivo
	19	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	Positivo
	20	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	Positivo
	21	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	-
	23	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	-
	24	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	Positivo
	25	CM061692	Gln91Leu	CAG-CTG	TA, TA	Negativo
	26	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	No call, G	Positivo
	30	CD062135	Ala43Val	Del C	DelC, DelC	Positivo
	32	CD062135	Ala43Val	Del C	DelC, DelC	Positivo
	33	CM030827	Leu44Pro	CTT-CCT	No call, CT	Positivo
56	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	No call, GT	-	
62	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	G, G	-	
79	CM030828	Cys58Gly	cTGC-GGC	GT, GT	-	
Exão 1 do gene <i>TCAP</i>	4	CD062239	Del 12Glu	Del GAG	Del, Del	Positivo
	9				No call, Del	Negativo
	13				Del, Del	Negativo
	22				Del, Del	Positivo
	23				No call, Del	Positivo
	29				Del, Del	Positivo
	31				Del, Del	Negativo
Exão 2 do gene <i>TCAP</i>	1	CM062010	Arg70Trp	gCGG-TGG	T, T	Positivo
	2	CM062010	Arg70Trp	gCGG-TGG	No call, CT	Positivo
	6	CM062009	Pro90Leu	CCG-CTG	No call, TC	Positivo
	7	CM062010	Arg70Trp	gCGG-TGG	CT, CT	Positivo
	8	CM043592	Arg153His	CGT-CAT	No call, A	Positivo
	16	CM062010	Arg70Trp	gCGG-TGG	No call, T	Positivo

¹⁶ HGMD (<http://www.hgmd.org/>)

Gene_Exão	Amostra	Código mutações ¹⁶	Alteração Tradução ¹⁶	Alteração nucleotídica ¹⁶	Resultado iPLEX <i>MassArray</i> (Call, Cluster Call)	Resultado de HRM
	17	CM062009	Pro90Leu	CCG-CTG	T, T	Positivo
	21	CM043591	Thr137Ile	ACA-ATA	No call, CT	Positivo
	23	CM043591	Thr137Ile	ACA-ATA	CT, CT	Positivo
	24	CM043592	Arg153His	CGT-CAT	No call, GA	Negativo
	28	CM062010	Arg70Trp	gCGG-TGG	No call, CT	Positivo
	29	CM062010	Arg70Trp	gCGG-TGG	No call, T	Positivo

Com a finalidade de confirmar as alterações identificadas como positivas ou como potencialmente positivas por iPLEX *MassArray* (algumas foram consideradas dúbias devido à baixa extensão da reacção de IPLEX), foi aplicada a técnica de HRM. Dada a sua elevada especificidade/sensibilidade na identificação de alterações permite a confirmação das amostras positivas e esclarecer situações de amostras dúbias, reduzindo desta forma a necessidade de sequenciação (Marques, 2011; Santos *et al.*, 2011).

Como é possível observar na tabela 3.2, a análise por iPLEX *MassArray* permitiu a identificação de mutações nos genes *CSRP3* e *TCAP* em vários doentes. Porém verifica-se uma taxa de resultados dúbios bastante elevada (cerca de 47,7%), sendo vários os casos em que o alelo apenas foi detectado após o *cluster call*, sendo a primeira análise dada como *No call*. Como foi explicado anteriormente o *cluster call* consiste na aplicação de um algoritmo de distribuição gaussiana de maneira a permitir a chamada de dados que se encontrem fora das regiões ideais. Estes casos podem ser explicados pelo facto de um alelo não ser detectado quando o seu sinal de amplificação é menor que o sinal do ruído de fundo devido à baixa eficiência da reacção de extensão. A eficiência da reacção de extensão pode ser baixa dependendo de erros técnicos, tais como baixa concentração de oligonucleótidos ou de DNA ou de erros inerentes à técnica, designadamente no caso de oligonucleótidos do mesmo *plex* interagirem ou competirem entre si (*Typer 4.0 User's Guide*).

Aliando a técnica de HRM à técnica de iPLEX *MassArray* foi possível confirmar 29 amostras alteradas (42 no total), 14 no exão 3 do *CSRP3*, 4 no exão 1 do *TCAP* e 11 no exão 2 do *TCAP*. Das 29 alterações confirmadas por HRM, foram sequenciadas 7 amostras, aguardando-se os resultados das restantes amostras. Após análise dos resultados da SA, as amostras 8, 23 e 29 não apresentam as alterações detectadas por iPLEX *MassArray* (Arg153His, Thr137Ile e Arg70Trp respectivamente) no exão 2 do gene *TCAP*, considerando-se então estes resultados como falsos positivos. Contudo, apresentaram a mesma alteração sinónima c.453 A>C, p.Ala151Ala. Esta alteração está registada como um polimorfismo (rs1053651), tendo o alelo A uma frequência de 0,34 em 1134 indivíduos testados (população em geral) (figura 3.4) (frequência retirada de NCBI em Setembro de 2011).

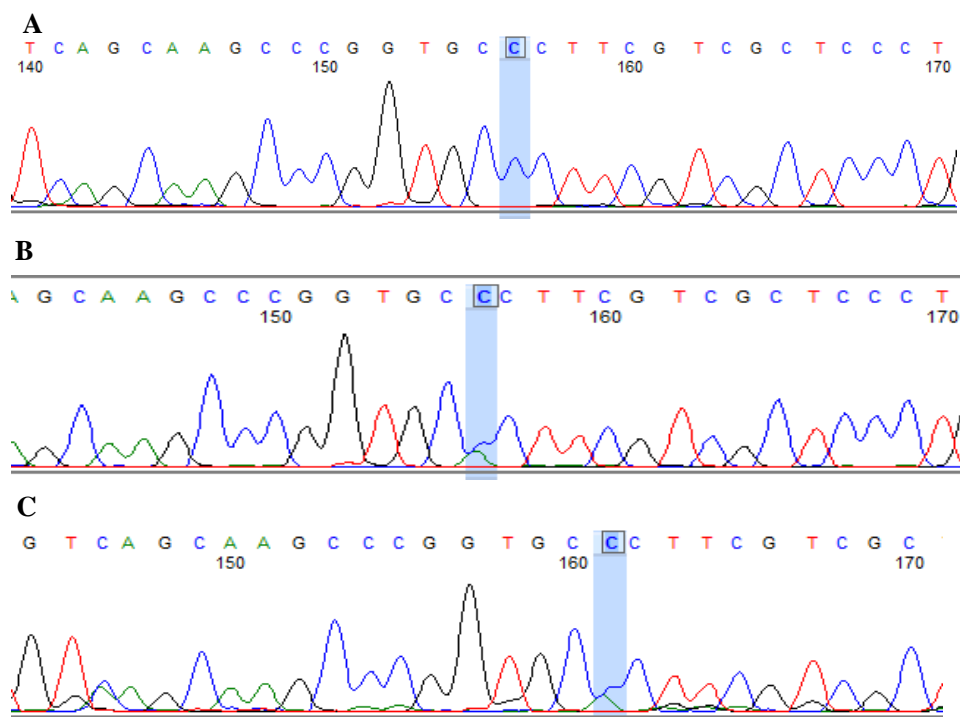


Figura 3.4 – Sequências do exão 2 do gene *TCAP* dos pacientes 8 (A), 23 (B) e 29 (C) com identificação da mutação sinómina c.453 A>C, p.Ala151Ala detectada por HRM em homozgotia para o doente 8 e em heterozgotia para os restantes dois doentes.

Relativamente às alterações c.208 C>T, p.Arg70Trp (CM062010), no exão 2 do gene *TCAP* do doente 16, e c.172 T>G, p.Cys58Gly (CM030828) no exão 3 do gene *CSRP3* do doente 20, também não foram detectadas por SA. Contudo, estas amostras deram perfis de desnaturação alterados para estes exões por HRM, sendo possível que as alterações se encontrem em regiões não abrangidas pelos oligonucleótidos usados na sequenciação. Existem assim vários resultados falsos positivos em *iPLEX MASSARRAY®*, sendo necessária a confirmação por SA das restantes alterações detectadas por esta técnica. De reforçar que os resultados falsos positivos apenas se verificam em casos em que a eficiência da reacção de extensão foi baixa para todas as amostras, sendo então um problema no desenho dos oligonucleótidos.

A mutação c.128 delC, p.Ala43Valfs165 (CD062135) no exão 3 do *CSRP3* foi confirmada por sequenciação nos doentes 30 e 32, pertencentes a famílias distintas (figura 3.4) (tabelas 3.1 e 3.2) (Santos *et al*, 2011).

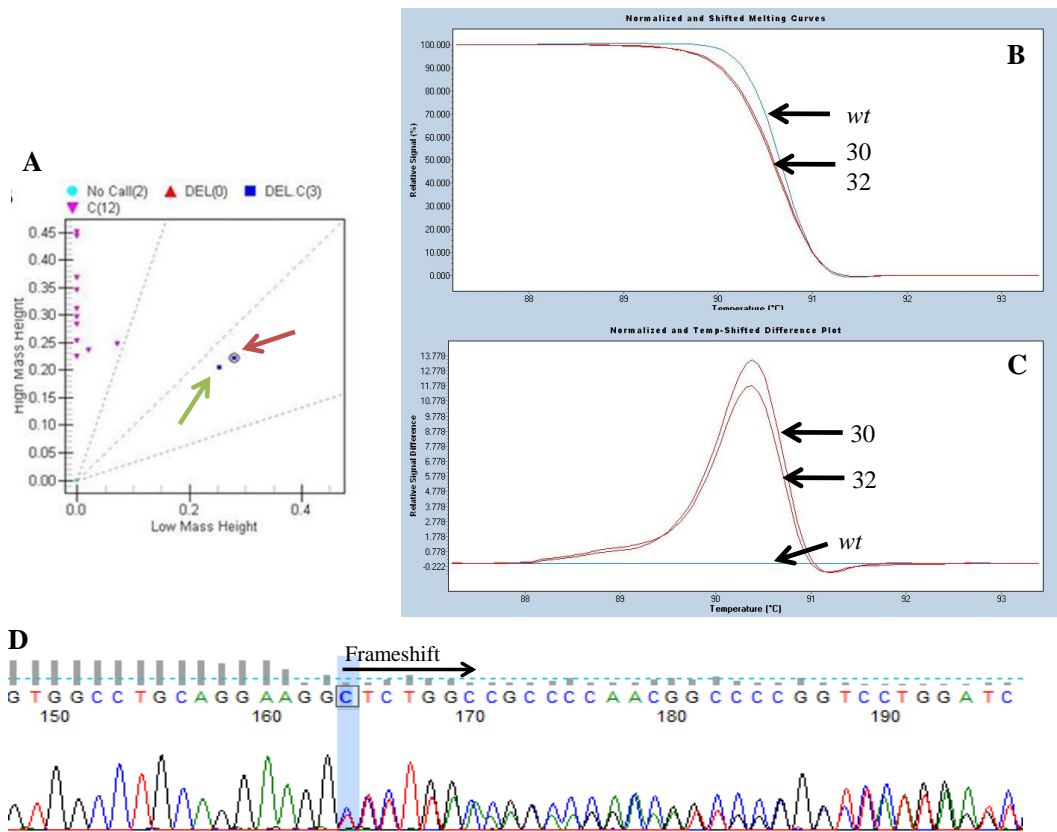


Figura 3.5 – Resultados de genotipagem por iPLEX *MassArray* (A) dos doentes 32 (seta vermelha) e 30 (seta verde). Perfil de HRM para o exão 3 do gene *CSRP3*. (B) Perfil de desnaturação. (C) Gráfico de diferenças relativas. Cromatograma com identificação da mutação c.128delC (D).

A mutação p.Ala43Valfs165 no *CSRP3* resulta na alteração da grelha de leitura (*frameshift*), tendo como consequência a alteração da sequência da proteína podendo ter consequências severas na sua função. A figura 3.5 representa o alinhamento entre a proteína no seu estado nativo e a proteína resultante da alteração p.Ala43Valfs165 (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular>).

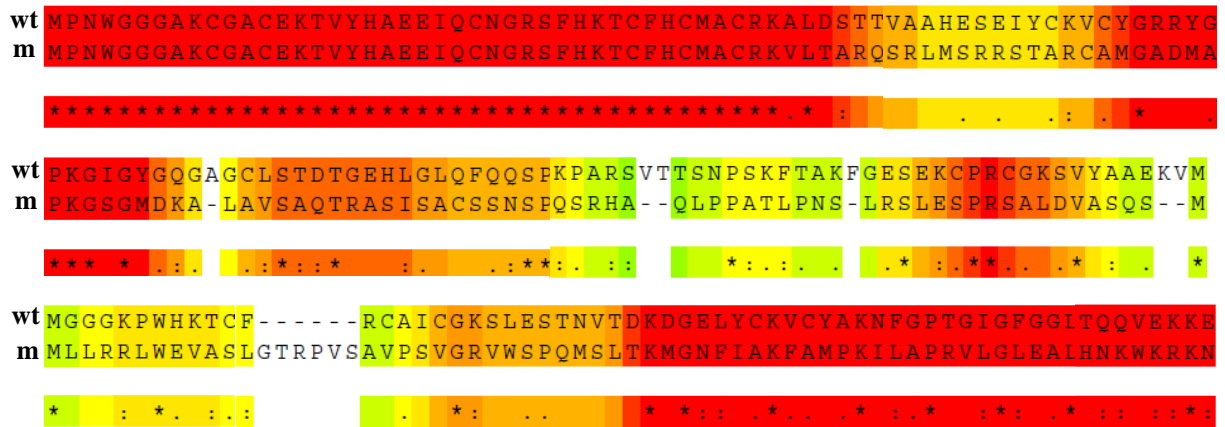


Figura 3.6 – Alinhamento da sequência da proteína LIM muscular na sua forma nativa (*wt*) e com a alteração p.Ala43Valfs165 (*m*) (<http://tcoffee.crg.cat/>). Os resíduos a vermelho são complementares ou apresentam características semelhantes ao invés dos resíduos a verde que são totalmente distintos.

A proteína alterada apresenta diferenças significativas na sua região central, relativamente à proteína nativa, havendo não só alterações de aminoácidos mas também das suas propriedades físico-químicas. Mais concretamente, verifica-se a alteração de aminoácidos envolvidos na coordenação dos iões zinco (C58, C61, C120, C123, H141, C144, C147, C150, C168 e C171) e também nos aminoácidos envolvidos nas interações hidrofóbicas entre os dedos de zinco (V49, I56, F145 e L166) (Schallus *et al*, 2009). Tais alterações deverão modificar a estrutura tridimensional da proteína e as suas funções já que os dedos de zinco são domínios com diversos papéis a nível molecular e celular (Laity *et al*, 2001). De facto, o doente 32 sofreu paragem cardíaca, podendo a função alterada da proteína LIM muscular ser uma potencial causa da morte súbita deste doente.

Outra mutação detectada no gene *CSRP3* foi a c.131 T>C, p.Leu44Pro (CM030827), nos doentes 1 e 33. Esta substituição foi detectada em heterozigotia por iPLEX *MassArray* (figuras 3.7A e 3.7B) nestes doentes. Por HRM foi detectada no doente 1 uma diferença de sinal relativa de -9,5 no exão 3 deste gene (figura 3.7D). No doente 33, a alteração foi detectada por HRM com uma diferença de sinal relativa de 18,8 (figura 3.7C).

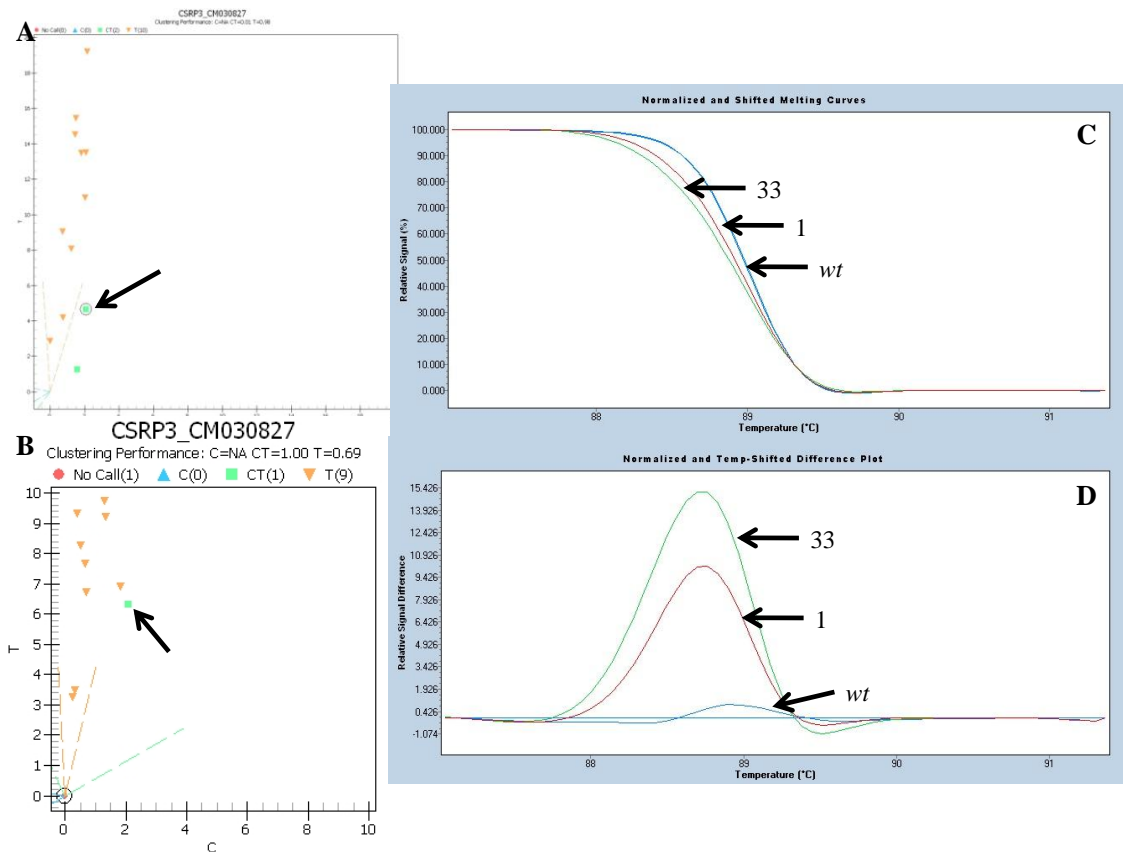


Figura 3.7 - Resultados de genotipagem por iPLEX *MassArray* do doente 1 (A) e o doente 33 (B). Análise do exão 3 do gene *CSRP3* por HRM. (C) Perfil de desnaturação de HRM. (D) Gráfico de diferenças relativas no ensaio de HRM. Encontram-se representados com setas os perfis das amostras usadas como controlos (Wt) (perfil a azul) e os perfis dos doentes 1 (vermelho) e 33 (verde).

Esta alteração poderá ter consequências graves na estrutura da proteína, uma vez que apesar de ambos os aminoácidos terem cadeias laterais alifáticas, a Prolina tem a cadeia lateral ligada covalentemente ao grupo amino (NH_2), formando assim uma estrutura com maior restrição conformacional (figura 3.8) (Berg *et al*, 2004). Recorreu-se à ferramenta *PolyPhen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) para prever o impacto das alterações aminoacídicas, analisadas nesta dissertação, na estrutura e função das proteínas (com aplicação do modelo HumVar). A escala de severidade tem valores compreendidos entre 0 e 1, sendo 1 o valor característico de uma substituição com danos severos para a proteína.

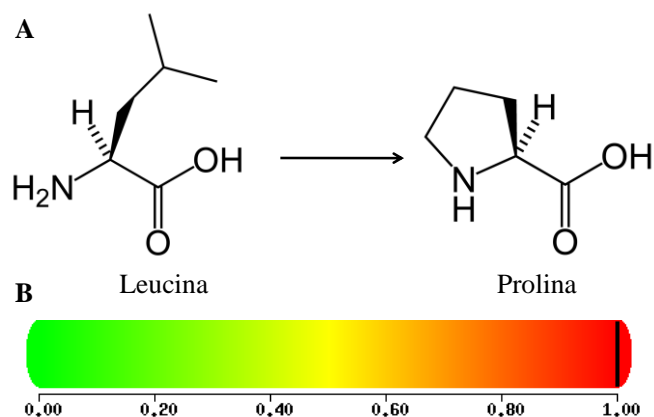


Figura 3.8 – (A) Estrutura molecular da leucina e da prolina. (B) Previsão da severidade da substituição Leu44Pro na estrutura da proteína LIM (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

De facto o doente 1 apresenta um fenótipo clínico bastante grave, tendo-lhe sido implantado um cardiodesfibrilhador após ter sofrido síncope cardíaca. Em 2006 tinha sido confirmada neste doente a alteração de uma C por uma A no intrão 27 do gene *MYBPC3* (ivs27+34) por SSCP e SA (Santos *et al.*, resultados submetidos para publicação cujo resumo se encontra no anexo 1). Esta alteração não coincidia no entanto, com o fenótipo grave que o doente apresentava, uma vez que se encontra numa zona intrónica bastante afastada da zona de *splicing*. Com a aplicação das técnicas de iPLEX *MassArray* e HRM foi possível identificar neste doente uma alteração no gene *CSRP3* com grau de severidade elevado em termos de alteração da estrutura proteica. No entanto permanecem por confirmar outras mutações noutros genes sarcoméricos, incluindo a alteração de *splicing* no gene *MYBPC3* (c.821+5 G>A) detectada por iPLEX *MassArray* e uma alteração no gene *TCAP* (c.208 C>T, p.Arg70Trp), para se poder determinar concretamente as relações entre o fenótipo e o genótipo neste doente.

A substituição c.208 C>T no exão 2 do gene *TCAP* com a consequente alteração da arginina (Arg) no codão 70 por triptofano (Trp) foi detectada por iPLEX *MassArray* nos doentes 1, 2, 7, 16, 28 e 29. Outra alteração detectada nesta região do gene *TCAP* foi a substituição c.269 C>T, com a correspondente alteração da prolina (Pro) no codão 90 por leucina (Leu) nos doente 6 e 17. Por HRM foram detectadas alterações nos doentes 1, 2, 7, 16, 28 e 29, 6 e 17. Apesar de estas substituições se localizarem em aminoácidos distintos na proteína, resultam do mesmo tipo de substituição nucleotídica no mesmo exão, tendo à partida perfis de HRM semelhantes (figura 3.9).

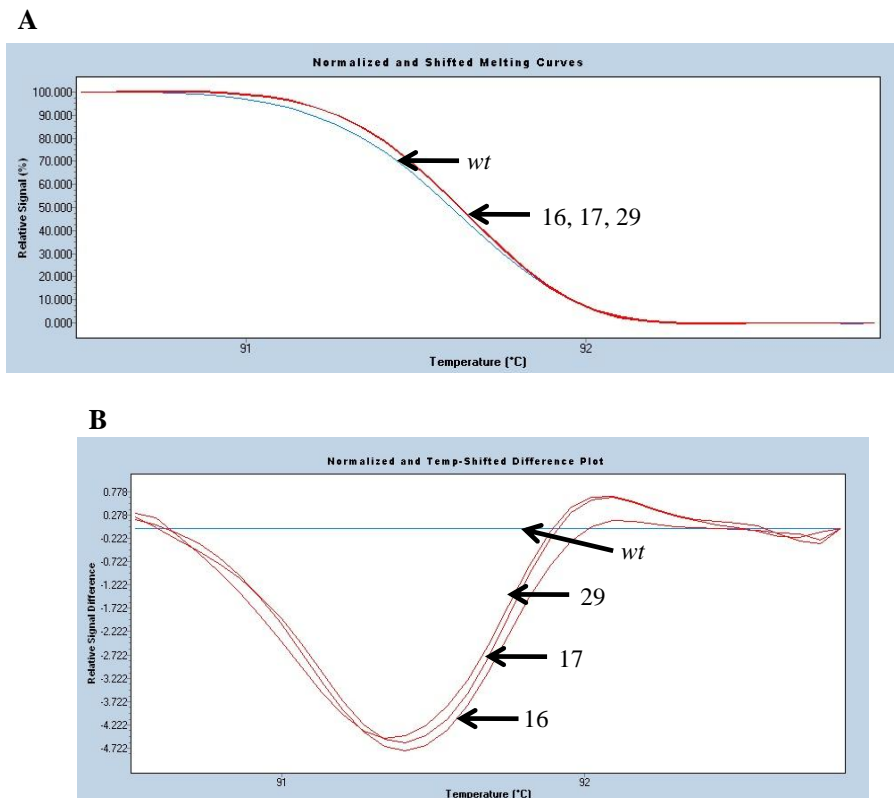


Figura 3.9 – Análise do exão 2 do gene *TCAP*. Curva de desnaturação (A) e curvas de diferenças relativas (B) dos doentes 16, 17 e 29.

Neste caso, uma passagem de um aminoácido com maior restrição conformacional, a Pro, para um aminoácido com uma estrutura menos restrigente, a Leu, poderá causar alterações consideráveis na estrutura da telenonina. Já a substituição de Arg por Trp, substituição esta igualmente severa para a estrutura da proteína (previsão da severidade da alteração feita pelo programa *PolyPhen*), leva à alteração de um ambiente hidrofílico para um ambiente hidrofóbico (figura 3.10).

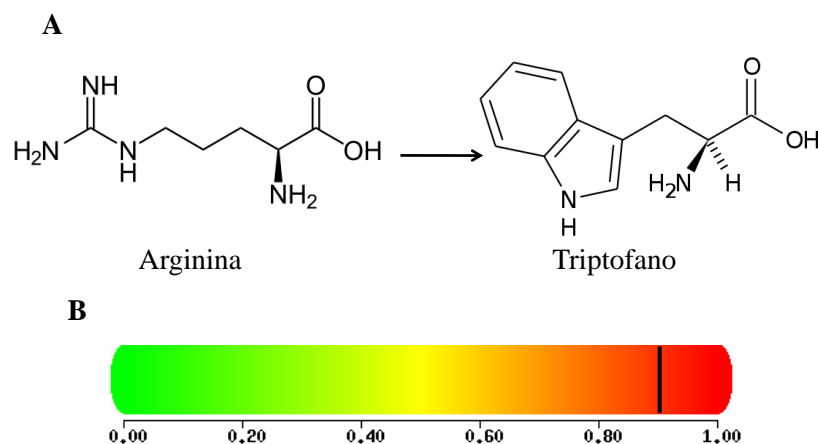


Figura 3.10 - (A) Estrutura molecular dos aminoácidos arginina e triptofano. (B) Previsão da severidade do dano da substituição Arg70Trp na estrutura da telenonina (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Uma das alterações no gene *CSRP3* com maior taxa de detecção por iPLEX MASSARRAY® no conjunto de doentes em estudo foi a substituição c.172 T>G, com substituição na proteína da cisteína (Cys) 58 por uma glicina (Gly) no primeiro domínio LIM. Esta alteração foi detectada em 16 doentes, 14 deles em heterozigotia e 2 em homozigotia. Relativamente ao HRM, até à data de realização deste relatório foi confirmada a alteração de perfil em 8 doentes (10, 11, 12, 14, 18, 19, 24 e 26) e em 3 dos doentes não foram detectadas alterações de perfil (13, 15 e 27). Dos doentes que não apresentam resultados de HRM, ou não houve amplificação na reacção ou o Cp foi superior a 30 ciclos, sendo assim impossível a análise destes doentes.

Embora esta alteração esteja descrita como um SNP (rs104894204), foi previamente associada a MH, em quatro membros de uma família germânica sem mutações noutros genes causais (Geier *et al*, 2003 e 2008). Dos 8 doentes portugueses, em 3 doentes (11, 18 e 24) não foram detectadas alterações adicionais nos genes sarcoméricos por iPLEX MASSARRAY® ou por HRM e num doente (10) foi confirmada por SA uma mutação no gene *TNNI3* (c.607 G>A, p.Gly203Ser) detectada por iPLEX MASSARRAY®. De 61 doentes analisados, 8 apresentam esta alteração estando portanto presente em 7,38% (9 alelos mutados em 122 cromossomas) da população estudada, podendo-se então tratar de um SNP nesta população. De realçar que para esta tese foi seleccionada uma população de doentes com MHO e se de facto esta alteração estiver associada a um fenótipo de obstrução cardíaca, poderá ser considerada um SNP associado a MHO na população portuguesa. De facto a análise de 100 cromossomas de indivíduos saudáveis, sem a presença desta alteração, comprova que esta alteração possa estar em associação com a MHO na população portuguesa.

Também de notar que estes doentes apresentam fenótipo grave de MHO. Relativamente ao doente 26, apesar de não estar disponível informação clínica de fenótipo obstrutivo, foi igualmente sujeito a miectomia, apresentando assim fenótipo grave. Assim será possível que esta alteração esteja associada a fenótipos graves de MHO, já que também um dos doentes germânicos foi sujeito a miectomia devido a obstrução do fluxo de saída e outro apresentava obstrução moderada. Neste contexto, o *software PolyPhen* prevê esta alteração como potencialmente severa para a estrutura da proteína, uma vez que a Cys apresenta um grupo tiol (SH) como grupo lateral, o que permite a formação de pontes dissulfureto. A substituição por uma Gly poderá levar a alterações na estrutura tridimensional da proteína por quebra de pontes dissulfureto (figura 3.11) (Berg *et al*, 2004). De facto, estudos funcionais indicam que a proteína com a mutação p.Cys58Gly é menos estável do que a proteína normal (Geier *et al*, 2008).

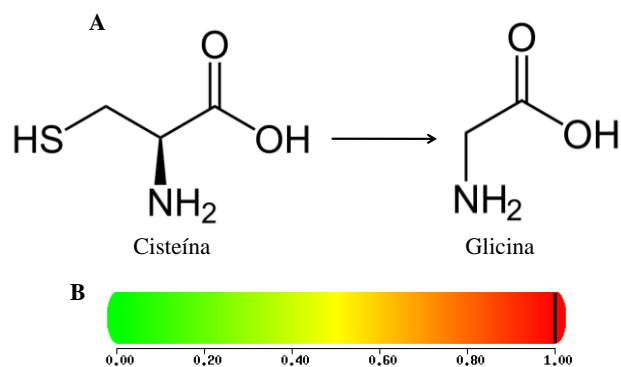


Figura 3.11 - (A) Estrutura molecular dos aminoácidos cisteína e glicina. (B) Previsão da severidade da substituição Cys58Gly na estrutura da proteína LIM (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Relativamente ao gene *TCAP*, foi detectada a deleção do triplete GAG (nucleótidos 34-36) com consequente perda do aminoácido glutamato (Glu) no codão 12 do exão 1 em 7 doentes, apresentando no entanto a maioria das amostras uma extensão por iPLEX *MASSARRAY*® bastante baixa. De forma a confirmar-se ou não a veracidade deste resultado de iPLEX *MASSARRAY*®, procedeu-se à análise por HRM do exão 1 do gene *TCAP*. Foram encontradas diferenças de perfil em 4 das 7 amostras (4, 22, 23 e 29) e nas restantes 3 amostras (9, 13 e 31) não foram encontradas quaisquer alterações neste exão. Uma vez que a alteração detectada apresenta uma frequência superior a 1% (5,74% alelos alterados em 122 cromossomas), poderá tratar-se de um polimorfismo da população (uma vez que foram detectadas mutações noutros genes nestes indivíduos), devendo tal facto ser confirmado através do estudo de 50 amostras (100 cromossomas) de DNA saudáveis.

Na figura 3.10C podemos verificar a diferença das curvas de desnaturação, respeitante à análise do exão 1 do gene *TCAP* dos indivíduos 22 e 29, comparativamente a indivíduos controlo (sem mutação). Como foi explicado na secção 1.3.2., as curvas de desnaturação serão diferentes conforme se trate de um indivíduo homozigótico ou heterozigótico. Os indivíduos homozigóticos apresentam uma curva de desnaturação com temperatura de desnaturação mais elevada, o que se reflecte numa curva mais alargada relativamente à curva dos indivíduos controlo, uma vez que a diminuição da fluorescência será mais demorada. Contrariamente ao que foi detectado em iPLEX *MassArray* (figura 3.12A e 3.12B), ambos os indivíduos 22 e 29 são homozigóticos, de acordo com o perfil obtido por HRM. Aguarda-se o resultado de sequenciação de forma a confirmar estes resultados.

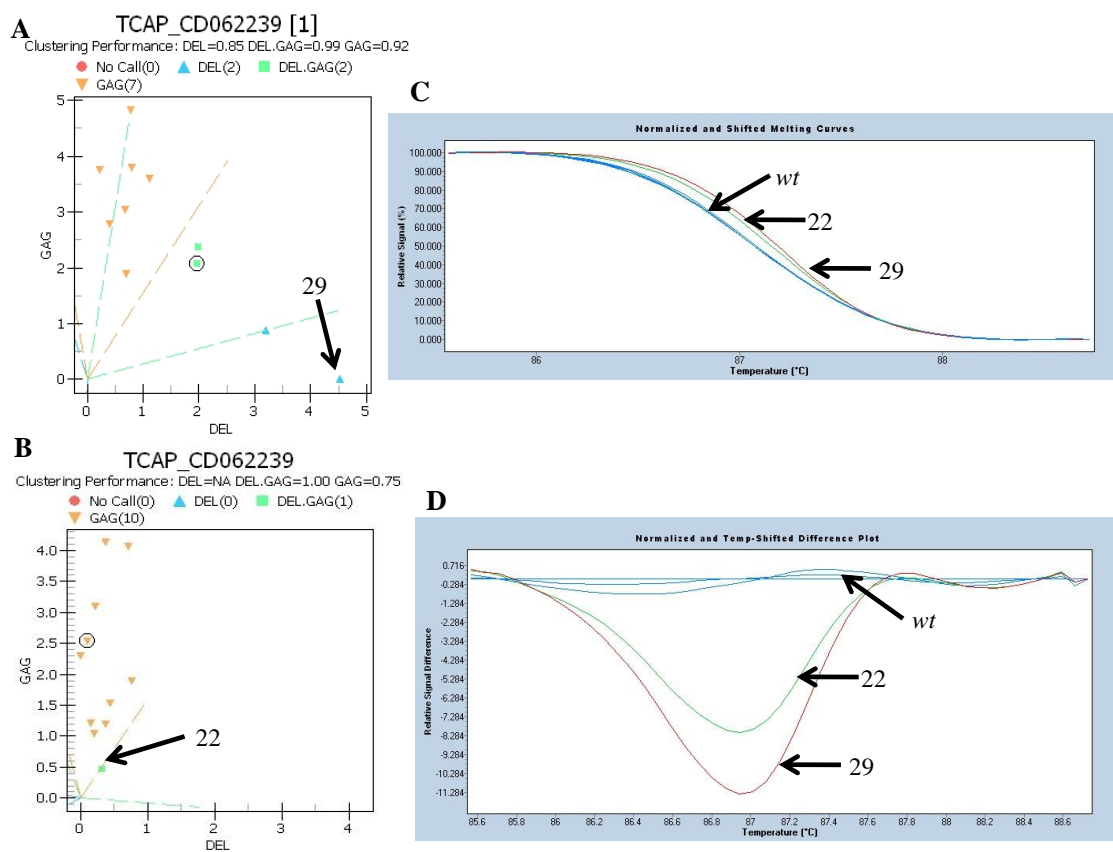


Figura 3.12 - Resultados de genotipagem por iPLEX MASSARRAY® dos doentes 29 (A) e 22 (B). Curvas de desnaturação (C) e curvas de diferenças relativas (D) dos doentes 22 (verde) e 29 (vermelho). As curvas azuis correspondem a amostras sem alterações (*wt*) para o exão 1 do gene *TCAP*.

Para além das mutações detectadas por iPLEX MASSARRAY® nos genes *CSRP3* ou *TCAP*, estes doentes apresentam também possíveis alterações noutros genes, incluindo os genes sarcoméricos, tendo algumas sido confirmadas por sequenciação (tabela 3.3).

Numa primeira análise não se consegue inferir nenhuma relação entre as mutações detectadas nos genes *CSRP3* e *TCAP* e outros genes envolvidos em MH. Aparentemente as mutações nestes dois genes não aparecem isoladas, tendo sido detectadas mutações noutros genes. Tal facto poderá reforçar a hipótese da existência de mutações compostas, inclusivamente envolvendo genes não sarcoméricos, sendo importante o estudo de tais genes para um diagnóstico preciso de MH.

Apesar da amostra reduzida (61 doentes) e do baixo número de mutações confirmadas por SA até agora (aproximadamente 18,4%), é possível verificar que destas mutações confirmadas (tabela 3.4), são mais frequentes as mutações no gene *MYBPC3*, tal como se verifica na maioria das populações. As percentagens de mutações são mais baixas do que seria de esperar, uma vez que a maior parte das mutações detectadas por iPLEX *MassArray* e HRM permanecem por confirmar por SA. Os genes *TNNT2*, *TNNI3* e *CSRP3* apresentam percentagens relativamente mais elevadas, apresentando o gene *TNNT2* uma percentagem próxima do gene *MYBPC3*. Embora pareça haver uma tendência para percentagens diferentes de outras populações já estudadas, a posterior confirmação de

outras mutações e a análise de doentes adicionais, incluindo indivíduos saudáveis, irá permitir obter percentagens de mutações mais fidedignas, devido ao aumento da amostragem.

Tabela 3.3 – Genotipagem por iPLEX MASSARRAY®, HRM e/ou SA dos doentes em estudo, incluindo os doentes do estudo de PCR em tempo real (excluindo os doentes: com resultados falsos positivos - 3, 9, 13, 25 e 31; sem mutações detectadas por iPLEX MASSARRAY® - 41, 42, 46, 58 e 108; e não genotipados - 50 e 53). Alguns destes resultados estão presentes no artigo cujo resumo se apresenta no anexo 1.

Amostra	Gene	Código da mutação	Alteração nucleotídica (alteração proteica)	Método de detecção
1	<i>MYBPC3</i>	NOVA ALTERAÇÃO	c.3187+36 C>A	HRM, SA
		CS971814	c.821+5 G>A	iPLEX
	<i>CSRP3</i>	CM030827	c.131 T>C (p.Leu44Pro)	iPLEX, HRM
	<i>TCAP</i>	CM062010	c.208 C>T (p.Arg70Trp)	iPLEX, HRM
2	<i>MYH7</i>	CM042418	c.2761 G>A (p.Glu921Lys)	iPLEX, HRM
	<i>TCAP</i>	CM062010	c.208 C>T (p.Arg70Trp)	iPLEX, HRM
4	<i>MYH7</i>	CM920491	c.1750 G>A (p.Gly584Arg)	HRM, iPLEX
	<i>TNNT2</i>	NOVA MUTAÇÃO	c.801+11 A>G	HRM, SA
	<i>TCAP</i>	CD062239	c.34 delGAG (p.Glu12del)	iPLEX, HRM
5	<i>CSRP3</i>	CM061693	c.190 G>T (Arg64Cys)	iPLEX, HRM
6	<i>MYH7</i>	NOVA ALTERAÇÃO	c.1408-35 T>C	HRM, SA
		CM952164	c.2788 G>A (p.Glu930Lys)	iPLEX
	<i>TNNI3</i>	NOVA MUTAÇÃO	c.462 G>A (p.Met155Ile)	SA
	<i>TNNT2</i>	NOVA ALTERAÇÃO	c.843-35 T>C	SA
	<i>TCAP</i>	CM062009	c.269 C>T (p.Pro90Leu)	iPLEX, HRM
7	<i>MYBPC3</i>	CD043684	c.1638 delGT (p.Val546fs)	iPLEX
	<i>MYH7</i>	NOVA ALTERAÇÃO	c.1408-35 T>C	HRM, SA
		CM068019	c.5305 C>A (p.Leu1769Met)	iPLEX
	<i>TNNI3</i>	CM031378	c.422 G>A (p.Arg141Gln)	iPLEX, SA
	<i>TNNT2</i>	NOVA ALTERAÇÃO	c.843-35 T>C	SA
<i>TCAP</i>	CM062010	c.208 C>T (p.Arg70Trp)	iPLEX, HRM	
8	<i>MYH7</i>	CM010347	c.2630 T>A (p.Met877Lys)	iPLEX, HRM
		HM0650	c.2168 G>A (p.Arg723His)	iPLEX
	<i>MYBPC3</i>	CS021760	c.1221-10 G>A	iPLEX
	<i>TCAP</i>	CM043592	c.458 G>A (p.Arg153His)	iPLEX
10	<i>MYH7</i>	CM011799	c.2183 C>T (p.Ala728Val)	iPLEX
		CM952025	c.2609G>A (p.Arg780His)	iPLEX, HRM
	<i>TNNI3</i>	CM971499	c.607 G>A (p.Gly203Ser)	iPLEX, SA
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM
11	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM
12	<i>MYBPC3</i>	CS021760	c.1221-10 G>A	iPLEX
	<i>SLC25A4</i>	CM054113	c.368 C>A (p.Ala123Asp)	iPLEX
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM

Amostra	Gene	Código da mutação	Alteração nucleotídica (alteração proteica)	Método de detecção
	<i>TNNT2</i>	CM031384	c.833 A>T (p.Asn278Ile)	iPLEX
14	<i>MYH7</i>	CM068019	c.5305 C>A (p.Leu1769Met)	iPLEX
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX
15	<i>MYH7</i>	CM050711	c.4423 C>T (p.Arg1475Cys)	iPLEX
	<i>TNNT2</i>	CD044989	c.53-11 delCTTCT	iPLEX
	<i>TNNI3</i>	CM973090	c.484 C>T (p.Arg162Trp)	iPLEX
16	<i>TCAP</i>	CM062010	c.208 C>T (p.Arg70Trp)	iPLEX, HRM
17	<i>TCAP</i>	CM062009	c.269 C>T (p.Pro90Leu)	iPLEX, HRM
18	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM
19	<i>MYH7</i>	CM050712	c.4472 C>G (p.Ser1491Cys)	iPLEX
		CM054005	c.438 G>T (Lys146Asn)	iPLEX
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM
20	<i>MYH7</i>	CM010347	c.2630 T>A (p.Met877Lys)	iPLEX
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM
21	<i>MYH7</i>	CM941086	c.2155 C>T (p.Arg719Trp)	iPLEX, HRM
		HM0650	c.2168 G>A (p.Arg723His)	iPLEX
	<i>PRKAG2</i>	CM066971	c.1516 G>A (p.Glu506Lys)	iPLEX
	<i>TCAP</i>	CM043591	c.410 C>T (p.Thr137Ile)	iPLEX, HRM
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX
22	<i>MYH7</i>	CM920491	c.1750 G>A (p.Gly584Arg)	iPLEX
	<i>TCAP</i>	CD062239	c.34 delGAG (p.Glu12del)	iPLEX, HRM
23	<i>TCAP</i>	CD062239	c.34 delGAG (p.Glu12del)	iPLEX, HRM
	<i>TNNT2</i>	CM951221	c.753 G>T (p.Glu251Asp)	iPLEX
	<i>MYH7</i>	CM930506	c.2333 A>G (p.Asp778Gly)	iPLEX
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX
24	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM
26	<i>MYH7</i>	CM034552	c.983 A>G (p.Glu328Gly)	iPLEX
		CM054010	c.2093 T>C (p.Val698Ala)	iPLEX
		CM031276	c.2334 C>G (p.Asp778Glu)	iPLEX
		CM050711	c.4423 C>T (p.Arg1475Cys)	iPLEX
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX, HRM
28	<i>TCAP</i>	CM062010	c.208 C>T (p.Arg70Trp)	iPLEX, HRM
29	<i>MYBPC3</i>	CM020156	c.1270 C>T (Gln424term)	iPLEX, HRM
	<i>MYH7</i>	CM992933	c.1495 G>A (p.Glu499Lys)	iPLEX
	<i>TNNI3</i>	CM031379	c.470 C>T (p.Ala157Val)	iPLEX, HRM
	<i>TCAP</i>	CD062239	c.34 delGAG (p.Glu12del)	iPLEX, HRM
		CM062010	c.208 C>T (p.Arg70Trp)	iPLEX, HRM
30	<i>MYBPC3</i>	NOVA MUTAÇÃO	c.2411-2 A>T	HRM, SA
	<i>TNNT2</i>	NOVA MUTAÇÃO	c.722 A>T (p.Lys241Met)	HRM, SA
	<i>TNNI3</i>	NOVA MUTAÇÃO	c.-52 A>T	HRM, SA
	<i>CSRP3</i>	CD062135	c.128 delC (p.Ala43fs)	iPLEX, HRM, SA
32	<i>CSRP3</i>	CD062135	c.128 delC (p.Ala43fs)	iPLEX, HRM, SA
	<i>MYBPC3</i>	CM043545	c.2538 C>G (p.Tyr846term)	iPLEX, HRM

Amostra	Gene	Código da mutação	Alteração nucleotídica (alteração proteica)	Método de detecção	
		CM031263	c.3577 G>A (p.Ala1193Thr)	iPLEX, HRM	
33	<i>CSRP3</i>	CM030827	c.131 T>C (p.Leu44Pro)	iPLEX, HRM	
	<i>MYBPC3</i>	NOVA ALTERAÇÃO	c.851+95 C>G	HRM, SA	
		NOVA MUTAÇÃO	c.3581 G>T (p.Gly1195Val)	HRM, SA	
43	<i>MYH7</i>	CM031270	c.1328 T>C (p.Ile443Thr)	iPLEX	
47	<i>MYH7</i>	CM032602	c.1231 G>A (p.Val411Ile)	iPLEX, HRM	
	<i>CSRP3</i>			HRM	
49	<i>MYBPC3</i>	CM971007	c.1621 G>C (p.Glu541Gln)	iPLEX	
54	<i>TNNI3</i>	CM034580	c.609 C>T (p.Arg203Cys)	iPLEX	
	<i>TCAP</i>	CM043591	c.410 C>T (p.Thr137Ile)	iPLEX	
	<i>MYH7</i>		CM042410	c.1318 G>A (p.Val440Met)	iPLEX
			CM031276	c.2334 C>G (p.Asp778Glu)	iPLEX
			CM068019	c.5305 C>A (p.Leu1769Met)	iPLEX
	<i>MYBPC3</i>	CM054002	c.2234 A>G (p.Asp744Gly)	iPLEX	
56	<i>TNNT2</i>	NOVA ALTERAÇÃO	c.802-33 C>T	HRM, SA	
	<i>MYH7</i>	CM042417	c.2707 G>A (p.Glu903Lys)	iPLEX	
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX	
59	<i>TNNT2</i>	CD044989	c.53-11 delCTTCT	iPLEX	
62	<i>TNNI3</i>	CM973090	c.484 C>T (p.Arg162Trp)	iPLEX	
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX	
79	<i>TNNT2</i>	CM951221	c.753 G>T (p.Glu251Asp)	iPLEX, HRM, SA	
	<i>CSRP3</i>	CM030828	c.172 T>G (p.Cys58Gly)	iPLEX	
92	<i>MYBPC3</i>	CM992932	c.2693G>A (p.Val896Met)	iPLEX, HRM, SA	
93	<i>MYH7</i>	CM920494	c.2770G>A (p.Glu924Lys)	iPLEX, HRM, SA	
94	<i>MYH7</i>	CM050712	c.4472C>G (p.Ser1491Cys)	iPLEX, HRM, SA	
95	<i>MYBPC3</i>	CM032959	c.2824C>T (p.Arg943ter)	iPLEX, HRM, SA	
96	<i>MYBPC3</i>	CM032959	c.2824C>T (p.Arg943ter)	iPLEX, HRM, SA	
98	<i>TNNT2</i>	CM034583	c.779A>G (p.Lys260Arg)	iPLEX, HRM, SA	
100	<i>MYBPC3</i>	CM981329	c.788T>C (p.Ile263Thr)	iPLEX, HRM, SA	
101	<i>MYBPC3</i>	DB04	c.1727G>A (p.Trp576ter)	iPLEX, HRM, SA	
102	<i>MYBPC3</i>	CM032959	c.2824C>T (p.Arg943ter)	iPLEX, HRM, SA	
103	<i>TNNT2</i>	CM031384	c.833A>T (p.Asn278Ile)	iPLEX, HRM, SA	
104	<i>MYBPC3</i>	CM992932	c.2683G>A (p.Val895Met)	iPLEX, HRM, SA	
105	<i>MYH7</i>	CM033923	c.958G>A (p.Val320Met)	iPLEX, HRM, SA	
106	<i>TNNT2</i>	CM034583	c.779A>G (p.Lys260Arg)	iPLEX, HRM, SA	
107	<i>MYH7</i>	CM981329	c.788T>C (p.Ile263Thr)	iPLEX, HRM, SA	

Tabela 3.4 – Número de mutações detectadas nos doentes em estudo por gene e percentagens de MH causada por mutações em cada um dos genes.

Gene	Nº de mutações detectadas	Nº de mutações confirmadas (SA)	% MH causada por mutações no gene
<i>MYH7</i>	39	6	9,83
<i>MYBPC3</i>	21	11	18,03
<i>CSRP3</i>	20	2	3,28
<i>TNNT2</i>	19	9	14,75
<i>TCAP</i>	15	-	-
<i>TNNI3</i>	12	4	6,56
<i>SLC25A4</i>	1	-	-
<i>PRKAG2</i>	1	-	-

A eficácia da detecção de mutações pela metodologia de iPLEX MASSARRAY® depende de vários pontos críticos dos quais se salienta: (i) o desenho dos oligonucleótidos necessários para amplificar e detectar as 541 mutações (cerca de 1600 oligonucleótidos); (ii) a concentração correcta desses mesmos oligonucleótidos nas reacções de amplificação e de extensão (o facto das misturas de amplificação e de extensão terem sido todas pipetadas sem auxílio de um *robot* aumentam assim a probabilidade de erros humanos), e (iii) a qualidade do DNA utilizado.

O elevado número de falsos positivos neste trabalho deveu-se sobretudo a situações de baixa eficiência das reacções de extensão por: (a) má pipetagem (quer ao nível dos oligonucleótidos ou do próprio DNA), ou (b) má qualidade do próprio DNA, ou (c) mau desenho dos oligonucleótidos. No entanto, esta técnica tem bastante potencial como técnica de diagnóstico, especialmente no caso de uma doença como MH, em que se verifica um elevado número de mutações associadas, sendo que se pode analisar em simultâneo um elevado número de mutações num determinado conjunto de doentes. Dado o impacto clínico no diagnóstico de MH que o *chip* em análise neste trabalho possa vir a trazer, terá de ser aperfeiçoado de forma a eliminar todos os resultados dúbios ou de *no calls*. As últimas alterações ao *chip*, designadamente a passagem de determinados conjuntos de oligonucleótidos para os *plexes* 22 a 35, permitiu igualmente inferir que, os resultados dados como *no call* se deviam a problemas com o desenho dos oligonucleótidos. Este dado foi inferido pelo facto dos resultados continuarem a ser de *no call* após se terem colocado esses oligonucleótidos isolados ou em *plexes* contendo apenas 2 ou 3 conjuntos de oligonucleótidos. Desta forma os oligonucleótidos contidos nestes *plexes* terão de ser redesenhados. Estas alterações estão em curso, assim como a adição de novas mutações ainda não incluídas no *chip*, que foram identificadas pelo nosso grupo (13 mutações novas apenas nos doentes apresentados nesta dissertação e no artigo no anexo 1) ou que foram sendo adicionadas às bases de dados (HGMD profissional).

Em 2010, Brion e colaboradores publicaram um trabalho em que estudam, com recurso à técnica de iPLEX MASSARRAY®, a presença de mutações associadas a MH numa família italiana

(Brion *et al*, 2010). Fizeram a análise de 658 mutações em 16 genes: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC*, *TTN*, *MYH6*, *TNNC1*, *PRKAG2*, *TCAP*, *GLA*, *MYO6* e *MYLK2*. Como foi mencionado anteriormente, apesar do *chip* desenhado por Santos e colaboradores (2011) conter de momento 541 mutações, está a ser implementado de momento um *chip* com 900 mutações em 33 genes (Santos *et al*, 2011). Assim, o *chip* desenhado por este grupo de investigação abrangerá um maior número de mutações que o do grupo de Brion *et al* (2010), sendo também incluído o gene *CSRP3*, não analisado no *chip* daqueles autores nem pelos métodos de diagnóstico genético correntes. Além disso, aliando a técnica de iPLEX MASSARRAY® à de HRM é possível a detecção de um elevado número de mutações em vários doentes em simultâneo e a identificação de novas mutações associadas a MH (por HRM), que serão incluídas posteriormente no *chip*, como se pode verificar na tabela 3.3.

3.2. Análise transcritômica

Relativamente à análise de transcritômica por PCR em tempo real foi realizado um ensaio *multiplex* com (i) uma sonda para detecção do nível de expressão do gene alvo, *CSRP3*, e (ii) uma sonda para detecção da expressão constitutiva do gene de controlo endógeno *rRNA 18S*, em três tipos de tecidos musculares: septo interventricular (V), apêndice auricular direito (A) e músculo esquelético (E). Os ensaios foram realizados em triplicado numa placa de 96 poços. O nível de expressão basal para aqueles dois genes, foi determinado a partir de amostras de cDNA sintetizadas a partir de RNA comercial extraído dos mesmos três tipos de tecidos musculares de um indivíduo saudável (CS).

Dado que nos dois primeiros ensaios *multiplex* não foi possível detectar a expressão do gene *rRNA 18S* e que a expressão do gene *CSRP3* não era concordante para uma mesma amostra em diferentes ensaios, equacionou-se a hipótese de as sondas ou os oligonucleótidos de amplificação poderem estar a competir entre si. Uma vez que quer os oligonucleótidos quer a sonda utilizados para detectar o nível de expressão do gene *rRNA 18S* são comerciais, não estando a sua sequência disponível a acesso público, realizou-se o alinhamento (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) da sequência de cDNA do gene *rRNA18S* com a sequência da sonda e dos oligonucleótidos desenhados especificamente para o cDNA do gene *CSRP3*, para verificar se existiriam zonas de homologia.

De facto, dependendo da zona da sequência onde se localiza a sonda e oligonucleótidos para a detecção da expressão do gene *rRNA18S* poderá ocorrer hibridação parcial sendo a complementaridade para a sonda de 13,63% e para os oligonucleótidos *forward* e *reverse* 9,09% (figura 3.13). Por este motivo, os ensaios posteriores foram realizados para cada um dos transcritos em separado, tendo nestas condições, sido detectado níveis de expressão para qualquer um dos genes.

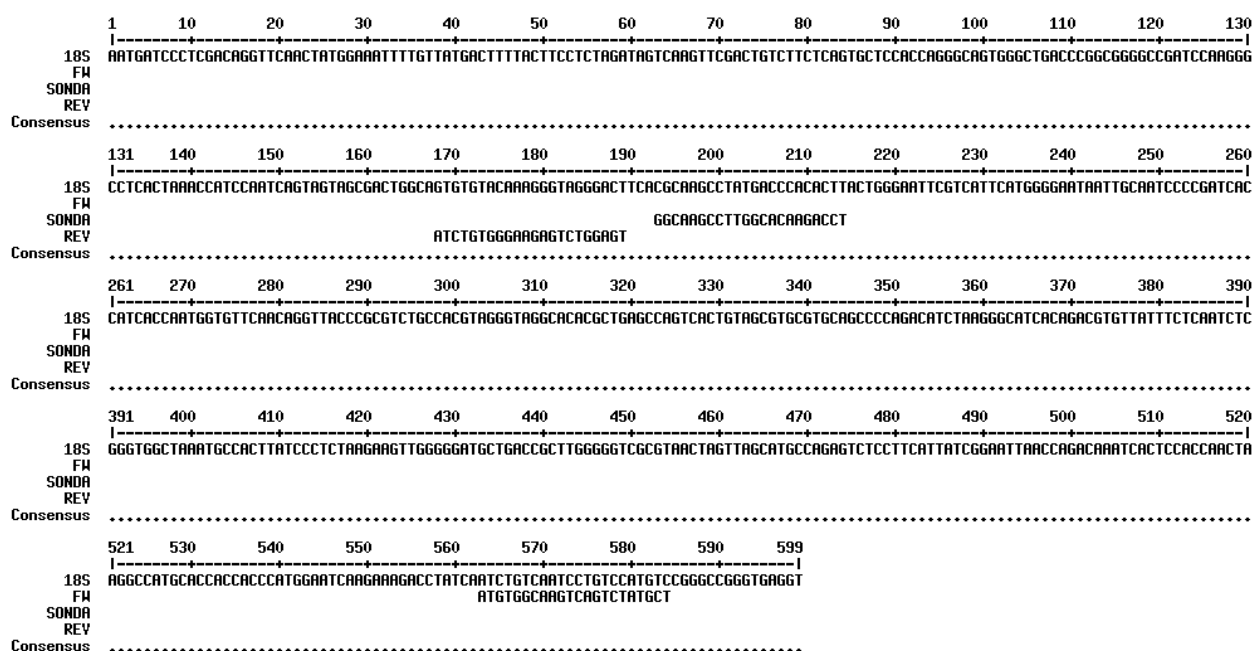


Figura 3.13 - Alinhamento entre a sequência de cDNA do gene *rRNA18S*, as sequências dos oligonucleótidos (sequência *forward* e sequência complementar ao *reverse*) e a sonda desenhados para detecção dos níveis de expressão do gene *CSRP3*.

A partir dos valores de *crossing point* (Cp), calculados pelo *software LightCycler 480® Software versão 1.5.0.39 SP3* da *Roche Diagnostics*, calcularam-se os valores das médias (\bar{x}), dos desvios padrão (σ), dos ΔCps (diferença dos valores de Cp do gene alvo e o gene de controlo endógeno) e os valores das razões de expressão relativa ($2^{\Delta Cp}$) (Tabela 3.5). Uma vez que os ensaios foram realizados em triplicado, nos casos em que o desvio padrão era superior a 0,35 foi excluído o valor de Cp mais discrepante relativamente aos restantes (optimização determinada pelo nosso grupo de investigação). Nos casos em que mesmo excluindo um dos valores o desvio padrão dava superior a 0,35 os ensaios foram repetidos.

Tabela 3.5 – Resultados das reacções de PCR em tempo real. Valor das médias dos Cps relativamente aos genes *CSRP3* e *rRNA18S* (Cp) e respectivos desvios padrão (σ). Diferença entre Cp do gene alvo e do gene de controlo endógeno (ΔCp) e respectivos desvios padrão (σ médio ΔCp). Razões de expressão relativa de expressão do gene *CSRP3* ($2^{\Delta Cp}$) e erro associado. As células sublinhadas a cinzento indicam os casos em que teve de ser excluído um dos valores de Cp. Resultados de iPLEX *MASSARRAY®* e HRM para o gene *CSRP3*. As amostras positivas apresentam alteração em HRM. A amostra CS corresponde ao controlo saudável. V – septo interventricular; A – apêndice auricular direito; E – músculo esquelético. nd – não determinado.

Amostra	Cp <i>CSRP3</i>	σ	Cp 18S	σ	ΔCp	σ médio ΔCp	$2^{\Delta Cp}$	Erro associado	Resultado iPLEX <i>MassArray</i>	Resultado HRM
CSV	24,93	0,29	25,10	0,06	-0,17	0,35	0,89	0,31	nd	
CSA	26,21	0,09	24,80	0,01	1,41	0,10	2,66	0,27		
CSE	29,72	0,02	26,6	0,07	3,12	0,09	8,69	0,78		
10V	32,69	0,27	31,62	0,04	1,07	0,31	2,10	0,65	Proteína LIM p.Cys58Gly No	Positivo
10A	32,71	0,18	30,14	0,30	2,57	0,48	5,94	2,85		

Amostra	Cp <i>CSRP3</i>	σ	Cp 18S	σ	Δ Cp	σ médio Δ Cp	2^{Δ Cp}	Erro associado	Resultado iPLEX <i>MassArray</i>	Resultado HRM
10E	32,03	0,05	28,13	0,04	3,90	0,09	14,93	1,34	call, GT	
12V	32,61	0,04	27,09	0,23	5,52	0,27	45,89	12,39	Proteína LIM p.Cys58Gly No call, GT	Positivo
12A	33,99	0,31	24,75	0,02	9,24	0,33	604,67	199,54		
12E	35,78	0,34	29,49	0,20	6,29	0,54	78,25	42,25		
15V	25,02	0,01	21,3	0,30	3,72	0,31	13,18	4,09	Proteína LIM p.Cys58Gly GT, GT	Negativo
15A	31,18	0,15	24,21	0,18	6,97	0,33	125,37	41,37		
15E	30,72	0,08	26,04	0,24	4,68	0,32	25,63	8,20		
18V	33,92	0,01	30,52	0,02	3,40	0,03	10,56	0,32	Proteína LIM p.Cys58Gly GT, GT	Positivo
18A	35,82	0,13	28,45	0,07	7,37	0,20	165,42	33,08		
18E	30,87	0,13	26,93	0,09	3,94	0,22	15,35	3,38		
20V	25,82	0,04	21,34	0,20	4,48	0,24	22,32	5,36	Proteína LIM p.Cys58Gly GT, GT	Positivo
20A	34,42	0,27	28,07	0,06	6,35	0,33	81,57	26,92		
20E	34,65	0,20	28,61	0,14	6,04	0,34	65,80	22,37		
21V	28,92	0,06	28,18	0,2	0,74	0,26	1,67	0,43	Proteína LIM p.Cys58Gly GT, GT	nd
21A	32,62	0,07	30,84	0,23	1,78	0,30	3,43	1,03		
21E	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
23V	21,83	0,04	20,79	0,29	1,04	0,33	2,06	0,68	Proteína LIM p.Cys58Gly GT, GT	nd
23A	25,89	0,07	22,29	0,12	3,60	0,19	12,13	2,30		
23E	26,96	0,03	25,54	0,11	1,42	0,14	2,68	0,37		
41V	29,24	0,22	25,80	0,16	3,44	0,38	10,85	4,12	Sem alterações	nd
41A	34,94	0,12	27,14	0,23	7,80	0,35	222,86	78,00		
41E	32,24	0,01	28,68	0,12	3,56	0,13	11,79	1,53		
42V	34,82	0,29	30,00	0,18	4,82	0,47	28,25	13,28	Sem alterações	nd
42A	30,77	0,02	20,39	0,08	10,38	0,10	1332,57	133,26		
42E	35,55	0,23	26,78	0,06	8,77	0,29	436,55	126,60		
43V	32,53	0,34	27,63	0,16	4,90	0,50	29,86	14,93	nd	Negativo
43A	26,75	0,28	19,54	0,19	7,21	0,47	148,06	69,59		
46V	25,60	0,08	24,12	0,10	1,48	0,18	2,79	0,50	Sem alterações	nd
46A	28,85	0,01	25,58	0,07	3,27	0,08	9,65	0,77		
46E	27,56	0,09	27,23	0,17	0,33	0,26	1,26	0,33		
47V	22,17	0,15	20,61	0,21	1,56	0,36	2,95	1,06	nd	Positivo
47A	25,12	0,09	23,51	0,24	1,61	0,33	3,05	1,01		
47E	27,64	0,04	26,22	0,08	1,42	0,12	2,68	0,32		
49V	27,72	0,13	22,67	0,14	5,05	0,27	33,13	8,94	nd	Negativo
49A	28,88	0,06	23,07	0,21	5,81	0,27	56,10	15,15		
49E	35,69	0,18	31,01	0,11	4,68	0,29	25,63	7,43		
50V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	nd	nd
50A	25,58	0,25	23,17	0,01	2,41	0,26	5,31	1,38		
50E	36,35	0,59	32,43	0,43	3,92	1,02	15,14	15,47		
53V	28,52	0,07	22,69	0,19	5,83	0,26	56,89	14,79	nd	nd
53A	35,89	0,17	26,23	0,32	9,66	0,49	809,00	396,41		

Amostra	Cp <i>CSRP3</i>	σ	Cp 18S	σ	Δ Cp	σ médio Δ Cp	2^{Δ Cp}	Erro associado	Resultado iPLEX <i>MassArray</i>	Resultado HRM
53E	33,74	0,09	32,13	0,19	1,61	0,28	3,05	0,85		
54V	33,49	0,02	29,02	0,15	4,47	0,17	22,16	3,77	nd	Positivo
54A	33,4	0,25	26,53	0,24	6,87	0,49	116,97	57,32		
54E	36,61	0,12	29,57	0,19	7,04	0,31	131,60	40,80		
56V	27,64	0,01	27,19	0,25	0,45	0,26	1,37	0,36	Proteína LIM p.Cys58Gly No call, GT	nd
56A	35,74	0,06	32,21	0,33	3,53	0,39	11,55	4,51		
56E	0,00	0,00	31,08	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00		
58V	32,78	0,16	25,98	0,13	6,80	0,29	111,43	32,31	Sem alterações	nd
58A	36,83	0,19	28,11	0,35	8,72	0,54	421,68	227,71		
58E	29,40	0,18	27,71	0,02	1,69	0,20	3,23	0,65		
59V	24,35	0,08	22,95	0,08	1,40	0,16	2,64	0,42	Sem alterações	nd
59A	30,24	0,12	28,09	0,04	2,15	0,16	4,44	0,71		
59E	27,16	0,04	25,98	0,07	1,18	0,11	2,27	0,25		
62V	0,00	0,00	33,73	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	Proteína LIM p.Cys58Gly G, G	nd
62A	0,00	0,00	33,63	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00		
62E	0,00	0,00	33,53	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00		
79V	29,49	0,11	28,69	0,13	0,80	0,24	1,74	0,42	Proteína LIM p.Cys58Gly GT, GT	nd
79A	28,34	0,14	26,67	0,12	1,67	0,26	3,18	0,83		
79E	28,42	0,08	26,04	0,11	2,38	0,19	5,21	0,99		
108V	29,55	0,11	23,47	0,11	6,08	0,22	67,65	14,88	Sem alterações	nd
108A	34,06	0,02	24,62	0,10	9,44	0,12	694,58	83,35		
108E	34,72	0,10	28,46	0,14	6,26	0,24	76,64	18,39		

A amostra CS foi usada como controlo negativo da doença dado ter sido obtida a partir de um indivíduo saudável. A utilização de apenas um único controlo prende-se com a dificuldade de obtenção do tipo de tecidos em estudo a partir de indivíduos saudáveis. À data de escrita desta tese foram obtidas mais 5 amostras colhidas de indivíduos saudáveis, cedidas pelo Instituto de Medicina Legal de Coimbra, o que irá permitir confirmar os valores basais de expressão em cada um dos tecidos.

Como foi mencionado anteriormente a MH é uma doença que se denota essencialmente ao nível do tecido ventricular. Além disso, a proteína LIM é mais expressa no tecido cardíaco do que no tecido esquelético (Barash *et al*, 2005). Por estas razões seriam de esperar alterações mais significativas no tecido cardíaco. Como se pode verificar na tabela 3.5 e nas figuras 3.14, 3.15 e 3.16, verificam-se algumas diferenças significativas entre os três tipos de tecidos. De uma forma geral, verifica-se sobreexpressão do gene *CSRP3* nos três tecidos. Nos casos em que se verifica aumento da expressão deste gene o tecido mais afectado parece ser, contrariamente ao que seria de esperar, o tecido auricular. Assim este tecido, que se pensava ser um tecido saudável em doentes com MH, também é afectado pela doença. Também o tecido esquelético apresenta alterações na expressão deste

gene. O facto de alguns casos de MH estarem associados a miopatias esqueléticas poderá justificar a alteração da expressão deste gene, principalmente se estas miopatias estiverem de facto associadas a alterações no gene *CSRP3* (Geier *et al*, 2008).

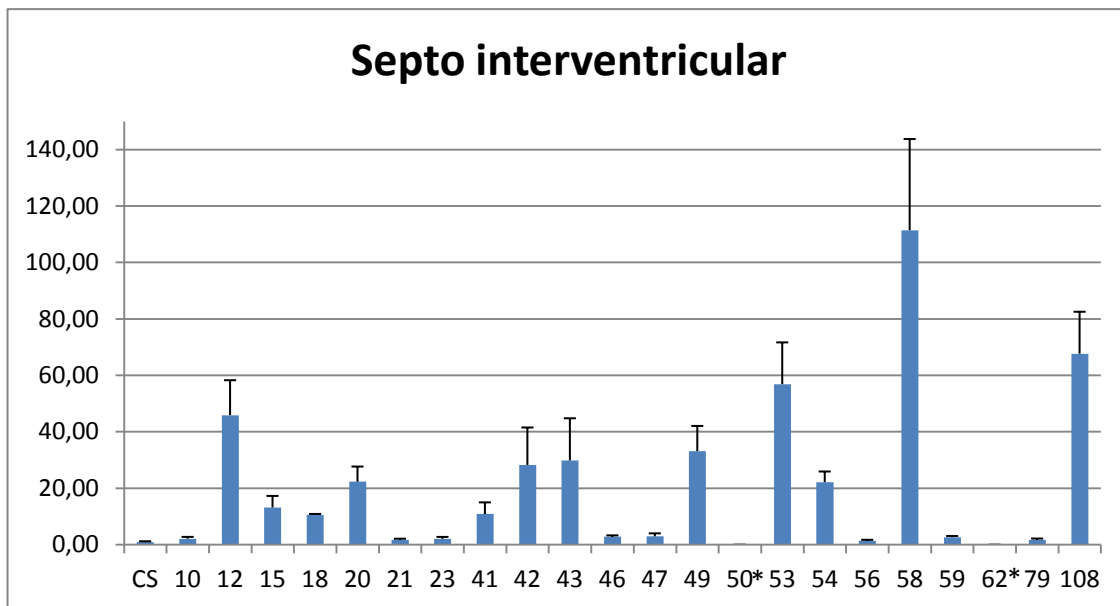


Figura 3.14 – Expressão do gene *CSRP3* no tecido do septo interventricular de doentes com MH (estão assinaladas com asterisco as amostras que não amplificaram).

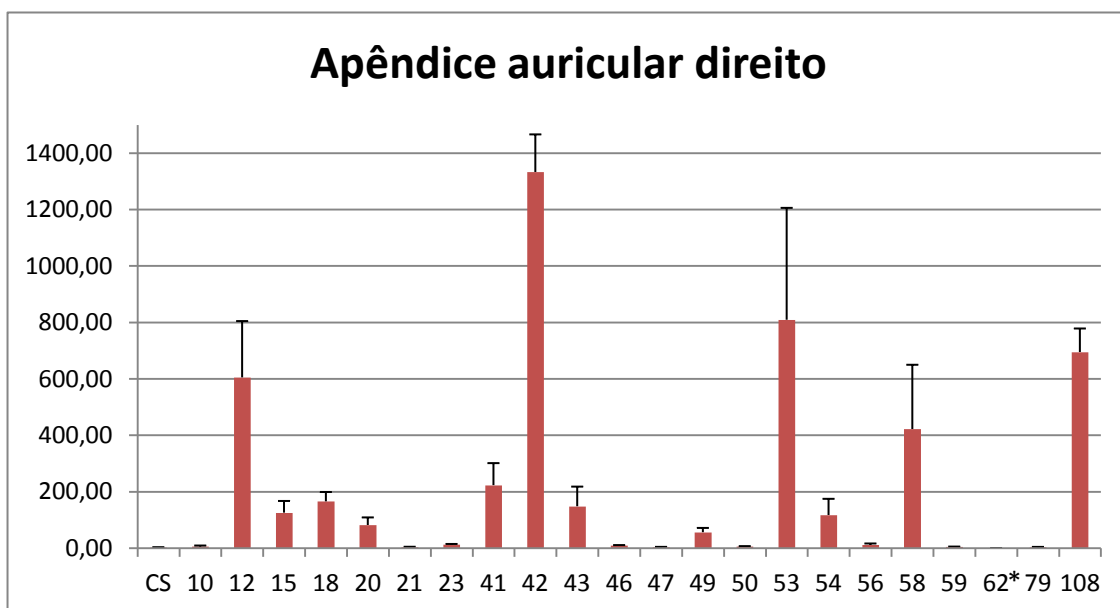


Figura 3.15 - Expressão do gene *CSRP3* no tecido do apêndice auricular direito de doentes com MH (estão assinaladas com asterisco as amostras que não amplificaram).

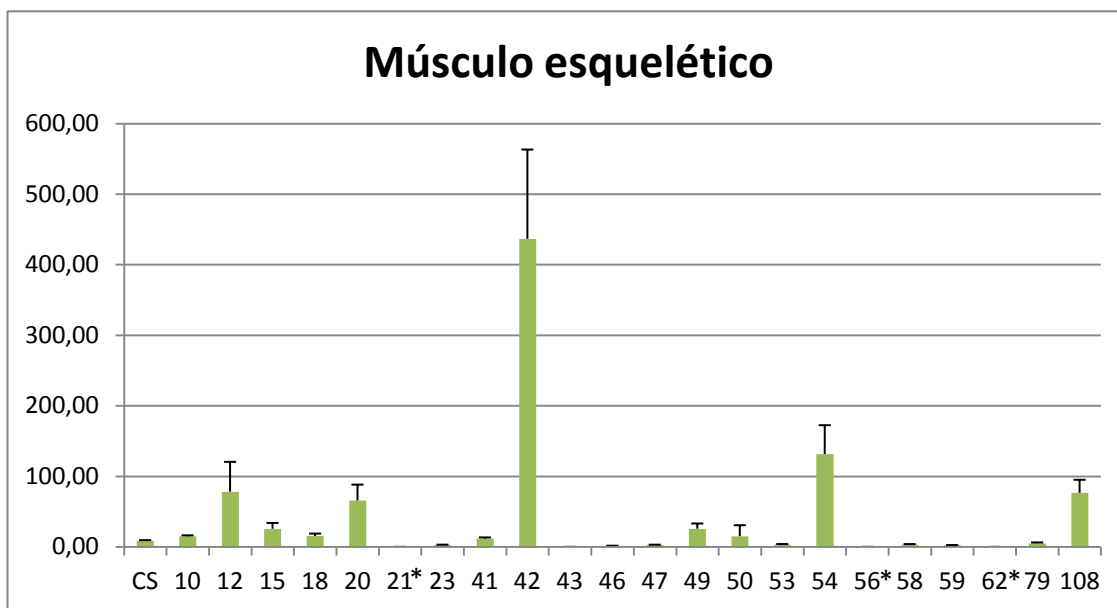


Figura 3.16 - Expressão do gene *CSRP3* no tecido muscular esquelético de doentes com MH (estão assinaladas com asterisco as amostras que não amplificaram).

A genotipagem do gene *CSRP3* das amostras em estudo foi realizada por iPLEX *MassArray* e HRM a partir de DNA extraído de sangue total. No entanto para os doentes 41, 50, 53, 58, e 108 foi realizada a análise por SSCP (trabalho prévio a esta dissertação) para os 4 genes sarcoméricos *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3*, não tendo sido identificadas quaisquer alterações naqueles genes (resultados não apresentados nesta dissertação). Adicionalmente, as amostras 43, 47, 49 e 54 foram testadas por HRM enquanto as amostras 21, 23, 42, 46, 56, 59, 62 e 79 apenas foram testadas por iPLEX *MassArray*, por conveniência de metodologia relativamente à quantidade existente de DNA. Das amostras testadas, 11 apresentaram alterações no exão 3 do gene *CSRP3* (10, 12, 18, 20, 21, 23, 47, 54, 56, 62 e 79) e 6 delas não apresentaram quaisquer alterações neste exão (15, 42, 43, 46, 49 e 59).

Apesar da falta de uma avaliação estatística da significância dos resultados, inerente à utilização de apenas um controlo saudável, poderão ser feitas algumas suposições. A determinação de diferenças relativas na expressão de genes é feita através do cálculo do valor de $2^{\Delta\Delta C_p}$. Procurou-se então esclarecer se a diferença de valores obtidos entre tecidos para um mesmo indivíduo e entre indivíduos diferentes pressupunha uma diferente evolução da MH. Como podemos verificar na tabela 3.5, o valor de expressão normal, ou seja o valor de $2^{\Delta\Delta C_p}$ nos três tecidos saudáveis analisados, septo interventricular, apêndice auricular e músculo esquelético é de $0,89 \pm 0,31$, $2,66 \pm 0,27$ e $8,69 \pm 0,78$ respectivamente. Comparando estes valores com os dos indivíduos doentes pode verificar-se um aumento de expressão do gene *CSRP3* na maioria dos indivíduos doentes, relativamente ao indivíduo saudável, também observável nos gráficos apresentados (figuras 3.14, 3.15 e 3.16).

Tentando relacionar os dados de genotipagem com os dados de transcritômica verificam-se quatro situações distintas (i) aumento de expressão nos três tecidos e presença de uma alteração

genética no gene *CSRP3* (situação verificada para as amostras 10, 12, 18, 20, 23 e 54), (ii) aumento de expressão do gene *CSRP3* nos três tecidos, sem detecção de alterações genéticas no exão 3 deste gene (amostras 15, 41, 42, 43, 49 e 108) (iii) aumento de expressão nos tecidos V e A e diminuição de expressão no tecido E, com presença de alteração do gene *CSRP3* (amostras 47 e 79) (iv) aumento de expressão nos tecidos V e A e diminuição de expressão no tecido E, sem presença de alteração no exão 3 do gene *CSRP3* (amostras 46, 58 e 59).

Para algumas amostras não foi possível detectar a expressão para os genes *rRNA18S* e/ou *CSRP3*. O facto de não ter sido detectada a expressão para ambos os genes para as amostras 21E e 50V pode estar relacionado com alguma deterioração da qualidade dos tecidos conservados por algum tempo em RNA *later*, apesar de o fabricante assegurar que o RNA *later* permite a sua conservação por tempo indefinido. No entanto, para as amostras 56E, 62V, 62A e 62E não foi possível detectar o nível de expressão apenas para o gene *CSRP3*, facto este que poderá estar associado à presença de alterações genéticas na sequência de DNA deste gene que levem a uma inibição total da sua expressão genética. De notar que poderá existir correlação entre a não amplificação do gene *CSRP3* e o fenótipo clínico dos doentes, uma vez que os doentes 50 e 56 têm MHO com a agravante de terem estenose da aorta em que se verifica a redução da abertura da válvula aórtica por acumulação de cálcio, que aumenta a resistência à passagem do fluxo de sangue do VE para a aorta. (<http://www.manualmerck.net/?id=45&cn=644>, acessado em Junho de 2011). Já no indivíduo 62 foi detectada a mutação c.172 T>G (p.Cys58Gly) em homozigotia no gene *CSRP3* por iPLEX *MassArray*. Como foi explicado anteriormente esta alteração poderá levar à alteração da estrutura tridimensional da proteína devido a quebra de pontes dissulfureto. Adicionalmente este indivíduo poderá apresentar uma mutação no gene *TNNI3* (c.484 C>T, p.Arg162Trp) detectada por iPLEX *MASSARRAY*® (aguarda-se a confirmação por SA). As mutações em homozigotia, assim como as mutações compostas, são bastante severas, podendo ser então a causa da inibição da expressão deste gene.

As amostras 10, 12, 18, 20, 23 e 54 apresentam sobreexpressão do gene *CSRP3*, sendo variável o nível de expressão. Estas amostras apresentam a alteração c.172 T>G (p.Cys58Gly) em heterozigotia no gene *CSRP3* detectada por iPLEX *MASSARRAY*®, considerada uma alteração severa pelo *software PolyPhen*. Esta mutação parece então ser em parte responsável pela alteração dos níveis de expressão do gene, que poderá ser um mecanismo de compensação de falta de proteína LIM normal (Geier *et al*, 2008). As diferenças do nível de expressão poderão ter a ver com a presença de mutações compostas que como descrito anteriormente, levam a uma vasta heterogeneidade de fenótipos clínicos. As diferentes mutações compostas poderão então influenciar o nível de expressão do gene *CSRP3*.

As amostras 47 e 79 apresentam esta mesma alteração no gene *CSRP3*, todavia apresentam subexpressão deste gene no tecido muscular esquelético. A amostra 79 apresenta uma alteração no gene *TNNT2* (c.753 G>T, p.Glu251Asp) já confirmada por SA, enquanto na amostra 47 foi detectada uma alteração no gene *MYH7* (c.1231 G>A, p.Val411Ile) por iPLEX *MASSARRAY*® e HRM, que permanece por confirmar. Estes doentes poderão então apresentar miopatias esqueléticas, que poderão

estar associadas a mutações compostas no gene *CSRP3* e noutros genes sarcoméricos. Seria então interessante fazer o estudo aprofundado destes dois doentes, quer a nível da histologia do tecido esquelético para identificação da existência de miopatia, quer a nível do estudo funcional das mutações.

Como foi referido algumas amostras não apresentaram alterações no exão 3 do gene *CSRP3*, sendo que as amostras 41, 42, 46, 58, 59 e 108 não apresentaram alterações por iPLEX *MassArray* e as amostras 15, 43 e 49 por HRM. Dado que estas amostras apresentam alterações na expressão deste gene poderão ocorrer três situações (i) no caso das amostras sem alterações em iPLEX *MassArray*, poderá existir uma alteração nova no gene *CSRP3*, (ii) este gene poderá apresentar alterações noutra exão, já que apenas foi analisado o exão 3 (iii) ou mutações em genes não sarcoméricos poderão de facto alterar a expressão do gene *CSRP3*. Todas estas hipóteses terão de ser analisadas, contudo foram detectadas por iPLEX *MassArray* alterações nos principais genes sarcoméricos nestas amostras, com a excepção das amostras 41, 42, 46, 58 e 108 sem alterações detectadas, incluindo os genes *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2* e *TNNI3* (tabela 3.3). Estes indivíduos apresentam diagnóstico de MH, sendo então importante o seu estudo por HRM para varrimento de exões dos genes associados a MH.

A proteína LIM muscular está de facto envolvida numa rede de interacção proteica muito complexa, envolvendo várias proteínas sarcoméricas (figura 3.17A). Para além de interagir directamente com a α -actinina e com a teletonina, tendo um importante papel estrutural no disco Z, parece estar envolvida na via de sinalização de resposta a stress através de mecanismos compensatórios. Alterações mecânicas e bioenergéticas no sarcómero como consequência de mutações nas proteínas sarcoméricas tais como *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2* ou *TNNI3*, levarão então à sobreexpressão de *CSRP3* (Barash *et al*, 2005, Geier *et al*, 2008).

As alterações na proteína LIM parecem também afectar todo o sarcómero através da titina, a proteína responsável pela tensão passiva nos músculos cardíaco e esquelético. A influência sobre a titina será conseguida através das interacções da proteína LIM com as proteínas teletonina e α -actinina, que também interactuam directamente com a titina (Barash *et al*, 2005) (figura 3.17).

Estes resultados servem para reforçar que basta uma alteração numa das proteínas do sarcómero para haver alteração da expressão de *CSRP3* nos tecidos musculares cardíaco e esquelético, sendo assim provável que este gene esteja de facto envolvido na via de resposta a stress (alteração num gene que codifica uma proteína sarcomérica). A proteína LIM parece ser de facto uma proteína essencial não só na estrutura do sarcómero, como na manutenção das suas funções normais. Sendo assim, o gene *CSRP3* poderá de facto ser considerado um marcador molecular transcritómico associado à remodelação sarcomérica resultante de MH.

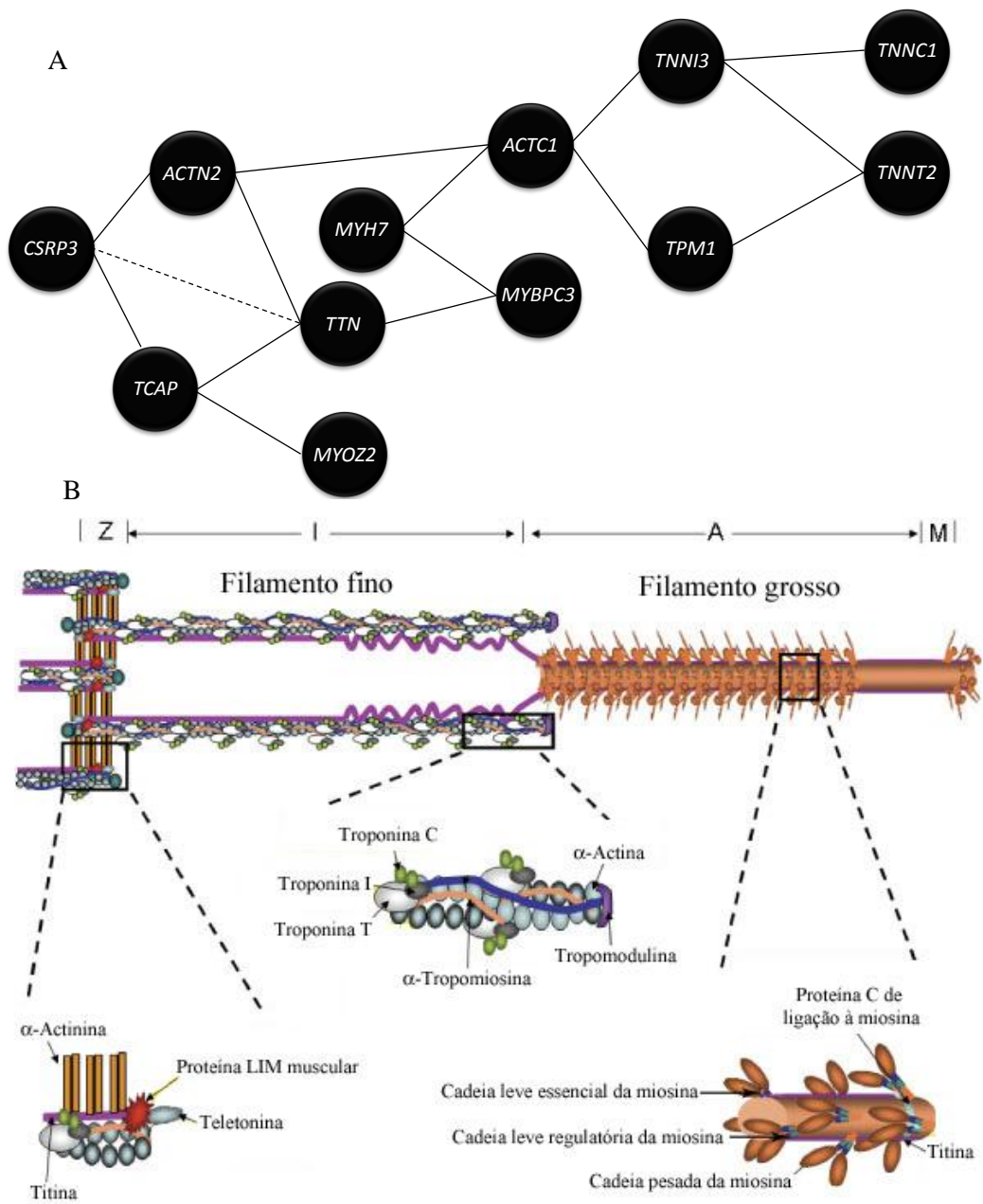


Figura 3.17 – (A) Rede de interação proteica e (B) estrutura do sarcômero (Imagem adaptada de Andersen, *et al*, 2008).

Capítulo 4 - Conclusões e Perspectivas Futuras

Um dos principais objectivos deste trabalho foi a validação da técnica de iPLEX *MassArray* para diagnóstico de MH. Esta técnica, em associação com a técnica de HRM, irá permitir um diagnóstico mais preciso, rápido e económico desta doença.

Foi desenhado um *chip* com 541 mutações em 33 genes associados a MH, descritas nas bases de dados. Foram então analisados 27 *chips* e foram seleccionados 61 indivíduos com alterações nos genes *CSRP3* e *TCAP*. Recorreu-se à técnica de HRM como meio de confirmação de alterações detectadas em iPLEX *MassArray*, tendo sido detectadas 29 alterações (num total de 42 amostras com alteração detectada por iPLEX *MassArray*): 14 alterações no exão 3 do gene *CSRP3*, 4 alterações no exão 1 do gene *TCAP* e 11 alterações no exão 2 deste mesmo gene. Das 29 amostras com alterações foram sequenciadas 7, sendo 5 destas alterações resultados falsos positivos de iPLEX *MassArray*, nomeadamente as alterações no exão 2 do gene *TCAP* c.458 G>A (p.Arg153His), c.208 C>T (p.Arg70Trp) e c.410 C>T (p.Thr137Ile) nos doentes 8, 16 e 29, e 23 respectivamente, e c.172 T>G (p.Cys58Gly) no exão 3 do gene *CSRP3* no doente 20. Os doentes 8, 16 e 29 apresentam no entanto, uma mutação sinónima (c.453 A>C, p.Ala151Ala) detectada por HRM. Algumas amostras consideradas como resultados falsos positivos de iPLEX *MassArray* após análise de HRM incluem as amostras 3, 13, 15 e 25 que não apresentaram alteração no exão 3 do gene *CSRP3* e as amostras 9, 13, 24 e 31 que não apresentaram alterações nos exões 1 e 2 do gene *TCAP*. Desta forma, existem bastantes resultados falsos positivos em iPLEX *MassArray* resultantes de problemas já anteriormente discutidos, quer no desenho dos oligonucleótidos quer associados a erros de pipetagens, já que apenas se verificam em casos em que a eficiência da reacção de extensão é baixa, sendo vários os casos em que o alelo apenas foi detectado após o *cluster call*. O desenho *de novo* destes oligonucleótidos e a compra de um *robot* para executar as mais de mil pipetagens inerentes a esta metodologia irá com certeza permitir uma melhoria significativa na redução destes falsos positivos.

A mutação c.128delC (p.A43Vfs165) no exão 3 do *CSRP3*, que resulta em *frameshift* foi confirmada por sequenciação nos doentes 30 e 32, pertencentes a famílias distintas. Esta mutação leva a alterações de aminoácidos importantes para a função normal da proteína, nomeadamente aminoácidos envolvidos na coordenação dos iões zinco e também nos aminoácidos envolvidos nas interações hidrofóbicas entre os dedos de zinco. Como consequência, observam-se fenótipos graves, sobretudo no caso do doente 32 que sofreu paragem cardíaca.

De facto as alterações no gene *CSRP3* parecem estar associadas a fenótipos graves. A mutação c.172 T>G (p.Cys58Gly) no exão 3 do gene *CSRP3* foi detectada em 16 doentes com fenótipo de MHO (3 destes identificados como falsos positivos) por iPLEX *MassArray* tendo sido confirmadas posteriormente 6 alterações por HRM. Apesar de estar descrita como SNP (rs104894204), esta

alteração é potencialmente severa. A análise de 200 cromossomas de indivíduos saudáveis, sem a presença desta alteração, comprova que esta alteração é uma mutação na população portuguesa.

Relativamente ao gene *TCAP*, foi detectada por iPLEX *MassArray* a alteração c.34 delGAG (p.Glu12del) em 7 doentes (3 destes resultados identificados como falsos positivos), apresentando as amostras uma extensão baixa. Uma vez que esta alteração parece ser bastante frequente na população portuguesa, será feito o estudo populacional (200 cromossomas de indivíduos saudáveis) para confirmar se será um polimorfismo de baixa frequência.

De momento, o nosso grupo de investigação encontra-se em fase de optimização do *chip*, sendo feita a análise de todos os resultados de iPLEX *MassArray*, de maneira a detectar todos os falsos positivos e *no calls*, o que permitirá a identificação dos oligonucleótidos que terão de ser redesenhadas.

Para além de mutações nos genes *CSRP3* e *TCAP*, a maioria destes doentes apresentam mutações noutros genes associados a MH comprovando-se a existência de mutações compostas associadas à doença. Foram calculadas as percentagens de MH causada por mutações em cada um dos genes nesta população doente, revelando-se o gene *MYBPC3* como o mais frequentemente afectado (18,03%). O gene *MYH7* apresenta uma percentagem mais baixa do que o esperado (9,83%) enquanto os genes *TNNT2*, *TNNI3* e *CSRP3* apresentam frequências elevadas (14,75%, 6,56% e 3,28% respectivamente). Certamente que estas percentagens não serão representativas da população em geral já que de momento, ainda não foram confirmadas por SA todas as alterações detectadas por iPLEX *MassArray* e por HRM (para as percentagens apresentadas apenas entraram as mutações já confirmadas). Além disso o aumento da amostra populacional, com a inclusão de indivíduos saudáveis, permitirá fazer uma aproximação mais fiável das percentagens de MH causada por mutações em cada um dos genes.

No sentido de relacionar os casos mais graves de MH, ou seja, casos de MHO, com a expressão do gene *CSRP3*, foi realizado o estudo transcritómico por PCR em tempo real, num grupo de doentes submetidos a cirurgia cardíaca. De um modo geral verificou-se um aumento da expressão nos indivíduos doentes relativamente ao controlo saudável, incluindo no tecido auricular que também parece ser afectado pela doença e no tecido esquelético. Nalguns doentes verifica-se diminuição dos níveis de expressão de *CSRP3* neste tecido, podendo haver associação a miopatias esqueléticas.

Em alguns casos parece haver inibição da expressão do gene *CSRP3*, já que em alguns dos doentes com fenótipos mais graves não se verificou amplificação deste gene. As mutações em homozigotia são as mais graves, levando a uma diminuição acentuada ou até a inibição da expressão. Os doentes 50 e 56 apresentam MHO com agravante de estenose aórtica. No indivíduo 62 foi detectada a mutação c.172 T>G (p.Cys58Gly) em homozigotia no gene *CSRP3* por iPLEX *MassArray*, que leva à alteração de aminoácidos importantes para a função da proteína LIM. Esta mutação parece ter como consequência a inibição da expressão do gene *CSRP3*.

A mutação c.172 T>G (p.Cys58Gly) em heterozigotia no gene *CSRP3* parece ser responsável pela alteração dos níveis de expressão do gene, num mecanismo de compensação de falta de proteína LIM normal.

A presença de mutações em genes sarcoméricos poderá alterar a expressão de *CSRP3*. A proteína LIM está envolvida numa rede complexa de interacções directas (α -actinina e teletonina) e indirectas (titina e proteína C de ligação à miosina) e poderá fazer parte da via de sinalização a respostas a stress. De acordo com os resultados obtidos as alterações mecânicas e bioenergéticas causadas em mutações nos genes que codificam as principais proteínas sarcoméricas, *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3*, levam à activação dessa via e portanto levam à sobreexpressão de *CSRP3* (Barash *et al*, 2005, Geier *et al*, 2008). Também as alterações nas proteínas α -actinina e teletonina poderão alterar a expressão deste gene, já que interactuam directamente com a proteína LIM (Barash *et al*, 2005, Geier *et al*, 2008).

Todos estes resultados apontam para a hipótese de uma alteração numa das proteínas do sarcómero alterar a expressão de *CSRP3*, sendo assim plausível que este gene esteja envolvido na via de resposta a stress, sendo então uma proteína essencial não só na estrutura do sarcómero, como na manutenção das suas funções normais. Este gene poderá então ser considerado um marcador transcritómico associado a MH.

Em termos de trabalho futuro o objectivo será terminar a optimização da técnica de iPLEX *MassArray*, com imenso potencial na detecção em larga escala de mutações associadas a MH. Para tal, serão redesenhados os oligonucleótidos e optimizadas as reacções em *plexes*. Serão incluídas novas mutações que foram adicionadas às bases de dados e as mutações detectadas por este grupo de investigação pela técnica de HRM e confirmadas por SA. Deverá também ser incluída a pesquisa de mutações no gene *ACTN2* que codifica a α -actinina, proteína que interage directamente com a proteína LIM. Serão também feitos estudos populacionais de 50 DNAs saudáveis (100 cromossomas), com o objectivo de determinar se as alterações detectadas no gene *TCAP* serão polimorfismos da população portuguesa. Com o aumento da amostra populacional, principalmente após o estudo de indivíduos saudáveis, será possível determinar a percentagem de MH causada por mutações em cada um dos genes na população portuguesa. A confirmação por SA de todas as alterações detectadas por iPLEX *MassArray* e HRM também irá contribuir para a obtenção de percentagens mais exactas.

Relativamente ao estudo transcritómico do gene *CSRP3*, foram adquiridas amostras de tecidos de 5 indivíduos saudáveis para confirmação de resultados obtidos na amostra CS. A população em estudo será aumentada, sendo neste momento constituída por 25 indivíduos. Será também feito um estudo histológico do tecido esquelético com marcação histoquímica (colorações de Gomori e NADH-desidrogenase) para identificação de miopatias esqueléticas, que se julga estarem associadas a mutações no gene *CSRP3*. Será também realizada uma análise semelhante em tecido cardíaco para comparação do padrão histológico.

Adicionalmente, de maneira a alargar o estudo sobre MH, pretende-se estudar a expressão de microRNAs associados a MH na população portuguesa. Serão analisados microRNAs associados a doenças cardíacas (miR-1, 23a, 23b, 24, 125b, 133, 150, 181b, 195, 199a e 214), por PCR em tempo real, de maneira a detectar sub ou sobre-expressão dos microRNAs em estudo (Thum *et al*, 2008).

O desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico genético tal como iPLEX *MassArray* aplicadas a doenças complexas como MH é de extrema importância. Tratando-se de uma técnica de detecção de mutações em larga escala permite o diagnóstico rápido e menos dispendioso de vários doentes em simultâneo. A conjugação com a técnica de HRM permite a detecção de novas variantes associadas ao fenótipo de MH. Assim, ficamos mais perto de atingir o objectivo mais ambicionado no que toca ao tratamento de doenças genéticas. Que as associações entre genótipo e fenótipo permitam levar a tratamentos individualizados e indicados a cada caso.

Capítulo 5 - Referências bibliográficas

- Ababou, A., Rostkova, E., Mistry, S., Le Masurier, C., Gautel, M. e Pfuhl, M. 2008. Myosin binding protein C positioned to play a key role in regulation of muscle contraction: structure and interactions of domain C1. *Journal of Molecular Biology* 384(3): 615-630.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. 2002. The Cytoskeleton. *In* *Molecular Biology of the Cell*, 4ª ed., pp 949-969, Garland Science, New York and London.
- Alcalai, R., Seidman, J.G. e Seidman, C.E. 2008. Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy: From bench to the clinics. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 19(1): 104-110.
- Anastasakis, A., Karandreas, N., Stathis, P., Rigopoulos, A., Theopistou, A., Sepp, R., Elliot, P.M., Panagiotakos, D.B., Stefanadis, C. e Toutouzas, P. 2003. Subclinical skeletal muscle abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy and their relation with clinical characteristics. *International Journal of Cardiology* 89: 249–256.
- Andersen, P.S., Havndrup, O., Sorensen, K.M., Jensen, M., Larsen, A.L., Hedley, P., Bie, A.R., Moolman-Smook, J., Christiansen, M. e Bundgaardz, H. 2008. Diagnostic yield, interpretation and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish Hypertrophic Cardiomyopathy patients and relatives. *Human Mutation* 30(3): 363-370.
- Arad, M., Maron, B.J., Gorham, J.M., Johnson, W.H., Saul, J.P., Perez-Atayde, A.R., Spirito, P., Wright, G.B, Kanter, R.J., Seidman, C.E., e Seidman, J.G. 2005. Glycogen Storage Diseases Presenting as Hypertrophic Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 352(4): 362-372.
- Arimura, T., Bos, J.M., Sato, A., Kubo, T., Okamoto, H., Nishi, H., Harada, H., Koga, Y., Moulik, M., Doi, Y.L., Towbin, J.A., Ackerman, M.J. e Kimura, A. 2009. Cardiac Ankyrin Repeat protein gene (ANKRD1) mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 54(4): 334-342.
- Arimura, T., Matsumoto, Y., Okazaki, O., Hayashi, T., Takahashi, M., Inagaki, N., Hinohara, K., Ashizawa, N., Yano, K., Kimura, A. 2007. Structural analysis of obscurin gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362: 281–287.
- Barash, I.A., Mathew, L., Lahey, M., Greaser, M.L. e Lieber, R.L. 2005. Muscle LIM protein plays both structural and functional roles in skeletal muscle. *AJP - Cell Physiology* 289: C1312-C1320.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. e Stryer, L. 2004. Protein Structure and Function *In* *Biochemistry*, 5ª ed., pp 43-79, W.H. Freeman and Company, New York.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. e Bourne, P.E. 2000. The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242. Acedido a Janeiro de 2011. <http://www.pdb.org>.

- Blankenfeldt, W., Thoma, N.H., Wray, J.S., Gautel, M. e Schlichting, I. 2006. Crystal structures of human cardiac-myosin II S2 – provide insight into the functional role of the S2 subfragment. *PNAS* 103(47): 17713-17717.
- Boateng, S.Y. e Goldspink, P.H. 2008. Assembly and maintenance of the sarcomere night and day. *Cardiovascular Research*. 77: 667-675.
- Bos, J.M. e Ackerman, M.J. 2010. Z-disc genes in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 55(11): 1136-1138.
- Bos, J.M., Towbin, J.A. e Ackerman, M.J. 2009. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 54(3): 201-211.
- Brion, M., Allegue, C., Gil, R., Blanco-Verea, A., Carracedo, A., Pagannonne, E., Evangelista, A., Di Castro, S., Marchitti, S., Stanzione, R., Volpec, M e Rubattu, S. 2010. Identification of a novel *MYBPC3* gene variant in a patient with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 40(3): 285-289.
- Brito, D., Richard, P., Komajda, M. e Madeira, H. 2008. Miocardiopatia Hipertrófica Familiar e Esporádica: diferenças e semelhanças numa população com estudo genético e longo tempo de seguimento clínico. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 27(2): 147-173.
- Burwinkel, B., Scott, J.W., Bühner, C., van Landeghem, F.K.H., Cox, G.F., Wilson, C.J., Hardie, D.G. e Kilimann, M.W. 2005. Fatal congenital glycogenosis caused caused by a recurrent activating R531Q mutation in the γ 2-subunit of AMP-activated protein kinase (*PRKAG2*), not by phosphorylase kinase deficiency. *American Journal of Human Genetics* 76: 1034–1049.
- Carson, R., McKnight, A.M., Todd, S., Liu, W.W., Heggarty, S., Craig, D., McGuinness, B., Irvine, G.B., Passmore, A.P. e Johnston, J.A. 2009. Variations in *RTN3* and *PPIL2* genes does not influence platelet membrane β -secretase activity or susceptibility to Alzheimer’s Disease in the northern Irish population. *Neuromolecular Medicine* 11: 337-344.
- Chakker, H.A., Hanson, R.L., Raza, S.M., DiStefano, J.K., Millis, M.P., Heilman, R.L., Mulligan, D.C., Reddy, K.S., Mazur, M.J., Hamawi, K., Moss, A.A. e Cerhan, J.R. 2009. Pilot study: Association of traditional and genetic risk factors and new-onset Diabetes Mellitus following kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 41: 4172-4177.
- Chiu, C., Bagnall, R.D., Ingles, J., Yeates, L., Kennerson, M., Donald, J.A., Jormakka, M., Lind, J.M. e Semsarian, C. 2009. Mutations in Alpha-Actinin-2 cause Hypertrophic Cardiomyopathy: A Genome-Wide Analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 55:1127-1135.
- Chiu, C., Tebo, M., Ingles, J., Yeates, L., Arthur, J.W., Lind, J.M., Semsarian, C. 2007. Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43: 337–343.

- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C. e Gregorio, C.C. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* 18: 637-706.
- Cooper, D.N., Ball, E.V., Stenson, P.D., Phillips, A.D., Howells, K., Mort, M.E. e Thomas, N.S.T. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Acedido a Setembro de 2010. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- Coto, E., Palacín, M., Martín, M., Castro, M.G., Reguero, J.R., García, C., Berrazueta, J.R., Morís, C., Morales, B., Ortega, F., Corao, A.I., Díaz, M., Távira, B. e 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.
- Crown Human Genome Center, Department of Molecular Genetics, the Weizmann Institute of Science. Acedido a Maio de 2010. <http://www.genecards.org>.
- Fatkin, D. e Graham, R.M. 2002. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiological Reviews* 82: 945-980.
- Faulkner, G., Lanfranchi, G. e Valle, G. 2001. Telethonin and Other New Proteins of the Z-Disc of Skeletal Muscle. *IUBMB Life* 51: 275–282.
- Fokstuen, S., Lyle, R., Munoz, A., Gehrig, C., Lerch, R., Perrot, A., Osterziel, K.J., Geier, C., Beghetti, M., Mach, F., Sztajzel, J. E Sigwart, U. 2008. A DNA Resequencing Array for Pathogenic Mutation Detection in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Human Mutation* 29(6): 879-885.
- Funada, A., Konno, T., Fujino, N., Muranoto, A., Hayashi, K., Tsubokawa, T., Sakata, K., Kawashiri, M., Takeda, Y., Ino, H. e Yamagishi, M. 2010. Impact of Renin-Angiotensin System polymorphisms on development of systolic dysfunction in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation Journal* 74(12): 2674-2680.
- Gabriel, S., Ziaugra, L. e Tabbaa, D. 2009. SNP genotyping using the Sequenom *MassArray* iPLEX platform. *Current Protocols in Human Genetics* Chapter 2:Unit 2.12.
- Geier, C., Gehmlich, K., Ehler, E., Hassfeld, S., Perrot, A., Hayess, K., Cardim, N., Wenzel, K., Erdmann, B., Krackhardt, F., Posch, M.G., Bublak, A., Nägele, H., Scheffold, T., Dietz, R., Chien, K.R., Spuler, S., Fürst, D.O., Nürnberg, P. e Özcelik, C. 2008. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 17: 2753-2765.
- Geier, C., Perrot, A., Ozcelik, C., Binner, P., Counsell, D., Hoffmann, K., Pilz, B., Martiniak, Y., Gehmlich, K., van der Ven, P. F. M., Furst, D. O., Vornwald, A., von Hodenberg, E., Nurnberg, P., Scheffold, T., Dietz, R., Osterziel, K. J. 2003. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 107: 1390-1395.
- Genetics Home Reference. U.S. National Library of Medicine. Acedido a Janeiro de 2011. <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/actin>.

- Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School. <http://www.cardiogenomics.org>.
- Girolami, F., Ho, C.Y., Semsarian, C., Baldi, M., Will, M.L., Baldini, K., Torricelli, F., Yeates, L., Cecchi, F., Ackerman, M.J. e Olivotto, I. 2010. Clinical Features and Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated With Triple Sarcomere Protein Gene Mutations. *Journal of the American College of Cardiology* 55(14): 1444-1453.
- Hanft, L.M., Korte, F.S. e McDonald, K. S. 2008. Cardiac Function and modulation of sarcomeric function by length. *Cardiovascular Research* 77: 627-636.
- Hayashi, T., Arimura, T., Itoh-Satoh, M., Ueda, K., Hohda, S., Inagaki, N., Takahashi, M., Hori, H., Yasunami, M., Nishi, H., Koga, Y., Nakamura, H., Matsuzaki, M., Choi, B.Y., Bae, S.W., You, C.W., Han, K.H., Park, J.E., Knöll, R., Hoshijima, M., Chien, K.R., e Kimura, A. 2004. Tcap Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy and Dilated Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 44(11): 2192-2201.
- Ho, C.Y. 2010. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Heart Failure Clinics* 6: 141–159.
- Ho, C.Y. e Seidman, C.E. 2006. A Contemporary Approach to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 113: e858-e862.
- Ikeda, S., Kong, S.W., Lu, J., Bisping, E., Zhang, H., Allen, P.D., Golub, T.R., Pieske, B. e Pu, W.T. 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics* 31: 367–373.
- Hoshijima, M., Knöll, R., Pashmforoush, M. e Chien, K.R. 2006. Reversal of Calcium Cycling Defects in Advanced Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 48(9): A15–23.
- Ingles, J., Doolan, A., Chiu, C., Seidman, J., Seidman, C. e Semsarian, C. 2005. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *Journal of Medical Genetics* 42:e59.
- Ishikawa, T., Kamei, Y., Otozai, S., Kim, J., Sato, A., Kuwahara, Y., Tanaka, M., Deguchi, T., Inohara, H., Tsujimura, T. e Todo, T. 2010. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of mutations in a Medaka TILLING library. *BMC Molecular Biology* 11:70.
- Kabsch, W. e Vandekerckhove, J. 1992. Structure and function of actin. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21: 49-76.
- Kelly, M. e Semsarian, C. 2009. Multiple Mutations in Genetic Cardiovascular Disease: A Marker of Disease Severity. *Circulation Cardiovascular Genetics* 2:182-190.
- Kubo, T., Kitaoka, H., Okawa, M., Hirota, T., Hoshikawa, E., Hayato, K., Yamasaki, N., Matsumura, Y., Yabe, T., Nishinaga, M., Takata, J. e Doi, Y.L. 2009. Clinical profiles of Hypertrophic Cardiomyopathy with apical phenotype – comparison of pure-apical form and distal-dominant form. *Circulation Journal*. 73(12): 2330-6.

- Laity, J.H., Lee, B.M. e Wright, P.E. 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 39–46.
- Lin, J., Hsiao, K., Chen, C., Wu, C., Lin, S., Chou, Y. e Shiesh, S. 2010. High resolution melting analysis for the detection of *SLC25A13* gene mutations in Taiwan. *Clinica Chimica Acta* 412(5-6): 460-465.
- Marian, A.J. 2008. Genetics determinants of cardiac hypertrophy. *Current Opinion in Cardiology* 23(3): 199-205.
- Marian, A.J. 2009. Contemporary treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Texas Heart Institution Journal* 36(3):194-204.
- Marian, A.J. 2010. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. *European Journal of Clinical Investigation* 40: 1365-2362.
- Marques, V. 2010. Desnaturalização de Alta Resolução Aplicada ao Diagnóstico Genético de Miocardiopatia Hipertrofica. FCT-UNL.
- McLeod, C.J., Bos, J.M., Theis, J.L., Edwards, W.D., Gersh, B.J., Ommen, S.R., e Ackerman, M.J. 2009. Histologic characterization of hypertrophic cardiomyopathy with and without myofibrillar mutations. *American Heart Journal* 158:799-805.
- Medin, M., Hermida-Prieto, M., Monserrat, L., Laredo, R., Rodriguez-Rey, J.C., Fernandez, X., Castro-Beiras, A. 2007. Mutational screening of phospholamban gene in hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy and functional study of the *PLN* - 42 C>G mutation. *European Journal of Heart Failure* 9: 37-43.
- Millat, G., Chanavat, V., Créhalet, H. e Rousson, R. 2010. Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta* 411(23-24): 1983-1991.
- Morita, H., Nagai, R., Seidman, J.G. e Seidman, C.E. 2010. Sarcomere gene mutations in hypertrophy and heart failure. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 3(4): 297-303.
- Mudd, J.O. e Kass, D.A. 2008. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451(21): 919-928.
- Oeth, P., Beaulieu, M., Park, C., Kosman, D., del Mistro, G., van der Boom, D. e Jurinke, C. 2005. iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for *MassArray* System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. Sequenom.
- Osio, A., Tan, L., Chen, S.N., Lombardi, R., Nagueh, S.F., Shete, S., Roberts, R., Willerson, J.T. e Marian, A.J. 2007. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Research* 100: 766-768.
- Ottenheijm, C.A.C., Heunks, L.M.A. e Dekhuijzen, P.N. 2008. Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respiratory Research* 9:12.

- Potthoff, M.J., Arnold, M.A., McAnally, J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. e Olson, E.N. 2007. Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by *Mef2c*. *Molecular and Cellular Biology* 27(23): 8143-8151.
- Ragoussis, J., Elvidge, G.P., Kaur, K. e Colella, S. 2006. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. *PLoS Genetics* 2(7): 0920-0929.
- 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. e Komajda, M. 2003. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 107(17):2227-2232.
- Richard, P., Fressart, V., Charron, P. e Hainque, B. 2010. Génétique des cardiomyopathies héréditaires. *Pathologie Biologie* 58: 343-352.
- Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Branco, P., Silveira, L., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M. e Fernandes, A.R. 2011. Diagnóstico genético de Miocardiopatia Hipertrófica por recurso a Espectrometria de Massa com Arrays de ADN e Desnaturação de Alta Resolução. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 30(1): 7-18.
- Schallus, T., Fehér, K., Ulrich, A.S., Stier, G. e Muhle-Goll, C. 2009. Structure and dynamics of the human muscle LIM protein. *FEBS Letters* 583: 1017–1022.
- Sequenom, Inc. 2007. *iPLEX MassArray Typer v4.0 Software User's Guide*. San Diego, USA.
- Sfichi-Duke, L., Garcia-Cazarin, M.L., Sumandea, C.A., Sievert, G.A., Balke, C.W., Zhan, D., Morimoto, S. e Sumandea, M.P. 2010. Cardiomyopathy-causing deletion K210 in cardiac troponin T alters phosphorylation propensity of sarcomeric proteins. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48(5): 934-942.
- Söderlund-Strand, A., Dillner, J. e Carlson, J. 2008. High-throughput genotyping of oncogenic human Papilloma Viruses with MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 54(1): 86-92.
- Sucharov, C., Bristow, M.R. e Port, D. 2008. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45(2): 185-192.
- Theoretical and Computational Biophysics Group, NIH Resource for Macromolecular Modeling and Bioinformatics, Beckman Institute, University of Illinois, Urbana-Champaign. Acedido a Janeiro de 2011. <http://www.ks.uiuc.edu/>.
- Thurn, T., Catalucci, D. e Bauersachs, J. 2008. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular Research* 79: 562-570.
- Tindall, E.A., Petersen, D.C., Woodbridge, P., Schipany, K. e Hayes, V.M. 2009. Assessing High-Resolution Melt Curve Analysis for Accurate Detection of Gene Variants in Complex DNA Fragments. *Human Mutations* 30: 876-883.

- van Dijk, S.J., Dooijes, D., Remedios, C., Michels, M., Lamers, J.M.J., Winegrad, S., Schlossarek, S., Carrier, L., ten Cate, F.J., Stienen, G.J.M. e van der Velden, J. 2009. Cardiac myosin-binding protein C mutations and Hypertrophic Cardiomyopathy: Haploinsufficiency, deranged phosphorylation, and cardiomyocyte dysfunction. *Circulation* 119: 1473-1483.
- Van Driest, S.L., Vasile, V.C., Ommen, S.R., Will, M.L., Gersh, B.J. e Ackerman, M.J. 2004. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 44(9):1903-1910.
- Varnava, A.M., Elliott, P.M., Sharma, S., McKenna, W.J. e Davies, M.J. 2000. Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis and small vessel disease. *Heart* 84: 476–482.
- Waldmüller, S., Sakthivel, S., Saadi, A.V., Selignow, C., Rakesh, P.G., Golubenko, M., Joseph, P.K., Padmakumar, R., Richard, P., Schwartz, K., Tharakan, J.M., Rajamanickam, C. e Vosberg, H.P. 2003. Novel deletions in *MYH7* and *MYBPC3* identified in Indian families with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35(6): 623-636.
- Wright, W.T., Heggarty, S.V., Young, I.S., Nicholls, D.P., Whittall, R., Humphries, S.E., Graham, C.A. 2008. Multiplex *MassArray* spectrometry (iPLEX) produces a fast and economical test for 56 familial hypercholesterolaemia-causing mutations. *Clinical Genetics* 74: 463–468.
- Xin, B., Puffenberger, E., Tumbush, J., Bockoven, J.R. e Wang, H. 2007. Homozygosity for a novel splice site mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene causes severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A(22): 2662-2667.

Capítulo 6 - Anexos

6.1. Anexo 1

HIGH RESOLUTION MELTING: improvements in the genetic diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy in a Portuguese cohort

Santos S.^{(a,b,c)*}, Marques V.^{(b)*}, Pires, M.^(b), Silveira, L.^(b), Oliveira, H.^(b), Lança V.^(d), Brito D.^(e), Madeira H.^(e), Monteiro, C.^(c), Carreira I.M.^(f), Gaspar I.M.^(g,h), Fernandes A.R.^(a, b, i)

*These authors contributed equally to this work.

^aCentro de Química Estrutural, Instituto Superior técnico, Lisboa, Portugal; ^bFaculdade de Engenharia e Ciências Naturais, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; ^cFaculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal; ^dCentro de Metabolismo e Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal; ^eCentro de Cardiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal; ^fLaboratório de Citogenética, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal; ^gGenética Médica, Hospital Egas Moniz; ^hCardiogenética, Hospital Santa Cruz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Portugal; ⁱDepartamento Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Portugal,

Corresponding author: Alexandra R. Fernandes: Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal; +351968078993; +351214844141; alexandrancrfernandes@gmail.com;

Abstract

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM), a complex myocardial disorder with an autosomal dominant genetic pattern has a prevalence of 1:500 and is considered as the most frequent cause of sudden death in young people apparently healthy. The elevated number of genes and mutations involved in this pathology limits HCM gene-based diagnosis that should be considered of most importance for both basic research and clinical medicine. HCM current genetic testing strategy using automated sequencing (AS) is limited due to the high considerable costs plus the time-consuming constraint of this technique. High Resolution Melting (HRM) has demonstrated to be an encouraging new strategy for HCM genetic diagnosis. Our aim was to prove the diagnostic efficacy of HRM technique by analyzing 28 HCM-associated genes, including the most frequent 4 HCM-associated sarcomere genes, as well as 24 genes with lower reported HCM phenotype association. The robustness of this technology was tested by analyzing 80 Portuguese individuals with clinical phenotype of HCM allowing simultaneously a better characterization of this disease in the Portuguese population. HRM technology allowed us to identify 60 mutated alleles in 64 HCM patients: 49 missense mutations, 3 nonsense mutations, one 1-bp deletion, one 5-bp deletion, one in frame 3-bp deletion, one insertion/deletion, three splice mutations, one 5'UTR mutation in *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *CSRP3*, *MYH6* and *MYL2* genes. Significantly 22 of them were novel mutations. In conclusion, HRM was proven to be a high sensitive and low false positive technique

allowing, a rapid, innovative and low cost genotyping of HCM patients. In a short return, HRM could be a cost-effective gene-based diagnosis appropriate for an accurate HCM genetic diagnosis and hopefully providing new insights into genotype/phenotype correlations.

Keywords: Hypertrophic cardiomyopathy; Gene-based diagnosis; High Resolution Melting; Sarcomere proteins; *CSRP3* gene; Z-disc proteins

6.2. Anexo 2

Molecular Strategies for Hypertrophic Cardiomyopathy Genetic Analysis: correlation between genotyping and expression data

Santos, S. ^(1,2), **Freitas A.T.** ⁽³⁾, **Machado C.M.** ⁽⁴⁾, **Branco, P.** ⁽²⁾, **Silveira, L.** ⁽²⁾, **Carreira I.** ⁽⁵⁾, **Antunes, M.** ⁽⁶⁾,
Monteiro C ⁽¹⁾, **Fernandes, A.R.** ^(2,7)

¹Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal; ² Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal;;³INESC_ID/IST, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal;⁴ Departamento de Informática, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal;⁵ Un. Citogenética e Diag.Pré-Natal, Fac. Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal;⁶Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal, ⁷Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Portugal

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is the most common hereditary cardiovascular disease. The benefits of a gene-based diagnosis for both basic research and clinical medicine are limited by the high considerable costs of current genetic testing strategy due to the elevated number of genes and mutations involved in HCM. We demonstrate coupling Mass Spectrometry Genotyping and High Resolution Melting as a new strategy for HCM diagnosis. This strategy allowed us to identify HCM known mutations and several new mutations in sarcomere and cytoskeleton genes including a mutation in CSRP3 gene, not usually studied in current HCM genetic diagnosis. In a new approach we hypothesized that sarcomere gene transcripts represent molecular markers for HCM evaluation being gene expression profile an indicator of the cardiac remodeling process. Real-Time analysis of sarcomere genes have been done using RNA extracted from interventricular septum and skeletal biopsies from HCM patients. Unsupervised machine learning methods were used to distinguish differences between groups of patients, tissues and genes. Clustering algorithms revealed two main groups both with a strong correlation between the genomic expression pattern in cardiac and skeletal muscles for MYH7 and TNNI3 genes. The transcriptional differences between the two group clusters could be due to different morphologic HCM features and to DNA genetic profile. Moreover, the correlation (sarcomere-skeletal) transcriptional profile will allow the inference of skeletal muscle as a valid biomarker of HCM. Together the new genotyping strategy and the establishment of a correlation of the genetic-transcriptional profile will have important implications for HCM clinical management and prognosis.

6.3. Anexo 3

Unsupervised analysis of HCM sarcomere gene expression data

Santos, S. ^(1, 2, 3), Fernandes, A.R. ^(2, 3), Freitas A.T. ⁽⁴⁾, Machado C.M. ⁽⁵⁾, Branco, P. ⁽²⁾, Silveira, L. ⁽²⁾,
Carreira I. ⁽⁶⁾, Antunes, M. ⁽⁷⁾, Monteiro C ⁽¹⁾

¹Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal; ² Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; ³Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Portugal; ⁴ INESC_ID/IST, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal; ⁵Departamento de Informática, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal; ⁶Un. Citogenética e Diag.Pré-Natal, Fac. Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; ⁷Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is the most common hereditary cardiovascular disease. It is hypothesized that sarcomere transcripts might represent molecular markers for HCM evaluation. RT analysis of sarcomere genes have been done in 30 HCM patients using RNA from interventricular septum and skeletal biopsies. Unsupervised machine learning methods were used to distinguish differences between groups of patients, tissues and genes. Clustering algorithms were tested, i.e., hierarchical clustering, using Average and Complete link algorithms and Euclidean and Pearson distance measures, as well as K-means with several K. Clustering analysis identified two different gene expression patterns between patients and two groups have been defined. Statistical analyses revealed a strong correlation between the genomic expression pattern in cardiac and skeletal muscles for MYH7 and TNNI3 genes in both patient groups. The transcriptional differences between the two clusters could be due to different morphologic HCM features and to DNA genetic profile. Also, the correlation (sarcomere-skeletal) transcriptional profile will allow the inference of skeletal muscle as a valid biomarker of HCM. Of most importance we intend to establish an association with the clinical profile so we can clearly propose that cardiac and skeletal sarcomere transcriptional variants could be considered as molecular biomarkers of HCM pathobiology.

In this study it is hypothesized that sarcomere transcripts represent molecular markers for Hypertrophic Cardiomyopathy evaluation being gene expression profile an indicator of the cardiac remodeling process. This assumption will have important implications for clinical management and prognosis

6.4. Anexo 4

HCM sarcomere gene expression analysis: a machine learning approach

Santos, S. ^(1, 2, 3), **Fernandes, A.R.** ^(2, 3), **Machado C.M.** ⁽⁴⁾, **Branco, P.** ⁽²⁾, **Silveira, L.** ⁽²⁾, **Carreira I.** ⁽⁵⁾,
Antunes, M. ⁽⁶⁾, **Monteiro C** ⁽¹⁾

¹Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal; ² Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; ³Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Portugal; ⁴ Departamento de Informática, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal; ⁵ Un. Citogenética e Diag.Pré-Natal, Fac. Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; ⁶Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is the most common hereditary cardiovascular disease. It is a primary disorder of the myocardium classically characterized by unexplained left ventricular hypertrophy and distinctive histopathologic features of myocyte disarray and interstitial fibrosis. HCM can present with mild symptoms of dyspnea and angina as well as sudden cardiac death. Clinical diagnosis can be difficult due to the range of clinical manifestations.

In this study it is hypothesized that sarcomere transcripts represent molecular markers for HCM evaluation in which gene expression profile could be an indicator of HCM's remodeling process. We aim to establish a representative HCM sarcomere gene expression in cardiac and skeletal muscles. The focus is to assess skeletal tissue for an accurate diagnosis and HCM patients monitoring.