



Ana Cláudia Ferreira Nunes

Licenciada

**Caracterização do perfil de expressão de microRNAs na
Miocardiopatia Hipertrófica**

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 dos Santos, Professora Doutora,
Instituto Superior Técnico

Júri:

Presidente: Prof. Doutora José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues

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

Caracterização do perfil de expressão de microRNAs na Miocardiopatia Hipertrófica

Copyright Ana Nunes, 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 educativos ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Parte do trabalho apresentado nesta dissertação encontra-se incluído nas seguintes publicações em congressos internacionais:

Poster: Santos, S., Marques, V., Pires, M., Nunes, A.C., Gaspar, I.M., Brito, D., Madeira, H., Carreira, I., Monteiro, C., Fernandes, A.R. Hypertrophic Cardiomyopathy – From genes and transcripts to clinical profile. EuroPrevent, May 3-5 2012, Dublin, Irlanda.

Poster: Fernandes A.R., Marques, V., Nunes, A.C., Freitas, A.T., Gouveia M.R., Antunes, M., Carreira, I.M., Gaspar, I.M., Monteiro, C., Santos, S. Transcriptomic signature pattern for HCM for remodeling. II Florence International Symposium on Advances in Cardiomyopathies, September 26-28 2012, Florence.

Os posters apresentados encontram-se em anexo no final da dissertação.

Agradecimentos

Após este longo percurso com sabores, dissabores, alegrias, tristezas, mas, sobretudo muitas conquistas, existem agradecimentos que não posso deixar de fazer.

A nível institucional, quero agradecer à Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pela disponibilização de infraestruturas necessárias à realização deste trabalho.

Ao Instituto de Medicina Legal de Coimbra, na pessoa da Dra. Rosa Gouveia, pela cedência das amostras saudáveis e patológicas que foram objecto de estudo desta tese.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, na pessoa da Dra. Isabel Carreira, agradeço a colaboração prestada.

À Prof. Ana Teresa Freitas, pela preciosa ajuda no tratamento de resultados e na análise bioinformática.

Às minhas orientadoras, Prof. Alexandra Fernandes e Prof. Susana Santos, por me terem recebido tão bem, pela confiança que tiveram no meu trabalho, por todos os ensinamentos transmitidos e por toda a disponibilidade que sempre demonstraram.

Aos meus colegas de laboratório, Ana, Daniel, Helena, Luís, Marina, Patrícia, Sónia e Vanda, pela alegria diária, companheirismo e pelo modo como me acolheram no laboratório. Agradeço especialmente à Marina e à Vanda, pelos conselhos, pela paciência que sempre tiveram para as minhas perguntas e para os meus desatinos nesta recta final, pela preciosa ajuda que me deram na realização deste trabalho e, principalmente, por me terem ensinado tantas coisas.

À Joana, que ao longo deste ano se demonstrou mais do que uma colega. Obrigada pelas conversas, pelos “abanões”, pelas discussões pertinentes sobre trabalho, pela amizade, por me ouvires e sobretudo por me compreenderes, mesmo quando não escolho o caminho certo.

À Filipa, pelos desabafos, pela força que sempre me deu, pelos momentos de brincadeira que só nós entendemos e que tanto me ajudaram a relaxar. Apesar de não estares sempre por perto, és-me muito, e sabes bem.

A todos os meus amigos do coração que conheci durante a licenciatura, entre eles o Filipe Alfaiate, a Joana Anjos, a Juliana Rochate, a Sofia Santos, o André Lourenço e muitos mais, cujos nomes são demasiados para escrever aqui e que, mesmo longe, sempre tentaram acompanhar o meu trabalho e tiveram uma palavra de força e incentivo.

Aos meus quatro fiéis companheiros, pelas brincadeiras que sempre me ajudaram a descontrair e a desanuviar. Obrigada rapazes, vão ser sempre uma grande parte da família!

Ao Emanuel, pela cumplicidade, pelo apoio nos momentos em que o desespero se começava a instalar,

pela amizade, pela dedicação, pelo esforço em ver-me bem e pela forma como me mima e me dá força para alcançar os meus objectivos.

À Lina e à “Zinha”, pelos conselhos, pela amizade, pelo carinho e por aquela palavra de conforto que eu sei sempre onde posso encontrar.

À minha grande irmã, Sara, pela ajuda preciosa que me deu na conclusão deste trabalho, pelos conselhos diários, pela companhia durante as longas noites de trabalho, pelas piadas, que sempre me põem um sorriso na cara, pela forma como, na maior parte das situações consegue apelar ao meu lado mais racional, pela amizade e pela cumplicidade, que são, sem dúvida, indiscritíveis por meio de palavras. Obrigada, por tudo!

E por último, mas em primeiro lugar no coração, aos melhores pais do mundo, pois sem eles nada disto seria possível. Obrigada pelo amor incondicional que nutrem por mim, que sabem que é, e sempre será mútuo, por serem o meu pilar, pelas palavras de força nas horas mais difíceis, por serem um exemplo na minha vida, por fazerem de tudo para me ver bem e para que eu alcance os meus objectivos, por caminharem sempre ao meu lado, pelo orgulho e confiança que têm em mim, mas sobretudo, por aquilo que um dia um senhor de bigode me disse “Os sonhos só se realizam se lutarmos por eles. Abdicar, adiar, ou simplesmente desistir é como ignorar todo um passado e acima de tudo hipotecar o futuro”. E desde esse dia, nunca mais me esqueci. Aqui está a concretização do meu sonho.

Às minhas avós, pelas grandes lições de vida.

RESUMO

A Miocardiopatia Hipertrófica (MH) é uma doença cardíaca genética com um padrão de transmissão autossómico dominante, que afecta 1:500 indivíduos. Caracteriza-se pelo espessamento do septo interventricular (SIV) e tem como principal causa mutações ao nível dos genes que codificam para proteínas do sarcómero cardíaco. A doença apresenta uma expressão fenotípica com uma elevada variabilidade, o que poderá resultar da combinação de diversos factores, entre eles, a expressão diferencial de microRNAs (miRNAs).

Os miRNAs são considerados importantes reguladores dos mecanismos celulares e moleculares de doença, interagindo ao nível do mRNA ou da proteína. São expressos diferencialmente em situações de hipertrofia cardíaca, podendo ser considerados anti- ou pro-hipertróficos.

O objectivo deste trabalho prendeu-se com a caracterização do perfil de expressão de miRNAs em amostras de SIV de doentes com diagnóstico de Miocardiopatia Hipertrófica Obstrutiva (MHO), a forma mais severa de MH, de modo a identificar os miRNAs associados ao desenvolvimento de MHO. A correlação destes resultados com o perfil de expressão de genes sarcoméricos e com os resultados de genotipagem dos doentes poderá contribuir para esclarecer a heterogeneidade fenotípica típica da MHO.

A análise de expressão genética de 739 miRNA permitiu identificar uma diminuição (100-1000x) do miR-10a, miR-647, miR-371-3p, miR-617 e o miR-220b e um aumento da expressão (na mesma ordem de grandeza) do miR-518f* e miR-518c*. O perfil de sub-expressão obtido para a maioria dos miRNAs poderá ser relacionado com o perfil de sobre-expressão denotado para os mRNA de genes codificantes de proteínas sarcoméricas. Por sua vez o perfil de expressão de diferentes miRNAs foi relacionado com o perfil mutacional e com o perfil clínico dos doentes.

Este estudo pioneiro e a sua aplicação a um número mais elevado de doentes irá permitir estabelecer importantes correlações entre o perfil clínico, genético e transcritómico. Esta correlação é de extrema importância na estratificação de risco da MH.

Palavras – Chave: Miocardiopatia Hipertrófica, MicroRNAs, septo interventricular, PCR em Tempo Real, Perfis de Expressão Genética Diferenciais

ABSTRACT

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is a cardiac genetic disease that presents an autosomal dominant transmission pattern, which affects 1:500 individuals. It is characterized by thickening of the interventricular septum (IVS) and is mainly caused by mutations on genes that encode proteins of the cardiac sarcomere. The disease presents a very variable phenotypic expression that may arise from the combination of several factors, such as the differential expression of microRNAs (miRNAs).

miRNAs are considered important regulators of cellular and molecular mechanisms in disease, interacting either at mRNA or protein level. They are differentially expressed in cardiac hypertrophy and can be considered pro- or anti-hypertrophic.

The aim of this work was to characterize the expression profile of miRNAs in IVS samples of patients diagnosed with hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM), the most severe form of HCM in order to identify miRNAs involved in development of HOCM. The correlation of these data with the expression profile of sarcomeric genes and the genotyping results may explain the typical phenotypic heterogeneity of HOCM.

Gene expression of 739 miRNAs allowed the detection of downregulated (100-1000x) miRs, namely: miR-10a, miR-647, miR-371-3p, miR-617 and miR-220b and upregulated miRs: (100-1000x) miR-518f* and miR-518c*. Overall, the vast majority of the evaluated miRNA are downregulated which may indicate a correlation with the mRNA upregulation of some sarcomeric genes. Moreover, both the mutational and clinical profiles of each of the patients were correlated with miRNA expression.

This cutting-edge study and the future application of this work to a larger number of patients will allow to establish important correlations between the clinical, genetic and transcriptomic profile of HCM patients. Importantly, these correlations could be important regarding HCM risk stratification.

Key words: Hypertrophic Cardiomyopathy, MicroRNAs, Interventricular Septum, Real-Time PCR, Differential Gene Expression Profile;

Índice geral

	Página
Índice de figuras	xv
Índice de tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas	xix
Lista de Unidades	xxii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Miocardiopatia Hipertrófica: Manifestações Clínicas e Epidemiologia	1
1.2 – Sintomatologia e Diagnóstico Clínico	3
1.3 – Tratamento da MH	4
1.4 – MH como doença genética	4
1.5 – Fisiologia celular dos cardiomiócitos	6
1.5.1 – Mecanismo de contracção muscular	7
1.6 – Patofisiologia da MH - Mutações em genes que codificam para as proteínas do sarcómero	7
1.6.1 – Mutações no gene <i>MYH7</i>	8
1.6.2 – Mutações no gene <i>MYBPC3</i>	8
1.6.3 - Mutações no gene <i>TNNT2</i>	9
1.6.4 - Mutações no gene <i>TNNI3</i>	9
1.6.5 - Mutações no gene <i>TPM1</i>	9
1.7 – Diagnóstico genético	9
1.7.1 – Desnaturação de Alta Resolução (HRM)	10
1.8 – Heterogeneidade Genotípica e Fenotípica na MH	11
1.9 – miRNAs	12
1.9.1 – Biogénese de miRNAs	12
1.9.2 – Modo de acção dos miRNAs	15
1.9.3 – miRNAs no desenvolvimento cardíaco	15
1.9.4 – miRNAs na patologia cardíaca	16
1.9.5 – miRNAs na MH	17
1.9.5.1 –miRNAs anti -hipertróficos	18
1.9.5.2 – miRNAs pró-hipertróficos	20
1.10 – Perspectivas Clínicas e Potencial Terapêutico dos miRNAs	21
1.11 – Objectivo do trabalho	23
2 – MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 – Amostra populacional	25
2.2 – Extracção de ácidos nucleicos	25
2.2.1 – Extracção de RNA a partir de tecido cardíaco	26
2.2.2 – Extracção de DNA a partir de sangue periférico e tecido cardíaco	26
2.3 – Quantificação e avaliação da integridade de ácidos nucleicos	26
2.4 – Genotipagem das amostras	27
2.4.1 – <i>iPLEX MassArray</i>	27

2.4.2 – Desnaturação de Alta Resolução (HRM)	27
2.4.3 – Reacções de PCR e Sequenciação	29
2.5 – Análise Transcritómica	30
2.5.1 – PCR em Tempo Real (RT-PCR)	30
2.5.2 – Análise de Dados	31
2.5.3 – Construção do dendograma	31
2.6 – Estudo do perfil de expressão genética de miRNAs	31
2.6.1 – Síntese de cDNA	31
2.6.2 – Análise de expressão de miRNAs por <i>Real Time</i> -PCR	32
2.6.3 – Análise bioinformática	33
2.6.3.1 – Calibração utilizando o controlo endógeno (<i>U6snRNA</i> /miR-191)	33
2.6.3.2 - Calibração utilizando os calibradores inter-placa UniSp3IPC	33
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 – Avaliação da integridade do RNA	35
3.2 – Genotipagem das amostras	38
3.3 – Análise transcritómica	43
3.3.1 – Perfil de expressão dos genes sarcoméricos <i>MYH7</i> , <i>TNNT2</i> , <i>TNNI3</i> e <i>MYBPC3</i> no septo interventricular e apêndice auricular direito	44
3.4 – Análise do perfil de expressão genética de miRNAs	48
3.4.1 – Análise de Dados – Cálculo da média e desvio padrão nas amostras saudáveis	49
3.4.2 – Perfil de expressão global dos miRNAs	50
3.4.3 – miRNAs com variações de expressão entre 100x e 1000x	51
3.4.3.1 – Alvos dos miRNAs com variações de expressão entre 100x e 1000x	53
3.4.4 – miRNAs com variações de expressão inferiores a 100x	55
4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
5 – BIBLIOGRAFIA	65
6 – APÊNDICES	75
Apêndice 1 – Níveis de Expressão Genética de todos os miRNAs incluídos no estudo desta tese, para os três doentes	75
ANEXOS	xxiii

Índice de figuras

	Página
Figura 1.1- Características anatómicas e histológicas da MH.	2
Figura 1.2- Representação dos vários tipos de hipertrofia cardíaca.	3
Figura 1.3- Ritmos cardíacos no ECG.	3
Figura 1.4- Representação esquemática da estrutura de um sarcómero.	6
Figura 1.5- Representação esquemática da composição parcial de um sarcómero.	7
Figura 1.6- Gráfico representativo de uma curva de desnaturação da técnica de HRM.	11
Figura 1.7- Localização genómica dos miRNAs.	13
Figura 1.8-Biossíntese de miRNAs.	14
Figura 1.9- miRNAs envolvidos em diversas patologias cardíacas.	17
Figura 1.10- miRNAs anti- hipertróficos e pro-hipertróficos e respectivos alvos celulares	18
Figura 1.11- Representação esquemática da função dos <i>mimics</i> de miRNAs e antimirs.	22
Figura 3.1 – Electroferogramas resultantes da análise de integridade do RNA e representação de uma electroforese em gel desnaturante da mesma amostra de RNA.	36
Figura 3.2 – Gel de agarose (0,8% p/v) representativo da integridade do DNA nos doentes SIV108, SIV109 e SIV119.	39
Figura 3.3 – Identificação da mutação CD044989 na amostra SIV108 por HRM, <i>iPLEX MassArray</i> e SA.	40
Figura 3.4 – Resultado da genotipagem do doente SIV109 por <i>iPLEX MassArray</i> para a alteração CM031384 no exão 15 do gene <i>TNNT2</i> .	41
Figura 3.5 – Resultados de genotipagem do doente SIV119.	42
Figura 3.6 – Dendograma obtido a partir da análise transcritómica (RT-PCR) no tecido cardíaco SIV e AAD dos genes <i>MYH7</i> , <i>TNNT2</i> , <i>TNNI3</i> , e <i>MYBPC3</i> em 40 doentes.	44
Figura 3.7 – Perfis de expressão dos principais genes sarcoméricos <i>MYH7</i> , <i>TNNT2</i> ; <i>TNNI3</i> ; <i>MYBPC3</i> , nos dois tipos de tecido cardíaco (SIV e AAD) correspondentes aos doentes do <i>cluster III</i> , relativamente ao controlo saudável.	45
Figura 3.8 – Análise do PolyPhen-2 da mutação c.833 A> T; p. Asn278Ile no gene <i>TNNT2</i> identificada no doente SIV109.	47
Figura 3.9 - Análise do Polyphen-2 da mutação c.4472 C> G; p.Ser1491Cys, situada no exão 32 do gene <i>MYH7</i> no doente SIV119.	48
Figura 3.10 – Exemplo, para alguns miRNAs do Painel I e do Painel II, do cálculo da média e do desvio padrão entre as amostras saudáveis	50
Figura 3.11 – miRNAs com níveis de expressão com ordens de grandeza entre 100x e 1000x relativamente ao controlo saudável.	51
Figura 3.12 – miRNAs cujos níveis de expressão apresentaram ordens de grandeza inferiores a 100x relativamente ao controlo saudável para os doentes SIV108, SIV109 e SIV119.	56
Figura 6.1 - Gráficos relativos à expressão genética de todos os miRNAs que constam neste estudo nos doentes SIV108, SIV109 e SIV119.	87

Índice de tabelas

	Página
Tabela 1.1- Principais genes sarcoméricos associados a MH.	5
Tabela 2.1- Amostra populacional em estudo e respectiva informação clínica adicional.	25
Tabela 2.2- Condições reaccionais aplicadas na técnica de HRM.	28
Tabela 2.3- Programa de PCR-HRM.	28
Tabela 2.4- Condições reaccionais utilizadas na reacção de PCR.	29
Tabela 2.5- Programa de PCR utilizado.	29
Tabela 2.6- Composição da mistura reaccional para a síntese de cDNA.	32
Tabela 2.7- Programa de <i>Real Time</i> -PCR utilizado.	32
Tabela 2.8- Composição da mistura reaccional sujeita a <i>Real Time</i> -PCR utilizada nos dois painéis.	33
Tabela 3.1 – Compilação dos valores de RIN e rácio de rRNA (28S/18S) para cada uma das amostras em estudo.	38
Tabela 3.2 - Quantificação de DNA extraído das amostras de tecido e sangue periférico dos três doentes.	39
Tabela 3.3 - Compilação dos resultados obtidos pelas técnicas de <i>iPLEX MassArray</i> , HRM e sequenciação automática aquando da genotipagem dos doentes SIV108, SIV109 e SIV119.	42
Tabela 3.4 – Genes alvos dos miRNAs identificados com expressão alterada nos doentes com MHO e proteína por eles codificada.	54
Tabela 3.5 - Análise comparativa dos níveis de expressão de alguns dos miRNAs com variações de expressão inferiores a 100x relativamente à amostra controlo saudável e que foram avaliados no decurso desta tese com outros estudos publicados.	57

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
a.a	Aminoácido
AAD	Apêndice auricular Direito
ABCB1	Gene que codifica para o membro 1 da subfamília B da <i>ATP-binding cassette</i>
Abs	Absorvância
ACTC1	Gene que codifica para a α -actina cardíaca
ACTN2	Gene que codifica para a α -actinina 2
AGO2	Proteína Argonauta 2
ANKRD1	Gene que codifica para o domínio 1 de repetição da anquirina
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina Tri-Fosfato, do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i>
au	do inglês, <i>approximately unbiased</i>
bp	do inglês, <i>boot strap probability</i>
C	Citosina
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C2ORF86	Gene que codifica para o <i>WD repeat-containing and planar cell polarity effector protein fritz homolog</i>
Ca²⁺	Di-catão de cálcio
CBX8	Gene que codifica para o homólogo 8 da cromobox
Cdc42	Proteína controladora de divisão celular 42, do inglês, <i>Cell division control protein 42</i>
cDNA	DNA complementar, do inglês, <i>Complementary DNA</i>
CSRP3	Gene que codifica para a proteína LIM do músculo cardíaco
Ct	do inglês, <i>Cycle treshold</i> – corresponde ao ciclo a partir do qual ocorre a intersecção entre a curva de amplificação e a linha de base
DGGE	electroforese em gel de gradiente desnaturante, do inglês, <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
dHPLC	cromatografia líquida desnaturante de alta resolução, do inglês, <i>denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês, <i>Deoxiribonucleic Acid</i>
dNTPs	desoxirribonucleósidos tri-fosfato
ECG	Electrocardiograma
ECO	Ecocardiografia cardíaca
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, do inglês, <i>Ethylenediamine tetra acetic acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina

GGTL3	Gene que codifica para o Precursor 4 da gama-glutamilttransferase
HOXA1	Gene que codifica para a Proteína da Homeobox A1
HRM	Desnaturação de alta resolução, do inglês, <i>High Resolution Melting</i>
IGF-1	Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1, do inglês, <i>Insulin like Growth Factor</i>
Ile	Isoleucina
LBD3	Gene que codifica para o domínio 3 de ligação à proteína LIM
LNA	Ácidos nucleicos não acessíveis, do inglês, <i>Locked Nucleic Acid</i>
MALDI-TOF	Matriz sujeita a laser de desorção/ionização – tempo de voo, do inglês, <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>
MD	Miocardiopatia Dilatada
MEF2	Factor promotor dos miócitos, do inglês <i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MH	Miocardiopatia Hipertrófica
MHO	Miocardiopatia Hipertrófica Obstrutiva
miRNA=miR	MicroRNA, do inglês, <i>MicroRNA</i>
MR	Miocardiopatia Restritiva
MYBPC3	Gene que codifica para a proteína C de ligação à miosina cardíaca
MYH6	Gene que codifica para a cadeia pesada α da miosina
MYH7	Gene que codifica para a cadeia pesada β da miosina
MYL2	Gene que codifica para a cadeia leve regulatória da miosina
MYL3	Gene que codifica para a cadeia leve essencial da miosina
MYLK2	Gene que codifica para a cinase 2 da cadeia leve da miosina
MYOZ2	Gene que codifica para a miozenina 2
NELF-A	Factor de alongação negativo, do inglês, <i>negative elongation factor A</i>
NFAT	Factor nuclear de células T activas do inglês, <i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NGS	Sequenciação de Nova Geração, do inglês, <i>New Generation Sequencing</i>
nt	nucleótidos
NTRK3	Gene que codifica para o Receptor Neurotrófico do tipo 3 da Tirosina-Cinase
ORF	Grelha aberta de leitura, do inglês, <i>Open Reading frame</i>
p-bodies	corpos de processamento de mRNA, do inglês, <i>mRNA processing bodies</i>
PCR	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pri-miRNA	miRNA primário
Rho-A	Proteína codificada pelo gene <i>RHOA</i> , do inglês, <i>Ras homolog gene family, member A</i>
RIN	Número de Integridade do RNA, do inglês, <i>RNA Integrity Number</i>
RISC	Complexo indutor do silenciamento de RNA, do inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i>

RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
mRNA	RNA mensageiro, do inglês, <i>messenger RNA</i>
rRNA	RNA ribossomal, do inglês, <i>ribosomal RNA</i>
RT – PCR	Reacção em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês, <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SA	Sequenciação automática
Ser	Serina
SIV	septo interventricular
SRF	Factor de resposta do soro, do inglês, <i>Serum Response Factor</i>
SSCP	polimorfismo de conformação de cadeia simples, do inglês, <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
T	Timina
TCAP	Gene que codifica para a teletonina
THRAP1	Proteína 1 associada ao receptor da hormona da tiróide, do inglês, <i>Thyroid Hormone Receptor Associated Protein 1</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TNK2	Gene que codifica para o não receptor 2 da tirosina cinase
TNNC1	Gene que codifica para a troponina cardíaca C
TNNI3	Gene que codifica para a troponina cardíaca I
TNNT2	Gene que codifica para a troponina cardíaca T
TPM1	Gene que codifica para a α -tropomiosina
TR	receptor da hormona tiroideia, do inglês, <i>thyroid hormone receptor</i>
TRBP	Proteína do complexo RISC, do inglês, <i>RISC-loading complex subunit TARBP</i>
TRIM63	Gene que codifica para <i>Muscle RING Finger Protein 1</i>
Trx1	proteína Tio redoxina 1, do inglês, <i>Thioredoxin 1</i>
TTN	Gene que codifica para a titina
Twf1	proteína <i>Twinfilin-1</i>
UTR	região não traduzida, do inglês, <i>untranslated region</i>
VCL	Gene que codifica para a vinculina
X	vezes
ZNF213	Gene que codifica para a proteína <i>zinc finger 213</i>
α	alfa
α-MHC	cadeia pesada α da miosina
β	beta

Lista de Unidades

% (p/v)	percentagem peso/volume
FU	Fluorescência
g	Gramas: mg – miligrama (10^{-3} g); ng – nanograma (10^{-9} g);
h	hora
L	Litro: ml - mililitro (10^{-3} L); μL - microlitro (10^{-6} L)
M	Molar: mM - milimolar (10^{-3} M)
m	Metro: cm – centímetro (10^{-2} m); mm – milímetro (10^{-3} m); μm – micrómetro (10^{-6} m); nm – nanómetro (10^{-9} m);
min	Minutos
°C	Graus Celsius
S	Unidade <i>Svedberg</i> (velocidade de sedimentação)
seg	Segundos
U	Unidades
V	Volts

1 – INTRODUÇÃO

As miocardiopatias são um grupo heterogéneo de doenças do músculo cardíaco associadas a disfunção mecânica e/ou eléctrica, nomeadamente alterações de espessura da parede cardíaca, contracção, relaxamento, condução e ritmo (Cecchi *et al.*, 2012; Maron e Maron, 2012; Maron *et al.*, 2006). São uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todas as idades, levando a progressiva insuficiência cardíaca ou à paragem cardiovascular (Cecchi *et al.*, 2012).

As miocardiopatias encontram-se divididas em dois grupos principais: as miocardiopatias primárias (genéticas, não genéticas, adquiridas) e as miocardiopatias secundárias (em que ocorre o envolvimento patológico do miocárdio numa grande variedade de desordens sistémicas) (Maron *et al.*, 2006). As miocardiopatias primárias são aquelas predominantemente confinadas ao músculo cardíaco, entre as quais se encontram a Miocardiopatia Dilatada (MD), Miocardiopatia Restritiva (MR), Não-Compactação Ventricular Esquerda, Displasia Ventricular Direita Arritmogénica e Miocardiopatia Hipertrofica (MH), que será abordada neste trabalho (Hershberger *et al.*, 2009; Maron *et al.*, 2006).

1.1- Miocardiopatia Hipertrofica: Manifestações Clínicas e Epidemiologia

A MH, como referido acima, é uma desordem primária do miocárdio de origem genética e clinicamente heterogénea que demonstra uma enorme diversidade relativamente à idade de início, evolução da doença, severidade dos sintomas e risco de morte súbita (Ho, 2010). Com um padrão de transmissão autossómico dominante e afectando 1:500 indivíduos na população geral, a MH é considerada a principal causa de morte súbita entre jovens e atletas (Ho, 2012; Pezzoli *et al.*, 2012; Maron *et al.*, 2009). As características histopatológicas da MH são bastante diversas e incluem hipertrofia ventricular (Fig. 1.1), tipicamente concêntrica e assimétrica que envolve particularmente o septo interventricular (SIV), com consequente diminuição do volume da cavidade ventricular (Olivotto *et al.*, 2012; Morimoto, 2008). Microscopicamente é visível uma hipertrofia ao nível dos cardiomiócitos acompanhada de um desarranjo fascicular da sua arquitectura – *disarray* - e fibrose intersticial (Fig. 1.1), presente maioritariamente na zona do SIV, mas que se estende por todo o músculo cardíaco (Ho, 2010; Marian, 2010; Seidman e Seidman, 2011).

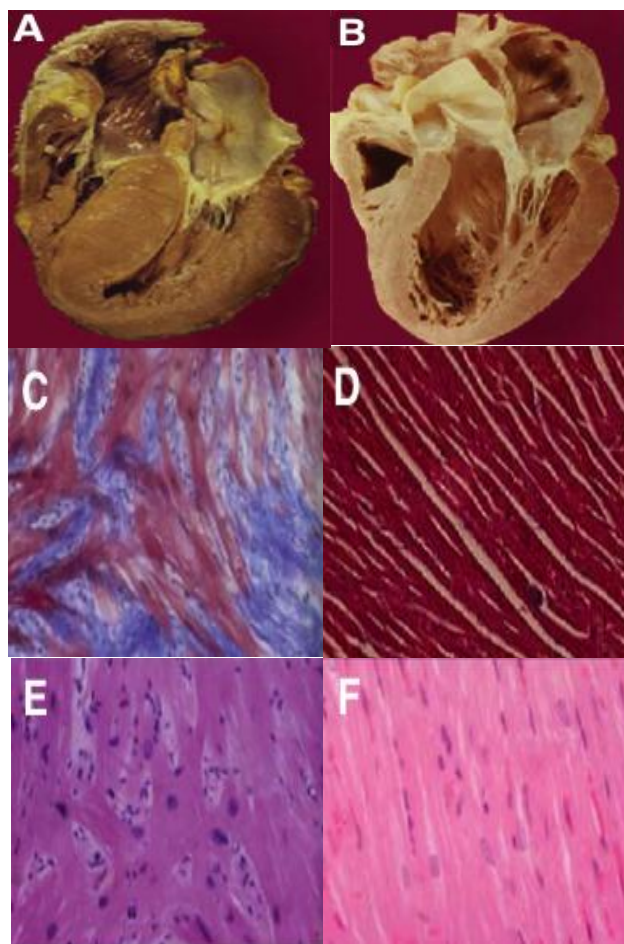


Figura 1.1 – Características anatómicas e histológicas da MH. (A) Peça anatómica de um coração de um indivíduo com MH com hipertrofia ventricular esquerda evidente; (B) Peça anatómica de um coração de um indivíduo saudável; (C) Com a coloração Tricrómio de Masson, quando em comparação com tecido saudável (D), é evidente o aumento da fibrose intersticial (corado a azul) bem como o *disarray* dos cardiomiócitos; (E) corte histológico de miocárdio com MH corado com Hematoxilina e Eosina verificando-se o padrão característico desta patologia: hipertrofia dos cardiomiócitos, desarranjo fascicular (*disarray*) e fibrose intersticial; (F) Corte histológico de miocárdio saudável corado com Hematoxilina e Eosina (Adaptado de Ahamad *et al.*, 2005).

Existem diversos tipos de hipertrofia cardíaca, classificados de acordo com a localização da mesma no ventrículo esquerdo (Fig.1.2), nomeadamente: MH septal assimétrica, MH obstrutiva, MH apical e MH localizada no centro do ventrículo esquerdo (Fonte: www.medscape.com, acessado em Julho de 2012).

A Miocardiopatia Hipertrofica Obstrutiva (MHO), que será abordada neste trabalho, é um tipo de hipertrofia cardíaca em que, devido ao espessamento do miocárdio, a passagem do fluxo sanguíneo pela válvula mitral é bloqueada, provocando refluxo sanguíneo (Figura 1.2 B) (Olivotto *et al.*, 2009; Ho, 2010; Marian, 2010).

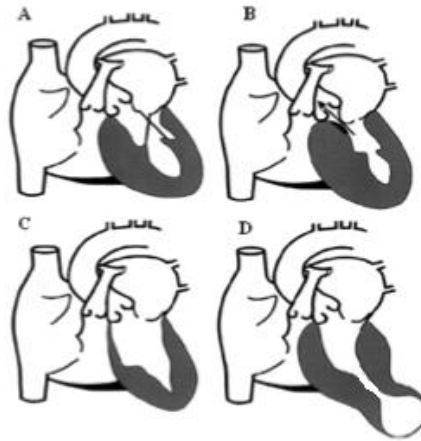


Figura 1.2 – Representação dos vários tipos de hipertrofia cardíaca. A) MH septal assimétrica; B) MH Obstrutiva; C) MH apical; D) MH localizada no centro do ventrículo esquerdo (Adaptado de Graham-Cryan *et al.*, 2004).

1.2 – Sintomatologia e Diagnóstico Clínico

Uma elevada percentagem dos doentes com MH permanecem assintomáticos ou apresentam sintomas moderados durante grande parte da sua vida (Marian, 2010). A dispneia e dor no peito são os sintomas mais recorrentes, sendo que, em muitos casos, um dos primeiros sintomas é a morte súbita cardíaca. São também comuns palpitações, que muitas vezes estão associadas a tonturas e ocasionalmente a fenómenos de síncope (Marian, 2010). O diagnóstico clínico da MH pode ser feito com recurso ao electrocardiograma (ECG), onde se identificam padrões anormais (Fig.1.3), como alterações da repolarização, ondas T invertidas e ondas Q profundas (Maron e Maron, 2012; Elliot e McKenna, 2004).

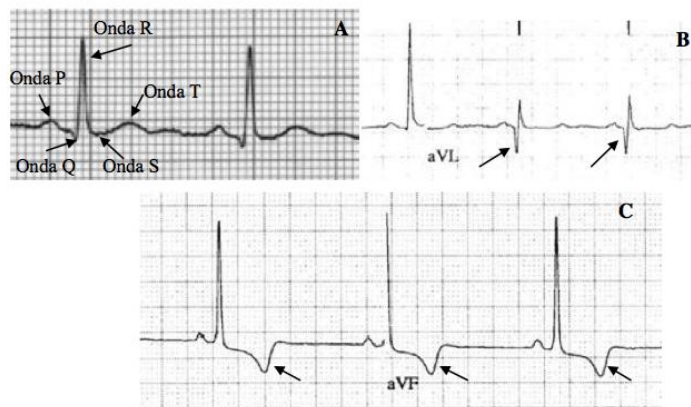


Figura 1.3 – Ritmos cardíacos no ECG. A) Padrão de ECG de um indivíduo saudável. B) Padrão de ECG de doente com MH com ondas Q profundas. C) Padrão de ECG de doente com MH com ondas T invertidas (Adaptado de Kelly *et al.*, 2007).

A MH pode também ser diagnosticada através de ecocardiografia cardíaca (ECO) bidimensional, onde é possível visualizar a hipertrofia ao nível da parede do ventrículo esquerdo e do SIV. Em indivíduos com MH, a hipertrofia pode variar entre moderada (13-15 milímetros (mm)) a severa

(superior a 30mm). Através deste método é também possível avaliar se ocorre obstrução parcial do fluxo sanguíneo a partir do ventrículo esquerdo (Maron e Maron, 2012; Olivotto *et al.*, 2009). Outra das técnicas utilizadas no diagnóstico da doença é a ressonância magnética cardíaca com contraste de *gadolinium* que fornece imagens tomográficas do ventrículo esquerdo hipertrofiado, possibilitando a detecção do aumento de fibrose (Uretsky, 2012; Ho, 2011). A melhor resolução espacial da ressonância magnética pode também ajudar a detectar uma hipertrofia subtil, pois permite obter imagens da parede externa do ventrículo esquerdo, do ápice ou da base inferior (Ho, 2011). Como a penetrância da doença é dependente da idade, alguns membros da família podem não expressar fenótipo no momento em que o ECG e/ou ECO são realizados, sendo assim necessária a avaliação periódica dos membros da família não afectados, dado que poderão vir a desenvolver MH ao longo da vida (Marian, 2010).

1.3– Tratamento da MH

A terapêutica médica é a abordagem de primeira linha para os doentes que apresentam sintomas, geralmente usando fármacos beta (β)-bloqueantes. O tratamento com β -bloqueantes melhora o relaxamento ventricular, aumenta o tempo de diástole e reduz a susceptibilidade a arritmias ventriculares e supraventriculares. De um modo geral os agentes farmacológicos utilizados actualmente, são parcialmente eficazes para o alívio sintomático. Contudo, não são eficazes na indução da regressão da hipertrofia cardíaca ou da fibrose presente na MH (Marian, 2010). Nos casos em que os doentes não apresentam uma melhoria dos sintomas e/ ou se verifica um aumento da hipertrofia cardíaca podem ser utilizadas abordagens invasivas, como a ablação septal com etanol absoluto ou a miectomia cirúrgica (Ho, 2010).

Doentes com a forma não obstrutiva da doença e aqueles que se encontram num estadio final da mesma devem ser tratados com terapia apropriada para insuficiência cardíaca avançada, nomeadamente através da implantação de um desfibrilhador-cardioversor e, em casos mais graves, pode ser necessário recorrer ao transplante cardíaco (Ho, 2012; Ho, 2010).

1.4 –MH como doença genética

A MH é uma doença genética com um padrão de transmissão autossómico dominante causada maioritariamente por mutações nos genes que codificam para as proteínas do sarcómero cardíaco (**Tabela 1.1**), afectando o normal funcionamento do mesmo. Grande parte dos indivíduos afectados são heterozigóticos para uma mutação causadora de MH, sendo esta transmitida apenas por um dos progenitores. Pode dar-se o caso de ocorrerem duas ou mais mutações no mesmo indivíduo, originando situações de heterozigotia composta, onde se verificam duas mutações no mesmo gene; dupla heterozigotia, em que ocorrem duas mutações heterozigóticas em dois genes diferentes, o que leva ao desenvolvimento da doença em idade precoce, à presença de uma hipertrofia ventricular esquerda mais grave e a uma maior incidência de eventos de morte súbita cardíaca, tal como ocorre

nas situações de homozigotia, onde se verifica a mesma mutação nos dois alelos do mesmo gene (Girolami *et al.*, 2010; Kelly e Semsarian, 2009, Olivotto *et al.*, 2008).

Estão identificadas mais de 1000 mutações em mais de 30 genes, e em cerca de 80% dos casos estas mutações ocorrem nos genes que codificam para a cadeia pesada β da miosina (*MYH7*) e para a proteína C de ligação à miosina (*MYBPC3*) (Ho, 2010; Richard *et al.*, 2006). Em 5% dos casos as mutações afectam genes que codificam para as proteínas dos filamentos finos, nomeadamente a troponina T (*TNNT2*), troponina I (*TNNI3*) e a alfa (α)-tropomiosina (*TPMI*). Mutações noutros componentes dos filamentos grossos e finos do sarcómero levam também ao desenvolvimento de MH, nomeadamente mutações em genes codificantes para a cadeia pesada α da miosina (*MYH6*), troponina C (*TNNC1*), α -actina cardíaca (*ACTC1*), titina (*TTN*), cadeia leve regulatória da miosina (*MYL2*) e cadeia leve essencial da miosina (*MYL3*) (Force *et al.*, 2010; Maron e Maron, 2012). Nos últimos anos, mutações em genes que codificam para as proteínas do disco Z do sarcómero têm vindo a ser associadas ao desenvolvimento de MH, nomeadamente, nos genes *ACTN2* (que codifica para a α -actinina 2), *ANKRD1* (que codifica para o domínio 1 de repetição da anquirina) *CSRP3* (que codifica para a proteína LIM do músculo cardíaco), *LBD3* (que codifica para o domínio 3 de ligação à proteína LIM), *MYOZ2* (que codifica para a miozenina 2), *TCAP* (que codifica para a teletonina), *VCL* (que codifica para a vinculina) e *TRIM63* (que codifica para *Muscle RING Finger Protein 1*) (Bos e Ackerman, 2010; Chen *et al.*, 2012). Embora a MH seja considerada uma doença do sarcómero, existem genes que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo mitocondrial, respiração celular, sinalização do cálcio (Ca^{2+}) e com funções auxiliares ao sarcómero, cujas mutações, apesar de raras, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença (Ho, 2010; Keren *et al.*, 2008). Torna-se assim necessário perceber a fisiologia e o funcionamento do sarcómero cardíaco.

Tabela 1.1 – Principais genes sarcoméricos associados a MH. Para cada gene encontra-se descrito a sua localização cromossómica, a proteína por ele codificada e o número de mutações. Fonte: HGMD, acedido em Setembro de 2012.

Gene	Locus	Proteína codificada	Nº de mutações
<i>MYH7</i>	14q12	Cadeia pesada β da miosina	409
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	Proteína C de ligação à miosina cardíaca	403
<i>TNNT2</i>	1q32	Troponina T cardíaca	74
<i>TNNI3</i>	19q13.4	Troponina I cardíaca	63
<i>TPMI</i>	15q22.1	α – tropomiosina	31
<i>MYH6</i>	14q12	Cadeia pesada α da miosina	27
<i>TNNC1</i>	3p21.3-p14.3	Troponina C	13
<i>ACTC1</i>	15q11-q14	Actina Cardíaca	21
<i>TTN</i>	2q31	Titina	35
<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	Cadeia leve regulatória da miosina	15
<i>MYL3</i>	3p21.3-p21.2	Cadeia leve essencial da miosina	12

1.5 - Fisiologia celular dos cardiomiócitos

As fibras musculares cardíacas são compostas por unidades celulares, os cardiomiócitos, que se encontram ligados entre si, apresentando núcleos centrais e formando uma rede tridimensional complexa, mas bem organizada (Fatkin e Graham, 2002). Os sarcómeros são as unidades funcionais e estruturais das fibras musculares e são compostos por filamentos grossos e finos. Cada sarcómero tem aproximadamente 2,2 micrómetros (μm) de comprimento e encontra-se ligado ao sarcómero adjacente através dos discos Z (Marian e Roberts, 2001). Cada sarcómero contém uma banda A (Fig.1.4) (composta pela sobreposição de filamentos grossos e filamentos finos), com uma linha M central composta por filamentos grossos. Em cada lado da banda A existem bandas I que são compostas apenas por filamentos finos e que se encontram delimitadas pelos discos Z (Seidman e Seidman, 2011; Luther, 2009).

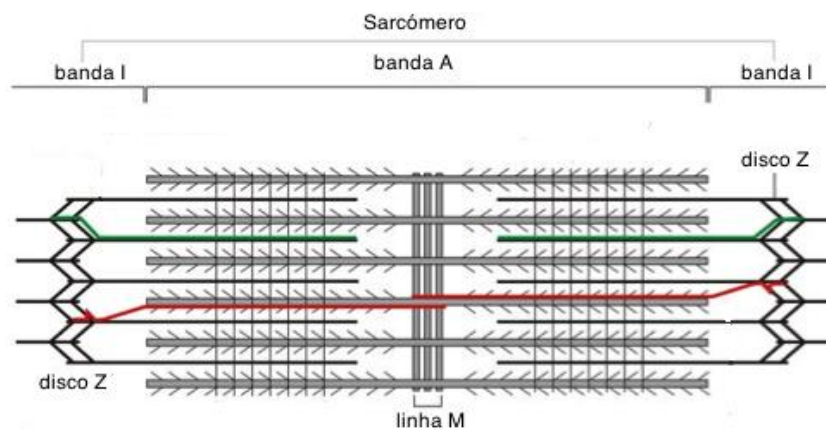


Figura 1.4 - Representação esquemática da estrutura de um sarcómero. Na figura é possível identificar, na zona central, a banda M composta por filamentos grossos, a banda I, composta por filamentos finos, a banda A, composta pela sobreposição dos filamentos grossos e finos, e os discos Z, que delimitam as bandas I (Adaptado de Luther, 2009).

Os filamentos grossos são compostos predominantemente pela cadeia pesada da miosina, pelas cadeias leves regulatória e essencial da miosina e pela proteína C de ligação à miosina. Os filamentos finos são compostos por actina cardíaca, α -tropomiosina e pelas troponinas C, I, e T (complexo das troponinas) (Fig.1.5) (Keren *et al.*, 2008). Outra proteína sarcomérica importante é a titina que se estende até metade do comprimento do sarcómero e possui uma extremidade ligada à linha M e a outra ao disco Z. A titina fornece elasticidade ao sarcómero e está envolvida na produção e transmissão de força (Marian e Roberts, 2001).

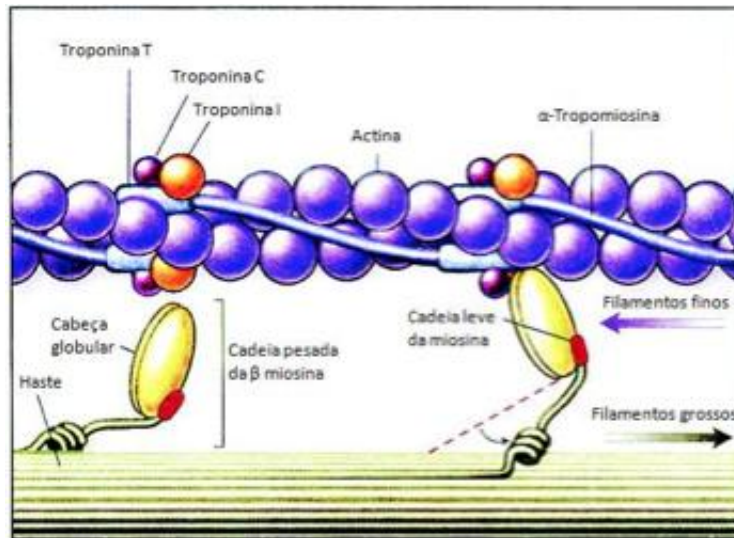


Figura 1.5 - Representação esquemática da composição parcial de um sarcómero (Adaptado de Seidman e Seidman, 2001).

1.5.1 – Mecanismo de contracção muscular

As interações complexas entre as proteínas sarcoméricas, reguladas pelo Ca^{2+} através do complexo troponina-tropomiosina, conduzem ao deslocamento dos filamentos finos pela cabeça globular da miosina, resultando no encurtamento do sarcómero e na consequente contracção muscular (Marian e Roberts, 2001). Em repouso, a interacção entre a actina e a miosina é inibida pela ligação da troponina I à α - tropomiosina, pois a α - tropomiosina está a bloquear o local de ligação da actina à miosina. A contracção começa devido à libertação de Ca^{2+} a partir do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} liga-se à troponina C e gera uma alteração conformacional, que vai enfraquecer a interacção entre a troponina I e a α -tropomiosina, libertando-a da ligação à actina e fortalecendo a interacção entre as troponinas C e I (Seidman e Seidman, 2001). Estas alterações conformacionais vão provocar a exposição do local de ligação entre a actina e a miosina, promovendo a sua interacção, ficando a actina fortemente ligada à cabeça da miosina. De seguida, uma molécula de adenosina tri-fosfato (ATP) liga-se à cabeça da miosina e provoca nesta uma alteração conformacional dos seus locais de ligação à actina, fazendo com que a miosina se desloque ao longo do filamento de actina. A hidrólise de ATP leva à geração de força e a conformação inicial da miosina não ligada à actina é restaurada (Fatkin e Graham, 2002). A força gerada é transmitida ao citosqueleto dos miócitos através do complexo de proteínas como a proteína C de ligação à miosina, titina e distrofina. A contracção muscular termina quando ocorre a diminuição da concentração de Ca^{2+} citoplasmático (Seidman e Seidman, 2001).

1.6 – Patofisiologia da MH: Mutações em genes que codificam para as proteínas do sarcómero

A hipertrofia cardíaca na MH é provocada principalmente por mutações nos genes codificantes de

proteínas sarcoméricas afectando a activação de várias vias de sinalização relacionadas com a função mecânica, eléctrica e com a geração de força. As mutações genéticas influenciam a estrutura das proteínas do sarcómero ou o seu nível de expressão, que por sua vez afecta as funções celulares e moleculares levando a perturbações na geração e transmissão de força, homeostase do Ca^{2+} intracelular e do metabolismo cardíaco (Frey *et al.*, 2012; Ho, 2010; Marian, 2008). Na MH, a maioria das mutações em heterozigotia são mutações *missense*, ou seja, que levam à substituição de um aminoácido (a.a.) por outro diferente durante a tradução. A maioria das mutações *missense* origina proteínas mutantes estáveis sendo que, tanto a proteína mutada como a normal são expressas. A proteína mutada é incorporada no sarcómero e interfere com a função da proteína normal, produzindo um efeito dominante negativo na estrutura ou na função sarcoméricas, designado efeito do péptido tóxico, conduzindo ao desenvolvimento da patologia (Keren *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2006; Seidman e Seidman, 2001). São também comuns as *mutações nonsense*, que ocorrem quando determinado codão é substituído por um codão de terminação, ocorrendo a formação de uma proteína truncada e subsequentemente perda de domínios de importância funcional (Konno *et al.*, 2006).

Também se conhecem inserções e deleções de nucleótidos, que se forem em número diferente de três (ou múltiplo de três), provocam mutações em *frameshift*, que levam a alterações da grelha de leitura (van Driest *et al.*, 2004). As mutações em *frameshift* sugerem um mecanismo de haploinsuficiência em que ocorre a produção de um transcrito instável ou de uma proteína truncada incapaz de se incorporar no sarcómero, funcionando como um alelo nulo. A proteína produzida pelo alelo normal poderá não ser suficiente para manter a função normal do sarcómero (Keren *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2006; Roberts e Sigwart, 2001). Ocorrem também mutações em regiões de *splicing*, podendo gerar proteínas truncadas (Konno *et al.*, 2006).

1.6.1 – Mutações no gene MYH7

O gene *MYH7* codifica para a cadeia pesada β da miosina. É composto por 41 exões, 38 dos quais codificam para uma proteína de 1935 a.a. (Fatkin e Graham, 2002). É a maior proteína contráctil do músculo cardíaco e tem dois domínios funcionais: uma cabeça globular com a região N-terminal e uma haste (Ho, 2010). O domínio da cabeça liga-se ao ATP e tem actividade de ATPase que exerce força contráctil, e o domínio de ligação à actina para formar o complexo actina-miosina é crucial para a geração de força. A haste com a região C-terminal interage com as cadeias leves da miosina (Ho, 2010). Mutações no gene *MYH7* estão normalmente associadas a uma hipertrofia moderada a severa, com elevada penetrância e prognóstico variável (Keren *et al.*, 2008).

1.6.2 – Mutações no gene MYBPC3

O gene *MYBPC3*, que codifica para a proteína C de ligação à miosina, tem 37 exões, sendo que 34 destes codificam para uma proteína de 1274 a.a., a isoforma cardíaca da proteína C de ligação à

miosina, expressa exclusivamente no coração (Cardim *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2004). A sua função não é clara, mas pensa-se que proporciona uma integridade estrutural ao sarcómero, desempenhando um papel na montagem sarcomérica e modulando a actividade de ATPase da miosina e a contractilidade cardíaca (Ho, 2010). Apesar de ocorrerem mutações *missense*, as mais comuns neste gene são as mutações *nonsense* (levam à terminação prematura da tradução), mutações de *splicing* e pequenas inserções ou deleções, dando origem a uma proteína truncada ou a um alelo nulo (Morimoto, 2008; Richard *et al.*, 2006; Cardim *et al.*, 2005). Mutações no gene *MYBPC3* estão normalmente associadas a um início tardio da doença, mas também são atribuídas como causa da doença em idade pediátrica e apresentam uma baixa penetrância e um melhor prognóstico quando comparadas com mutações nos genes *MYH7* e *TNNT2* (Niimura *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2008).

1.6.3 – Mutações no gene *TNNT2*

A troponina T, proteína codificada pelo gene *TNNT2*, é expressa no coração durante o desenvolvimento embrionário, na fase adulta e durante o desenvolvimento do músculo esquelético. O gene que codifica para a troponina T é composto por 16 exões e a sua isoforma principal no coração adulto possui 288 a.a. com dois domínios principais, em que um deles interage com a α -tropomiosina e o outro liga-se tanto à α -tropomiosina, como à troponina C, e troponina I (Fatkin e Graham, 2002). Doentes com mutações em *TNNT2*, apesar de não apresentarem características histopatológicas severas, têm um maior risco de sofrer morte súbita cardíaca (Keren *et al.*, 2008).

1.6.4 – Mutações no gene *TNNI3*

O gene *TNNI3* é composto por 8 exões que codificam para a troponina I cardíaca, que é constituída por 210 a.a. e é expressa apenas no tecido cardíaco (Fatkin e Graham, 2002). Mutações neste gene são a causa de aproximadamente 5% dos casos de MH e estão associadas a uma expressão da doença bastante heterogénea e tardia, com prognóstico variável (Keren *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2003).

1.6.5 - Mutações no gene *TPMI*

O gene *TPMI*, que codifica para a α -tropomiosina, é constituído por 15 exões originando múltiplas isoformas proteicas a partir de *splicing* alternativo. A isoforma cardíaca da α -tropomiosina é composta por 284 a.a. e tem dois locais de ligação à troponina T, um dos quais é sensível ao Ca^{2+} (Fatkin e Graham, 2002). As mutações em *TPMI* são raras e estão associadas a uma forma leve de MH e de início precoce, mas caracterizada por um mau prognóstico devido à possível evolução para insuficiência cardíaca e a eventos de morte súbita (Jongbloed *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2003).

1.7 – Diagnóstico Genético

A necessidade de estratificação de risco de doentes com MH e a manutenção do estado clínico dos mesmos, levaram a que se recorresse a testes genéticos para auxiliar o diagnóstico clínico de MH

(Force *et al.*, 2010). Através deste tipo de testes é possível obter a confirmação genética da doença em doentes com características clínicas de MH (Frey *et al.*, 2012).

Os testes genéticos utilizados baseiam-se em técnicas como SSCP (polimorfismo de conformação de cadeia simples, do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*), dHPLC (cromatografia líquida desnaturante de alta resolução, do inglês *denaturing High-Performance Liquid Chromatography*), DGGE (electroforese em gel de gradiente desnaturante, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e sequenciação automática (SA, do inglês, *Automated dideoxysequencing*) do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Desoxiribonucleic Acid*) (Ingles *et al.*, 2005; Arad *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2002).

Nos últimos anos a técnica *gold standard*, não só em Portugal, mas em todo o mundo é a SA dos principais genes envolvidos na MH (Brito *et al.*, 2012; Maron e Maron, 2012). O facto desta técnica não incluir a análise de todos os genes associados a MH mas apenas os quatro principais genes sarcoméricos (*MYH7*, *TNNT2*, *MYBPC3* e *TNNI3*), deixando de fora genes que codificam para outras proteínas implicadas na contracção cardíaca, como por exemplo, as proteínas do disco Z, leva a que cerca de 1/3 dos doentes fiquem por caracterizar (Santos *et al.*, 2012). Como consequência foram procuradas técnicas alternativas, tais como *iPLEX MassArray* com análise por espectrometria de massa MALDI-TOF (espectrometria de massa de matriz sujeita a laser de dessorção/ionização – tempo de voo, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization –time of flight Mass Spectrometry*), e a técnica de HRM (Desnaturação de Alta Resolução, do inglês, *High Resolution Melting*) (Santos *et al.*, 2011, 2012; Pires, 2011; Marques, 2010). Futuramente, apesar dos elevados custos associados, outra das técnicas bastante promissoras para o diagnóstico de MH é a Sequenciação de Nova Geração (NGS, do inglês, *New Generation Sequencing*) (Xu *et al.*, 2012).

1.7.1 – Desnaturação de Alta Resolução (HRM)

A técnica de HRM baseia-se num PCR (reacção em cadeia da polimerase, do Inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real permitindo o rastreio de alterações genéticas em genes causadores de doença em várias amostras em simultâneo. Esta técnica depende das propriedades diferenciais de desnaturação de sequências que variam em pelo menos um nucleótido e proporciona um reduzido risco de contaminação aliado a um tempo de análise diminuto, não havendo necessidade de manipulação da amostra pós-PCR (Santos *et al.*, 2012; Stoep *et al.*, 2009).

O procedimento experimental consiste num passo de amplificação das amostras em estudo através de um PCR na presença de um fluoróforo saturante que intercala DNA em cadeia dupla. No final do PCR inicia-se o passo de HRM propriamente dito em que os produtos de amplificação são rapidamente desnaturados e posteriormente renaturados, permitindo a formação de duplexes. Se a amostra for heterozigótica formar-se-ão quatro duplexes: dois homoduplexes (híbridos perfeitamente complementares) e dois heteroduplexes (híbridos não totalmente complementares) (Montgomery *et*

al., 2007; Reed *et al.*, 2007). Posteriormente a temperatura é aumentada gradualmente, sendo a fluorescência emitida monitorizada de forma contínua. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência diminui, até ocorrer a desnaturação total da dupla cadeia de DNA. Esta desnaturação dá se a uma determinada temperatura, a temperatura de *melting* (T_m , do inglês *melting temperature*) característica de cada amplicão e dependente do seu conteúdo em GC (guanina+citosina), comprimento e sequência nucleotídica (Reed *et al.*, 2007). Como os heteroduplexes são menos estáveis que os homoduplexes, desnaturam mais rapidamente (Fig.1.6). As alterações nos amplicões são detectadas devido ao seu perfil de desnaturação alterado, relativamente ao observado para amostra controlo (Roche Diagnostics (www.roche-appliedscience.com)).

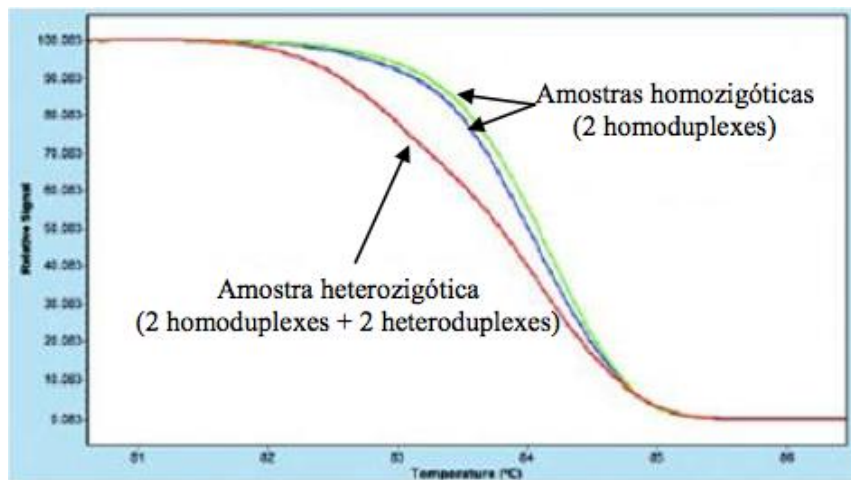


Figura 1.6 – Gráfico representativo de uma curva de desnatuação da técnica de HRM. Nas amostras heterozigóticas a forma da curva de desnatuação é diferente dado que, esta é uma composição dos componentes homoduplexes e heteroduplexes (Roche Diagnostics).

No entanto, a técnica de HRM indica apenas se a amostra em estudo apresenta ou não uma alteração no perfil de desnatuação para uma dada região de DNA. Caso a alteração se verifique, esta técnica terá depois de ser aliada à SA dessa região para determinar exactamente qual a alteração nucleotídica inerente ao perfil de desnatuação anómalo para o amplicão em causa (Tindall *et al.*, 2009). Desta forma, é perceptível que com esta técnica se evite sequenciar uma série de amplicões em que não se detecte qualquer alteração em relação a amostras controlo sem alterações, tornando a análise de muitos genes, rápida e muito mais económica (Santos *et al.*, 2011, 2012).

1.8 - Heterogeneidade Genotípica e Fenotípica na MH

Tal como a heterogeneidade genética que se verifica ao nível alélico e não alélico na MH, também a expressão fenotípica da doença apresenta grande variabilidade (Ho, 2010; Marian, 2008). Indivíduos da mesma família possuindo a mesma mutação causal podem apresentar diferenças consideráveis na severidade da hipertrofia cardíaca. A variabilidade na expressão fenotípica da MH tem como causa a combinação de vários factores, nomeadamente a heterogeneidade das mutações nos genes causais, a

presença de múltiplas variantes funcionais nas proteínas sarcoméricas, expressão de genes modificadores, fenocópias, factores epigenéticos, modificações pós-traducionais de proteínas (fosforilações, acetilações e glicosilações), factores ambientais e microRNAs (miRNA, do Inglês (Marian, 2008).

A descoberta dos miRNAs veio reforçar o entendimento dos mecanismos de patogénese de muitas doenças. Os estudos sobre a importância dos miRNAs na MH têm posto a descoberto perfis de expressão diferenciais destes pequenos RNAs não codificantes nos mecanismos de doença (Cheng *et al.*, 2007; Sayed *et al.*, 2007).

1.9 – miRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de ácido ribonucleico (RNA) em cadeia simples, não codificantes, com cerca de 22 nucleótidos (nt), que actuam como reguladores da expressão genética, em plantas e animais, ao nível pós-transcricional, através da clivagem de um RNA mensageiro (mRNA) alvo ou da repressão da tradução (Bartel, 2004).

O primeiro miRNA, *lin-4*, foi descrito em 1993 pelo grupo de Rosalind Lee associado à regulação do desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee *et al.*, 1993). *lin-4* regulava negativamente o nível da proteína *LIN-14* (da primeira fase larvar), criando uma diminuição da expressão da mesma ao longo do tempo (Lee *et al.*, 1993).

Sete anos após a descrição de *lin-4*, ocorreu a descoberta do segundo miRNA, *let-7*, também no mesmo organismo modelo (Reinhart *et al.*, 2000). Verificou-se que este miRNA actuava ao nível pós-transcricional e apresentava complementaridade parcial com a região 3' não traduzida (3'-UTR) do mRNA *LIN-41* (Lee e Ambros, 2001; Reinhart *et al.*, 2000).

Os miRNAs foram mais tarde descritos em humanos, o que fez com que fosse validada a hipótese de que este mecanismo regulador poderia estar envolvido na regulação de importantes funções celulares (Lagos-Quintana *et al.*, 2001).

Até o momento, mais de 17000 sequências de miRNAs em mais de 140 espécies diferentes foram catalogadas na *miRBase* (<http://www.mirbase.org/>), número este que tem aumentado exponencialmente, e nos últimos três anos quase triplicou (Kozomara e Griffiths-Jones, 2011).

1.9.1 – Biogénese de miRNAs

Os miRNAs são filogeneticamente conservados e podem ter várias localizações no genoma (Fig. 1.7) (Olena e Patton, 2010; Kim e Nam, 2006). Os miRNAs intergénicos podem ser encontrados em regiões genómicas distintas das unidades de transcrição conhecidas. Estes miRNAs podem ser monocistrónicos e ter os seus próprios promotores, ou policistrónicos, onde vários miRNAs são

transcritos como um conjunto de transcritos primários com um promotor partilhado (Fig.1.7, A). Os miRNAs intrónicos localizam-se nos intrões de genes que podem ou não codificar proteínas. Estes miRNAs podem estar presentes individualmente ou organizados em *cluster* (Fig.1.7, B). Embora raros, alguns miRNAs podem também ter origem exónica, sobrepondo-se muitas vezes a um exão e a um intrão de um gene não codificante (Fig. 1.7, C) (Olena e Patton, 2010).

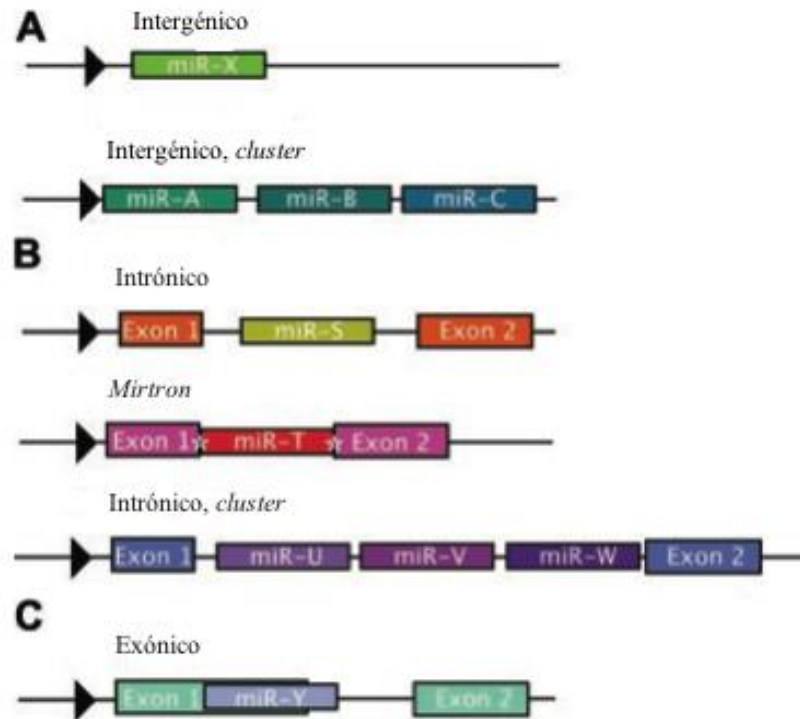


Figura 1.7- Localização genómica dos miRNAs. A) miRNA intergénicos: estes miRNAs são encontrados em regiões genómicas distintas de unidades de transcrição conhecidas. Podem ser monocitrónicos (parte superior) e ter os seus próprios promotores (seta preta) ou policitrónicos (parte inferior), onde vários miRNAs são transcritos como um conjunto de transcritos primários com um promotor partilhado (seta preta); B) miRNAs intrónicos: estes miRNAs são encontrados em intrões de genes conhecidos (codificantes ou não codificantes de proteínas). Podem estar representados apenas por um único miRNA (parte superior), ou por um conjunto (*cluster*) de miRNAs (parte de baixo). Os miRNAs intrónicos são transcritos a partir do promotor do gene onde se encontram (setas pretas) e processados a partir dos intrões transcritos a partir desse gene. No caso dos mirtrons (no meio), o intrão possui a sequência exacta do pré-miRNA com locais de splicing de cada lado (evidenciados com asteriscos brancos); C) miRNAs exónicos: estes miRNAs sobrepõem-se a um exão e a um intrão de um gene não codificante e são transcritos pelo promotor do gene onde se encontram (seta preta) (Adaptado de Olena e Patton, 2010).

A biogénese, o processamento e a maturação de um miRNA ocorre no núcleo e no citoplasma, respectivamente (Fig. 1.8) Na primeira etapa, no núcleo, o miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito a partir de longas moléculas precursoras codificadas pelos genes de miRNAs (Fig. 1.8, A). Esta transcrição é feita pela RNA polimerase II ou III (Wang *et al.*, 2007, Bartel, 2004; Ohler *et al.*, 2004).

Ainda no núcleo, ocorre a clivagem do pri-miRNA pelo complexo microprocessador Drosha-DGCR8 (Fig. 1.8, B) cujo principal interveniente é uma endonuclease tipo III, a Drosha. A excisão provocada por esta enzima vai definir uma das extremidades do miRNA maduro (Lee *et al.*, 2003). O *hairpin* precursor resultante deste corte, o pré-miRNA, agora com cerca de 60 a 70 nt é exportado activamente para o citoplasma (Fig. 1.8, C) por uma *Ran-GTP* e pelo receptor de exportação, Exportina-5 (Yi *et al.*, 2003).

Depois de transportado para o citoplasma, o pré-miRNA é clivado (Fig. 1.8, D) originando um duplex imperfeito (miRNA: miRNA*) constituído por duas cadeias de RNA (dsRNA, do inglês, *double strand RNA*), uma que compreende o miRNA maduro e outra com um fragmento de tamanho similar a este, derivado do braço oposto do pré-miRNA, que tem o nome de miRNA* (Bartel, 2004). Este processo é realizado pela Dicer, uma endonuclease do tipo III em conjunto com a proteína TRBP, e vai definir a outra extremidade do miRNA maduro (Lee *et al.*, 2003).

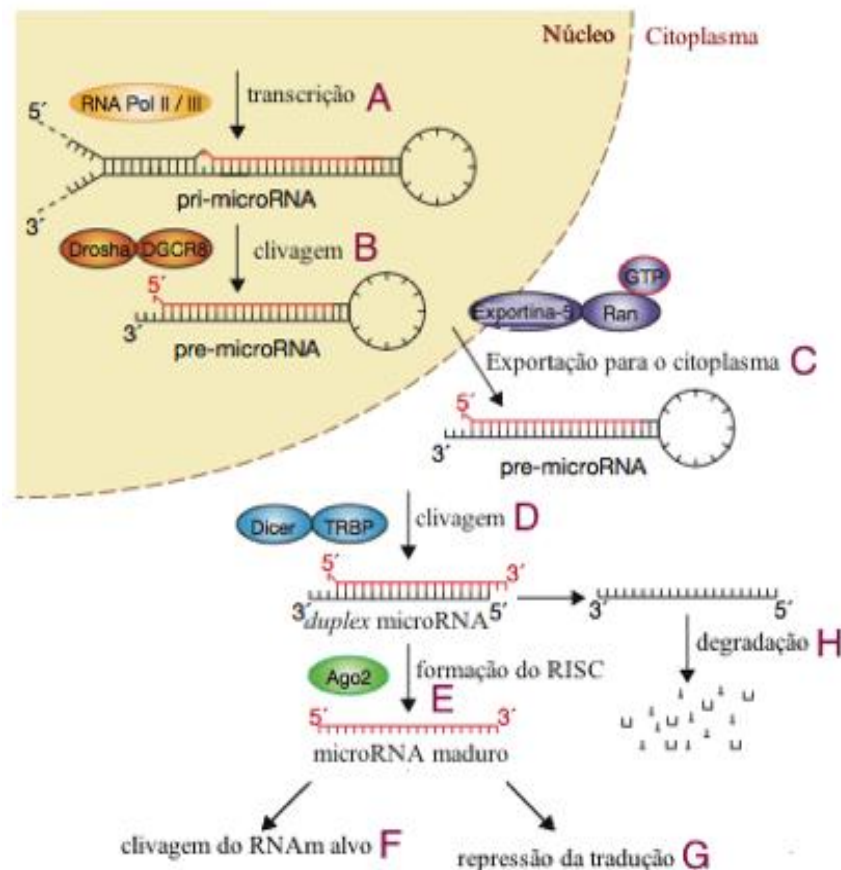


Figura 1.8 – Biossíntese de miRNAs. A) Transcrição do pri-miRNA; B) Clivagem do pri-miRNA pelo complexo Drosha/DGCR8; C) Exportação do pré-miRNA para o citoplasma pela Exportina 5 e Ran-GTP; D) Clivagem do pré-miRNA por acção da Dicer e TRBP; E) Incorporação do *duplex* miRNA no complexo RISC; F) Clivagem do mRNA; G) Repressão da tradução; H) Degradação do miRNA (adaptado de Winter *et al.*, 2009).

1.9.2 – Modo de acção dos miRNAs

Depois de o miRNA ser transformado num duplex pela Dicer, uma das cadeias é seleccionada e incorporada no complexo proteico RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) (Fig. 1.8, E), cujo principal componente é a proteína Argonata2 (AGO2) que possui acção catalítica. Esta selecção é feita com base na estabilidade termodinâmica da extremidade 5' de ambas as cadeias do duplex. A cadeia menos estável termodinamicamente na extremidade 5' é incorporada no complexo RISC e tem o nome de cadeia guia, enquanto a outra cadeia é, na maioria dos casos, degradada (Wang *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2003).

Os miRNAs podem levar o complexo RISC a regular negativamente a expressão do gene alvo através de dois mecanismos pós-transcricionais: clivagem do mRNA (Fig. 1.8, F) ou repressão da tradução (Fig. 1.8, G). A escolha do mecanismo é determinada pela complementaridade com a região 3'UTR do alvo mRNA (Bartel, 2004).

Um conjunto de 2 a 8 nt na extremidade 5' do miRNA, região denominada “*seed sequence*”, são os mais importantes na selecção do mRNA alvo. No entanto, outros nucleótidos e a estrutura secundária do mRNA nas regiões em torno da sequência alvo também influenciam a associação de miRNAs com os seus alvos (van Rooij *et al.*, 2008a).

O emparelhamento perfeito entre o miRNA e a região 3' UTR do mRNA alvo, promove a clivagem do mRNA e o seu posterior encaminhamento para os *p-bodies* (do inglês, *mRNA processing bodies*) para a sua consequente degradação (Fig. 1.8, H) (Tang *et al.*, 2003). Já o emparelhamento imperfeito entre o miRNA e a região 3' UTR do mRNA vai promover a inibição da tradução, o principal mecanismo de actuação dos miRNAs em mamíferos (Zeng *et al.*, 2002). Através deste emparelhamento, o miRNA tem a capacidade de inibir a tradução interferindo directamente com os factores de iniciação da tradução ou perturbando a função da cauda poli-A (Gebauer e Hentze, 2004).

Um único miRNA pode ter como alvo dezenas de mRNAs, assim como um único mRNA pode ser alvo de múltiplos miRNAs, gerando assim um grande poder regulatório da expressão genética (van Rooij *et al.*, 2008a).

Em animais, os miRNAs foram associados a processos como o controlo dos diferentes estadios de desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular, apoptose, secreção de insulina e outras hormonas, hematopoiese, defesa antiviral, para além de actuarem no desenvolvimento e funcionamento muscular esquelético e cardíaco (Qin e Zhang, 2011; Thum *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007; Alvarez-Garcia e Miska, 2005).

1.9.3 – miRNAs no desenvolvimento cardíaco

O desenvolvimento cardíaco requer interacções precisas e complexas entre diversos tipos celulares, tais como cardiomiócitos, células do endocárdio, epicárdio, células vasculares e fibroblastos (Small e Olson, 2011). O desenvolvimento do tecido cardíaco depende de uma expressão espácio-

temporal correcta de determinados miRNAs (Thum *et al.*, 2008). miRNAs específicos estão presentes em diferentes tipos de células cardíacas e, em alguns casos, estão envolvidos na especificação de identidade celular, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de processos como diferenciação de células estaminais embrionárias, proliferação dos cardiomiócitos, contractilidade, regulação dos canais de Ca^{2+} , integridade da parede ventricular e condução cardíaca (Small e Olson, 2011; van Rooij *et al.*, 2007).

O miR-1 é o miRNA mais abundante em cardiomiócitos, e foi o primeiro miRNA implicado no desenvolvimento cardíaco (Zhao *et al.*, 2007). Tanto o miR-1 como o miR-133 têm origem a partir de um precursor de RNA comum e a sua expressão no tecido cardíaco embrionário é mediada por dois promotores separados que são regulados pelos factores de transcrição *SRF* (do inglês, *Serum Response Factor*), regulador essencial na diferenciação muscular e *MEF2* (do inglês, *Myocyte Enhancer Factor-2*), necessário para o desenvolvimento do músculo cardíaco (Liu *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005). Mais tarde no desenvolvimento cardíaco, estes miRNAs têm papéis opostos na linhagem cardíaca: enquanto o miR-1 promove a diferenciação dos cardiomiócitos, o miR-133 inibe essa diferenciação (Small e Olson, 2011).

Os miRNAs miR-1, miR-16, miR-27b, miR-30d, miR-126, miR-133, miR-143 e a família de miRNAs let-7 são abundantes, mas não são exclusivamente expressos no tecido cardíaco adulto (Thum *et al.*, 2008). Por sua vez, um grupo de miRNAs expresso de modo selectivo nos cardiomiócitos são os “*myomirs*” (do inglês, *muscle specific miRNAs*) miR-208a, miR-208b e miR-499 cujos genes encontram-se nos intrões dos genes *MYH6*, *MYH7* e *MYH7b*, respectivamente, já anteriormente descritos (ponto 1.6.1) (van Rooij *et al.*, 2008a).

Para além dos cardiomiócitos, o tecido cardíaco é constituído por outros tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais, musculares lisas e imunitárias, as quais apresentam um perfil de expressão de miRNAs completamente distinto dos cardiomiócitos (Thum *et al.*, 2008).

1.9.4 – miRNAs na patologia cardíaca

Diversas experiências têm vindo a demonstrar que cada doença cardíaca apresenta um padrão de expressão de determinados miRNAs distinto, o que parece ser necessário para induzir o estado patológico (Thum *et al.*, 2008, van Rooij *et al.*, 2007).

O perfil de expressão dos miRNAs sofre alterações durante o desenvolvimento cardíaco e muitos miRNAs que normalmente só são significativamente expressos no coração fetal humano, são re-expressos no estado de patologia cardíaca (Latronico e Condorelli, 2009; Thum *et al.*, 2007).

Alguns miRNAs foram já implicados em patologias cardíacas (Fig. 1.9), tais como o miR-1 e o miR-133 em arritmias; o miR-21 e o miR-195 em apoptose; o miR-208 na diminuição da contractilidade; o miR-29 e o miR-21 em fibrose; o miR-21, o miR-133, o miR-195 e o miR-214 em hipertrofia dos cardiomiócitos (Small e Olson, 2011; van Rooij *et al.*, 2008b).

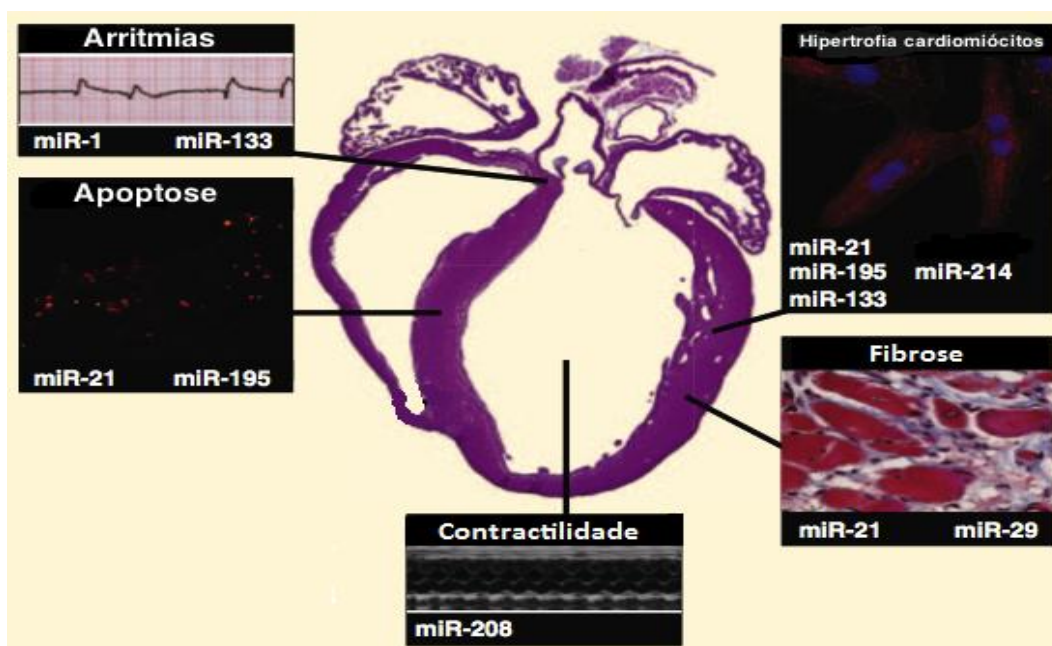


Figura 1.9 – miRNAs envolvidos em diversas patologias cardíacas (Adaptado de van Rooij *et al.*, 2008b).

1.9.5 – miRNAs na MH

O coração é um órgão muito sensível a estímulos fisiológicos, e mesmo ligeiras perturbações podem levar a remodelações cardíacas graves e a situações patológicas (Thum *et al.*, 2008). De forma a dar resposta a estes estímulos, ocorre uma extensa remodelação do tecido cardíaco, conhecida como crescimento hipertrófico fisiológico que é definido como um aumento da massa ventricular devido ao aumento do tamanho dos cardiomiócitos (Thum *et al.*, 2008).

Em situações patológicas, esta resposta envolve uma alteração global no perfil de expressão de vários genes e leva à re-expressão de genes fetais (Thum *et al.*, 2007). Esta mudança no perfil de expressão de determinados miRNAs em tecido cardíaco, alterando a regulação pós-transcricional dos seus genes alvo, assume um papel crucial no crescimento hipertrófico patológico, característico da hipertrofia cardíaca (Sayed *et al.*, 2007).

O perfil de expressão de miRNAs em tecido cardíaco foi estudado por van Rooij e colaboradores (2006), utilizando dois modelos animais com hipertrofia patológica induzida por compressão da aorta e utilizando um rato transgénico com sobre-expressão de calcineurina, que uma vez sobre-expressa vai levar à síntese de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca. Os resultados revelaram que os perfis de expressão de miRNAs dependem do estímulo responsável pela hipertrofia cardíaca e da duração do tratamento. Isto sugere que diferentes estímulos hipertróficos e fases divergentes do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca requerem o envolvimento de miRNAs distintos (van Rooij *et al.*, 2006). Outros resultados baseados em estudos utilizando modelos animais de hipertrofia cardíaca, indicam que alguns miRNAs são considerados como anti- ou pró-hipertróficos consoante o seu padrão de expressão (Fig. 1.10). Os miRNAs anti-hipertróficos incluem os miRNAs: miR-1, miR-133, miR-26,

miR-9 e miR-98, enquanto os miRNAs miR-23a, miR-195, miR-208, miR-499 são considerados miRNAs pró-hipertroficados (Da Costa Martins e De Windt, 2012; Ding *et al.*, 2011).

Os resultados dos “screenings” de expressão de grandes números de miRNAs em humanos não são concordantes (Matkovich *et al.*, 2009). Apesar disso, destacam-se alguns miRNAs que apresentam um perfil de expressão alterado e que são comuns entre os estudos, nomeadamente o miR-195, o miR-23a e o miR-125b, que se apresentam sobre-expressos em caso de patologia cardíaca (Matkovich *et al.*, 2009; Sucharov *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2007; Thum *et al.*, 2007; van Rooij *et al.*, 2006).

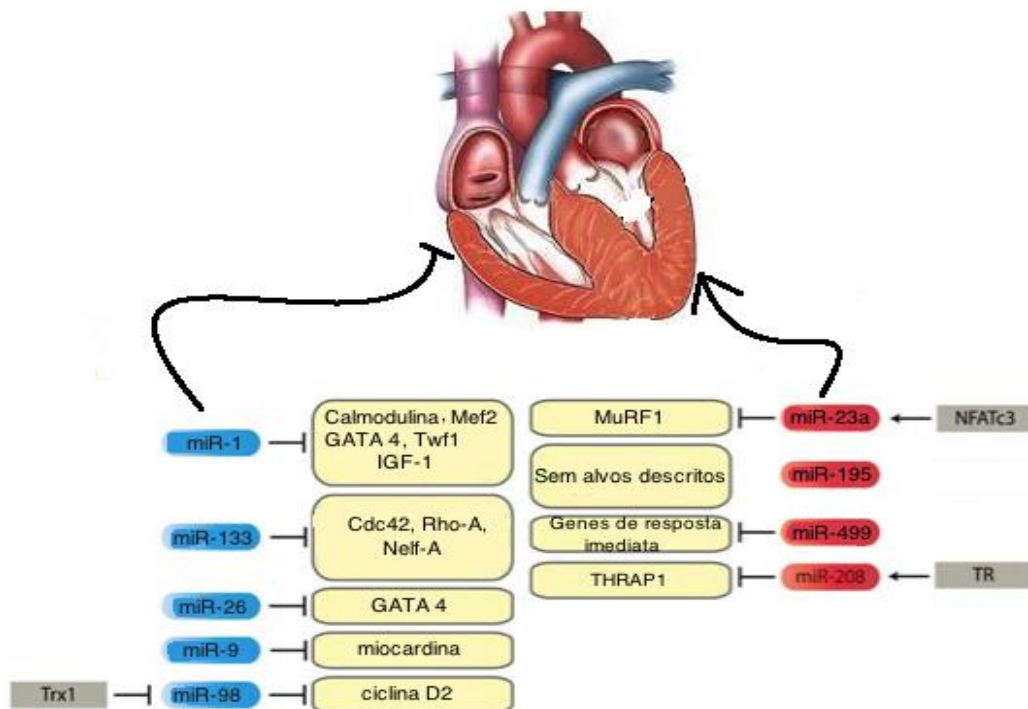


Figura 1.10 – miRNAs anti-hipertroficados (azul) e pró-hipertroficados (vermelhos) e respectivos alvos celulares (Adaptado de Da Costa Martins e De Windt, 2012)

1.9.5.1 - miRNAs anti-hipertroficados

Os miRNAs anti-hipertroficados miR-1, miR-133, miR-26, miR-9 e miR-98 encontram-se sub-expressos em condições de hipertrofia (Da Costa Martins e De Windt, 2012; Ding *et al.*, 2011).

O miR-1 desempenha um importante papel no desenvolvimento cardíaco ao nível da diferenciação celular e, no estado patológico, este é um dos miRNAs que mais cedo sofre alterações no seu padrão de expressão (Sayed *et al.*, 2007). Estudos revelam que a sobre-expressão do miR-1 atenua a hipertrofia dos cardiomiócitos, o que indica que a sua sub-expressão é causadora da hipertrofia cardíaca (Ikeda *et al.*, 2009; Sayed *et al.*, 2007). Foi observado o decréscimo da sua expressão utilizando modelos humanos de hipertrofia (Carè *et al.*, 2007). Este miRNA regula o crescimento dos cardiomiócitos, através da regulação negativa de mediadores na sinalização de Ca^{2+} , como é o caso da

calmodulina. Como a quantidade da calmodulina dentro dos cardiomiócitos é limitante, o controlo preciso da sua expressão é importante para a regulação da sinalização de Ca^{2+} (Ikeda *et al.*, 2009). MEF2e GATA4 são dois factores de transcrição com um papel chave na mediação das alterações, dependentes de Ca^{2+} , na expressão de genes e importantes na sinalização da hipertrofia, sendo regulados negativamente pelo miR-1 (Da Costa Martins e De Windt, 2012; Ikeda *et al.*, 2009). Twf1, uma proteína reguladora do citoesqueleto, é também um alvo directo do miR-1. Twf1 tem a função de ligar monómeros de actina, inibindo a formação dos filamentos finos de actina. Experiências *in vitro* demonstraram que cardiomiócitos hipertróficos expressam maiores quantidades desta proteína (Li *et al.*, 2010). Outro dos alvos de miR-1 é a proteína IGF-1, um factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1, responsável por regular o crescimento das células musculares, que sofre um aumento de expressão após a repressão de miR-1 (Elia *et al.*, 2009).

O miR-133 também desempenha um papel anti-hipertrófico apresentando-se sub-expresso em tecido proveniente de ventrículo esquerdo de doentes com hipertrofia cardíaca (Carè *et al.*, 2007). Este miR exerce o seu efeito tendo como alvos Cdc42, Rho-A e Nelf-A (Ding *et al.*, 2011). Cdc42 e Rho-A são proteínas que estão relacionadas com a organização dos miofilamentos nas unidades sarcoméricas e são responsáveis por rearranjos no citoesqueleto durante a hipertrofia cardíaca. Nelf-A é um factor de alongação envolvido na cardiogénese, que regula negativamente a RNA polimerase II (Ding *et al.*, 2011; Xiao e Chen, 2010).

Por seu turno, o miR-26 desempenha um papel importante na regulação da sobrevivência dos cardiomiócitos e na hipertrofia tendo como alvo o factor de transcrição GATA4. Através da modulação da expressão dos níveis de miR-26 com o auxílio de um vector adenoviral, verificou-se que num quadro de hipertrofia cardíaca, utilizando modelos animais, ocorreu um aumento da expressão de GATA4, acompanhado de um decréscimo da expressão do miR-26. Um aumento adicional nos níveis de miR-26 está assim associado com uma diminuição dos níveis basais de GATA4 e consequente morte celular (Han *et al.*, 2009, citado por Da Costa Martins e De Windt, 2012).

Foi também demonstrado que o miR-9 é um regulador negativo da hipertrofia cardíaca tendo como alvo a miocardina, um co-activador transcricional que promove a resposta hipertrófica. Assim, a administração de um *mimic* (duplex de RNA sintético que tem como função "imitar" a função endógena do miRNA) de miR-9 pode atenuar os níveis de expressão de miocardina e levar consequentemente à inibição da hipertrofia cardíaca (Frost e van Rooij, 2010; Wang *et al.*, 2010).

Num quadro de hipertrofia induzida por angiotensina 2, num modelo animal, a família miR-98/let-7 apresenta também um papel anti-hipertrófico, mediante a acção de Trx1, uma proteína com função antioxidante que possui efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos, e tendo como alvo directo a ciclina D2. De uma forma geral, a sub-regulação de Trx1 leva a uma sobre-expressão do miR-98 e a uma inibição da hipertrofia cardíaca, decrescendo assim os níveis de ciclina D2 (Yang *et al.*, 2011).

1.9.5.2 - miRNAs pró-hipertróficos

A sobre-expressão de miRNAs pró-hipertróficos (miR-23a, miR-195, miR-499 e miR-208) conduz ao fenómeno de hipertrofia (Da Costa Martins e De Windt, 2012; Ding *et al.*, 2011). Um dos miRNAs com função pró-hipertrófica é o miR-23a. Modelos *in vitro* de hipertrofia cardíaca demonstraram que a sobre-expressão deste miRNA é necessária para induzir hipertrofia em cardiomiócitos, sendo a sua expressão regulada por um factor de transcrição, o factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Lin *et al.*, 2009). Os resultados do estudo levado a cabo por Lin e colaboradores (2009) mostraram que ocorreu uma sobre-expressão do miR-23a em cardiomiócitos hipertróficos tratados com isoproterenol e aldosterona. MuRF1, uma proteína anti-hipertrófica e reguladora da degradação da troponina I, foi identificada como um alvo de miR-23a e a sua tradução pode ser suprimida por este miRNA (Lin *et al.*, 2009).

Dado que a composição do sarcómero em ratos apresenta grandes flutuações nas isoformas da cadeia pesada da miosina por acção dos níveis de hormona tiroideia, os “*myomirs*”, já descritos em 1.9.3, desempenham um papel crucial na regulação da expressão de genes codificantes da miosina e na resposta ao *stress* cardíaco (Van Rooij *et al.*, 2009). O miR-208a é controlado pelo receptor da hormona tiroideia (TR), tem como alvo a proteína THRAP1 e a sua sobre-expressão é suficiente para aumentar a expressão de *MYH7* e levar a hipertrofia cardíaca (Callis *et al.*, 2009). O papel do miR-208b em processos patológicos permanece por esclarecer (Da Costa Martins e De Windt, 2012). Foi demonstrado que elevados níveis de miR-499 afectam a expressão e levam à hipertrofia cardíaca induzida pelo *stress*. Este miRNA tem a capacidade de dosear a resposta cardíaca ao *stress*, em parte, através da regulação dos genes de resposta imediata (Shieh *et al.*, 2011).

Outro dos miRNAs envolvido no crescimento hipertrófico no coração adulto é o miR-195. Este miRNA encontra-se sobre-expresso em corações hipertrofiados em ratos e humanos (van Rooij *et al.*, 2006). Isto demonstra que o miR-195 é um factor pró-hipertrófico que participa activamente no processo de hipertrofia cardíaca, apesar de até agora não terem sido validados alvos directos deste miRNA no contexto de doença cardíaca hipertrófica (Da Costa Martins e De Windt, 2012).

Tem sido relatado que doentes com MH, de diferentes faixas etárias, apresentam diferentes características morfológicas e diferentes prognósticos da doença, o que leva a crer que a hipertrofia cardíaca em diferentes idades e com diferentes etiologias apresenta padrões de expressão de miRNAs distintos (Ding *et al.*, 2011).

Palacín e colaboradores (2011a) compararam o perfil de expressão de 377 miRNAs humanos em tecido ventricular de doentes com MH portadores de uma mutação *missense* no gene *MYH7* e em tecido cardíaco de doentes com MH sem mutações com tecido cardíaco saudável (Palacín *et al.*, 2011a). Globalmente, as amostras patológicas apresentaram uma sub-expressão dos miRNAs relativamente às amostras saudáveis. O miR-1, miR-133b, miR-208b, miR-218, miR-306, miR-30b, miR-374, miR-454, apresentaram-se sub-expressos em todas as amostras patológicas, enquanto o

miR-590-5p e o miR-92a apresentaram um aumento de expressão (Palacín *et al.*, 2011a). O miRNA-495 apresentou-se sub-expresso nas amostras patológicas com mutação e sobre-expresso nas amostras de doentes sem mutações sarcoméricas (Palacín *et al.*, 2011a).

Curiosamente, observou-se uma sobre-expressão do miR-208a nos doentes portadores de mutação em *MYH7* e uma sub-expressão do miR-208b nas amostras patológicas que apresentavam hipertrofia cardíaca como resposta secundária a outra doença cardíaca (Palacín *et al.*, 2011a). Os autores sugerem que alterações na expressão do miR-208 podem permitir distinguir entre tecido cardíaco de indivíduos com e sem mutações em genes causadores de MH (Palacín *et al.*, 2011a).

1.10 – Perspectivas Clínicas e Potencial Terapêutico dos miRNAs

A expressão diferencial de miRNAs específicos nos diferentes tipos de patologias cardíacas, tal como por exemplo no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, levanta o conceito de que os miRNAs podem ser considerados como biomarcadores moleculares tendo desta forma importantes aplicações clínicas nas doenças cardíacas (Ding *et al.*, 2011; Small e Olson, 2011). Por exemplo, o miR-195 e miR-23a apresentam-se sobre-expressos durante a hipertrofia, podendo actuar como indicadores de diagnóstico precoce na hipertrofia patológica (Ding *et al.*, 2011).

Um dos obstáculos à utilização dos miRNAs como biomarcadores, prende-se com a dificuldade em obter tecido cardíaco de doentes num estágio precoce de MH, o que leva à necessidade de identificar miRNAs que sejam diferencialmente expressos no tecido cardíaco e direccionados para a circulação sanguínea. Neste sentido esses miRNAs podem vir a ser considerados como biomarcadores circulantes de hipertrofia cardíaca o que facilitaria o diagnóstico genético da doença (Ding *et al.*, 2011).

No que respeita a novas formas de terapêutica, uma alternativa prende-se com a regulação da expressão dos miRNAs que se apresentam sobre- ou sub-expressos na hipertrofia cardíaca, tentando normalizar o seu padrão de expressão (Fig. 1.11). O nível de expressão de um determinado miRNA identificado como alterado, poderá ser normalizado, quer seja inibindo um miRNA sobre-expresso quer seja induzindo a expressão de um miRNA sub-expresso (Thum *et al.*, 2007, van Rooij e Olson, 2007).

Os *mimics* de miRNA são duplexes de RNA sintético em que uma das cadeias (cadeia guia) é idêntica à sequência de miRNA maduro e tem como função "imitar" a função endógena do miRNA. A outra cadeia é muitas vezes apenas parcialmente complementar à cadeia guia e é normalmente ligada a moléculas de colesterol para melhorar a absorção celular. Assim uma alternativa terapêutica direccionada para a hipertrofia cardíaca será a utilização de *mimics* de miRNAs, o que seria particularmente útil para aumentar a expressão de miRNAs cuja sub-expressão contribui para o início ou progressão de doença cardiovascular (Frost e van Rooij, 2010). Inversamente os *antimiRs* são oligonucleótidos *antisense* quimicamente modificados, visando a sequência do miRNA maduro que

podem reduzir os níveis de miRNAs considerados como indutores de patologia ou cuja sobre-expressão é aberrante (Krüzfeldt *et al.*, 2005).

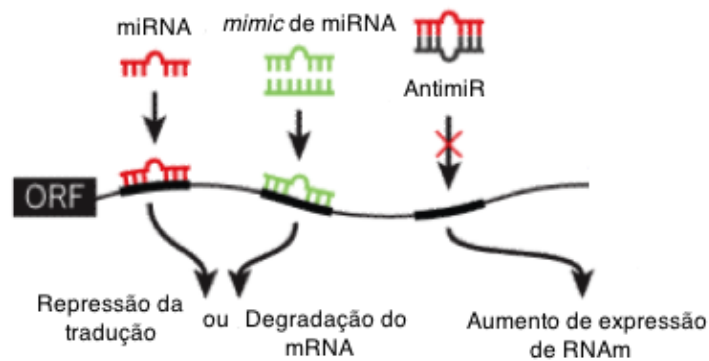


Figura 1.11. – Representação esquemática da função dos *mimics* de miRNAs e anti-miRs. O “*mimic*” de um dado miRNA (verde) tem a mesma sequência de um miRNA endógeno e vai ter como alvos os mesmos mRNA que o miRNA endógeno. Um anti-miR (cinza) complementa um miRNA endógeno, ligando-se a ele e inibindo a sua função (Adaptado de Small e Olson, 2011). ORF – *Open Reading frame*.

Como qualquer tipo de terapia génica, as terapias baseadas em miRNAs apresentam vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas e discutidas. Por um lado, a utilização dos miRNAs como agentes terapêuticos, tendo estes vários alvos em simultâneo, faz com que seja possível regular vários genes pertencentes a uma via comum ou com a mesma função biológica (Ding *et al.*, 2011). Este é o caso do miR-1 que inibe a hipertrofia regulando negativamente vários elementos envolvidos na sinalização de Ca^{2+} (Ding *et al.*, 2011). Esta característica faz com que este miRNA não tenha como alvo apenas um único gene, mas sim uma rede de genes reguladores da hipertrofia cardíaca, permitindo assim uma maior eficiência relativamente a outros métodos terapêuticos que têm como alvo apenas uma molécula (Ding *et al.*, 2011; van Rooij e Olson, 2007).

Contudo, o facto de um único miRNA ter múltiplos alvos mRNA, envolvidos em funções celulares diferentes, pode levar a que algumas destas funções sejam perturbadas (Ding *et al.*, 2011). Por exemplo, o miR-133 regula não só a hipertrofia, mas também a condutância cardíaca (Ding *et al.*, 2011). Sendo este miRNA alvo de terapia génica com vista ao tratamento da hipertrofia, os seus efeitos secundários sobre a condutância cardíaca devem ser tidos em conta, sendo necessário realizar novos estudos para melhorar a compreensão do potencial de toxicidade de tais miRNA (Ding *et al.*, 2011). É de esperar que através da prevenção e inversão das consequências da hipertrofia cardíaca, através de um diagnóstico e terapia baseados na acção dos miRNA, a qualidade de vida dos doentes com MH melhore, e a sua longevidade seja prolongada (Da Costa Martins e De Windt, 2012).

1.11- Objectivo do trabalho

Sendo a MH uma doença com uma prevalência significativa de 1:500 na população, e com uma apresentação genética e fenotípica heterogénea, torna-se imperativo a análise dos seus determinantes, nomeadamente a nível genético, através do estudo dos perfis de expressão de miRNAs em condições normais e patológicas. Pretende-se assim, com este trabalho, avaliar o padrão de expressão de 739 miRNAs em doentes com diagnóstico clínico de MHO, tendo como principal objectivo a identificação de miRNAs desregulados que possam não só estar na base do perfil fenotípico de MHO, como também, estar associados ao desenvolvimento de MH em geral. Numa nova perspectiva de esclarecimento dos mecanismos moleculares subjacentes à MH, o perfil de expressão de miRNAs será relacionado não só com o perfil de expressão de genes sarcoméricos, mas também com o perfil mutacional de genes relacionados com o desenvolvimento de MH.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostra populacional

Foram analisados cinco doentes portugueses (Tabela 2.1) não relacionados entre si, com diagnóstico clínico de MHO. Estes foram submetidos a miectomia septal onde foi recolhida uma amostra de tecido cardíaco, nomeadamente SIV. As amostras foram conservadas em tubos com *RNA later* (SIGMA[®], *Sigma Aldrich*, EUA) e armazenados a 4 graus centígrados (°C). Foram igualmente colhidos de cada doente, 6 mililitros (mL) de sangue periférico em tubos com Ácido Etilenodiaminotetra-Acético (EDTA) e conservados a -20 °C até posterior utilização.

Como controlo saudável foi utilizado RNA extraído de ventrículo esquerdo humano proveniente de um indivíduo saudável (sem patologia cardíaca), colhido *post-mortem* no Instituto de Medicina Legal de Lisboa e um RNA de ventrículo esquerdo humano comercial (Ambion[®], *Applied Biosystems*, EUA).

Tabela 2.1 – Amostra populacional em estudo e respectiva informação clínica adicional (M- Masculino; F- Feminino).

Código da Amostra	Informação Clínica adicional ao diagnóstico de MHO	Ano de nascimento /Género
SIV100	Hipertrofia maciça > = 30mm	1937 / M
SIV108	Insuficiência cardíaca congestiva	1926 / F
SIV109	Insuficiência cardíaca congestiva; Angina de peito; Síncope Cardíaca	1927 / F
SIV119	Insuficiência cardíaca congestiva; Angina de peito; com Desfibrilhador- cardioversor	1938 / F
SIV124	Insuficiência cardíaca congestiva; Angina de peito; Síncope Cardíaca	1949 / F
SIV_C.Saudável	Amostra controlo saudável	
SIV_C.Comercial	Amostra controlo saudável	

2.2 - Extração de ácidos nucleicos

Nesta fase do trabalho procedeu-se à extração e purificação do RNA e do DNA a ser utilizado posteriormente nos ensaios de expressão genética e genotipagem.

2.2.1 – Extração de RNA a partir de tecido cardíaco

O RNA total foi extraído, a partir de fragmentos de tecido ventricular (com aproximadamente 60 miligramas (mg) cortados e macerados, utilizando o *kit* de extração *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation, Madison, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Todos os passos foram realizados no gelo para evitar a degradação do RNA pela ação de enzimas (RNAses). Os RNAs foram conservados em tubos *ependorf* estéreis e isentos de RNAses a -80°C até posterior utilização.

2.2.2 – Extração de DNA a partir de sangue periférico e tecido cardíaco

O DNA foi extraído e purificado, a partir de aproximadamente 30 mg de tecido cardíaco ou a partir de 200 microlitros (µL) de sangue total, através da utilização do *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA foi conservado em tubos *ependorf* estéreis a -20°C até posterior utilização.

2.3 Quantificação e avaliação de integridade de ácidos nucleicos

A qualidade dos ácidos nucleicos isolados em 2.2 foi avaliada por espectrofotometria- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A), confirmando-se a sua pureza, através das razões entre a absorvância a 260 nanómetros (nm) (Abs260) e a absorvância a 280 nm (Abs280) e entre a Abs260 e a absorvância a 230 nm (Abs230). O pico de absorvância dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) é a 260 nm, o das proteínas é a 280 nm, e contaminantes como sais e compostos orgânicos apresentam um pico de absorvância máximo a 230 nm. Estas razões permitem avaliar a contaminação dos ácidos nucleicos com proteínas (A260/A280 inferior a 1,8) e com os outros compostos acima referidos (A260/A230 fora do intervalo 1,8 a 2,2). (Manual de utilização do Nanodrop - NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual- <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/NanoDrop%202000%20User%20Manual.pdf>).

A concentração de ácidos nucleicos de cada amostra (nanograma/microlitro) (ng/µL) pode ser calculada a partir da Lei de Lambert-Beer:

$$[\text{concentração ácidos nucleicos}] = \frac{Abs_{260}}{b \times \varepsilon}$$

em que b corresponde ao percurso óptico em centímetros (cm) e ε corresponde ao coeficiente de extinção molar ($\mu\text{L} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), sendo que o valor do coeficiente de extinção molar para o DNA de dupla cadeia é de $50 \mu\text{L} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, e para o RNA é de $40 \mu\text{L} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Sempre que as amostras de DNA apresentaram concentrações elevadas, realizou-se uma diluição da

respectiva concentração para $10\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, de forma a manter uma concentração fixa em todas as amostras.

A integridade do DNA foi avaliada através de electroforese unidimensional em gel de agarose (Bioline) a 0,8% (peso/volume; p/v) contendo $2 \mu\text{L}$ de GelRed (Biotarget, representante da Biotium, Portugal) (concentração inicial 10000x; $500 \mu\text{L}$) por cada 100 mL de gel, durante 1 hora (h) a 110V (volts). A integridade do RNA foi avaliada num espectrofotómetro de elevada sensibilidade, Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, EUA) e que se baseia na utilização de um *microchip* onde é realizada uma electroforese simultânea de 11 a 12 amostras de RNA durante 30-40 minutos (min). Após a electroforese, a análise é realizada através um algoritmo informático que permite o cálculo do Número de Integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA Integrity Number*) (Schroeder *et al.*, 2006), permitindo classificar o RNA eucariótico total com base num sistema de numeração de 1 a 10, sendo 1 o perfil mais degradado e 10 o mais intacto (Mueller *et al.*, 2004). O valor mínimo de RIN para um dado RNA para obtenção de resultados adequados em estudos de expressão por PCR em tempo real é 5 (Fleige e Pfaffl, 2006). Esta análise foi efectuada na Unidade de Expressão Genética do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) (prestação de serviço).

2.4 - Genotipagem das amostras

A genotipagem das amostras de doentes com MHO foi realizada por duas técnicas de larga escala: o *iPLEX MassArray* e o HRM, de modo a identificar as alterações genéticas associadas à MH.

2.4.1 – iPLEX MassArray

A genotipagem das amostras foi previamente efectuada recorrendo à técnica de *iPLEX*® *MassArray* (Sequenom Hamburgo, Alemanha). No grupo de investigação onde este trabalho foi desenvolvido, esta técnica faz uso de um *microchip* de DNA que permite a identificação de 541 alterações genéticas associadas a MH (Santos *et al.*, 2011, 2012). Foi utilizado o *kit* de *iPLEX Gold* (Sequenom Hamburgo, Alemanha), que permite a amplificação por PCR das regiões de DNA contendo as mutações em estudo, seguida de uma reacção de extensão de um único nucleótido associada à alteração em causa e sua posterior detecção por espectrometria de massa MALDI-TOF no sistema *Sequenom MassArray* (Sequenom, Hamburgo, Alemanha) (Santos *et al.*, 2011). Todas as alterações foram confirmadas por SA no âmbito de uma colaboração com o Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2.4.2 – Desnaturação de Alta Resolução (HRM)

Nas amostras em que o resultado obtido pela técnica de *iPLEX MassArray* se apresentou dúbio, foi realizada a análise pela técnica de HRM, recorrendo à plataforma *LightCycler 480*® (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Os iniciadores de DNA (*primers*) utilizados para a amplificação das regiões a estudar por HRM foram previamente desenhados e otimizados (Marques, 2010). Para a realização desta técnica utilizou-se o kit *High Resolution Melting Master* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), que contém o fluoróforo saturante de DNA em cadeia dupla, *Resolight Dye*, uma mistura reaccional que integra a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase*, dNTPs e tampão de reacção. As reacções foram efectuadas em placas de 96 poços (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), perfazendo em cada poço um volume reaccional final de 10µL. As condições reaccionais e o programa de PCR-HRM encontram-se indicados nas tabelas 2.2 e 2.3. Sumariamente, após um passo de PCR inicial, as amostras foram desnaturadas e rapidamente renaturadas para permitir a formação de homo- e heteroduplexes. Em seguida, as amostras foram sujeitas a um aumento gradual de temperatura, dos 60°C aos 95°C, dando-se uma desnaturação contínua dos duplexes, levando à diminuição da fluorescência, continuamente monitorizada pelo equipamento.

Tabela 2.2 – Condições reaccionais aplicadas na técnica de HRM.

Componente	Volume	Concentração final
DNA (stock: 10ng/µL)	2 µL	2ng/µL
<i>Master Mix</i>	5 µL	5U/µL
MgCl ₂ (stock: 25mM)	0,8 -1,6 µL	2,0 – 4,0 mM
<i>Primer</i> (stock: 4 mM)	0,5 – 1,25 µL	0,2 – 0,5 mM
Águadestilada	0,55 – 1,7 µL	
	Volume final: 10 µL	

Tabela 2.3 - Programa de PCR-HRM.

	Nº de ciclos	Tempo	Temperatura	Aquisições (por °C)	Taxa de Variação (°C/seg)
Desnaturação inicial	1x	10 min	95°C		
Desnaturação	35x	10 seg.	95°C		4,40
Annealing^a		10 seg.	55°C – 60°C ^b		2,20
Extensão		20 seg.	72°C		4,40
HRM	1x	1 min	95°C		4,40
		1 min	40°C		2,20
		1 seg.	60°C-95°C		1,00
			95°C	25	0,02
Cooling	1x	10 seg.	40°C		

^aHibridação ou emparelhamento dos *primers*^b Variável consoante a temperatura de emparelhamento dos *primers*

Os resultados obtidos foram analisados por recurso ao *software LightCycler 480® versão 1.5.0.39 SP3* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Em cada ensaio foram utilizadas no mínimo cinco amostras controlo (DNA de indivíduos saudáveis, sem história de doenças cardiovasculares e previamente genotipados, para confirmar ausência de mutações associadas a MH). Da análise foram excluídas as amostras cuja amplificação ocorria a partir do ciclo nº 30. Os dados foram normalizados, obtendo-se curvas de desnaturação que permitiram identificar perfis de desnaturação distintos entre as amostras controlo e os indivíduos em estudo. Todas as amostras que apresentassem um valor de diferença relativa fora do intervalo de normalidade do gráfico de diferenças (entre -2 e +2) foram consideradas como provavelmente alteradas, e os amplicões foram enviados para SA para identificação da alteração nucleotídica em causa.

2.4.3 – Reacções de PCR e Sequenciação

A confirmação das mutações identificadas por *iPLEX MassArray* e a identificação das alterações genéticas identificadas por HRM foram realizadas por SA. Para tal as regiões do DNA que potencialmente continham estas alterações foram amplificadas por PCR num termociclador (Multigene Gradient, Labnet International, Inc.) tendo por base a preparação de uma mistura reaccional contendo um par de *primers* previamente desenhado e optimizado por Marques (2010). As condições reaccionais e o programa de PCR utilizados encontram-se descritos nas tabelas 2.4 e 2.5, respectivamente.

Tabela 2.4 - Condições reaccionais utilizadas na reacção de PCR.

Componente	Volume	Concentração final
DNA	6 µL	10 ng/µL
<i>Primers</i> (stock: 0,4 mM)	1,2 µL	0,016 mM
Tampão (stock 10x)	6 µL	1x
MgCl ₂ (stock: 50 mM)	1,2 µL – 3,6 µL	1,0 – 3,0 mM
dNTP's	6 µL	6 mM
<i>Hi-Specific</i> (5x)	3 µL	0,5x
BIOTAQ DNA Polimerase	0,7 µL	5U/µL
Água destilada	33,5 µL - 35,9 µL	
	Volume final: 60µL	

Tabela 2.5 – Programa de PCR utilizado.

	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5 min	1x
Desnaturação	94°C	30 seg	35x
Hibridação	53°C-60°C ^a	1 min	35x
Extensão	72°C	30 seg	35x
Extensão final	72°C	10 min	1x

^a Variável consoante a temperatura de emparelhamento dos *primers*

Após a amplificação por PCR, as amostras foram sujeitas a electroforese unidimensional em gel de agarose (Bioline, Citomed, Lisboa, Portugal) a 2% (p/v), contendo 2 μ L de GelRed (Biotarget, representante da Biotium, Portugal) por cada 100 mL de gel, durante 1h a 110V. A dimensão dos fragmentos foi verificada através da utilização de um marcador de pesos moleculares, *Hyperladder IV* (Bioline, Citomed, Lisboa, Portugal), utilizando-se um transiluminador *UVIpure* (UVITEC, Cambridge, Reino Unido) para verificação da presença da banda específica correspondente ao fragmento pretendido. A aquisição de imagem foi efectuada com o equipamento de fotografia digital Kodak AlphaDigiDoc, Alpha Innotech, utilizando o *software* AlphEaseFC (AlphaDigiDoc 1000, Alpha Innotech).

Os amplicões de DNA foram enviados para o Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde foram purificados e sujeitos a SA.

Os cromatogramas foram analisados com o programa *Codon Code Aligner* versão 3.7 (CodonCode Corporation, EUA).

Através da ferramenta informática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível online (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi realizado o alinhamento das sequências de DNA dos amplicões das amostras em estudo com as sequências de DNA existentes na base de dados do genoma Humano (*wild type*) (http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml), permitindo assim a confirmação das mutações anteriormente identificadas por *iPLEX MassArray* ou a identificação das alterações detectadas por HRM. A previsão do efeito das alterações genéticas na actividade da proteína (alterações benignas, potencialmente malignas ou malignas) foi realizada recorrendo à ferramenta PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>).

2.5 Análise transcritómica

A análise transcritómica insere-se no âmbito do trabalho de base do grupo de investigação onde foi desenvolvida esta tese. O principal objectivo foi determinar a expressão dos quatro principais genes sarcoméricos, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYBPC3*, cujas mutações estão envolvidas no desenvolvimento de MH. Para tal, foram utilizadas amostras de RNA provenientes de 40 biópsias cardíacas, de SIV e apêndice auricular direito (AAD) de doentes com diagnóstico de MH.

2.5.1 PCR em tempo real (RT-PCR)

A técnica de PCR em tempo real permite a análise quantitativa de cDNA (DNA complementar) ao longo da reacção de amplificação, através da utilização de fluoróforos intercalantes ou de sondas marcadas que se ligam à cadeia de cDNA, o que 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 (*LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual*, Roche Diagnostics).

Nestes ensaios foi utilizada uma sonda de hidrólise (ensaio TaqMan®; Applied Biosystems, EUA), que apresenta dois fluoróforos em cada extremidade, o *quencher* (extremidade 3') e o *repórter* (extremidade 5'). Enquanto a sonda está intacta o *quencher* reprime a fluorescência do *repórter*. Na fase de desnaturação das cadeias de cDNA, a sonda liga-se às cadeias. Na fase de extensão a sonda é clivada, libertando o *repórter* que assim emite fluorescência (*LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual*, Roche Diagnostics).

Os níveis de expressão dos genes em estudo foram detectados através do método de quantificação relativa que consiste na expressão dos seus níveis de mRNA relativamente ao mRNA de um gene de expressão basal, neste caso o gene 18S rRNA (RNA Ribossomal).

2.5.2 – Análise de Dados

Na análise de dados foi utilizado o valor de Ct (*cycle threshold*), 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 (Ct mais baixo) (*LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual*, Roche Diagnostics).

O nível de expressão de cada um dos genes em estudo foi determinado a partir do método de $\Delta\Delta Ct$, em que ΔCt que consiste na diferença de valores entre o Ct do gene em estudo e o Ct do gene de controlo endógeno, 18S rRNA. Todos estes valores foram relativizados, subtraindo o valor de expressão correspondente ao controlo saudável para cada um dos genes e tecidos, obtendo-se assim o valor de $\Delta\Delta Ct$.

2.5.3 – Construção do dendograma

A partir dos valores de ΔCt , e utilizando a ferramenta *pvclust*, foi construído um dendograma que permitisse inferir a relação entre os níveis de transcrição dos quatro genes para cada tecido e para cada um dos 40 doentes com diagnóstico de MH. A análise de correlação estatística foi obtida através da correlação de *Spearman* e *Pearson*. Cada valor em falta (significando que não ocorreu expressão de determinado gene) foi substituído pelo valor de expressão média do gene, em cada tecido.

2.6 – Estudo do perfil de expressão genética de miRNAs

Nesta etapa do trabalho experimental, foi efectuado o procedimento conducente à obtenção do perfil de expressão genética dos miRNAs nas amostras saudáveis e patológicas.

2.6.1 – Síntese de cDNA

A partir do RNA extraído em 2.2.1 foi efectuada a diluição do RNA para uma concentração de 5ng/ μ L e realizada a síntese de cDNA pela utilização do *kit Universal cDNA synthesis* (ExiqonInc, EUA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A reacção de síntese decorreu num

termociclador (Multigene Gradient, Labnet International. Inc.). A mistura reaccional, cuja composição está descrita na tabela 2.6, foi incubada durante 60 min a 42°C e a enzima transcriptase reversa foi inactivada durante 5 min a 95°C. O cDNA foi depois conservado a -20°C até posterior utilização.

Tabela 2.6 – Composição da mistura reaccional para a síntese de cDNA.

Componente	Volume
RNA total (5ng/μL)	8 μL
Tampão de reacção (stock: 5x)	8 μL
Água destilada	18 μL
RNA <i>spike in</i> sintético	2 μL
Mistura de enzima	4 μL
	Volume final: 40μL

2.6.2 –Análise de expressão de miRNAs por Real Time-PCR

Para obter o perfil de expressão dos miRNAs nas amostras de tecido cardíaco referidas em 2.1. foi utilizado o *kit miRCURY LNATM-Universal RT microRNA PCR* (ExiqonInc, EUA). Este *kit* baseia-se na utilização da tecnologia de ácidos nucleicos não acessíveis - *locked nucleic acid* (LNA), concebidos para a detecção sensível e precisa de 739 diferentes miRNAs através de uma reacção de RT-PCR utilizando o fluoróforo *SYBR[®] Green*. Os 739 miRNA estão separados em dois painéis de reacção com a capacidade de 384 poços cada um (**Anexo I**). Em ambos os painéis encontram-se presentes (i) seis conjuntos de *primers* para amplificação de genes de referência (três de pequenos RNAs: *U6snRNA*, *SNORD38B*, *SNORD49A*; e três de miRNAs: miR-103, miR-191 e miR-423-5p), (ii) três calibradores inter-placa (UniSp3IPC) e (iii) um controlo do conjunto de *primers* (UniSp6 CP).

Os painéis 1 e 2 diferem nos conjuntos de *primers LNATM* liofilizados para amplificação de miRNAs humanos, sendo que o painel 1 é composto por conjuntos de *primers LNATM* para a amplificação de 372 miRs enquanto o painel 2 é composto por conjuntos de *primers LNATM* para a amplificação de 367 miRs. Para a realização do protocolo foram seguidas as instruções fornecidas pelo fabricante. No anexo I são indicados os miRNAs de cada um dos painéis.

A técnica de *Real Time-PCR* foi realizada num equipamento ABI 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, EUA) no IGC. O programa utilizado e as condições reaccionais desta técnica encontram-se, respectivamente, nas tabelas 2.7 e 2.8.

Tabela 2.7 – Programa de *Real Time-PCR* utilizado.

	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos	Taxa de Variação (°C/seg)
Activação da polimerase /Desnaturação	95°C	10 min	1x	
Amplificação	95°C	10 seg.	40x	1,6
	60°C	1min	1x	

Tabela 2.8 – Composição da mistura reaccional sujeita a *Real Time*-PCR utilizada nos dois painéis.

Componente	Volume
cDNA	40 µL
<i>Master mix SYBR® Green</i>	4000 µL
Água destilada	3960 µL
	Volume final: 8000 µL

2.6.3 – Análise bioinformática

Os resultados obtidos foram analisados por recurso ao *software Sequence Detection Systems* (V. 2.4.1) (*Applied Biosystems*, EUA). A análise da expressão diferencial foi realizada, utilizando como referência os valores de expressão dos genes, *U6snRNA* e *miR-191*. Os valores de Ct foram directamente calculados pelo *software* referido acima, e a partir destes valores foi calculada a média e o desvio padrão. De acordo com as normas de análise, que constam no protocolo fornecido pelo fabricante estabeleceu-se, de, um limite máximo de intervalo do desvio padrão de 0,8.

A calibração de placas foi realizada utilizando os valores calculados para os genes de controlo endógeno (*U6snRNA* e *miR-191*) e os três calibradores inter-placa UniSp3IPC.

2.6.3.1 - Calibração utilizando o controlo endógeno (*U6snRNA* /*miR-191*)

Como acima referido, calculou-se a média dos valores de Ct para os genes *U6snRNA* e *miR-191* nas amostras em análise (SIV_C. Saudável, SIV108, SIV109 e SIV119) para cada um dos painéis em separado (média do painel) e para os dois painéis em conjunto (média global). O factor de calibração para cada um dos painéis I e II foi calculado de acordo com as seguintes expressões:

$$\text{Factor de Calibração}_{(\text{painel I})} = \text{Média global} - \text{Média painel I}$$

$$\text{Factor de Calibração}_{(\text{painel II})} = \text{Média global} - \text{Média painel II}$$

Foi calculado o valor de ΔCt para cada um dos miRNAs nas amostras em análise, utilizando a fórmula: $(\text{Ct}_{\text{miRNA}_{\text{patológico}}} - \text{Ct}_{\text{miRNA}_{\text{C.Saudável}}})$.

A partir do cálculo de ΔCt foi calculado o $-\Delta\Delta\text{Ct}$, de acordo com a seguinte expressão:

$$-\Delta\Delta\text{Ct} = -(\Delta\text{Ct}_{\text{miRNA}} - \text{Factor de Calibração})$$

2.6.3.2 – Calibração utilizando os calibradores inter-placa UniSp3 IPC

Foi calculada a média dos valores de Ct dos três calibradores inter-placa (UniSp3 IPC) para cada uma das amostras em análise (SIV_C. Saudável; SIV108; SIV109 e SIV119) para cada um dos painéis. Com o valor das médias foi calculado o valor da média global em cada um dos painéis. O factor de calibração para cada uma das amostras foi calculado de acordo com as seguintes expressões:

$$\text{Factor de Calibração}_{(\text{SIV_C.Saudável})} = \text{Média UniSp3 IPC}_{(\text{SIV_C.Saudável})} - \text{Média global UniSp3 IPC}$$

Factor de Calibração _(SIV108) = Média UniSp3 IPC _(SIV108) - Média global UniSp3 IPC

Factor de Calibração _(SIV109) = Média UniSp3 IPC _(SIV109) - Média global UniSp3 IPC

Factor de Calibração _(SIV119) = Média UniSp3 IPC _(SIV119) - Média global UniSp3 IPC

Foi de seguida subtraído o valor do factor de calibração da amostra correspondente ao valor de Ct de cada miRNA para cada uma das amostras.

Calculou-se de seguida o valor de ΔCt para cada um dos miRNAs nas amostras em análise, utilizando a fórmula: $(Ct_{miRNA_{patológico}} - Ct_{miRNA_{C.Saudável}})$.

A partir do valor de ΔCt foi calculado o $-\Delta\Delta Ct$, de acordo com a seguinte expressão:

$$-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_{miRNA} - \Delta Ct_{U6snRNA}) \text{ e } -\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_{miRNA} - \Delta Ct_{miR-191})$$

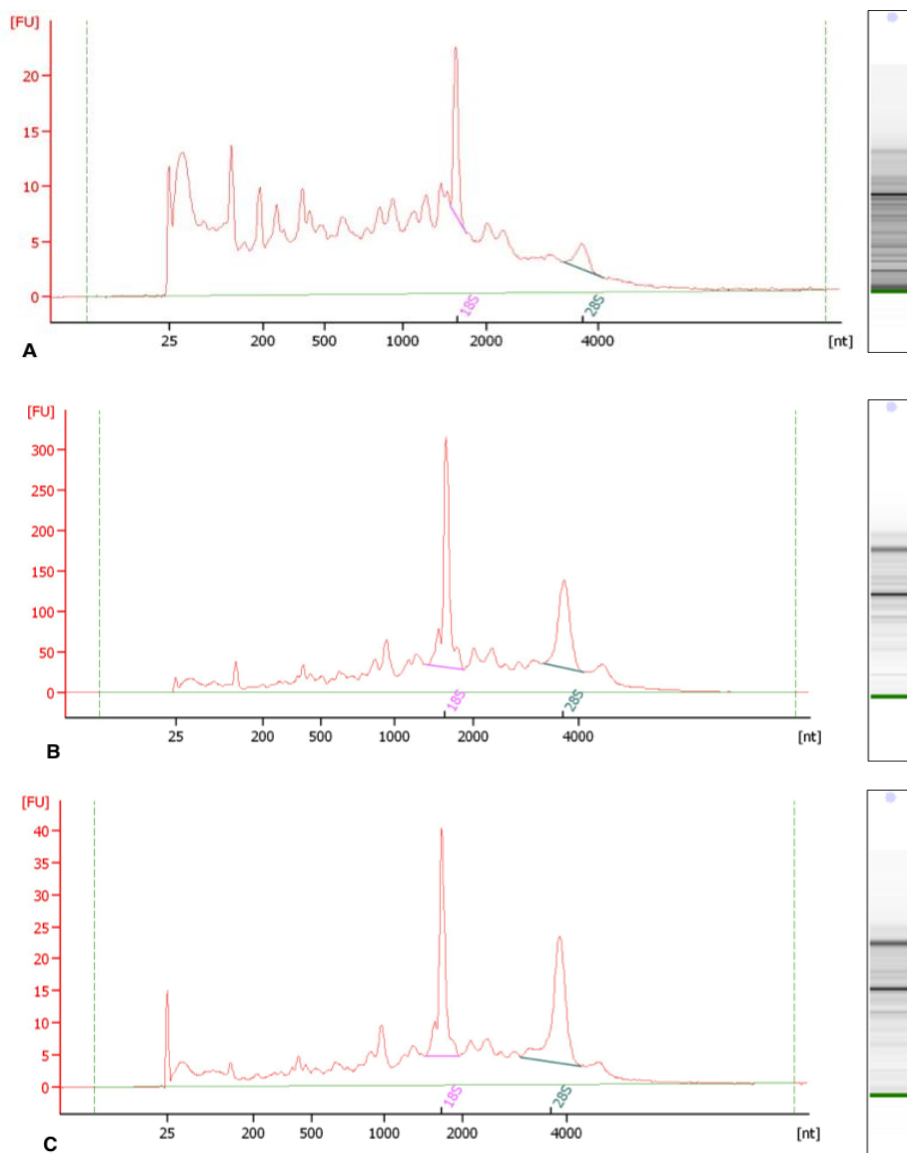
Após a realização desta primeira análise foram aplicados vários níveis de corte aos valores de $-\Delta\Delta Ct$ das três amostras patológicas. Foram utilizados os seguintes níveis de corte (níveis a partir dos quais são filtrados os miRNAs que apresentem determinada variação expressão): 1,5, 6,5 e 10, que permitiram determinar quais os miRNAs com variação de expressão de cerca de 2,5, 100 ou 1000 vezes (x), respectivamente, em relação ao controlo saudável.

Por facilidade de representação, nos gráficos apresentados no capítulo seguinte foi utilizado o valor de $-\Delta\Delta Ct$.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da integridade do RNA

O RNA extraído a partir das amostras de tecido de SIV cardíaco dos cinco doentes foi sujeito a análise num espectrofotómetro de elevada sensibilidade, o *Bioanalyzer 2100* (*Agilent Technologies*, EUA) de modo a avaliar a sua integridade, garantindo que a sua qualidade não compromete os futuros ensaios de expressão de mRNAs e miRNAs. Os resultados desta avaliação para as amostras em questão encontram-se representados na Fig. 3.1.



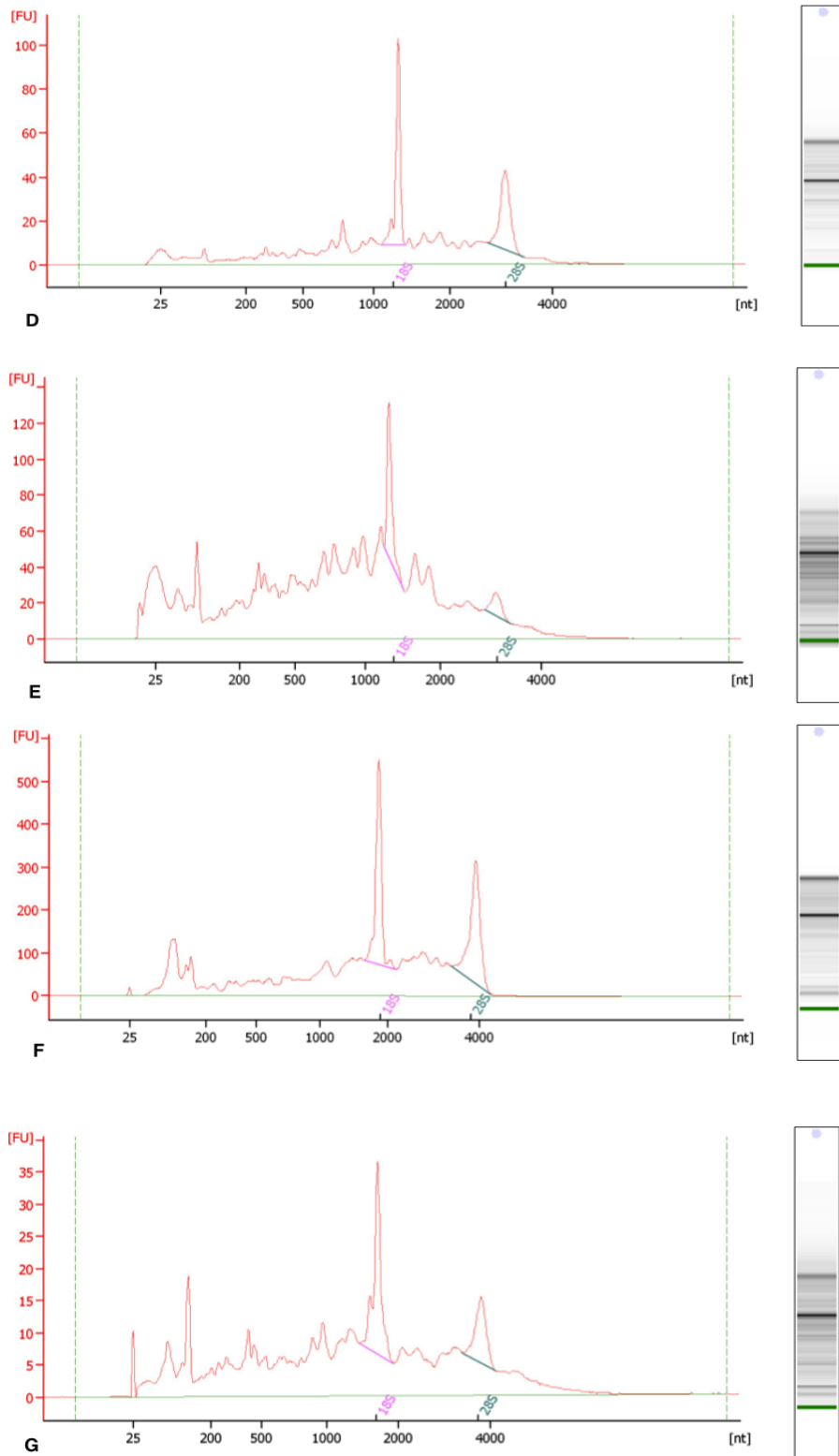


Figura 3.1 – Electroferogramas resultantes da análise de integridade do RNA (à esquerda) e representação de uma electroforese em gel desnaturante (à direita) da mesma amostra de RNA. A) RNA_SIV100; B) RNA_SIV108; C) RNA_SIV109; D) RNA_SIV119; E) RNA_SIV124; F) RNA_SIV_C.Comercial; G) RNA_SIV_C.Saudável. Na imagem do electroferograma encontram-se evidenciados os picos relativos às bandas correspondentes aos rRNA18S (a roxo) rRNA28S (a verde). Na imagem representativa do gel de agarose em

condições desnaturantes identifica-se a banda correspondente ao rRNA28S (em cima) e em baixo a banda relativa ao rRNA18S). FU – Fluorescência; nt – nucleótidos.

A presença de arrastamento abaixo das bandas de rRNA é um indicador da sua degradação, sendo que a presença de bandas de elevado peso molecular são uma indicação de contaminação por DNA genómico. Considera-se que uma amostra de RNA de boa qualidade deve apresentar bandas correspondentes ao rRNA 18S e rRNA 28S bem definidas. Além disso, a banda correspondente ao rRNA 28S, que tem um maior número de bases (5034nt) relativamente à molécula de rRNA18S (1870nt) (Figura 3.1), logo deve apresentar o dobro da intensidade desta no gel de agarose. Este facto acontece pois, apesar de existirem tantas moléculas de rRNA 28S como de rRNA 18S, a detecção de rRNA depende da intercalação do corante no RNA que, por sua vez, depende do número de bases presente em cada molécula. Assim o dobro das bases de RNA ligar-se-á ao dobro de moléculas de corante, o que vai resultar numa intensidade de sinal no gel da banda correspondente ao rRNA 28S duas vezes superior (<http://biomedicalgenomics.org/index.html>). Outro dos parâmetros, que é possível visualizar através dos electroferogramas, e que um RNA de boa qualidade deve apresentar, é o pico relativo à molécula rRNA 28S, que deverá apresentar uma área com o dobro do tamanho da área do pico relativo à molécula rRNA 18S, e o rácio entre as moléculas rRNA (28S/18S) deverá ser aproximadamente 2 (<http://biomedicalgenomics.org/index.html>).

Na representação dos géis de agarose em condições desnaturantes respeitantes a cada electroferograma da figura 3.1 constata-se que as amostras SIV100 (A) e SIV124 (E) relativas a dois dos cinco doentes com MHO, apresentam um arrastamento entre as bandas correspondentes ao rRNA 18S e 28S e abaixo da banda correspondente ao rRNA 18S, o que indica que o RNA está parcialmente degradado. Relativamente aos electroferogramas de ambas as amostras, é possível observar que o pico relativo à molécula de rRNA 28 não apresenta o dobro da área do pico relativo à molécula rRNA 18S, e o rácio rRNA (28S/18S) é de 0,4 para a amostra SIV100 e 0,3 para a amostra SIV124, o que demonstra a degradação do RNA. Relativamente ao valor de RIN, a amostra SIV100 apresenta um RIN de 3,4 e a amostra SIV124 um valor de 3,7. Tendo em conta que o valor mínimo de RIN para obtenção de resultados fiáveis na técnica *Real Time-PCR* é 5 (numa escala de 1 (completamente degradado) a 10 (intacto), e que ambas as amostras se apresentam degradadas, o que é possível inferir através da observação dos picos e das bandas relativas ao rRNA 28S e rRNA 18S, tal como descrito acima, estas foram excluídas do estudo (Fleige e Pfaffl, 2006).

Relativamente às amostras controlo (SIV_C.Comercial e SIV_C.Saudável) e às amostras SIV108, SIV109 e SIV119, estas apresentaram um RIN de 6,70; 5,60; 6,70; 7,0 e 6,90 respectivamente, valores estes superiores ao valor mínimo de RIN para obtenção de resultados fiáveis em *Real Time-PCR*. Através da observação dos géis de agarose em condições desnaturantes referentes a estas amostras (Fig. 3.1), é possível constatar que, em todas as amostras, apesar das bandas correspondentes aos rRNA 28S e 18S se encontrarem bem definidas, e de não se verificar a presença de um elevado arrastamento, a banda relativa ao rRNA 28S não apresenta o dobro da intensidade da banda

correspondente ao rRNA 18S, o que indica alguma degradação da molécula rRNA 28S. Nos electroferogramas referentes às amostras é também possível verificar que o pico referente à molécula rRNA 28S não apresenta o dobro da área do pico referente à molécula rRNA 18S. O rácio 28S/18S para as amostras SIV_C.Comercial, SIV_C.Saudável, SIV108, SIV109 e SIV119 é respectivamente 0,9; 0,4; 0,6; 1,0 e 0,7, respectivamente. Este rácio é para todas as amostras inferior a 2, mas quando o RNA é isolado a partir de tecidos, é muito difícil de obter rácios 28S/18S de 2. A principal razão para isso é que, para além de alguma degradação enzimática que ocorre durante a extracção e isolamento de RNA, a homogeneização mecânica do tecido vai levar a que algumas moléculas de RNA sejam degradadas. Logo, como a molécula de rRNA 28S é duas vezes maior que a molécula rRNA 18S, é mais vulnerável à ruptura mecânica, tendo uma maior probabilidade de ser degradada. Este facto resulta num declínio acentuado do rácio rRNA (28S/18S) aquando homogeneização mecânica do tecido, sendo ainda mais elevado quando os tecidos são duros, tal como o músculo cardíaco, que é, o objecto do nosso estudo (<http://biomedicalgenomics.org/index.html>). Devido a este facto e tendo em conta o RIN destas amostras, que tal como referido é superior a 5, estas foram as amostras utilizadas nos ensaios posteriores.

Na tabela 3.1 encontra-se a compilação dos valores de RIN e do rácio rRNA (28S/18S) para cada uma das amostras em estudo, relativas aos cinco doentes com diagnóstico de MHO e aos dois controlos saudáveis.

Tabela 3.1 – Compilação dos valores de RIN e rácio rRNA (28S/18S) para cada uma das amostras em estudo.

Amostra	Rácio rRNA (28S/18S)	RIN
SIV100	0,4	3,4
SIV108	0,6	6,70
SIV109	1,0	7,0
SIV119	0,7	6,90
SIV_124	0,3	3,7
SIV_C.Comercial	0,9	6,70
SIV_C.Saudável	0,4	5,60

3.2 – Genotipagem das amostras

Após a extracção de DNA de cada doente a partir de amostras de tecido e sangue periférico, estes foram quantificados por espectrofotometria e a sua integridade avaliada em gel de agarose (Fig. 3.2 e Tabela 3.2). As amostras representadas na Fig. 3.2 correspondem a DNA extraído de tecido de septo interventricular dos doentes SIV108, SIV109 e SIV119. Como é possível verificar através das bandas representadas no gel de agarose (Fig.3.2) e através do rácio 260/280 (cerca de 1,8) (Tabela 3.2) o DNA extraído apresenta uma boa integridade. O rácio 260/230 encontra-se ligeiramente abaixo do

esperado, sendo que um valor numa gama entre 2,0- 2,2 seria o valor ideal. Este facto pode dever-se ao método de extracção de DNA, podendo ter ocorrido contaminação com alguns dos constituintes químicos do kit de extracção que absorvem a 230nm, tais como álcoois e EDTA.

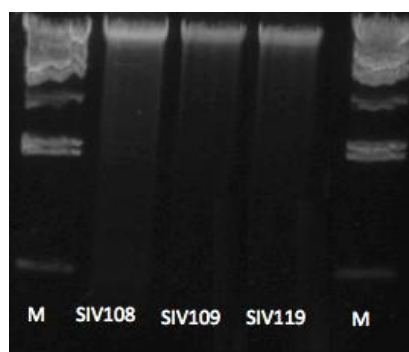


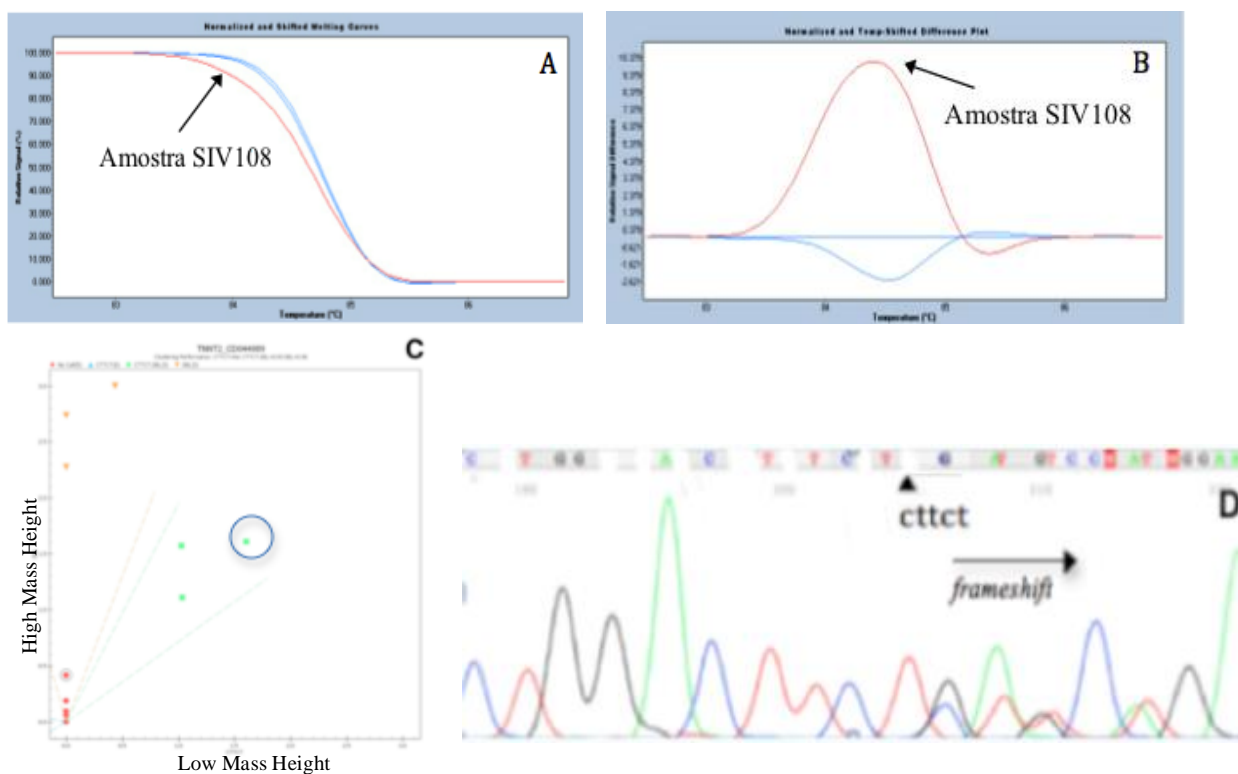
Figura 3.2 – Gel de agarose (0,8% p/v) representativo da integridade do DNA nos doentes SIV108, SIV109 e SIV119. M-Marcador de pesos moleculares;

Tabela 3.2 – Quantificação de DNA extraído das amostras de tecido e sangue periférico dos três doentes (SIV108, SIV109, SIV119).

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Abs 260/280	Abs 260/230
SIV108	66,0	1,83	1,74
SIV109	42,3	1,82	1,77
SIV119	45,2	1,80	1,79

A genotipagem dos três doentes com diagnóstico clínico de MHO (SIV108, SIV09, SIV119) foi realizada acoplando duas tecnologias: (i) iPLEX *MassArray*, que permite a detecção de 541 mutações (associadas à MH) em 33 genes sarcoméricos e não sarcoméricos; e (ii) HRM que permite a identificação de novas variantes genéticas com uma elevada sensibilidade e especificidade. Em conjunto, estas duas técnicas permitem um diagnóstico rápido, preciso e económico (Santos *et al.*, 2012). A genotipagem por iPLEX *MassArray* foi realizada por outros membros do grupo de investigação mas a sua análise foi alvo deste trabalho. Todas as alterações detectadas por esta metodologia careciam, no entanto, de confirmação, a qual foi realizada no decurso deste trabalho por HRM e/ou SA.

Relativamente ao doente SIV108, foi detectada por HRM (Fig.3.3 A e B) e por iPLEX *MassArray* (Fig. 3.3 C) uma mutação no gene *TNNT2*, no intrão 3. A mutação identificada, com o código CD044989 na base de dados de Mutações do Genoma Humano (HGMD, do inglês *Human Gene Mutation Database*) diz respeito a uma deleção de 5 pares de bases (CTGGACTTCTtcttGAGCAG_I3E4_AA^19GC) (Fig. 3.3, E) em heterozigotia originando uma alteração da grelha de leitura (mutação *frameshift*) (Fig.3.3 D).



E

ggtaagcgtaaacgtgtgtactcatttggatcaaagacagcctgggttcgaaactgaccacctcttctcttctcttctctgctgcctggacttctctctgag
 cagAAGCAGCTGTTGAAG

Figura. 3.3 – Identificação da mutação CD044989 na amostra SIV108 por HRM, *iPLEX MassArray* e SA. A amostra SIV108 (a vermelho) apresenta uma curva de desnaturação distinta das amostras controlo (a azul) (A) com uma diferença relativa de sinal de +10,3 no *Difference plot* (B); No gráfico de *iPLEX MassArray* (C) observa-se em cima um grupo representado por triângulos laranja invertidos que correspondem às amostras homocigóticas para a deleção de *cttct*. Afastado desse grupo encontra-se um quadrado verde, rodeado com uma circunferência azul que corresponde à amostra SIV108, que como é possível verificar, é heterocigótico para a mutação CD044989. No cromatograma (D) é possível identificar a deleção das bases *cttct* em heterocigotia (indicada com triângulo preto no cromatograma), o que origina um padrão de *frameshift* com sobreposição dos picos seguintes na sequência do cromatograma. E) Sequência retirada da base de dados (NCBI-RefSeq - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) correspondente ao intrão 3 (letras minúsculas) e exão 4 (letras maiúsculas) do gene *TNNT2*, onde se encontra, destacado a azul, os cinco nucleótidos (*cttct*) delectados; A- Adenina; C- citosina; G- Guanina; T – Timina;

A genotipagem, por *iPLEX MassArray*, do doente SIV109 permitiu detectar uma alteração em homocigotia, no exão 15 do gene *TNNT2* (CM031384 – c.833 A>T; p.Asn278Ile) (Fig. 3.4). Esta alteração foi sujeita a confirmação por HRM e por SA, mas até à data de escrita desta tese não foi

possível, após sucessivas extracções de DNA, conseguir a amplificação pela técnica de HRM desta amostra, nem obter os resultados de SA.

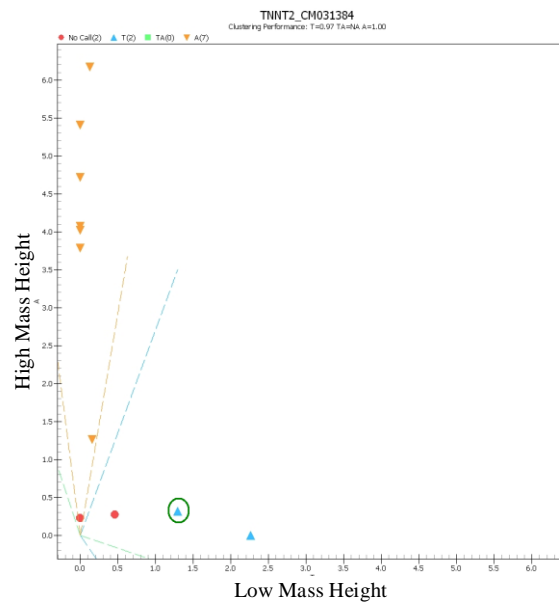
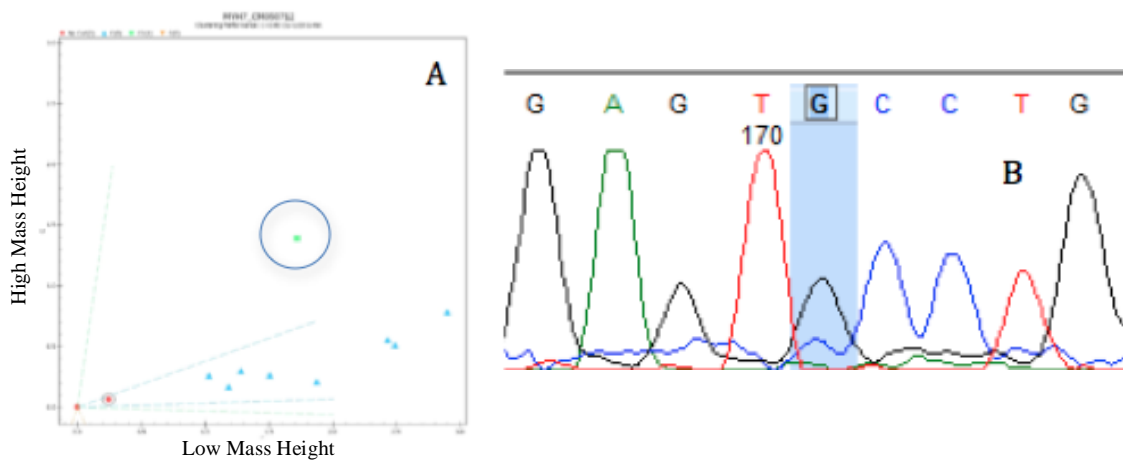


Figura 3.4 – Resultado da genotipagem do doente SIV109 por *iPLEX MassArray* para a alteração CM031384 no exão 15 do gene *TNNT2*. Observa-se um grupo principal (triângulos laranja invertidos) em que as amostras são identificadas como tendo o alelo A (*wild type*) na posição 833 da sequência nucleotídica. Afastado desse grupo e assinalado com uma circunferência verde, encontra-se um triângulo azul que corresponde à amostra SIV109, detectada como homocigótica para a mutação c.833 A>T; p. Asn278Ile.

No doente SIV119 foi identificada por *iPLEX MassArray* uma mutação em heterozigotia no exão 32 do gene *MYH7*, correspondente à alteração c.4472 C>G; p.Ser1491Cys (código do HGMD - CM050712) (Fig.3.5), a qual foi confirmada por SA.



GENE ID: 4625 MYH7 | myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)

C

Score = 266 bits (294), Expect = 1e-68
Identities = 159/163 (98%), Gaps = 3/163 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 56   GCCGAGCTGGAAGCAGAAGTATGATGGAGTCGCAGTCGGAGCTGGAGTCCCTCGTCAGAAG 115
          |||
Sbjct 4466  GCCGAG-TCGAAGCAGAAGTATGA--GGAGTCGCAGTCGGAGCTGGAGTCCCTCG-CAGAAG 4522

Query 116  GAGGCTCGCTCCCTCAGCACAGAGCTCTTCAAACCTCAAGAACGCCTATGAGGAGTGCCTG 175
          |||
Sbjct 4523  GAGGCTCGCTCCCTCAGCACAGAGCTCTTCAAACCTCAAGAACGCCTATGAGGAGTGCCTG 4582

Query 176  GAACATCTGGAGACCTTCAAGCGGGAGAACAAAAACCTGCAGG 218
          |||
Sbjct 4583  GAACATCTGGAGACCTTCAAGCGGGAGAACAAAAACCTGCAGG 4625
  
```

Figura 3.5 -Resultados de genotipagem do doente SIV119; A) Genotipagem por *iPLEX MassArray* para a alteração CM050712 no gene *MYH7*; observa-se um grupo principal (triângulos azuis) em que as amostras são identificadas como tendo alelo C (*wild type*) na posição 4472 da sequência nucleotídica. Afastado desse grupo e assinalado com uma circunferência azul, encontra-se um quadrado verde que corresponde à amostra SIV119, sendo a mutação c.4472 C>G detectada como heterozigótica, no exão 32 do gene *MYH7*. B) Cromatograma em que assinalado com a linha azul encontra-se a sobreposição dos picos de C e G, que definem a heterozigotia na posição c.4472, no exão 32 do gene *MYH7*; C) Alinhamento parcial da sequência de referência do gene *MYH7* com a sequência de DNA da amostra SIV119, onde se identifica a substituição de C por G (assinalado a azul), que origina a mutação c.4472 C>G; p.Ser1491Cys (NCBI, BLASTn, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Na tabela 3.3 encontra-se uma compilação dos resultados de genotipagem obtidos pelas três técnicas utilizadas aquando da genotipagem dos três doentes.

Tabela 3.3 - Compilação dos resultados obtidos pelas técnicas de *iPLEX MassArray*, HRM e SA aquando da genotipagem dos doentes SIV108, SIV109 e SIV119.

Doente	Gene	Localização	Tipo de Mutação	Resultado <i>iPLEX MASSARRAY</i>		Resultado HRM	Resultado SA
				Alteração nucleotídica	Alteração da tradução	Perfil de desnaturação	
SIV108	<i>TNNT2</i>	Intrão 3	Deleção	Del CTTCT	não aplicável	Diferente (+10,3)	CTGGACTTCTcttct GAGCAG_I3E4_AA ^19GC
SIV109	<i>TNNT2</i>	Exão 15	Pontual	c.833 A>T	p.Asn278Ile	Sem amplificação	Confirma resultado de <i>iPLEX MASSARRAY</i>
SIV119	<i>MYH7</i>	Exão 32	Pontual	c.4472 C>G	p.Ser1491Cys	Sem amplificação	A aguardar resultado

A integração dos resultados de genotipagem com o restante trabalho realizado e a sua discussão será compilada ao longo dos próximos capítulos desta secção.

3.3 – Análise transcritómica

Foi previamente determinado pelo grupo de investigação o nível de expressão genética de quatro genes sarcoméricos, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYBPC3* em dois tipos de tecido muscular (SIV e AAD) em 40 doentes com diagnóstico de MH. Neste trabalho, foram reconfirmados os resultados de expressão para os doentes que apresentavam uma forma de MH mais severa (MHO). Os valores de expressão para cada tecido e doente foram normalizados com base nos valores de expressão do gene *rRNA18S* (ΔCt). Para cada amostra foram realizados dois ensaios, com três réplicas por ensaio e todos os valores de expressão correspondentes aos indivíduos doentes foram relativizados utilizando os valores de expressão correspondentes ao controlo saudável para cada um dos quatro genes e tecidos ($\Delta\Delta\text{Ct}$).

Com os valores de ΔCt obtidos foi realizada uma análise bioinformática que permitisse a avaliação independente dos valores de expressão por gene, doente e tecido de modo a averiguar uma relação entre os níveis de expressão dos quatro genes sarcoméricos por tecido e por doente. Pela análise de resultados obteve-se um dendograma onde é possível observar o agrupamento das amostras em quatro *clusters* (Fig. 3.6). O agrupamento dos doentes nestes quatro *clusters* poderá reflectir características clínicas e genéticas distintas entre os diferentes *clusters*.

Desta forma todos os doentes analisados no âmbito deste trabalho, foram agrupados no *cluster* III (figura 3.6). Ao longo desta secção será então discutido o perfil de expressão genética deste grupo de doentes para os 4 genes sarcoméricos, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYBPC3*, nos dois tecidos cardíacos: SIV e AAD. Para os doentes SIV108, SIV109 e SIV119 foi realizada uma análise mais detalhada no sentido de relacionar os perfis de expressão genética dos quatro genes sarcoméricos com os respectivos perfis de expressão de miRNAs e perfis de genotipagem.

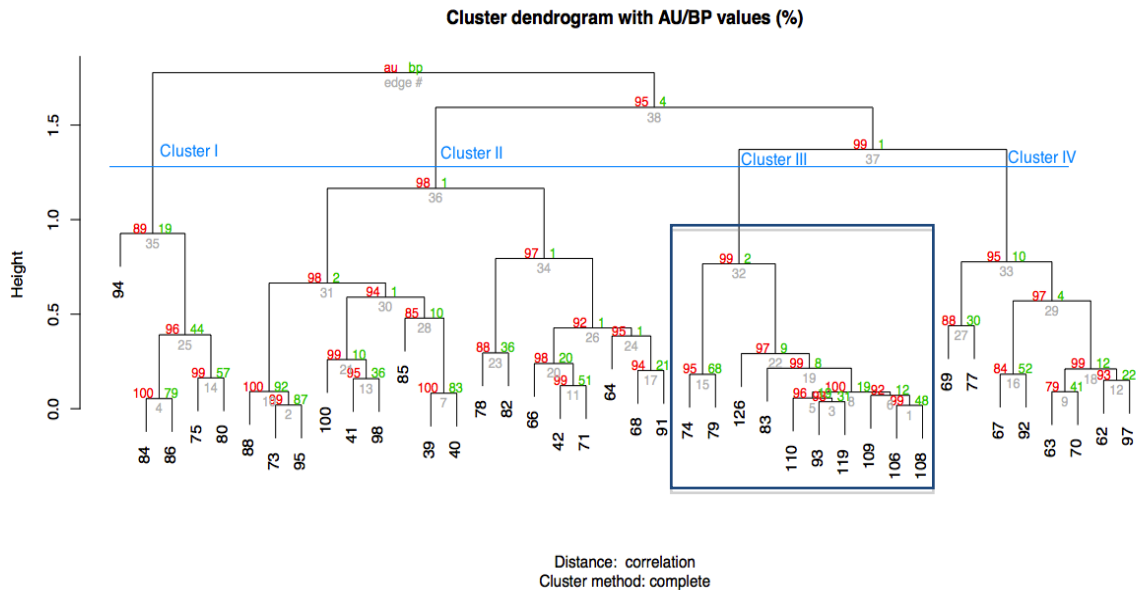
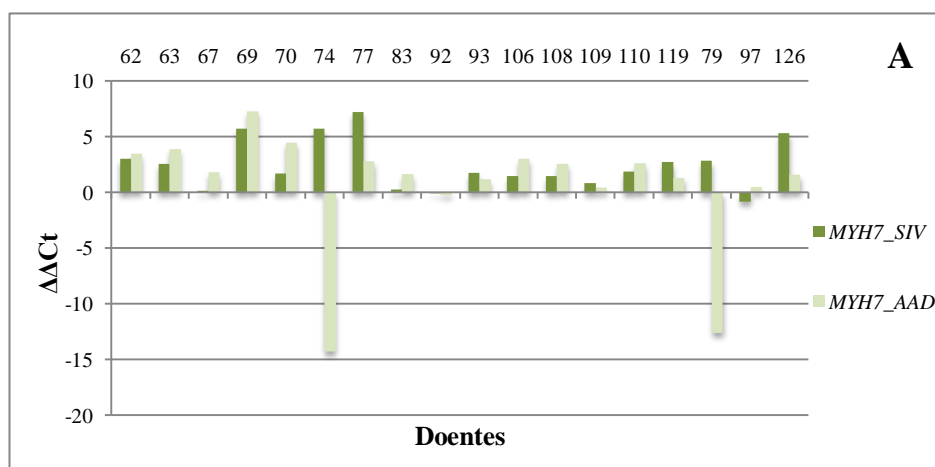


Figura 3.6 - Dendrograma obtido a partir da análise transcritômica (RT-PCR) no tecido cardíaco SIV e AAD dos genes *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, e *MYBPC3* em 40 doentes; au = *approximately unbiased* (AU) *p-value*, bp = *bootstrap probability* (BP) *value*. Em destaque (assinalado com um quadrado azul) encontram-se os doentes do *cluster* III que possuem MHO e entre os quais se identificam os doentes SIV108, SIV109 e SIV119, objecto de estudo desta tese.

3.3.1 – Perfil de expressão dos genes sarcoméricos *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYBPC3* no septo interventricular e apêndice auricular direito

Os perfis de expressão dos genes sarcoméricos *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYBPC3*, relativamente ao controlo saudável, nos dois tipos de tecido cardíaco (septo interventricular e apêndice auricular direito), correspondentes a cada doente do *cluster* III e do *cluster* IV, encontram-se apresentados nos gráficos abaixo (Fig. 3.7).



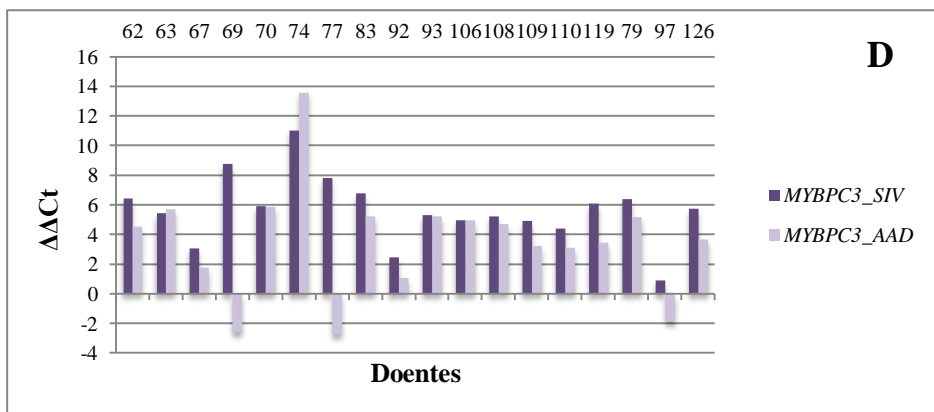
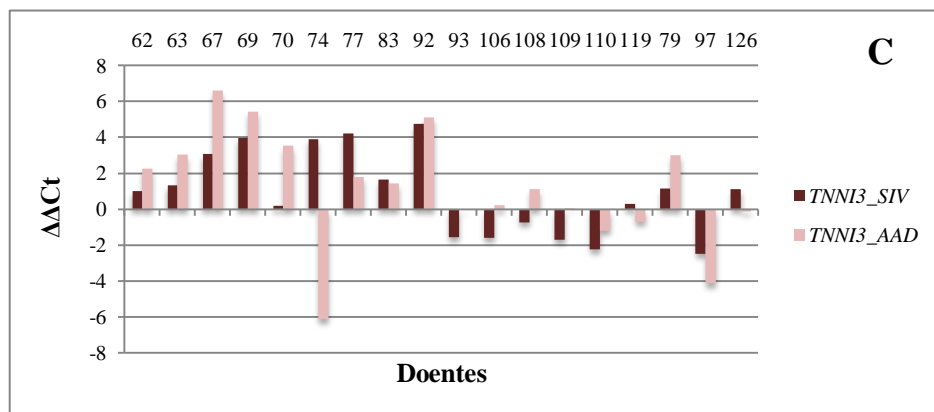
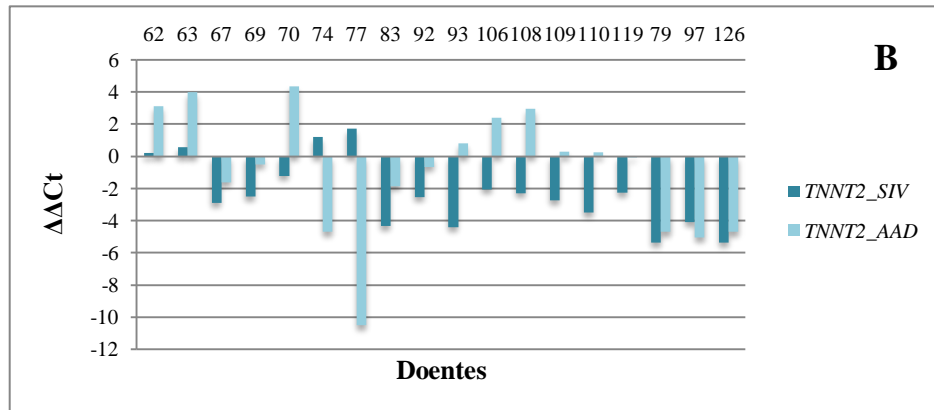


Figura 3.7 – Perfis de expressão dos principais genes sarcoméricos A) *MYH7*; B) *TNNT2*; C) *TNNI3*; D) *MYBPC3*, nos dois tipos de tecido cardíaco (SIV e AAD) correspondentes aos doentes do *cluster* III e do *cluster* IV, relativamente ao controlo saudável.

Como foi referido anteriormente, a MH é uma doença que tem impacto essencialmente ao nível do ventrículo e do septo interventricular, afectando de forma moderada ou mais severa a sua morfologia, fisiologia e funcionamento. Por esta razão seria de esperar uma alteração de expressão genética mais significativa ao nível do SIV. No entanto, como se pode verificar pela análise da figura 3.6, denotam-se algumas diferenças significativas entre os dois tipos de tecidos, mas de uma forma geral, verifica-se

que o tecido auricular aparece também bastante afectado. Realizando uma análise global, todos os genes sarcoméricos estudados apresentam um padrão geral de sobre-expressão, excepto o gene *TNNT2*, que se apresenta na maior parte dos doentes sub-expresso.

O gene *MYH7* (figura 3.7, A) encontra-se maioritariamente sobre-expresso relativamente ao controlo saudável em ambos os tecidos, apesar de em grande parte dos doentes ocorrer uma maior expressão no tecido auricular comparativamente ao tecido ventricular. Os doentes 74 e 79 apresentam uma diminuição da expressão deste gene ao nível do tecido auricular e um aumento da expressão ao nível do tecido ventricular. No geral, seria de esperar uma maior expressão deste gene ao nível ventricular, pois trata-se de um gene que codifica para a cadeia pesada β da miosina, responsável essencialmente pelo mecanismo de contracção cardíaca, mas tal facto não se verifica na maioria dos doentes.

O gene *TNNT2* (figura 3.7, B), apresenta-se globalmente sub-expresso relativamente ao controlo saudável. Denotam-se algumas diferenças entre a expressão deste gene entre os dois tecidos estudados, sendo mais notório o padrão de sub-expressão no tecido ventricular.

O gene *TNNI3* (figura 3.7, C) não apresenta um padrão de expressão homogéneo entre os doentes, nos dois tecidos estudados. Tal facto poderá dever-se a diferentes alterações na sequência de DNA do gene para os diferentes doentes.

A maioria dos doentes apresenta um aumento de expressão do gene *MYBPC3* (figura 3.7, D), a nível ventricular relativamente ao controlo saudável, sendo que isso não se verifica apenas no doente 74.

Na compreensão dos mecanismos moleculares inerentes à MH, a análise de genotipagem realizada para estes doentes, aliada aos resultados derivados da expressão genética para os quatro genes sarcoméricos principais, constitui uma mais-valia no estabelecimento de uma correlação entre o perfil mutacional e o perfil de expressão genética daqueles genes.

Relativamente aos doentes SIV108, SIV109 e SIV119, estes possuem um padrão de expressão diferencial para os principais genes sarcoméricos nos dois tecidos estudados (SIV e AAD), observando-se globalmente para estes três doentes, um aumento de expressão dos genes *MYH7* e *MYBPC3* (Fig. 3.7 A, D) e uma diminuição de expressão dos genes *TNNT2* e *TNNI3* (Fig. 3.7 B, C) relativamente ao controlo saudável.

Tal como descrito no ponto 3.2, foi identificado no doente siv108 uma deleção de cinco pares de bases no intrão 3 do gene *TNNT2*, em heterozigotia (Fig. 3.3). Estudos *in vitro* utilizando culturas celulares revelaram que esta deleção afecta o padrão de expressão do mRNA, ocorrendo uma diminuição da sua expressão, pois, como este polimorfismo ocorre numa região de *splicing*, afecta o exão 4 do gene (Komamura *et al.*, 2004). Dado que o doente possui um diagnóstico de MH, sendo que esta patologia tem um efeito morfológico e funcional mais acentuado ao nível do tecido ventricular, é de esperar, para este doente, uma diminuição da expressão de *TNNT2* neste tecido quando comparado

com o tecido auricular, facto que se verifica pela análise da Fig.3.7 (B). Esta alteração, por ocorrer em heterozigotia, leva a um mecanismo de haploinsuficiência, em que os alelos normais que estão a ser expressos vão actuar de forma a compensar o efeito provocado pela deleção dos outros alelos, o que também levará à redução da expressão do gene *TNNT2* a nível ventricular.

No doente SIV109, a alteração em homozigotia no exão 15 do gene *TNNT2*, a confirmar-se por SA, poderá influenciar a expressão do mesmo, já que em termos de severidade, o *software* PolyPhen-2 prevê esta alteração como potencialmente maligna (Fig.3.8) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>).

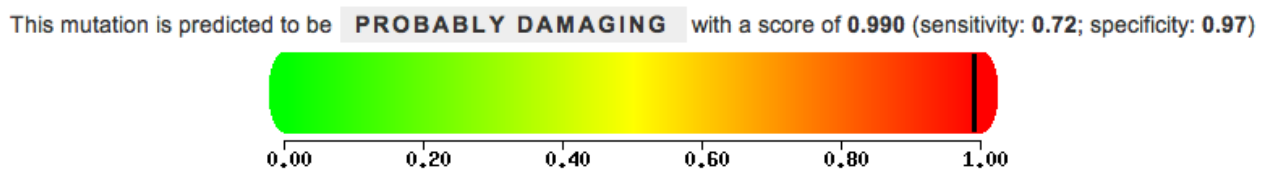


Figura 3.8 - Análise do PolyPhen-2 da mutação c.833 A>T; p. Asn278Ile no gene *TNNT2* identificada no doente SIV109; a alteração é prevista como provavelmente prejudicial com um *score* de 0,990, uma sensibilidade de 0,72 e uma especificidade de 0,97 (Fonte:<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>)

Como se trata de uma alteração em homozigotia e potencialmente maligna, poderá estar associada a fenótipos mais severos de MH, como é o caso deste doente, que sofreu uma síncope cardíaca (Kelly e Semsarian, 2009). É também de salientar que poderá existir correlação entre a expressão dos genes sarcoméricos ao nível tecido ventricular e o fenótipo clínico dos doentes, visto que o doente SIV109 apresenta um padrão de expressão heterogéneo para os quatro genes sarcoméricos, verificando-se um padrão de sub-expressão nos genes *TNNT2* e *TNNI3* e sobre-expressão nos genes *MYH7* e *MYBPC3*.

Relativamente ao doente SIV119, a alteração c.4472 C>G; p.Ser1491Cys, situada no exão 32 do gene *MYH7*, apesar de ser uma alteração prevista como benigna pelo *software* PolyPhen-2 (Fig.3.9), poderá estar a influenciar a expressão deste mesmo gene a nível ventricular, relativamente ao controlo saudável (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>).

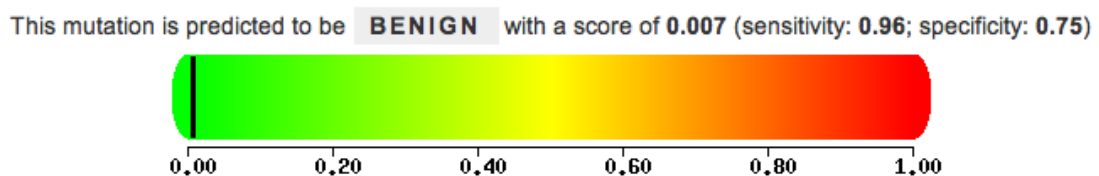


Figura 3.9 – Análise do Polyphen-2 da mutação c.4472 C>G; p.Ser1491Cys, situada no exão 32 do gene *MYH7* no doente SIV119. A alteração é prevista como benigna com um *score* de 0,007, uma sensibilidade de 0,96 e uma especificidade de 0,75 (Fonte: <http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>).

Esta alteração tinha já sido descrita por Roncarati e seus colaboradores (2011) num grupo de doentes italianos com diagnóstico de MH, não sendo identificada nos indivíduos do grupo controlo (indivíduos saudáveis) do mesmo estudo (Roncarati *et al.*, 2011). Esta alteração foi também avaliada como benigna pelos autores, após recurso ao software de previsão de efeito de alterações genéticas na funcionalidade das proteínas (PolyPhen) (Roncarati *et al.*, 2011).

Outras alterações ainda não detectadas, noutras regiões dos principais quatro genes sarcoméricos, também poderão estar na origem dessas diferenças de expressão, o que leva à necessidade de efectuar uma pesquisa mais alargada de alterações nestes genes.

3.4 – Análise do perfil de expressão genética de miRNAs

De forma a caracterizar o perfil de expressão genética dos miRNAs numa situação patológica, nomeadamente na MH, foram efectuados ensaios de RT-PCR utilizando amostras de SIV provenientes de três doentes (108, 109 e 119) com diagnóstico clínico da doença. Estes ensaios foram realizados para a detecção de 739 miRNAs humanos usando para tal *primers LNATM* liofilizados distribuídos por dois painéis (Painel 1 e Painel 2) (**Anexo 1**). Como amostras controlo, foram utilizados RNAs extraídos do septo interventricular de dois indivíduos saudáveis sem manifestação clínica de doença cardíaca. A utilização de apenas duas amostras controlos nestes ensaios prende-se com a dificuldade de obtenção de biópsias deste tipo de tecido a partir de indivíduos saudáveis. Neste caso em particular, os tecidos foram cedidos pela Dra. Rosa Gouveia do Instituto Medicina Legal de Coimbra.

O cálculo do valor de expressão para cada um dos miRNA por amostra foi realizado utilizando o método de $-\Delta\Delta Ct$ (colocou-se o sinal de – no cálculo, de modo a que os valores de sub-expressão ficassem representados na parte negativa do eixo das ordenadas, pois, quando os miRNAs da amostra patológica começavam a amplificar depois dos miRNAs do controlo saudável, apresentavam um Ct superior, mas estavam sub-expressos). Para a realização dos cálculos associados a este método é proposto pelo fabricante do kit usar como controlo endógeno, um dos seis controlos que fazem parte dos painéis: três de pequenos RNAs: *U6snRNA*, *SNORD38B*, *SNORD49A*; e três de miRNAs: miR-103, miR-191 e miR-423-5p. Para a realização dos cálculos neste trabalho foram utilizados como controlos endógenos dois RNAs: o *U6snRNA*, bastante utilizado como controlo em ensaios de RT-PCR por outros autores (Palacín *et al.*, 2011a; Cheng *et al.*, 2007) e o miRNA-191, pois, de entre os controlos de miRNA sugeridos no kit, era o único que nunca tinha sido reportado como implicado em doenças do foro cardíaco, ao contrário do miR-103 e do miR-423-5p (Olivieri *et al.*, 2012; Tijssen *et al.*, 2010; Eisenberg *et al.*, 2007). Optou-se por usar dois controlos de forma a dar mais robustez ao ensaio, pois trata-se de um ensaio preliminar e com uma pequena amostragem populacional. A calibração das placas foi também realizada de duas formas, utilizando como calibrador não só o controlo endógeno, acima referido, como os calibradores inter-placa UniSp3IPC.

Os resultados obtidos com estes diferentes métodos de análise foram coincidentes, o que fornece uma maior robustez e grau de confiança ao ensaio e diminui as variações subjacentes a qualquer análise bioinformática.

3.4.1 – Análise de Dados - cálculo da média e desvio padrão nas amostras saudáveis

De modo a estabelecer um padrão de expressão de miRNA em tecido cardíaco saudável, foi realizada uma análise comparativa do perfil de expressão entre as duas amostras saudáveis. Numa primeira fase, a partir dos valores de Ct das duas amostras saudáveis, foi realizado o cálculo da média e do desvio padrão associado. Após realização destes cálculos, verificou-se que a maioria dos miRNAs apresentava valores de desvio padrão, entre as amostras saudáveis, fora do intervalo máximo considerado (0,8) (Fig.3.10). Adicionalmente os valores de Ct relativos aos controlos endógenos da amostra SIV_C.Comercial não eram congruentes entre si, verificando-se grandes níveis de variação. Por esta razão, esta amostra foi excluída da análise subsequente.

Confrontando os valores de expressão dos diversos miRNAs nas três amostras patológicas verificou-se que a amostra SIV109 apresentava valores diferentes relativamente às outras duas amostras patológicas (SIV108 e SIV119) (Fig. 3.11, Fig. 6.1 do Apêndice 1). Apesar dos três doentes terem o mesmo diagnóstico clínico (MHO) e terem sido agrupados de acordo com os resultados da análise do perfil transcritómico no mesmo *cluster*, trata-se de indivíduos de diferentes idades, com um quadro clínico ligeiramente distinto e com um perfil de mutações nos genes codificantes para as proteínas do sarcómero distinto. Estes factores podem resultar de diferentes perfis de expressão de miRNAs (Ding *et al.*, 2011). Por esta razão decidiu-se analisar estas amostras de forma independente.

	Painel I			A
Sample Name	Ct (SIV_C. Comercial)	Ct (SIV_C.Saudável)	Média amostras saudáveis	DESVPAD < 0.8
hsa-miR-379	32,940147	0	16,4700735	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-217	27,26293	0	13,631465	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-337-5p	31,101765	38,005383	34,553574	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-328	21,48338	23,86939	22,676385	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-374b*	29,811699	28,483574	29,1476365	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-143	18,023138	20,847176	19,435157	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-623	6,6346188	35,630844	21,1327314	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-520c-3p	28,118061	37,019276	32,5686685	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-557	36,09106	0	18,04553	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-218	23,409786	26,501541	24,9556635	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-136	23,730892	33,25984	28,495366	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-127-5p	33,064682	31,351376	32,208029	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-140-5p	22,051092	27,59153	24,821311	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-31*	0	0	0	0
hsa-miR-20b*	24,464016	26,182426	25,323221	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-325	0	0	0	0
hsa-miR-509-3-5p	33,045452	0	16,522726	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-210	23,544495	23,259506	23,4020005	0,201517654
hsa-miR-199b-5p	23,453594	29,1845	26,319047	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-194	26,669127	32,637707	29,653417	ELEVADO DESVPAD
hsa-let-7g	18,144432	17,927025	18,0357285	0,153729964
hsa-miR-203	26,777786	0	13,388893	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-181a*	26,126879	25,191753	25,659316	0,661233936
hsa-miR-934	27,429968	30,069849	28,7499085	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-551b	26,533403	29,370293	27,951848	ELEVADO DESVPAD

Painel II				
Sample Name	Ct (SIV_C. Comercial)	Ct (SIV_C. Saudável)	Média amostras saudáveis	DESVPAD < 0.8
(hsa-miR-220b)	36,886913	27,086449	31,986681	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-146b-3p	28,152782	29,880383	29,0165825	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-543	28,413431	27,990376	28,2019035	0,299145059
hsa-miR-604	32,32216	0	16,16108	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-1260	26,363846	27,413837	26,8888415	0,742455756
hsa-miR-182*	30,189823	32,09217	31,1409965	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-632	30,474815	30,569672	30,5222435	0,067074028
hsa-miR-508-5p	28,897896	31,043118	29,970507	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-671-3p	28,573599	29,056568	28,8150835	0,341510655
hsa-miR-941	26,23244	26,149746	26,191093	0,058473488
hsa-miR-23b*	26,677559	26,178421	26,42799	0,352943865
hsa-miR-591	37,354862	7,7529902	22,5539261	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-26b*	27,006792	28,580015	27,7934035	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-519b-3p	31,850412	32,283993	32,0672025	0,306588065
hsa-miR-130b*	25,019783	27,07763	26,0487065	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-30d*	23,866682	24,631058	24,24887	0,540495453
hsa-miR-526a	0	0	0	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-675b	28,075245	29,676004	28,8756245	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-520e	30,50722	32,04718	31,2772	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-646	34,626724	30,917984	32,772354	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-149*	32,529392	0	16,264696	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-1271	24,975092	28,322338	26,648715	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-520h	33,687813	28,535795	31,111804	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-769-5p	25,317303	26,866117	26,09171	ELEVADO DESVPAD
hsa-miR-612	21,152788	0	10,576394	ELEVADO DESVPAD

Figura 3.10 – Exemplo, para alguns miRNAs do Painel I (A) e do Painel II (B), do cálculo da média e do desvio padrão entre as amostras saudáveis (SIV_C.Comercial e SIV_C.Saudável). Como é possível verificar em ambos os painéis, a maioria dos miRNAs apresentava elevados desvios padrão (ELEVADO DESVPAD, a vermelho) entre as duas amostras saudáveis, o que levou à exclusão da análise da amostra SIV_C.Comercial.

3.4.2 – Perfil de expressão global dos miRNAs

Globalmente observou-se uma sub-expressão de miRNAs nas amostras SIV de doentes com MHO relativamente ao tecido cardíaco saudável (Fig. 6.1 do Apêndice 1).

Relativamente à análise de expressão genética das amostras de SIV para os doentes SIV108, SIV109 e SIV119, compararam-se os valores de expressão dos miRNAs com os valores de expressão dos genes sarcoméricos sendo que, no geral, para estes últimos se observou um aumento de expressão dos genes *MYH7* e *MYBPC3* (Fig. 3.7 A, D e Fig. 6.1) e uma diminuição de expressão dos genes *TNNT2* e *TNNI3* relativamente ao controlo saudável (Fig. 3.7 B, C e Fig. 6.1). Neste sentido, se a maioria dos miRNAs se apresentam sub-expressos e os seus alvos celulares previstos são os mRNA, era de esperar que os transcritos apresentassem um padrão geral de sobre-expressão, o que apenas se verifica nos genes *MYH7* e *MYBPC3*. Esta situação levanta a hipótese, já referida por outros autores, de que miRNAs específicos poderão regular a expressão genética dos mRNAs de genes sarcoméricos (Ikeda e Pu, 2010; Matkovich, 2009). No entanto, para os genes *TNNT2* e *TNNI3* o mesmo não se verifica. Este facto pode ser justificado por várias razões: ou os miRNAs contemplados nos painéis analisados (pré-definidos pela EXIQON) não têm como alvos os genes *TNNT2* e *TNNI3*, ou, caso o alvo seja algum destes dois genes, os miRNAs poderão ter associada à sua função a inibição da tradução proteica e não uma repressão directa a nível do mRNA.

Como foi descrito anteriormente, as três amostras de doentes com MHO foram analisadas independentemente, e para cada uma delas serão apresentados os miRNAs com expressão mais alterada. Os resultados obtidos serão comparados com os resultados publicados em bases de dados e bibliografia.

3.4.3 – miRNAs com variações de expressão entre 100x e 1000x

Entre os miRNAs que apresentam variações dos níveis de expressão da ordem dos 100x e 1000x relativamente ao controlo saudável salientam-se os miRNAs miR-10a, miR-647, miR-371-3p, miR-617 e miR-220b (sub-expressos) e o miR-518f* e o miR-518c* (sobre-expressos) (Fig.3.11). Os restantes miRNAs analisados encontram-se, na grande maioria, com variações de expressão inferiores a 100x e serão abordados mais à frente neste trabalho.

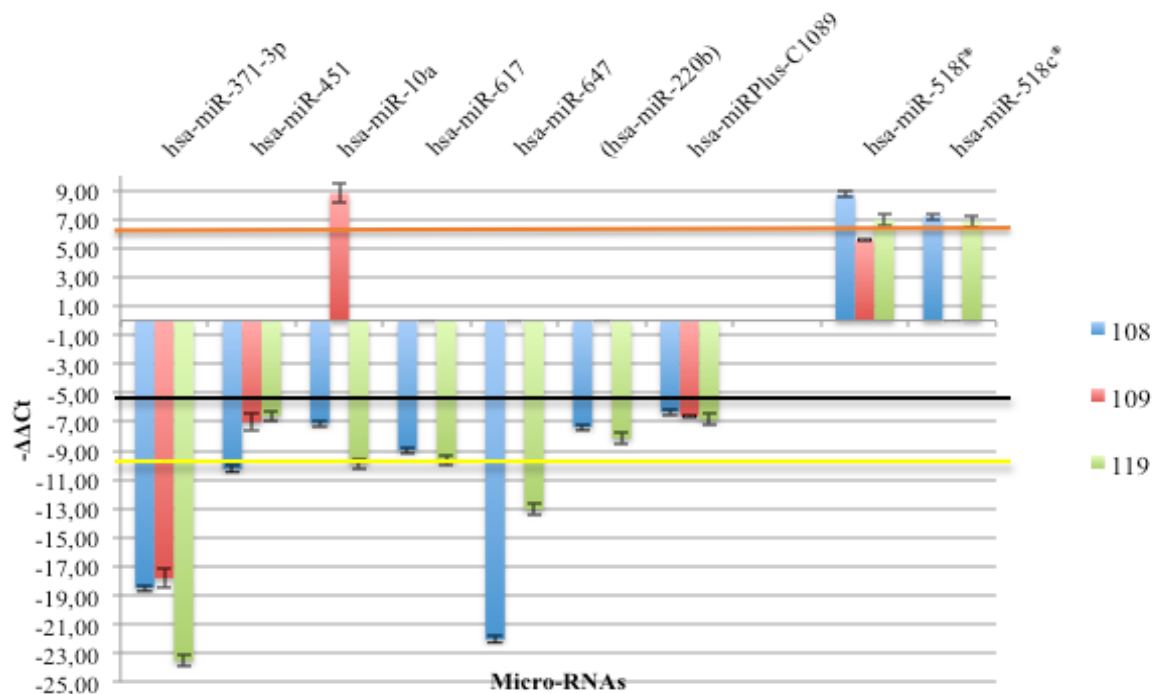


Figura 3.11 – miRNAs com níveis de expressão com ordens de grandeza entre 100x e 1000x relativamente ao controlo saudável. À esquerda no gráfico encontram-se os miRNAs sub-expressos relativamente ao controlo saudável nos 3 doentes: SIV108 (azul), SIV109 (vermelho) e SIV119 (verde). Entre estes, salientam-se o miR-371-3p e o miR-617 que se encontram cerca de 1000x sub-expressos relativamente ao controlo saudável, enquanto os miR-10a, miR-647 e miR-220b encontram-se cerca de 100x sub-expressos. À direita, encontram-se os miRNAs (miR-518f* e o miR-518c*) sobre-expressos cerca de 100x relativamente ao controlo saudável nos três doentes. As linhas coloridas horizontais da imagem referem-se aos diversos níveis de corte efectuados (laranja – (6,5); preta – (-6,5); amarela - (-10), que correspondem a uma expressão de cerca de 100x, -100x e -1000x relativamente ao controlo saudável, respectivamente).

Como é possível verificar através da análise da figura 3.11, o doente SIV109 foi aquele que apresentou resultados mais díspares relativamente aos outros doentes, nomeadamente, nos níveis de

expressão do miRNA-10a, que se encontra sub-expresso nos doentes SIV108 e SIV119, e sobre-expresso no doente SIV109. Também no doente SIV109 não foi detectada a expressão do miR-617, miR-647, miR-220b e miR-518c*. Um dos objectivos desta tese seria integrar o perfil de expressão de miRNAs de cada doente, com o seu perfil genotípico e o seu historial clínico. Na medida em que o perfil de expressão dos genes sarcoméricos para estes doentes é muito semelhante (ver resultados, fig. 3.7), o factor a considerar como modificador da expressão de miRNA e de um diferente quadro clínico deverá ser o perfil genotípico. No caso do doente SIV109 pode inferir-se que, a síncope cardíaca que consta no historial clínico deste doente, poderá estar relacionada com a alteração genética identificada no exão 15 do gene *TNNT2* (c.833 A> T; p. Asn278Ile, em homozigotia) prevista como potencialmente maligna (fig.3.5 e fig.3.9), no entanto esta hipótese terá de ser confirmada, por exemplo através de estudos funcionais de interações de proteínas. Recentemente Palacín e colaboradores (2011a) referiram que diferentes mutações nos genes sarcoméricos, podem influenciar os perfis de expressão dos miRNA (Palacín *et al.*, 2011a). Desta forma as alterações de expressão de miRNA identificadas nos três doentes e o seu quadro clínico podem dever-se ao seu perfil genotípico.

É de salientar que muitos dos resultados publicados até à data relativos a estudos de expressão de miRNAs associados a doenças cardíacas não são concordantes (Matkovich *et al.*, 2009). Em cada estudo identifica-se um conjunto de miRNAs diferencialmente expressos, sendo que devido às divergências entre estudos (nomeadamente no que respeita ao tipo de amostra utilizada) torna-se difícil chegar a uma conclusão geral sobre quais os miRNA específicos associados a uma dada patologia cardíaca. Inúmeros factores têm limitado a reprodutibilidade destes ensaios, como por exemplo: a) as diferenças em termos de modelos de doenças, designadamente linhas celulares, modelos animais, indução de patologia vs patologia congénita; b) a pequena amostragem utilizada; c) diferentes tipos de tecido analisados, designadamente coração total, ventrículo esquerdo, septo interventricular; d) fase em que cada doente é estudado dado que a evolução da doença não é igual em todos os doentes; e) a variabilidade própria de cada indivíduo, inerente às amostras patológicas e controlo utilizadas. No que se refere às tecnologias também as diferentes plataformas de ensaio, os métodos de normalização e o tipo de análise estatística utilizados influenciam a conclusão final dos resultados. Por estes motivos, os estudos de expressão de miRNAs deverão ser realizados utilizando um maior número de amostras patológicas e saudáveis, que tenham sido colhidas e preservadas em condições adequadas. Para cada doente, deve ser determinado o perfil genotípico e o historial clínico deve ser bem documentado. A par destes factores devem ser utilizadas plataformas de quantificação *gold standard*, como é o caso do RT-PCR sendo que, o *design* estatístico deve ser rigoroso e padronizado entre os vários ensaios (Ikeda e Pu, 2010).

Os miRNAs identificados com níveis de expressão alterados nos três doentes (Fig. 3.11) nunca haviam sido descritos como associados a doenças cardíacas, excepto o miR-451, cuja sobre-expressão foi já relatada pelo grupo de Palacín, como associada a MH, em três dos cinco doentes por eles estudados (Palacín *et al.*, 2011a). Dado que, no estudo incluído nesta tese, este miR se encontra sub-

expresso em todos os doentes, torna-se necessário um *screening* de determinação de expressão num maior número de doentes, para que se confirme uma tendência de expressão deste miRNA.

3.4.3.1. –Alvos dos miRNAs com variações de expressão entre 100x e 1000x

Um dos aspectos mais interessantes da biologia dos miRNAs, é que um determinado miRNA pode regular vários genes envolvidos em cascatas de sinalização específicas ou mecanismos celulares, podendo fazê-lo quer ao nível da degradação do mRNA e/ou do bloqueio da tradução da proteína, o que torna os miRNAs eficazes reguladores biológicos (van Rooij, 2011). No entanto, a identificação dos genes que são alvos de acção dos miRNAs, é uma das tarefas mais difíceis na investigação na área dos miRNAs. Estes alvos podem ser consultados através de programas bioinformáticos, disponíveis em inúmeras bases de dados, que na sua maioria prevê apenas alvos putativos, logo, é importante confirmar estas previsões através de técnicas de validação da interacção miRNA-alvo (van Rooij, 2011).

Como se trata de um trabalho preliminar, e de modo a avaliar a robustez dos resultados obtidos, foram feitas pesquisas dos alvos celulares dos miRNAs (Tabela 3.4) em várias bases de dados, nomeadamente Tarbase (<http://microRNA.gr/tarbase>), Diana Micro-T (<http://microRNA.gr>) miRanda (<http://www.microRNA.org>), Targetscan (<http://www.targetscan.org>) e miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>).

O processo de pesquisa revelou-se complexo, pois, como referido anteriormente, cada miRNA pode ter como alvo milhares de genes e os resultados quanto aos alvos apresentados pelas bases de dados não são muitas vezes coincidentes. Por isso restringiu-se a pesquisa fazendo uma intersecção entre as bases de dados Tarbase 6.0, miRTarBase (para alvos validados) e Diana Micro-T v.3. Nesta última, são atribuídos *scores* aos alvos, sendo este valor atribuído com base em simulações de modo a que o utilizador possa avaliar o grau de certeza das previsões. É indicada a metodologia através da qual cada alvo foi validado (caso esteja validado), a ligação do miRNA com o respectivo alvo, as vias onde actua e o tipo de regulação que efectua (Vergoulis *et al.*, 2012; Maragkakis *et al.*, 2009).

Como a MH afecta maioritariamente o sarcómero cardíaco, foi também efectuada uma pesquisa no sentido de procurar quais os miRNAs que teriam como alvo os principais genes sarcoméricos. No entanto, nas principais bases de dados analisadas não foram encontrados quaisquer resultados neste sentido, logo apenas se poderá conseguir tirar conclusões com base em bibliografia ou em futuros ensaios funcionais utilizando linhas celulares de cardiomiócitos.

Na tabela 3.4 é possível verificar quais os alvos validados e quais os alvos previstos (considerados apenas aqueles com maior *score*, segundo as bases de dados consultadas) para cada miRNA cuja expressão se apresentou alterada, e a proteína correspondente codificada pelo gene alvo.

Tabela 3.4 – Genes alvo dos miRNAs identificados com expressão alterada nos doentes com MHO e respectiva proteína por eles codificada. Encontram-se destacados a cinzento os alvos previamente validados, sendo que os restantes foram apenas previstos bioinformaticamente (Fonte: Diana Micro-T v.3.0, Tarbase 6.0, a miRTarBase acesso a 4 de Setembro 2012).

miRNA	Gene Alvo (com maior <i>score</i>)	Proteína Codificada
miR-371-3p	<i>ZNF213</i>	Proteína <i>zinc finger</i> 213
miR-451	<i>ABCB1</i>	Membro 1 da subfamília B da <i>ATP-binding cassette</i>
miR-10a	<i>HOXA1</i>	Proteína da <i>homeobox A1</i>
miR-617	<i>NTRK3</i>	Receptor neurotrófico do tipo 3 da tirosina-cinase
miR-647	<i>C2ORF86</i>	<i>WD repeat-containing and planar cell polarity effector protein fritz homolog</i>
miR-220b	<i>GGTL3</i>	Precursor 4 da gama-glutamyltransferase
miR-518f*	<i>CBX8</i>	Homólogo 8 da <i>cromobox</i>
miR-518c*	<i>TNK2</i>	Não receptor 2 da tirosina-cinase

O alvo previsto com maior *score* para o miR-371-3p é o gene *ZNF213*, que codifica a proteína *zinc finger* 213, envolvida na regulação da transcrição (UniProt). A desregulação da expressão deste miRNA encontra-se descrita em variados tipos de neoplasias (HMDD – Human MiRNAs & Diseases). Sabe-se também que os genes *ZNF*, efectores de GATA4, são importantes reguladores da transcrição no desenvolvimento cardíaco normal e em condições patológicas, logo desregulações ao nível destes genes, provocadas por alterações de expressão do miR-371-3p, poderão estar correlacionadas com o fenómeno hipertrófico (Debrus *et al.*, 2005).

O gene *ABCB1*, que codifica para o membro 1 da subfamília B da *ATP-binding cassette* é um dos alvos validados do miR-451. Esta proteína é uma bomba de efluxo que está associada à metabolização de fármacos cardiovasculares (Meissner *et al.*, 2004). A expressão deste miRNA relativamente às funções do seu gene alvo sugere que a terapêutica dos doentes estará a influenciar a expressão do gene *ABCB1*, o que se denota através da sub-expressão do miR-451 (Fig. 3.11). Posto isto, a terapêutica associada a cada doente é um factor que deve ser tomado em linha de conta quando se procuram identificar os mecanismos de regulação associados a uma dada patologia. Este miRNA encontra-se também ligado à função de supressor de tumores e está também associado à multirresistência das células à presença de drogas anti-tumorais (Li *et al.*, 2011; miRBase).

O mir-10a tem como alvo validado com maior *score* o gene *HOXA1*, que codifica para a proteína da *homeobox* Hox-A1, envolvida na regulação da identidade celular durante o desenvolvimento embrionário (UniProt). A desregulação deste miRNA está associada a diversos tipos de cancros, entre eles, o cancro do pâncreas (Ohuchida *et al.*, 2012). Mutações neste gene estão directamente relacionadas com o desenvolvimento de graves anomalias cardíacas (Makki e Cappechi, 2012). Foram efectuados estudos, utilizando ratinhos *knock-out* para o gene em causa, e verificaram-se defeitos ao nível do arco aórtico, hipertrofia do ventrículo direito (Makki e Cappechi, 2012). A ligação deste gene alvo ao surgimento de patologias cardíacas e o padrão de expressão aberrante do miR-10a em doentes

com MH, vem reforçar a necessidade de serem efectuados estudos em que sejam elucidadas as vias de sinalização em que o miR-10a actua, de modo a que se encontre uma relação com a MH.

O alvo previsto para o miRNA-617 é o gene *NTRK3*, que codifica para o receptor neurotrófico do tipo 3 da tirosina-cinase, que se encontra maioritariamente expresso no tecido nervoso, mas sabe-se, a partir de estudos efectuados *in vivo*, utilizando como modelo cardiomiócitos embrionários de galinha, que este regula a proliferação dos cardiomiócitos durante a torção cardíaca e no estabelecimento da trabeculação ventricular (Lin *et al.*, 2000). Variações na expressão deste miRNA não se encontram associadas a doenças (HMDD – Human MiRNAs & Diseases).

C2ORF86 é o gene alvo previsto para o miR-647, que não se encontra descrito como interveniente em estados patológicos estando envolvido na biogénese do cílio celular (UniProt).

Já o miR-220b tem como principal alvo o gene *GGTL3* que participa no metabolismo do enxofre e da glutatona e é um antioxidante hidrossolúvel (UniProt). A desregulação deste miRNA não se encontra até à data, associada a estados de doença (HMDD – Human MiRNAs & Diseases).

O alvo do miR-518f*, o gene *CBX8*, tem como função biológica a regulação da transcrição, enquanto o alvo do miR-518c*, o gene *TNK2* desempenha funções na endocitose e está associado à transição de fenótipos hiperplásicos para fenótipos hipertróficos em embriões de peixe-zebra (Johnston *et al.*, 2009)

Como é assim possível constatar, grande parte dos principais alvos dos miRNAs encontrados com uma variação de expressão entre 100x e 1000x (Tabela 3.4), encontram-se relacionados com o desenvolvimento cardíaco ou estão associados a patologias cardíacas, contudo a maioria destes alvos estão apenas previstos, não se encontrando validados por métodos experimentais, o que leva à necessidade emergente da validação de alvos para estes miRNAs, e serem efectuados estudos acerca das vias de sinalização onde os mesmos interferem, para verificar se os mesmos estão implicados na MH.

3.4.4 – miRNAs com variações de expressão inferiores a 100x

A maioria dos miRNAs estudados neste trabalho apresentou valores de expressão inferiores a 100x nas amostras dos doentes com MHO relativamente à amostra controlo saudável (Fig.6.1, apêndice). De forma a direccionar a análise destes resultados, dado o elevado número de miRNAs estudados (739), comparou-se os resultados de $-\Delta\Delta Ct$ obtidos com os resultados de expressão de miRNAs associados a MH já descritos na bibliografia (Figura, 3.12, Tabela 3.5). Entre os estudos que serviram de comparação, encontra-se o estudo realizado por Palacín e colaboradores (2011a), que é, de todos os estudos, aquele que mais se assemelha ao estudo efectuado nesta tese, principalmente no que respeita ao tipo de amostras estudadas, designadamente tecido recolhido de SIV de doentes com MH com mutações identificadas em proteínas sarcoméricas e doentes sem mutações identificadas e à metodologia utilizada (Palacín *et al.*, 2011a).

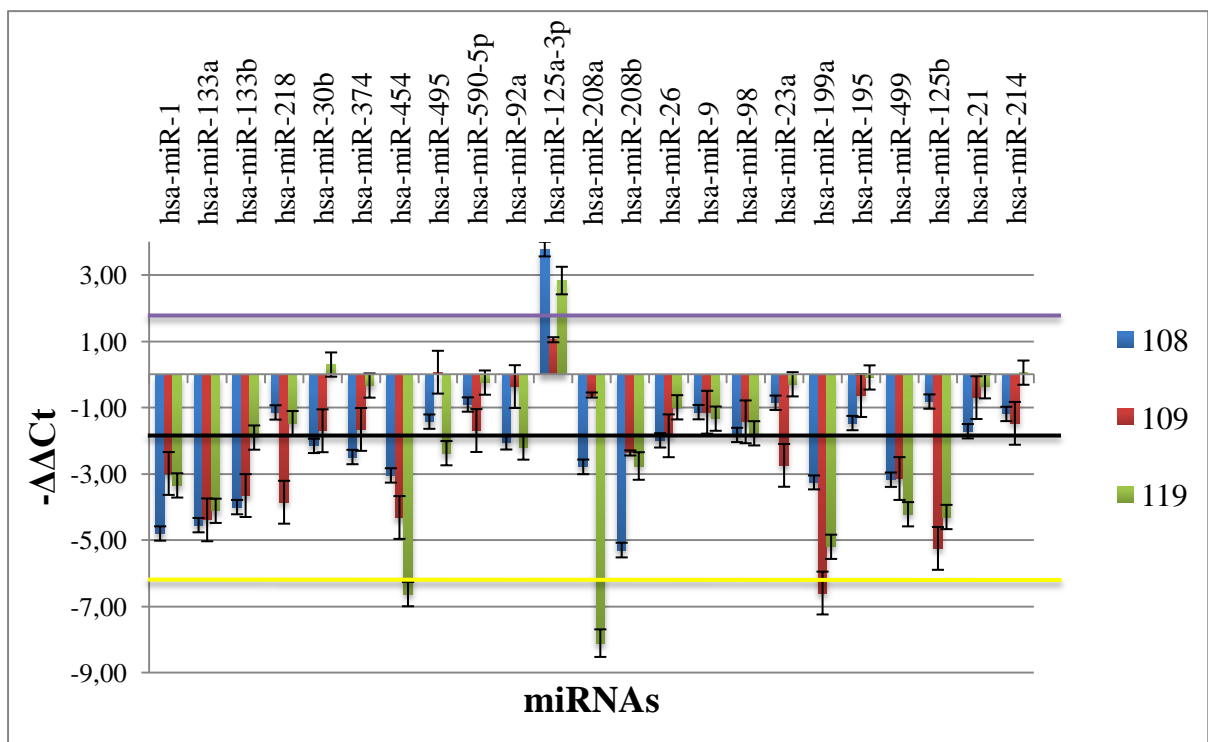


Figura 3.12 – miRNAs cujos níveis de expressão apresentaram ordens de grandeza inferiores a 100x relativamente ao controlo saudável para os doentes SIV108 (azul), SIV109 (vermelho) e SIV119 (verde). As linhas coloridas horizontais da imagem referem-se aos diversos níveis de corte efectuados (preta – (-1,5); roxa – 1,5; amarela – (-6,5) que correspondem a uma expressão de -2,5x, 2,5x e -100x relativamente ao controlo saudável, respectivamente).

Tabela 3.5 – Análise comparativa dos níveis de expressão de alguns dos miRNAs com variações de expressão inferiores a 100x relativamente à amostra controlo saudável e que foram avaliados no decurso desta tese com outros estudos publicados. A laranja encontram-se destacados, os miRNAs em que se observou sub-expressão (Sub-expressão), a azul os miRNAs em que se observou uma sobre-expressão (Sobre-expressão), e a verde os miRNAs que apresentaram valores de expressão inalterada (Normal). Variável – No respectivo estudo a expressão do miRNA varia entre as amostras.

miRNA	Presente estudo			Outros estudos	
	SIV 108	SIV 109	SIV 119	Estudo	Regulação
1	Sub-expressão	Sub-expressão	Sub-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sub-expressão
133a	Sub-expressão	Sub-expressão	Sub-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sub-expressão
133b	Sub-expressão	Sub-expressão	Sub-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sub-expressão
218	Normal	Sub-expressão	Normal	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sub-expressão
30b	Sub-expressão	Normal	Normal	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sub-expressão
374	Sub-expressão	Normal	Normal	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sub-expressão
454	Sub-expressão	Sub-expressão	Sub-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sub-expressão
495	Normal	Normal	Normal	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Variável
590-5p	Normal	Normal	Normal	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sobre-expressão
92a	Sub-expressão	Normal	Sub-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sobre-expressão
125a-3p	Sobre-expressão	Normal	Sobre-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Variável
208a	Sub-expressão	Normal	Sub-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Sobre-expressão
208b	Sub-expressão	Sub-expressão	Sub-expressão	(Palacín <i>et al.</i> , 2011a)	Variável
26	Normal	Normal	Normal	(Han <i>et al.</i> , 2009, citado por Da Costa Martins e De Windt, 2012)	Sub-expressão
9	Normal	Normal	Normal	(Wang <i>et al.</i> , 2010)	Sub-expressão
98	Normal	Normal	Normal	(Yang <i>et al.</i> , 2011)	Sub-expressão
23a	Normal	Sub-expressão	Normal	(Cheng <i>et al.</i> , 2007)	Sobre-expressão
199a	Sub-expressão	Sub-expressão	Sub-expressão	(Rane <i>et al.</i> , 2010)	Sobre-expressão
195	Normal	Normal	Normal	(van Rooij <i>et al.</i> , 2006)	Sobre-expressão
499	Sub-expressão	Sub-expressão	Sub-expressão	(Shieh <i>et al.</i> , 2011)	Sobre-expressão
125b	Normal	Sub-expressão	Sub-expressão	(van Rooij <i>et al.</i> , 2006)	Sobre-expressão
21	Normal	Normal	Normal	(Cheng <i>et al.</i> , 2007)	Sobre-expressão
214	Normal	Normal	Normal	(van Rooij <i>et al.</i> , 2006)	Sobre-expressão

Fazendo uma comparação global, em termos de expressão de miRNAs, entre o estudo desenvolvido nesta tese e os outros estudos, mais uma vez se confirma que o estudo que mais se assemelha com o aqui descrito nesta dissertação, é o estudo efectuado por Palacín e colaboradores (2011a). Em ambos os estudos, a maioria dos miRNAs encontra-se sub-expressa no tecido patológico (Palacín *et al.*, 2011a).

Estabelecendo uma relação entre a expressão de um dado miRNA e o seu mecanismo de acção, verifica-se que a maioria dos miRNAs se encontra sub-expresso. Deste modo os mRNAs por eles regulados, encontrar-se-ão sobre-expressos, o que em consequência implicará uma maior síntese de proteína. É deste modo colocada a hipótese, de que no caso dos doentes com mutações em proteínas sarcoméricas, será sintetizada uma maior quantidade de proteína mutada, o que poderá justificar o fenómeno de hipertrofia. Por sua vez, no caso do mecanismo de acção de um determinado miRNA envolver a inibição da tradução, dado que estes se encontram sub-expressos, irá assim ocorrer um decréscimo no processo de inibição da tradução, o que irá levar, tal como na hipótese anterior, a uma maior síntese de proteína anómala nos doentes com mutações.

Analisando a expressão de cada miRNA, denota-se que o miR-1, o miR-133a e o miR-133b se encontram sub-expressos em ambos estudos. Esta redução semelhante nos níveis de expressão destes miRNAs já era esperada, pois eles pertencem à mesma unidade de transcrição (Thum *et al.*, 2008). O decréscimo nos níveis de expressão destes miRNAs em casos de hipertrofia patológica já tinha sido reportado por outros autores, não só em corações humanos, como também em modelos animais, o que sugere que estes desempenham importantes papéis nas vias de sinalização biológicas, cuja desregulação promove a hipertrofia cardíaca (Carè *et al.*, 2007; Sayed *et al.*, 2007; van Rooij *et al.*, 2006).

Segundo dados da Tarbase v.6.0, o miR-1 apresenta cerca de mil genes alvo validados experimentalmente, o miR-133a apresenta 51 alvos validados e o miR-133b apresenta cerca de 10 alvos. Como é de esperar, todos eles interferem num grande número de vias de sinalização biológicas, cuja desregulação poderá a levar à hipertrofia cardíaca, como é o caso da via de sinalização de Ca^{2+} , que é comum aos três miRNAs. O Ca^{2+} é um importante mensageiro citoplasmático e interfere na cascata de eventos que levam à hipertrofia cardíaca, pois de entre os inúmeros papéis que desempenha, é determinante na contracção muscular e participa na sinalização que leva à síntese de novas proteínas (Marian e Roberts, 2001).

Relativamente ao miR-30b, miR-218, miR-374, no estudo realizado nesta tese, apresentam-se com uma expressão normal na maioria dos doentes estudados, enquanto, no estudo de Palacín e colaboradores (2011a) se encontram sub-expressos (Palacín *et al.*, 2011a). Estas diferenças podem ter diversas razões, entre elas, o facto dos doentes estudados serem portadores de diferentes mutações, em diferentes genes sarcoméricos.

O miR-454 apresenta-se sub-expresso em ambos os estudos. Devido à coerência de resultados é expectável que a variação de expressão deste miRNA esteja, de facto, relacionada com a hipertrofia cardíaca. Segundo as bases de dados consultadas não existem alvos validados para este miRNA, mas fazendo uma pesquisa pela base de dados Diana Micro-T v.3, o alvo previsto com maior *score* para o miR-454 é o gene *RFD2*. Este gene faz parte da via proteolítica dependente de ubiquitina. Esta via tem um importante papel na MH, pois no decorrer da doença existe um aumento da existência de proteínas ubiquitinadas (Carrier *et al.*, 2010). A principal função desta via é evitar a acumulação de danos e a degradação de proteínas mutantes. Se existirem anomalias ao nível da regulação desta via, as proteínas mutantes não conseguem ser degradadas, logo vão estar na célula a produzir um efeito tóxico (Carrier *et al.*, 2010). Este é provavelmente o fenómeno que está a ocorrer nos doentes com MH analisados nestes estudos, cuja expressão do miR-454 se encontra diminuída.

Relativamente ao miR-495, que nos doentes SIV108, SIV109 e SIV119 se apresenta com um nível de expressão normal, no estudo de Palacín e colaboradores (2011a) encontra-se com um padrão de expressão variável. A desregulação deste miRNA encontra-se associada a desordens musculares primárias, mas ainda não foi descrita a sua associação com doenças cardíacas (Palacín *et al.*, 2011a). Serão necessários mais estudos utilizando um número alargado de doentes de modo a avaliar a expressão concreta deste miRNA.

Por sua vez, os miR-590-5p e miR-92a encontram-se sobre-expressos no estudo efectuado por Palacín e colaboradores (2011a) (Palacín *et al.*, 2011a). Já no presente estudo, o miR-590-5p apresenta níveis de expressão normal, enquanto o miR-92a se apresenta sub-expresso em duas das três amostras estudadas. O miR-590-5p nunca foi referenciado como associado à hipertrofia cardíaca nem a outras doenças do foro cardiovascular. Ao contrário, a sub-expressão do miR-92 já foi anteriormente associada ao processo hipertrófico (Sucharov *et al.*, 2008). O facto de no presente estudo o miR-92 se encontrar sub-expresso, vai de encontro com os estudos de Sucharov, contrariando assim os resultados de Palacín e colaboradores (2011a) (Palacín *et al.*, 2011a).

O miR-125a-3p, que não se encontra descrito como associado à hipertrofia, nem a outro tipo de doenças cardíacas, não apresenta níveis de expressão coerentes entre os estudos. Enquanto no estudo de Palacín e colaboradores (2011a), a expressão deste miRNA se encontra variável, no estudo efectuado neste trabalho isso também se observa. No doente SIV109 a expressão deste miRNA foi considerada normal, no entanto, nos doentes SIV108 e SIV119 encontra-se aumentada quando comparada com o controlo saudável. Esta incoerência entre estudos e entre doentes pode ter diversas causas, inerentes aos ensaios e aos próprios doentes, tal como referido no ponto 3.4.2 desta secção. Mas, é de suspeitar o facto de em ambos os estudos, este miRNA aparecer sempre com diferenças de expressão, estejam elas aumentadas ou diminuídas. Será interessante efectuar um estudo acerca dos alvos celulares deste miRNA e das vias de sinalização onde interfere, e, cujas desregulações, poderão, possivelmente, relacionar-se com o fenómeno de hipertrofia cardíaca.

O miR-208a e o miR-208b encontram-se expressos de diferentes modos em ambos os estudos. No estudo efectuado por Palacín e colaboradores (2011a), o miR-208a encontra-se sobre-expresso nos doentes portadores de mutações, enquanto nas amostras SIV108 e SIV119 deste estudo apresenta-se sub-expresso. Já o miR-208b, encontra-se também sub-expresso nas três amostras patológicas alvo deste estudo à semelhança do que acontece nos tecidos patológicos sem mutações amostrados pelo grupo de Palacín e colaboradores (2011a), o que sugere que as alterações na regulação deste miRNA podem diferir entre corações hipertrofiados com ou sem mutações sarcoméricas. Estes miRNAs já foram descritos em modelos animais de hipertrofia cardíaca, apresentando-se sobre-expressos, ao contrário do que ocorre nas amostras patológicas deste estudo (Tatsuguchi *et al.*, 2007). O miR-208a e o miR-208b pertencem à mesma família e estão codificados nos intrões dos genes *MYH6* e *MYH7*, respectivamente. Eles partilham a mesma “seed region”, diferindo apenas em 3 nucleótidos na sua região 3’UTR e são um exemplo de miRNAs intrónicos que participam em processos de regulação no próprio gene onde estão localizados (Small e Olson, 2011; van Rooij *et al.*, 2008). Estes miRNAs regulam uma ampla gama de repressores transcricionais e moléculas de sinalização, bem como a actividade da hormona tiroideia (Small e Olson, 2011). Contudo, os resultados obtidos neste trabalho não estão de acordo com a bibliografia. Essas diferenças de expressão podem ser explicadas devido à utilização de modelos animais nesses estudos, que em muito diferem dos humanos (Ikeda e Pu, 2010). É também de salientar que, no doente 119, a diminuição de expressão do miR-208a é a mais acentuada de todos os doentes estudados (Fig.3.12). Este facto, talvez se deva à existência de uma mutação no gene *MYH7* (c.4472 C>G;p.Ser1491Cys) do mesmo (Fig. 3.4), mutação esta, que poderá estar a influenciar a expressão deste miRNA, na medida em que, mutações em regiões codificantes de miRNAs podem ter um efeito no processamento e expressão do pré-miRNA e do miRNA maduro (Palacín *et al.*, 2011b).

Relativamente aos outros miRNAs da tabela 3.4, é possível verificar que estes, não se encontram de acordo com os resultados obtidos no estudo que consta nesta tese. Mas, convém salientar, e através da figura 3.12 é perceptível, que apesar da expressão do miR-26, miR-98 e miR-9 ser considerada normal (entre os níveis de corte -1,5 e 1,5), apresenta uma tendência para a sub-expressão.

A explicação destas diferenças entre expressões nos diferentes estudos poderá estar relacionada com o facto de, na maioria destes estudos, serem utilizados modelos animais ou humanos com hipertrofia induzida de diversos modos, na maioria das vezes utilizando agentes químicos ou factores mecânicos. São também geralmente utilizadas culturas de cardiomiócitos onde o fenómeno hipertrófico é induzido quimicamente. Como seria de esperar, estes ensaios não correspondem a réplicas fiéis da hipertrofia cardíaca humana, na maioria das vezes originada por mutações em proteínas sarcoméricas, tal como foi abordado neste estudo. Outra das grandes diferenças, prende-se com o facto de neste estudo ter sido utilizado como amostra tecido colhido do septo interventricular de

doentes com MH. Como é sabido, o miocárdio apesar de ser maioritariamente constituído por cardiomiócitos, também contém outros tipos celulares, em diferentes proporções (células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos) que são essenciais para a função cardíaca e resposta ao stress. Essas outras linhagens celulares são igualmente enriquecidas por miRNAs característicos que podem contribuir para mudanças aquando da medida de expressão dos miRNAs, tornando-se difícil identificar o tipo celular que apresenta alterações na expressão (Ikeda e Pu, 2010). De modo a identificar os tipos celulares presentes numa amostra de miocárdio em estudo, poderia ser efectuado um corte histológico do tecido e com marcadores histoquímicos verificar cada um dos tipos celulares presentes.

Sendo os miRNAs moléculas tão sensíveis, é de esperar que a sua expressão se comporte de diversas formas, consoante o modelo escolhido, tipo de tecido estudado, o modo de indução de hipertrofia e o tipo celular onde se encontram.

4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como principal objectivo a identificação de miRNAs que pudessem estar na base do desenvolvimento de MH e, designadamente no perfil fenotípico de MHO. Para tal, foi realizado um *screening* de expressão de miRNAs em amostras de SIV de três doentes com diagnóstico clínico de MHO, através de uma reacção de RT-PCR, analisando 739 miRNAs humanos. Os resultados obtidos revelaram que os miRNAs que se destacam em termos de expressão (100x e 1000x) relativamente ao controlo saudável são o miR-10a, o miR-647, o miR-371-3p, o miR-617 e o miR-220b que se encontravam sub-expressos e o miR-518f* e miR-518c* que se apresentavam sobre-expressos. Uma grande parte dos alvos destes miRNAs encontram-se relacionados com o desenvolvimento cardíaco ou estão associados a patologias cardíacas, mas visto que a maioria deles apenas se encontram previstos, emerge a necessidade de serem realizados métodos de validação de alvos para estes miRNAs e o estudo das vias de sinalização onde estes alvos possam vir a interferir para ver se de algum modo se relacionam com a MH.

Outro dos pontos de constatação deste trabalho assenta no facto de, os estudos realizados utilizando modelos animais de hipertrofia, ou culturas de cardiomiócitos humanos, portanto modelos de hipertrofia induzida, diferirem relativamente aos valores de expressão de miRNAs, dos estudos realizados utilizando biópsias humanas de miocárdio com a patologia MHO inerente. Estas diferenças podem dever-se às diferentes metodologias utilizadas, diferentes análises estatísticas, mas sobretudo, devido à amostragem.

Salienta-se que o perfil de expressão de determinados miRNAs se apresenta concordante entre o presente estudo e o estudo efectuado por Palacín e colaboradores (2011a). Alguns desses miRNAs nunca tinham sido associados à MH, mas, devido a estes resultados, pode pensar-se nalgum tipo de correlação entre os miRNAs e esta patologia dado que o tipo de amostras foi semelhante nos dois estudos.

Comparando os valores de expressão dos miRNAs com a expressão dos genes sarcoméricos e com o perfil mutacional de cada doente em particular, pode-se colocar a hipótese de o perfil geral de sub-expressão de miRNAs se relacionar directamente com o perfil de sobre-expressão dos mRNA dos genes *MYH7* e *MYBPC3*. Por sua vez foi inferido se perfil mutacional e as manifestações clínicas inerentes a cada doente se relacionavam entre si e com a expressão de diferentes miRNAs.

No entanto, será importante realizar um *screening* de expressão de miRNAs utilizando um maior número de doentes com diagnóstico de MHO, de modo a que se confirme a expressão diferencial dos miRNAs que surgiram alterados no presente estudo. Ainda, será necessário realizar, estudos funcionais em linhas celulares de cardiomiócitos isoladas a partir de doentes com MHO de modo a identificar se as alterações celulares características desta patologia são devidas a alterações da expressão dos miRNAs que se apresentaram com expressão alterada neste trabalho.

Outro dos trabalhos que é proposto realizar tem como objectivo o estudo de expressão de miRNAs em tecido auricular proveniente de amostras de doentes com MH, pois, tal como foi observado neste estudo, este tecido também apresenta alterações ao nível de expressão de genes sarcoméricos, o que poderá indicar que também estará implicado no desenvolvimento de MH.

A aparente importância dos miRNAs e a capacidade da sua manipulação *in vivo* fornece a oportunidade única de os explorar como uma terapêutica alternativa aos fármacos cardiovasculares existentes (Elton *et al.*, 2011). Uma das possíveis abordagens seria no sentido de inibir a expressão de miRs envolvidos na patogénese de doenças cardíacas usando *antimiRs* ou promover a expressão de miRNAs benéficos utilizando *mimics* de miRNAs (van Rooij *et al.*, 2008a). Outra das abordagens será o desenvolvimento de compostos que modulem a expressão ou a actividade de miRNAs relacionados com doenças (van Rooij *et al.*, 2008a). A terapêutica baseada em miRNAs representa, neste momento, um grande desafio dado que um miRNA tem numerosos alvos moleculares, o que aumenta a probabilidade de o direccionamento de um miRNA poder perturbar múltiplas funções celulares (Elton *et al.*, 2011; van Rooij *et al.*, 2008a). Dado que a pesquisa na área dos miRNAs está ainda numa fase inicial, essa informação encontra-se incompleta. Portanto, antes de avançar com qualquer terapêutica que tenha como alvos os miRNAs será necessário um conhecimento detalhado dos seus alvos genéticos, funções e distribuições pelos tecidos (Elton *et al.*, 2011). Além disso, questões relativas a farmacocinética, biodistribuição e penetração celular também representam obstáculos susceptíveis a estratégias terapêuticas, portanto devem ser delineadas novas técnicas para que a entrega terapêutica de miRNAs seja realizada de uma forma específica no tecido a ser tratado (Elton *et al.*, 2011).

Os miRNAs podem ser utilizados no diagnóstico e prognóstico de várias patologias cardiovasculares, na medida em que os resultados de danos cardíacos reflectem-se nos níveis de expressão de miRNAs (Small *et al.*, 2010; Xiao e Chen, 2010). Os resultados obtidos nesta tese parecem estar de acordo com este facto.

Devido ao tamanho, abundância, especificidade e relativa estabilidade no plasma, os miRNAs circulantes são potenciais biomarcadores para monitorizar lesões, existindo estudos que indicam a possibilidade de utilizar os miRNAs ao nível do diagnóstico e prognóstico de doenças cardíacas, como a MH (Small *et al.*, 2010; Laterza *et al.*, 2009). Será assim interessante verificar, se os miRNAs que neste estudo apresentaram níveis de expressão alterados (100x-1000x) nas amostras de septo interventricular provenientes de doentes com MH, se apresentam igualmente com um padrão de expressão alterada em circulação. Dada a dificuldade na obtenção de tecido cardíaco, esta avaliação no sentido de correlacionar os miRNA alterados em tecido cardíaco com os miRNAs em circulação, poderia permitir um avanço ao nível de utilização dos miRNAs como biomarcadores moleculares da patologia MH.

5 - BIBLIOGRAFIA

- Ahamad**, F., Seidman, J.G. e Seidman, C.E. 2005. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6: 185–216.
- Alvarez-Garcia**, I. e Miska, E.A. 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132(21): 4653-4662.
- Arad**, M., Seidman, J.G. e Seidman, C.E. 2002. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 11(20): 2499-2506.
- Bartel**, D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116: 281-297.
- Basic Local Alignment Search Tool** - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Biomedical Genomics** - <http://biomedicalgenomics.org/index.html>
- Bos**, J.M. e Ackerman, M.J. 2010. Z-Disc genes in hypertrophic cardiomyopathy - Stretching the cardiomyopathies? *Journal of the American College of Cardiology* 55(11): 1136-1138.
- Brito**, D., Miltenberger-Miltenyi, G., Vale Pereira, S., Silva, D., Diogo, A.N. e Madeira, H. 2012. Sarcomeric Hypertrophic cardiomyopathy: Genetic profile in a Portuguese population. *Revista Portuguesa de Cardiologia* (artigo em fase de publicação).
- Callis**, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M.S., Selzman, C.H. e Wang, D.Z. 2009. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 119(9): 2772-86.
- Cardim**, N., Perrot, A., Santos, S., Morgado, P., Pádua, M., Ferreira, S., Reis, R.P., Monteiro, C., Ferreira, T., Correia, J.M. e Osterziel, K.J. 2005. *Rev Port Cardiol* 24 (12): 1463-1476.
- Carè**, A., Catalucci D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V., Høydal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dorn, G.W. 2nd, Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K.L., Croce, C.M., Peschle, C. e Condorelli, G. 2007. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine* 13(5): 613-618.
- Carrier**, L., Schlossarek, S., Willis, M.S. e Eschenhagen, T. 2010. The ubiquitin-proteasome system and nonsense-mediated mRNA decay in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 85: 330–338.
- Cecchi**, F., Tomberli, B. e Olivotto, I. 2012. Clinical and molecular classification of cardiomyopathies. *Global Cardiology Science & Practice* 4 (artigo em fase de publicação).
- Chen**, S.N., Czernuszewicz, G., Tan, Y., Lombardi, R., Jin, J., Willerson, J.T. e Marian, A.J. 2012. Human Molecular Genetic and Functional Studies Identify TRIM63, Encoding Muscle RING Finger Protein 1, as a Novel Gene for Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation Research* (artigo em fase de publicação).
- Cheng**, Y., Ji, R., Yue, J., Yang, J., Liu, X., Chen, H., Dean, D.B. e Zhang, C. 2007. MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophic Heart – Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy? *The American Journal of Pathology* 170(6).
- Da Costa Martins**, P.A. e De Windt, L.J. 2012. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* 93: 563-572.
- Debrus**, S., Rahbani, L., Marttila, M., Delorme, B., Paradis, P. e Nemer, M. 2005. The Zinc Finger-Only Protein Zfp260 Is a Novel Cardiac Regulator and a Nuclear Effector of α 1-Adrenergic Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 25(19): 8669.
- Diana Micro-T** - <http://microRNA.gr>

- Ding, S. -L., Zhou, L. -Y. e Li, P. -F.** 2011. MicroRNAs in cardiac Hypertrophy: angels or devils. *WIREs RNA* 2: 124-134.
- Eisenberg, I., Eranb, A., Nishinod, I., Moggioe, M., Lampertie, C., Amato, A.A., Lidovb, H.G., Kangb, P.B., Northi, K.N., Mitrani-Rosenbaumj, S., Flanigank, K.M., Neelyl, L.A., Whitney, D., Beggsb, A.H., Kohanec, I.S. e Kunkela, L.M.** 2007. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *ProcNatlAcadSci U S A.* 104(43): 17016-21.
- Elia, L., Contu, R., Quintavalle, M., Varrone, F., Chimenti, C., Russo, M.A., Cimino, V., De Marinis, L., Frustaci, A., Catalucci, D. e Condorelli, G.** 2009. Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation* 120(23): 2377-85.
- Elliot, P. e McKenna, W.J.** 2004. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Lancet* 363: 1881–91.
- Elton, T.S., Khan, M. e Terentyev, D.** 2011. MicroRNAs in cardiovascular disease. *F1000 Medicine Reports* 3 (10).
- Fatkin, D. e Graham, R.M.** 2002. Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies. *Physiological Reviews* 82: 945-980.
- Fleige, S. e Pfaffl, M.W.** 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 126–139
- Force, T., Bonow, R.O., Houser, S.R., Solaro, R.J., Hershberger, R.E., Adhikari, B., Anderson, M.E., Boineau, R., Byrne B.J., Cappola, T.P., Kalluri, R., LeWinter, M.M., Maron, M.S., Molken, J.D., Ommen, S.R., Regnier, M., Tang, W.H.W., Tian, R., Konstam, M.A., Maron, B.J e Seidman, C.E.** 2010. Research Priorities in Hypertrophic Cardiomyopathy: Report of a Working Group of the National Heart Lung and Blood Institute. *Circulation* 122(11): 1130–1133.
- Frey, N., Luedde, M. e Katus, H.A.** 2012. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Rev. Cardiol.* 9: 91-100.
- Frost, R.J. e van Rooij, E.** 2010. miRNAs as a therapeutic targets in ischemic heart disease. *J CardiovascTransl Res.* 3: 280-289.
- Gebauer, F. e Hentze M.W.** 2004 Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 827-835.
- Girolami, F., Ho, C.Y., Semsarian, C., Baldi, M., Will, M.L., Baldini, K., Torricelli, F., Yeates, L., Cecchi, F., Ackerman, M.J. e Olivetto, 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.
- Graham-Cryan, M.A., Rowe, G., Hathaway, L., Biddle, S., Tripodi, D. e Fananapazir, L.** 2004. Obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy. *ProgCardiovascNurs* 19(4): 133-140.
- Hershberger, R.E., Lindenfeld, J., Mestroni, L., Seidman, C.E., Taylor, M.R.G. e Towbin, J.A.** 2009. Genetic Evaluation of Cardiomyopathy - A Heart Failure Society of America Practice Guideline. *Journal of Cardiac Failure* 15(2): 83-97.
- HMDD - Human MiRNA& Disease Database** (<http://202.38.126.151/hmdd/mirna/md/>)
- Ho, C.Y.** 2010. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Heart Failure Clin* 6:141-159.
- Ho, C.Y.** 2011. New paradigms in hypertrophic cardiomyopathy: Insights from genetics. *Progress in Pediatric*

Cardiology 31: 93-98.

Ho, C.Y. 2012. Hypertrophic Cardiomyopathy in 2012. *Circulation* 125:1432-1438.

Ikeda, S. e Pu, W.T. 2010. Expression and Function of MicroRNAs in Heart Disease. *CurrentDrugTargets* 11(8): 913-925.

Ikeda, S., He, A., Kong, S.W., Lu, J., Bejar, R., Bodyak, N., Lee, KH, Ma, Q., Kang, P.M., Golub, T.R. e Pu, W.T. 2009. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol.* 29(8): 2193-2204.

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. *Physiol Genomics* 31(3): 367-373.

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 counseling. *J Med Genet*; 42:e59.

Johnston, I.A., Lee, H. -T., Macqueen, D.J., Paranthaman, K., Kawashima, C., Anwar, A., Kinghorn, J.R. e Dalmy, T. 2009. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome- wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *The Journal of Experimental Biology* 212, 1781-1793.

Jongbloed, R.J., Marcelis, C.L., Doevendans, P.A., Schmeitz-Mulkens, J.M., Van Dockum W.G., Geraedts, J.P. e Smeets, H.J. 2003. Variable Clinical Manifestation of a Novel Missense Mutation in the Alpha-Tropomyosin (*TPMI*) Gene in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 41(6): 981-986.

Kelly, B.S., Mattu, A., Brady, W. J. 2007. Hypertrophic cardiomyopathy: electrocardiographic manifestations and other important considerations for the emergency physician. *American Journal of Emergency Medicine* 25: 72-79.

Kelly, M. e Semsarian C. 2009. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: a marker of disease severity? *CircCardiovasc Genet.* 2(2): 182-190.

Keren, A., Syrris, P. e McKenna, W. 2008. Hypertrophic Cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nature* 5(3): 158-168.

Kim, V.N. e Nam, J. -W. 2006. Genomics of microRNAs. *Trends in Genetics* 22(3): 165-173.

Komamura, K., Iwai, N., Kokame, K., Yasumura, Y., Kim, J., Yamagishi, M., Morisaki, T., Kimura, A., Tomoike, H., Kitazake, M. e Miyatake, K. 2004. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet* 49:129–133.

Konno, T., Shimizu, M., Ino, H., Fujino, N., Uchiyama, K., Mabuchi, T., Sakata, K., Kaneda, T., Fujita, T., Masuta, E. e Mabuchi, H. 2006. A novel mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with severe ventricular hypertrophy and sudden death. *Clinical Science* 1(10): 125-131.

Kozomara, A. e Griffiths-Jones, S. 2011. MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* 39; D152-D157.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M. e Stoffel, M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438(7068): 685-9.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R. Lendeckel, W. e Tuschl T. 2001. Identification of Novel Genes Coding for

Small Expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.

Laterza, O.F., Lim, L., Garrett-Engele, P.W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W.K., Johnson, J.M., Sina, J.F., Fare, T.L., Sistare, F.D. e Glaab, W.E. 2009. Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury. *Clinical Chemistry* 55 (11):1977-1989.

Latronico, M.V.G. e Condorelli, G. 2009. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat. Rev. Cardiol* 6(6): 419-429.

Lee, R. e Ambros, V. 2001. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.

Lee, R., Feinbaum, R.L. e Ambros, V. 1993. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75: 843-854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., e Kim, V.N. 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.

Li, X., Sanda, T., Look, A.T., Novina, C.D., von Boehmer, H. 2011. Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. *J Exp Med*. 2011 Apr 11; 208(4): 663-75.

Li, Q., Song, X.W., Zou, J., Wang, G.K., Kremneva, E., Li, X.Q., Zhu, N., Sun, T., Lappalainen, P., Yuan, W.J., Qin, Y.W. e Jing, Q. 2010. Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy. *J Cell Sci*. 123(Pt 14): 2444-52.

Lin, Z., Murtaza, I., Wang, K., Jiao, J., Gao, J. e Li, P.F. 2009. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 106(29): 12103-12108.

Lin, M.I., Das, I., Schwartz, G.M., Tsoulfas, P., Mikawa, T. e Hempstead, B.L. 2000. Trk C Receptor Signaling Regulates Cardiac Myocyte Proliferation during Early Heart Development in Vivo. *Developmental Biology* 226, 180-191.

Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnnaly, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. e Olson, E.N. 2007. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *PNAS* 104(52): 20844-20849.

Luther, P.K. 2009. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signaling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 30:171-185.

Makki, N. e Capecchi, M.R. 2011. Cardiovascular defects in a mouse model of HOXA1 syndrome. *Human Mol Genet*. 21(1): 276-31.

Manual de utilização do Nanodrop - NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual - <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/NanoDrop%202000%20User%20Manual.pdf>

Maragkakis, M., Alexiou, P., Papadopoulos, G.L., Reczko, M., Dalamagas, T., Giannopoulos, G., Goumas, G., Koukis, E., Kourtis, K., Simossis, V.A., Sethupathy, P., Vergoulis, T., Koziris, N., Sellis, T., Tsanakas, P. e Hatzigeorgiou, A.G. 2009. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 10: 295.

Marian, A.J. 2010. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. *Eur J Clin Invest* 40(4): 360-369.

Marian, A.J. 2008. Genetic determinants of cardiac hypertrophy. *Curr Opin Cardiol* 23(3): 199-205.

Marian, A.J. e Roberts, R. 2001. The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 33(4): 655-670.

- Maron, B.J.** e Maron, M.S. 2012. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* (artigo em fase de publicação).
- Maron, B.J., Doerer, J.J., Haas, T.S., Tierney, D.M.** e Mueller, F.O. 2009. Sudden Deaths in Young Competitive Athletes: Analysis of 1866 Deaths in the United States. *Circulation* 119: 1085-1092.
- Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E.** e Young, J.B. 2006. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Circulation* 113: 1807-1816.
- Marques, V.** 2010. Desnaturação de alta resolução aplicada ao diagnóstico genético de MH. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.
- Matkovich, S.J., Van Booven, D.J., Youker, K.A., Torre-Amione, G., Diwan, A., Eschenbacher, W.H., Dorn, L.E., Watson, M.A., Margulies, K.B.** e Dorn, G.W. 2nd. 2009. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 119(9): 1263-1271.
- Medscape** - <http://www.medscape.com/>
- Meissner, K., Jedlitschky, G., Meyer zu Schwabedissen, H., Dazert, P., Eckel, L., Vogelgesang, S., Warzok, R.W., Bohm, M., Lehmann, C., Wendt, M., Cascorbi, I.E Kroemer, H.K.** 2004. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* 14(6): 381-385.
- miRanda** (<http://www.microRNA.org>)
- miRBase** – The microRNA database (<http://www.mirbase.org/>)
- miRTarBase** (mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw)
- Montgomery, J., Wittwer, C.T., Palais, R.** e Zhou, L. 2007. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Reviews* 2(1): 59-66.
- Morimoto, S.** 2008. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovascular Research* 77: 659–666.
- Morita, H., DePalma, S.R., Arad, M., McDonough, Barr, S., Duffy, C., Maron, B.J., Seidman, C.E.** e Seidman, J.G. 2002. Molecular Epidemiology of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67: 383-388.
- Morita, H., Rehm, H.L., Menesses, A., McDonough, B., Roberts, A.E., Kucherlapati, R., Towbin J.A., Seidman, J.G.** e Seidman C.E. 2008. Shared Genetic Causes of Cardiac Hypertrophy in Children and Adults. *N Engl J Med* 358(18): 1899–1908.
- Mueller, O., Lightfoot, S.** e Schroeder, A. 2004. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control – Application. Agilent Technologies.
- NCBI – RefSeq** (NCBI-RefSeq - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)
- Niimura, H., Patton, K.K., McKenna, W.J., Soultis, J., Maron, B.J., Seidman, J.G.** e Seidman, C.E. 2002. Sarcomere Protein Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly. *Circulation* 105: 446-451.
- Ohler, U., Yekta, S., Lim, L.P., Bartel, D.P.** e Burge, C.B. 2004. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA* 10(9): 1309-1322.
- Ohuchida, K., Mizumoto, K., Lin, C., Yamaguchi, H., Ohtsuka, T., Sato, N., Toma, H., Nakamura, M., Nagai, E., Hashizume, M., Tanaka, M.** 2012. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the *HoxA1* gene. *Ann Surg Oncol.* (7): 2394-402.
- Olena, A.F.** e Patton, J.G. 2010. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 222(3): 540-545.

- Olivieri**, F., Antonicelli, R., Lorenzi, M., D'Alessandra, Y., Lazzarini, R., Santini, G., Spazzafumo, L., Lisa, R., La Sala, L., Galeazzi, R., Recchioni, R., Testa, R., Pompilio, G., Capogrossi, M.C. e Procopio, A.D. 2012. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* (artigo em fase de publicação).
- Olivotto**, I., Cecchi, F., Poggesi, C. e Yacoub, M.H. 2012. Patterns of disease progression in hypertrophic cardiomyopathy: an individualized approach to clinical staging. *Circ Heart Fail* 5(4): 535-546.
- Olivotto**, I., Girolami, F., Ackerman, M.J., Nistri, S., Bos, J.M., Zachara, E., Ommen, S.R., Theis, J.L., Vaubel, R.A., Re, F., Armentano, C., Poggesi, C., Torricelli, F. e Cecchi, F. 2008. Myofibrillar protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo ClinProc* 83(6): 630-638.
- Olivotto**, I., Girolami, F., Nistri, S., Rossi, A., Rega, L., Garbini, F., Grifoni, C., Cecchi, F. e Yacoub, M.H. 2009. The many faces of hypertrophic cardiomyopathy: from developmental biology to clinical practice. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2(4) 349-367.
- Palacín**, M., Coto, E., Reguero, J.R., Martín, M., Morís, C., Alonso, Belén, Díaz, M., Corao, A.I. e Alvarez, V. 2011b. DNA variation in myoMIRs of the 1, 133, and 208 families in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiogenetics* 1:e12 (artigo em fase de publicação)..
- Palacín**, M., Reguero, J.R., Martín, M., Molina, B.D., Morís, C., Alvarez, V. e Coto, E. 2011a. Profile of MicroRNAs Differentially Produced in Hearts from Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy and Sarcomeric Mutations. *Clinical Chemistry* 57:11 (artigo em fase de publicação).
- Pezzoli**, L., Sana M.E., Ferrazzi, P. e Iacone, M. 2012. A new mutational mechanism for hypertrophic cardiomyopathy. *Gene* 507 (2): 165-169.
- Pires**, M. 2011. Miocardiopatia Hipertrófica: novas metodologias aplicadas ao diagnóstico genético. Faculdade de Ciências e Tecnologias. Universidade Nova de Lisboa.
- PolyPhen -2** - Polymorphism Phenotyping v2 - (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2>).
- Qin**, S. e Zhang, C. 2011. MicroRNAs in vascular disease. *J CardiovascPharmacol* 57(1): 8-12.
- Rane**, S., He, M., Sayed, D., Yan, L., Vatner, D. e Abdellatif, M. 2010. An antagonism between the AKT and beta-adrenergic signaling pathways mediated through their reciprocal effects on miR-199a-5p. *Cell Signal.* 22(7): 1054-62.
- Reed**, G.H., Kent, J.O. e Wittwer, C.T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8(6): 597-608.
- Reinhart**, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. e Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906.
- 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): 2227-32.
- Richard**, P., Villard, E., Charron, P. e Isnard, R. 2006. The Genetic Bases of Cardiomyopathies. *J. Am. Coll. Cardiol* 48:A79-A89.
- Roberts**, R. e Sigwart, U. 2001. New concepts in hypertrophic cardiomyopathies, part I. *Circulation* 104: 2113-2116.

Roche Diagnostics. Light Cycler 480 Real-Time PCR System Technical Note No.1. Versão 2008 em www.roche-applied-science.com.

Roche Diagnostics. Roche Applied Science. Support and Resources. <https://www.roche-applied-science.com/techresources/index.jsp> in www.roche-applied-science.com.

Roncarati, R., Latronico, M.V.G., Musumeci, B., Aurino, S., Torella, A., Bang, M. -L., Jotti, G.S., Puca, A.A., Volpe, M., Nigro, V., Autore, C. e Condorelli, G. 2011. Unexpectedly Low Mutation Rates in Beta-Myosin Heavy Chain and Cardiac Myosin Binding Protein Genes in Italian Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy

Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Branco, P., Silveira, S., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M. e Fernandes, A.R. 2011. Genetic Diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry DNA arrays and high resolution melting. *Rev Port Cardiol* 30(01): 7-18.

Santos, S., Marques, V., Pires, M., Silveira, L., Oliveira, H., Lança, V., Brito, D., Madeira, H., Esteves, J.F., Freitas, A., Carreira, I.M., Gaspar, I.M., Monteiro, C. e Fernandes, A.R. 2012. High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort. *BMC Medical Genetics* 13 (17): 1471-2350.

Sayed, D., Hong, C., Chen, I. -Y., Lypowy, J. e Abdellatif, M. 2007. MicroRNAs Play an Essential Role in Development of Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* 100: 416-424.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. e Ragg, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7 (3): 1471-2199.

Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. e Zamore, P.D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.

Seidman, J.G. e Seidman, C. 2001. The Genetic Basis for Cardiomyopathy: from Mutation Identification to Mechanistic Paradigms. *Cell* 104:557-56.

Seidman, J.G. e Seidman, C. 2011. Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circulation Research* 108(6): 743-750.

Shieh, J.T., Huang, Y., Gilmore, J. e Srivastava, D. 2011. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One* 6(5): e19481.

Small, E. M., Frost, R.J.A. e Olson, E.N. 2010. MicroRNAs Add a New Dimension to Cardiovascular Disease. *Circulation* 121:1022-1032.

Small, E.M. e Olson, E.N. 2011. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 469(7330): 336-342.

Stoep, N., Paridon, C., Janssens, T., Krenkova, P., Stamberгова, A., Macek, M., Matthijs, G. e Bakker, E. 2009. Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of *BRCA1* mutation scanning using the 96-well lightscannerTM. *Human Mutation* 30(6): 899-909.

Sucharov, C., Bristow, M.R. e Port, J.D. 2008. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J Mol Cell Cardiol.* 45(2): 185-192.

Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. e Zamore, P.D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17:49-63.

Tarbase - (<http://microRNA.gr/tarbase>)

Targetscan (<http://www.targetscan.org>)

- Tatsuguchi, M.**, Seok, H.Y., Callis, T.E., Thomson, J.M., Chen, J-F., Newman, M., Rojas, M., Scott, Hammond, S.M. e Wang, D.-Z. 2007. Expression of microRNAs is dynamically regulated during of cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42: 1137-1141.
- Taylor, M.R.G.**, Carniel, E. e Mestroni, L. 2004. Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4(1): 99-113.
- The Human Gene Mutation Database** (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)
- Thum, T.**, Catalucci, D. e Bauersachs, J. 2008. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 79(4): 562-570.
- Thum, T.**, Galuppo, P., Wolf, C., Fiedler, J., Kneitz, S., van Laake, L.W., Doevendans, P.A., Mummery, C.L., Borlak, J., Haverich, A., Gross, C., Engelhardt, S., Ertl, G. e Bauersachs, J. 2007. MicroRNAs in the Human Heart – A Clue to Fetal Gene Reprogramming in Heart Failure. *Circulation* 116: 258-267.
- Tijssen, A.J.**, Creemers, E.E., Moerland, P.D., de Windt, L.J., van der Wal, A.C., Kok, W.E. e Pinto, Y.M. 2010. MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. *Circ Res.* 106: 1035-1039.
- 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. *Hum Mutat* 30: 876–883.
- UniProt** – Universal Protein Resource (<http://uniprot.org>)
- Uretsky, S.** 2012. Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Progress in Cardiovascular Diseases* 54(6): 512-516.
- Van Driest, S.**, Vasile, V.C., Ommen, S.R., Will, M.L., Tajik, A.J., 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.
- van Rooij, E.** 2011. The Art of MicroRNA Research. *Circulation* 108: 219-234.
- van Rooij, E.** e Olson, E.N. 2007. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J. Clin. Invest.* 117(9): 2369-76.
- van Rooij, E.**, Sutherland, L.B. , Qi, X. , Richardson, J.A., Hill, J., Olson, E.N. 2007. Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science* 316: 576-579.
- van Rooij, E.**, Liu, N. e Olson, E.N. 2008a. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetic* 24(4): 159-166.
- van Rooij, E.**, Marshall, W.S. e Olson, E.N. 2008b. Toward MicroRNA–Based Therapeutics for Heart Disease: The Sense in Antisense. *Circ Res.* 103:919-928.
- van Rooij, E.**, Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm, R.J. Jr e Olson, E.N. 2009. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell.* (5): 662-673.
- van Rooij, E.**, Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnnally, J., Gerard, R.D. Richardson, J.A. e Olson, E.N. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *PNAs.* 103(48): 18255-18260.
- Vergoulis, T.**, Vlachos, I.S., Alexiou, P., Georgakilas, G., Maragkakis, M., Reczko, M., Gerangelos, S., Koziris, N., Dalamagas e T., Hatzigeorgiou, A.G. 2012. Tarbase 6.0: Capturing the Exponential Growth of miRNA Targets with Experimental Support NAR. *Nucleic Acids Res.* 40(D1): D222–D229.
- Wang, K.**, Long, B., Zhou, J. e Li, P.F. 2010. MiR-9 and NFATc3 Regulate Myocardin in Cardiac Hypertrophy.

J BiolChem 285(16): 11903–11912.

Wang, Y., Stricker, H.M., Gou, D. e Liu, L., 2007. MicroRNA: past and present. *Frontiers in Bioscience* 12: 2316-2329.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. e Diederichs, S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 11(3): 228-234.

Xiao, J. e Chen, Y.H. 2010. MicroRNAs: Novel Regulators of the Heart. *Journal of Thoracic Disease* 2(1): 43-47.

Xu, F., Wang, Q., Zhang, F., Zhu, Y., Gu, Q., Wu, L., Yang, L. e Yang, X. 2012. Impact of Next-Generation Sequencing (NGS) technology on cardiovascular disease research. *Cardiovasc. DiagnTher* 2(2): 138-146.

Yang, Y., Ago, T., Zhai, P., Abdellatif, M. e Sadoshima, J. 2011. Thioredoxin 1 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation of miR-98/let-7. *Circ Res.* 108(3): 305-313.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. e Cullen, B.R. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17: 3011–3016.

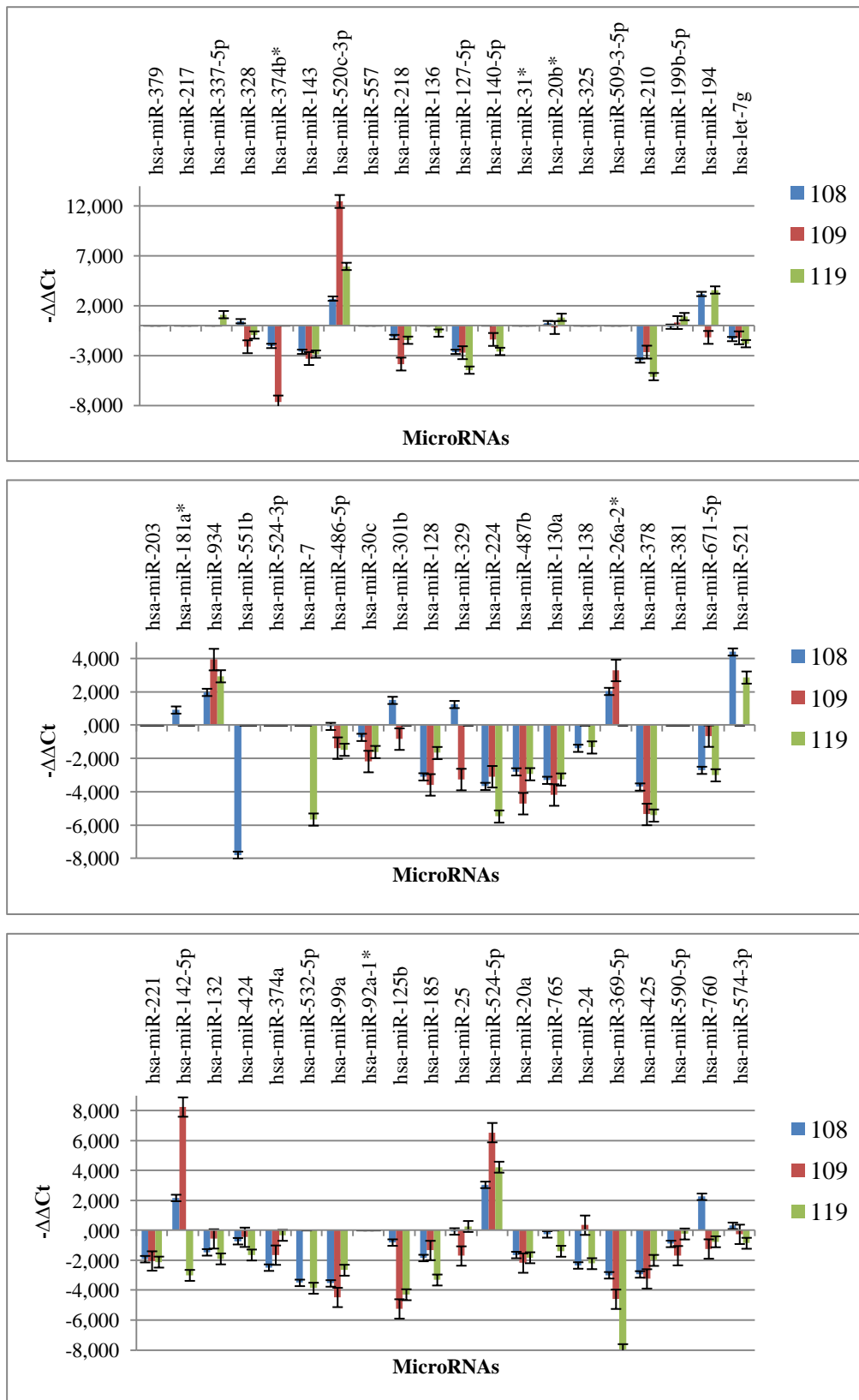
Zeng, Y. Wagner, E.J. e Cullen, B.R. 2002. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 9: 1327-33.

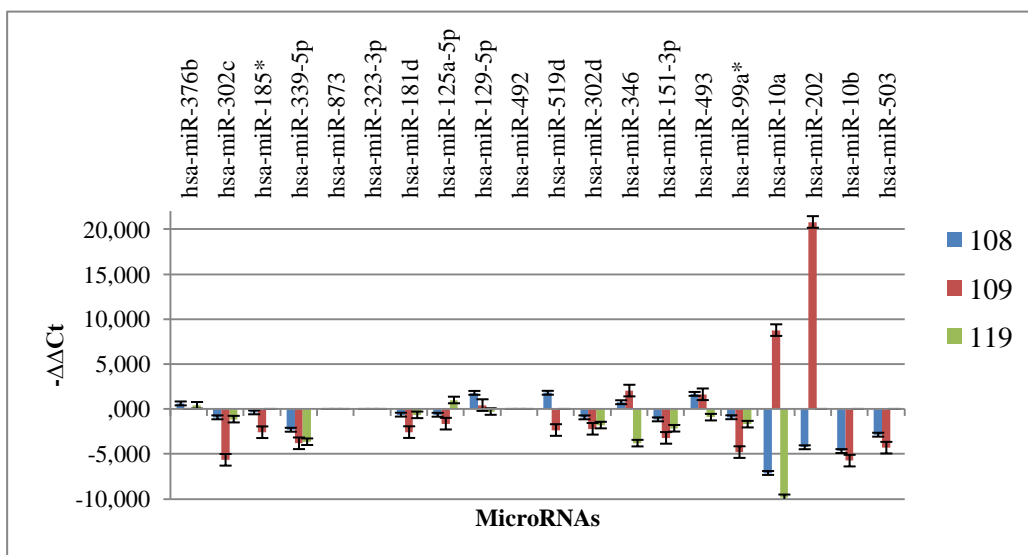
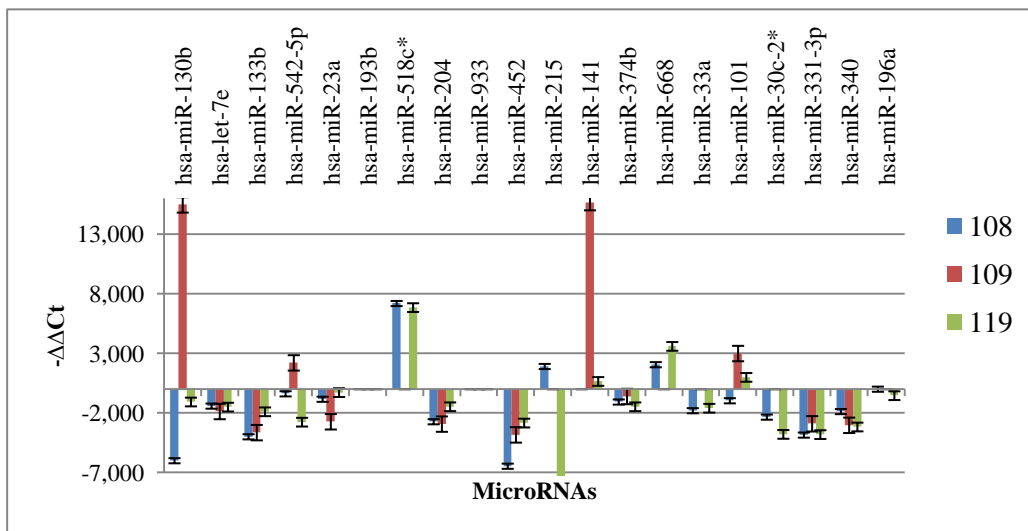
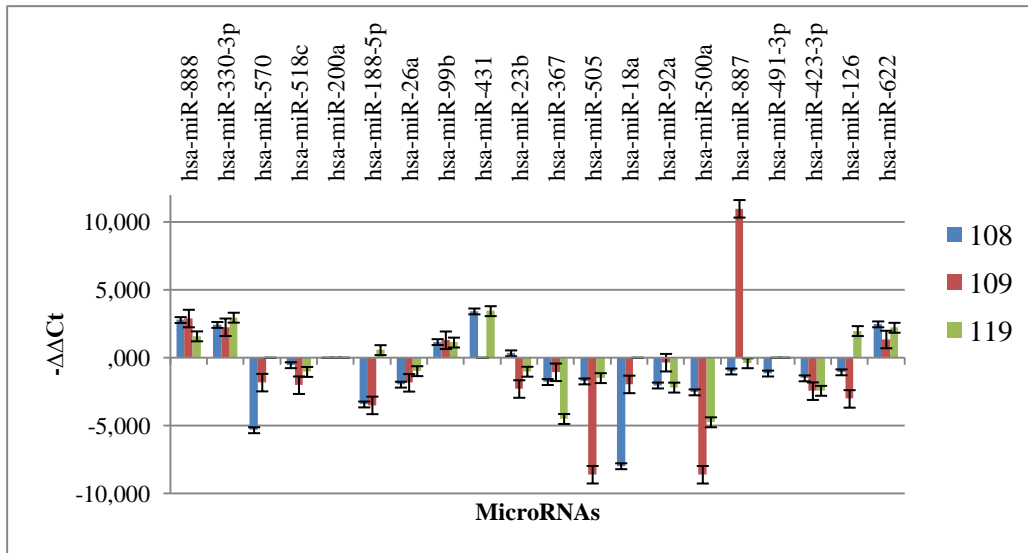
Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J. e Srivastava, D. 2007. Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2. *Cell* 129: 303–317.

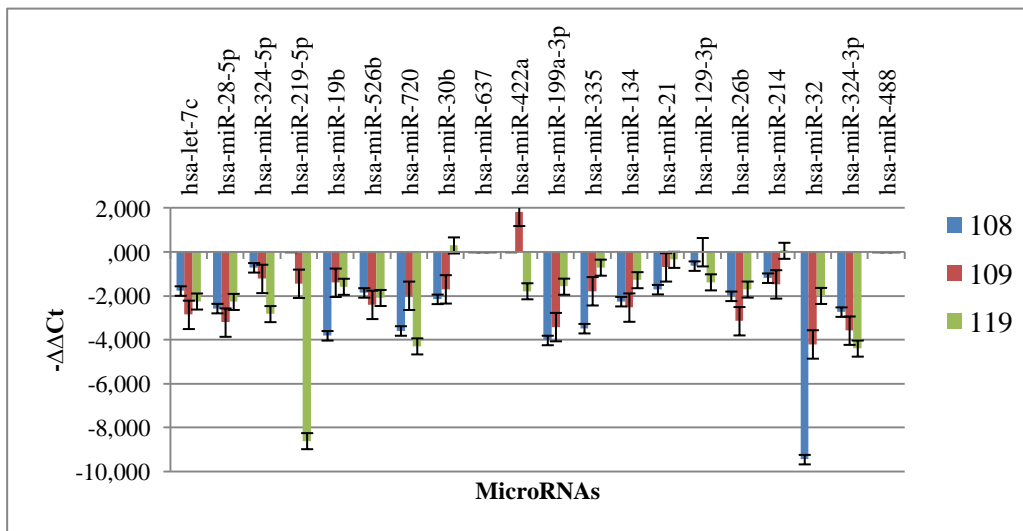
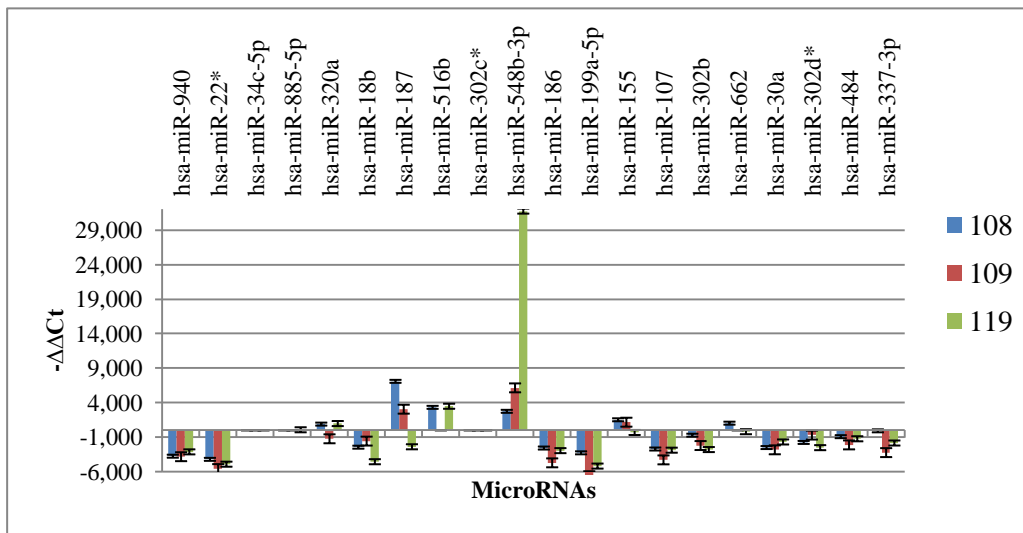
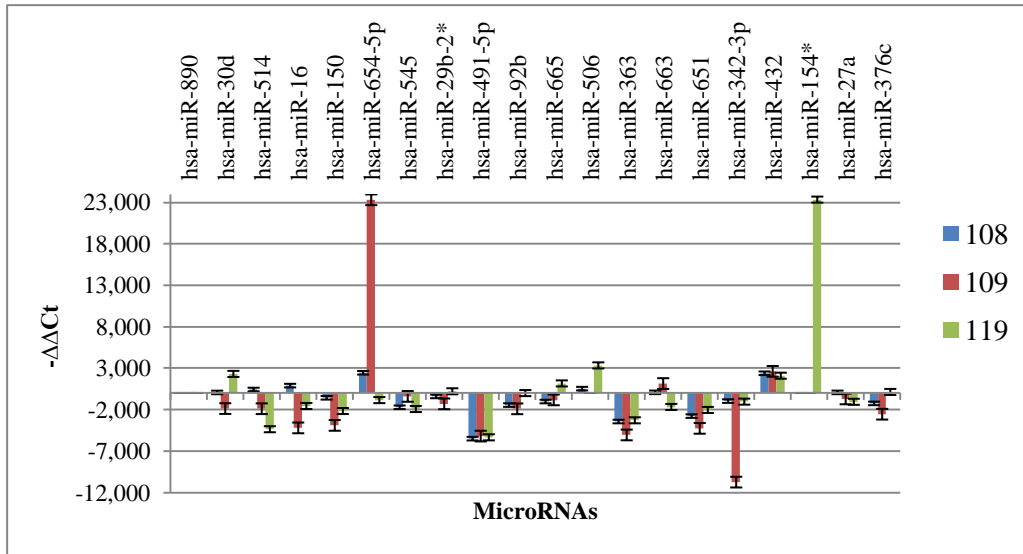
Zhao, Y., Samal, E. e Srivastava, D. 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436: 214-220.

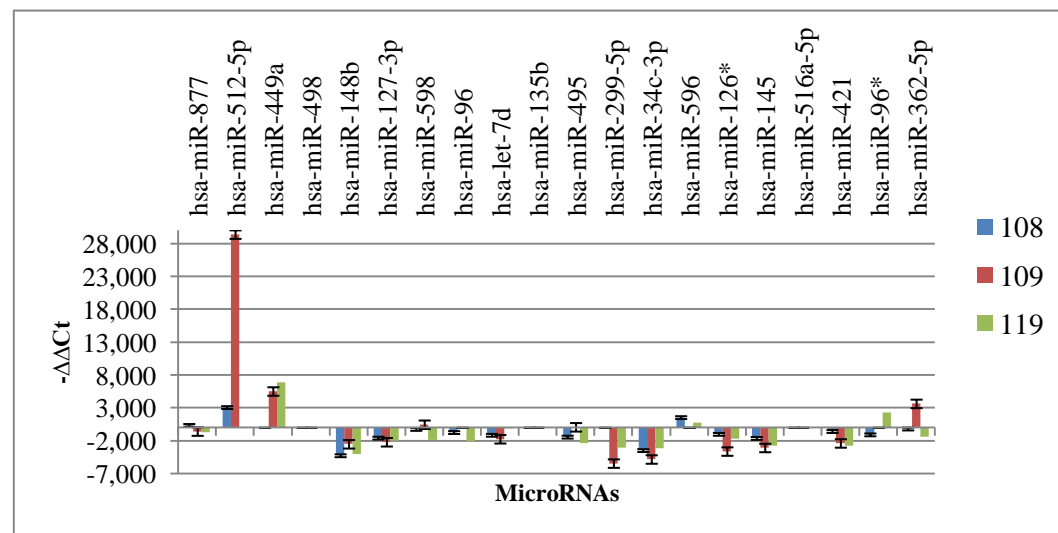
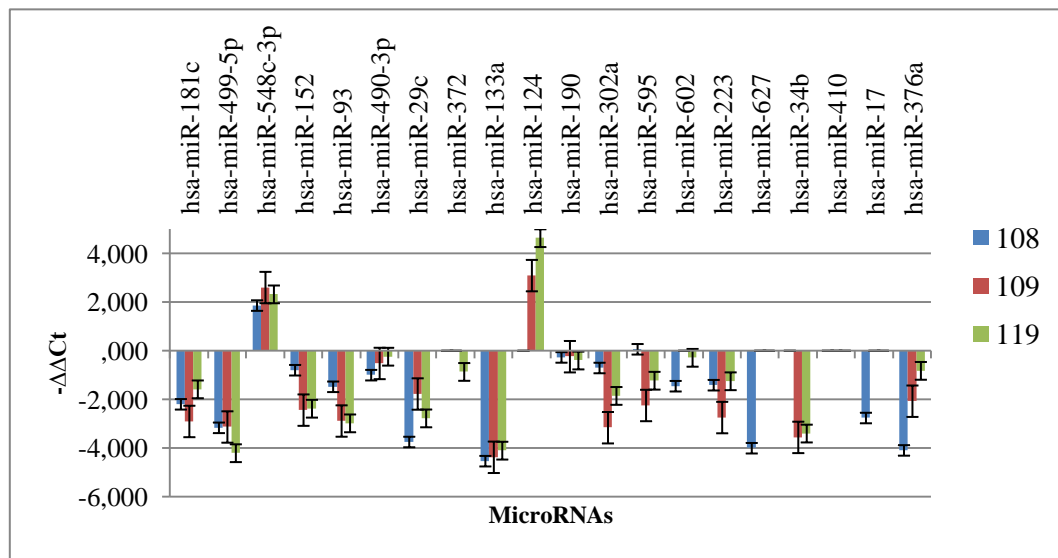
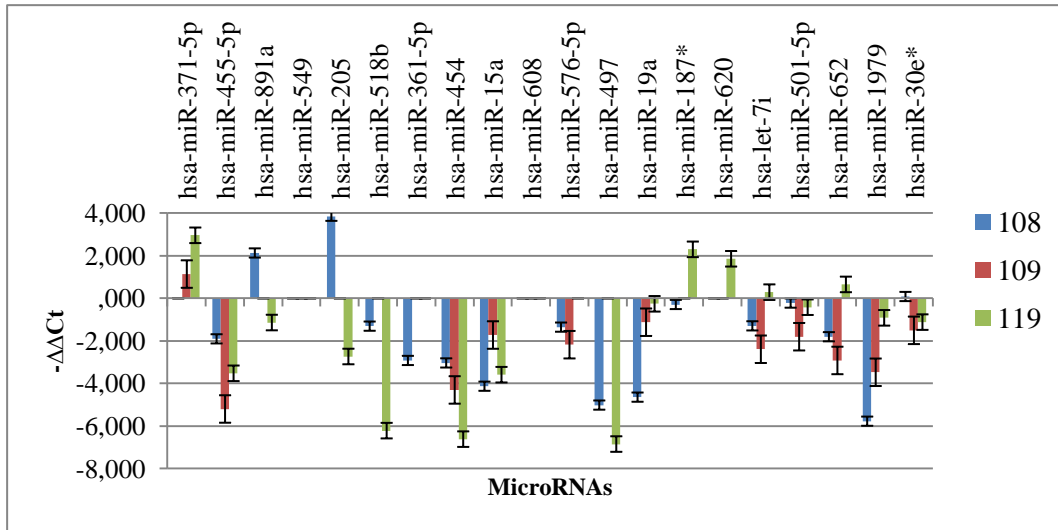
6 – APÊNDICES

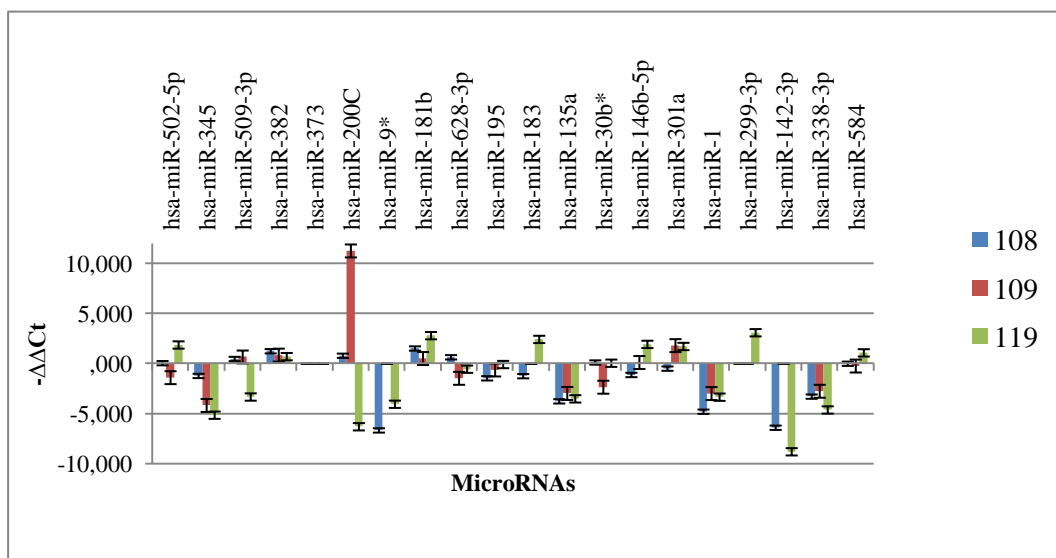
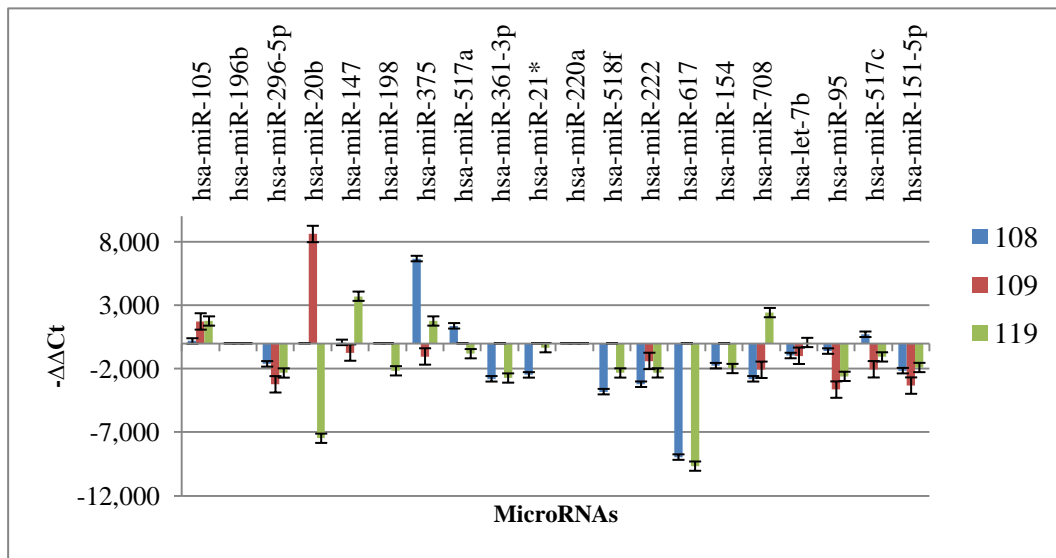
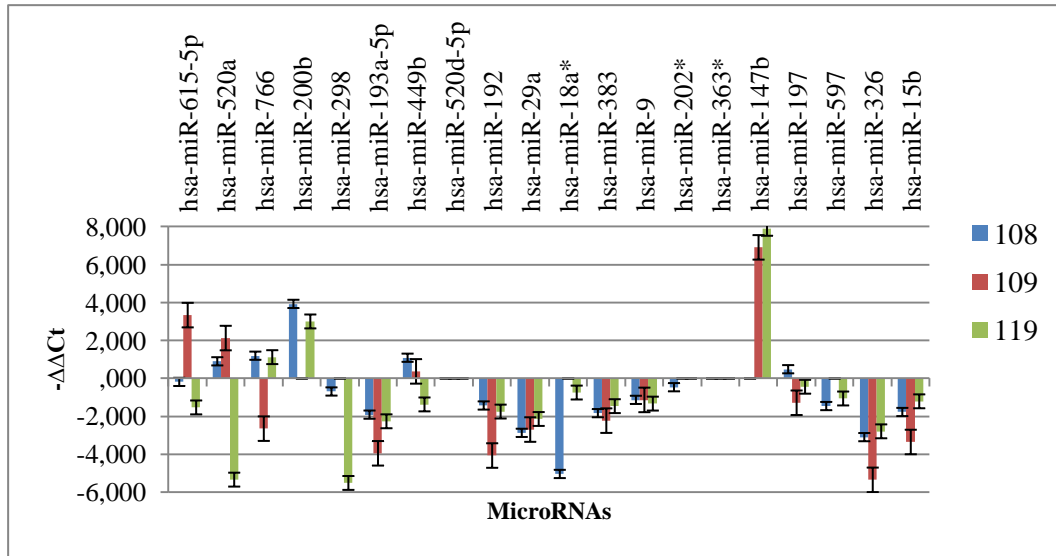
Apêndice 1 – Níveis de Expressão Genética de todos os miRNAs incluídos no estudo desta tese, para os três doentes (SIV108, SIV109 e SIV119).

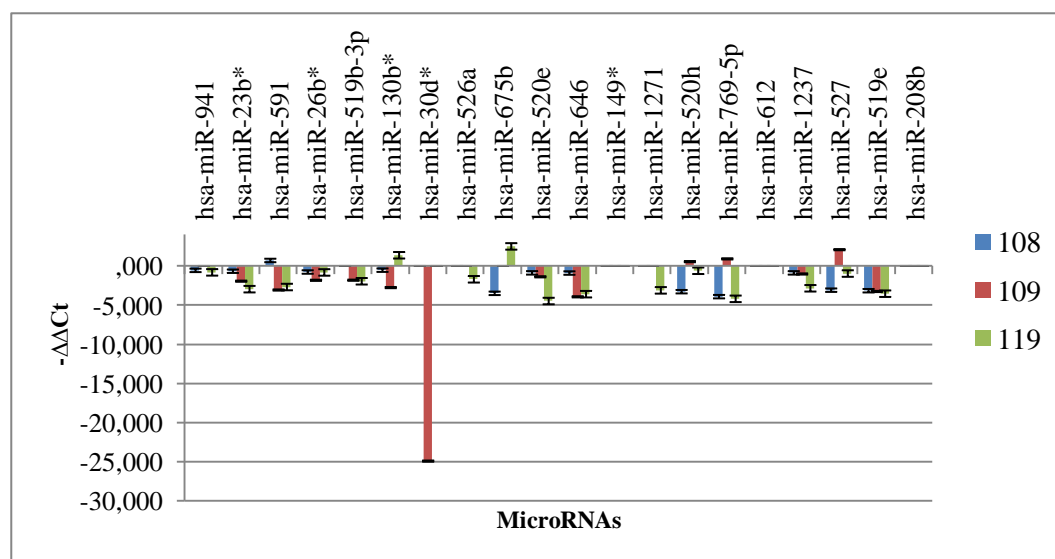
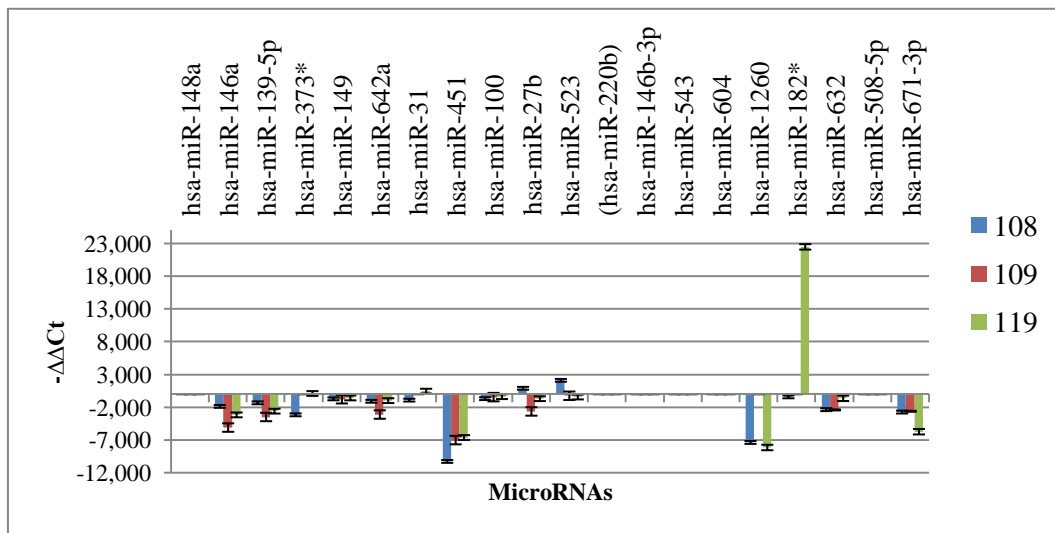
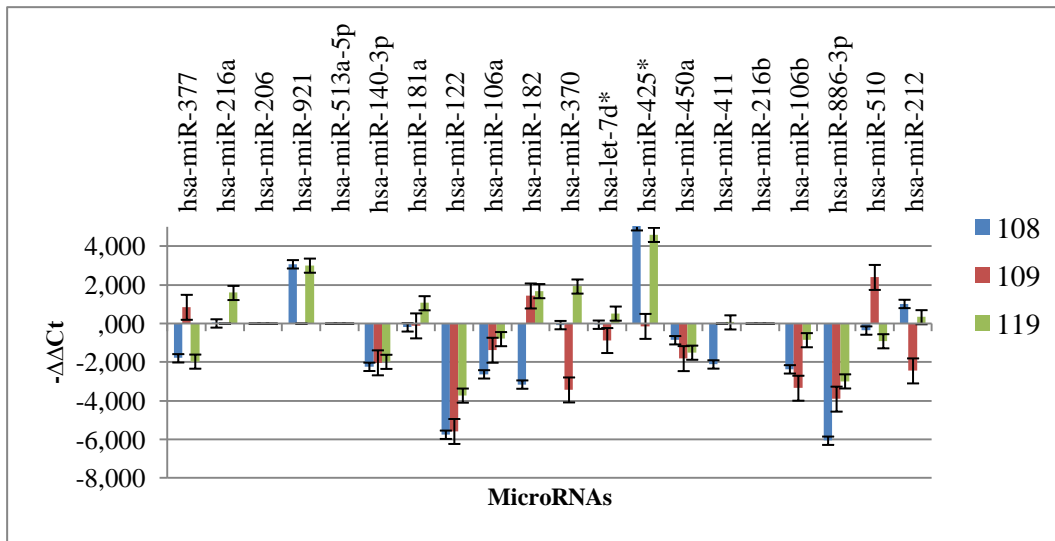


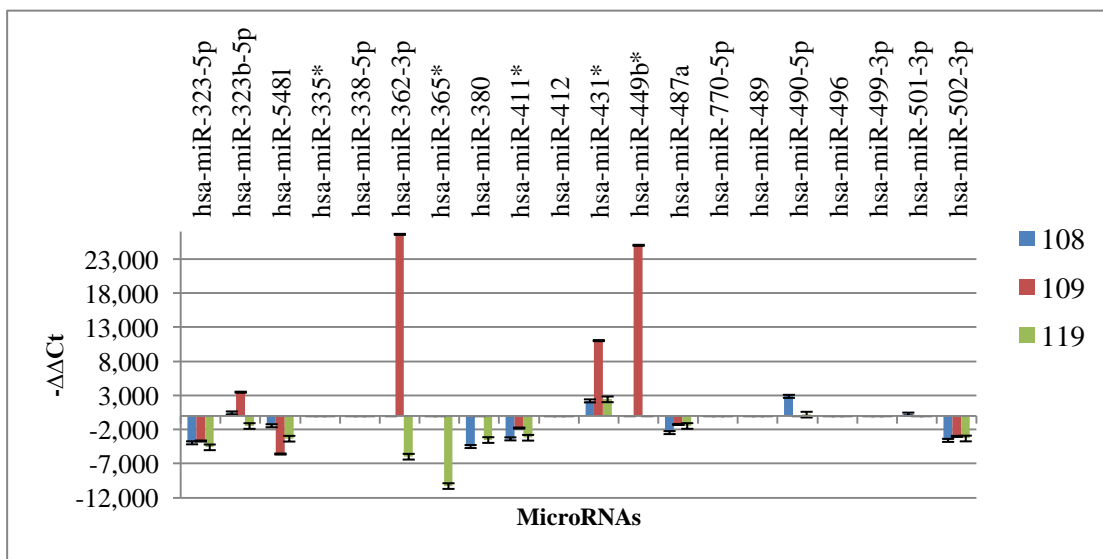
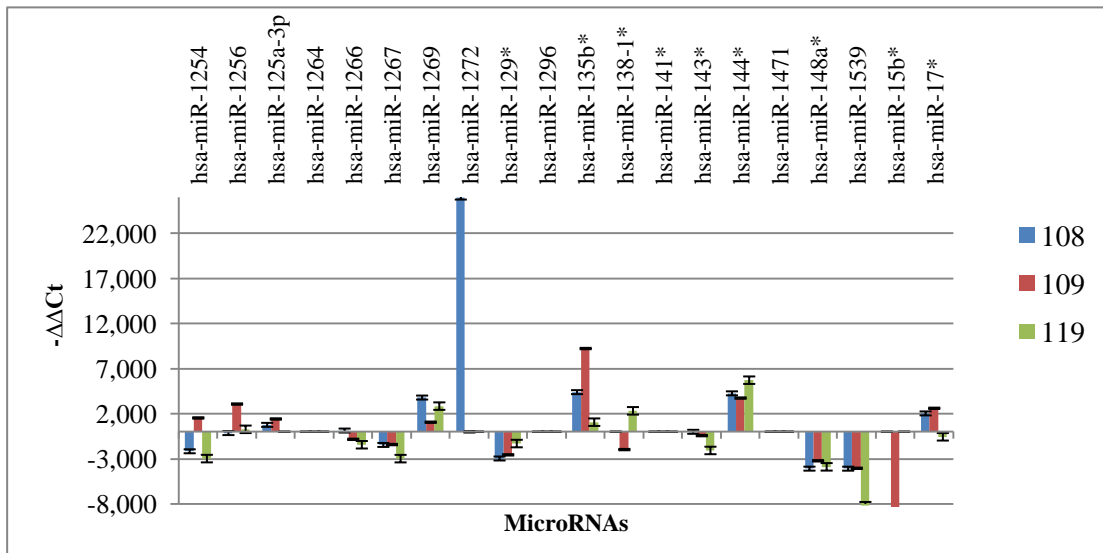
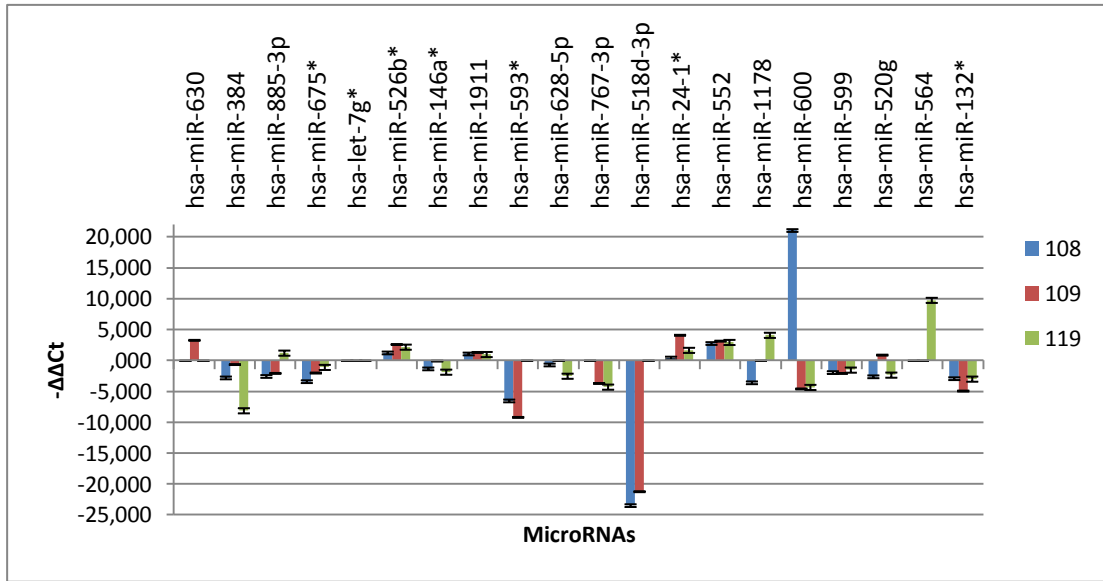


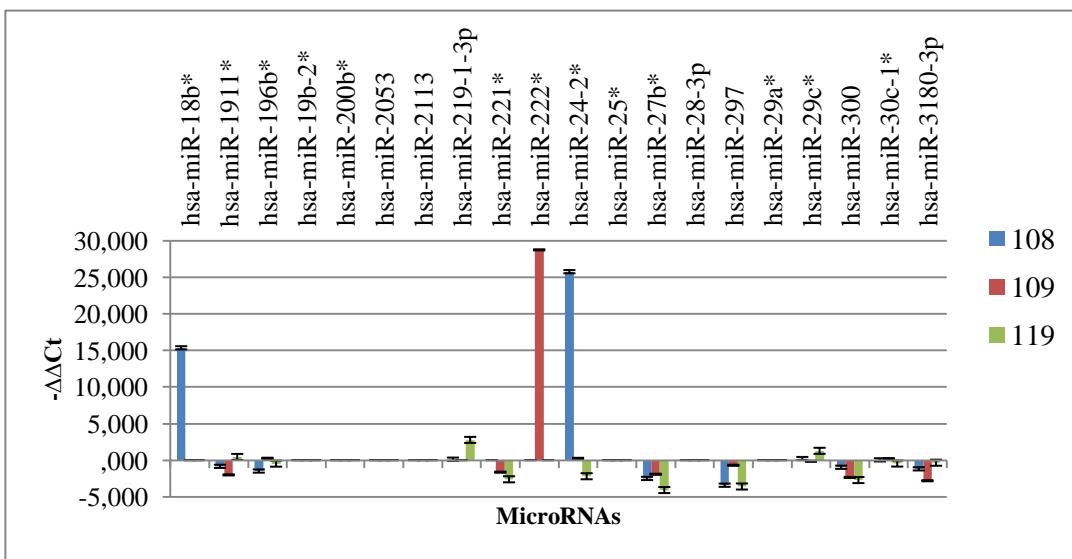
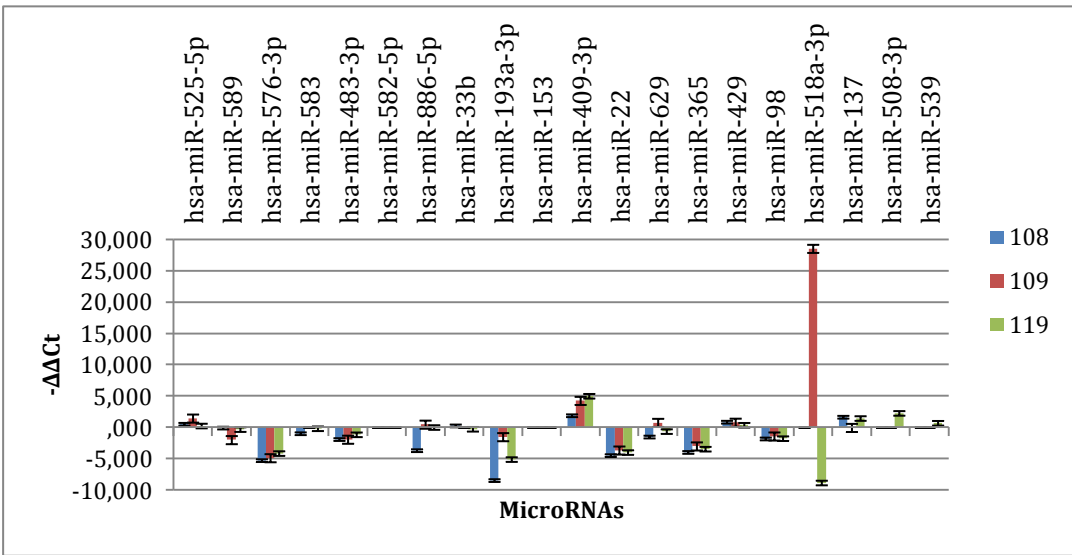
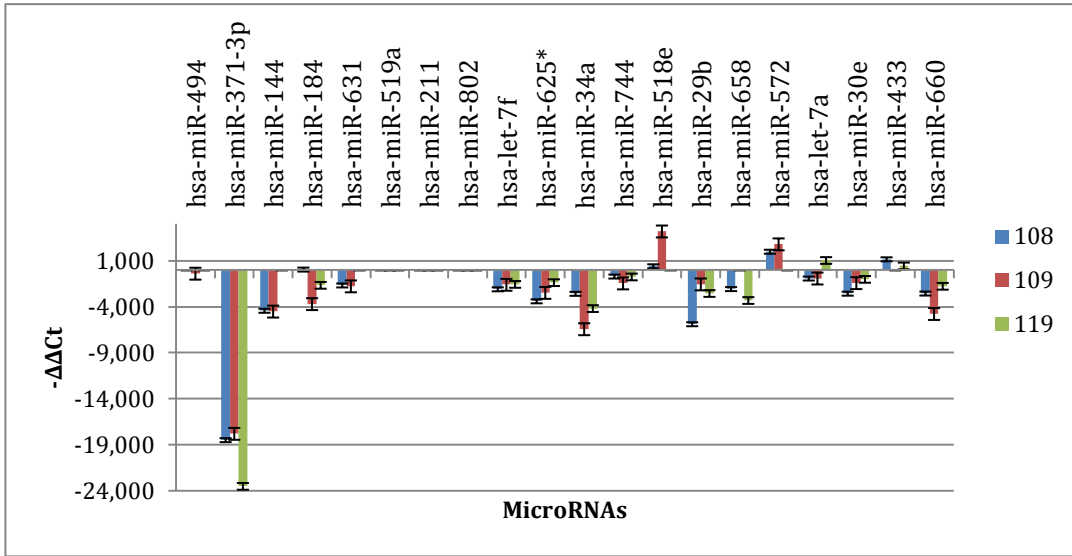


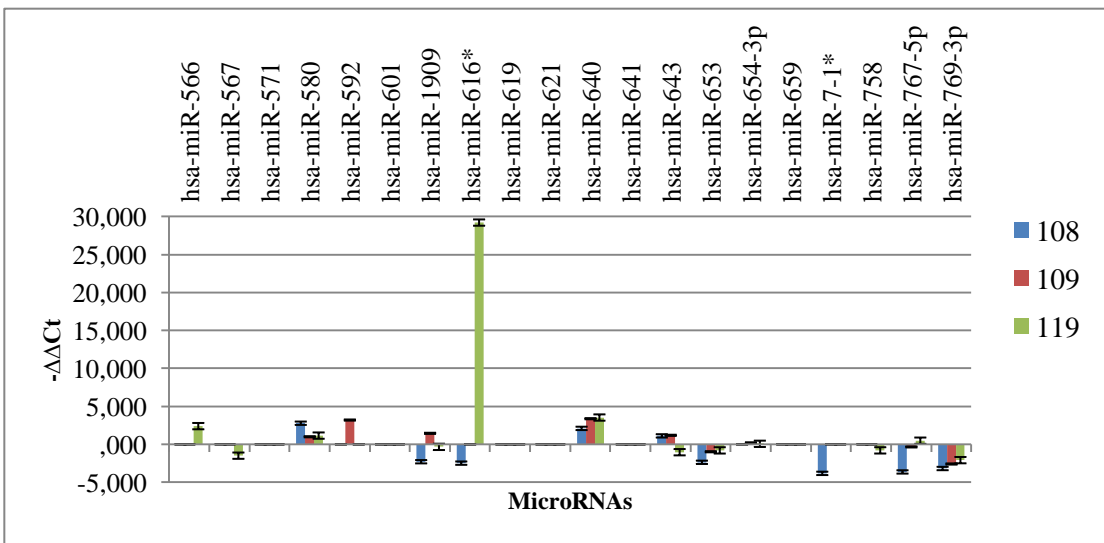
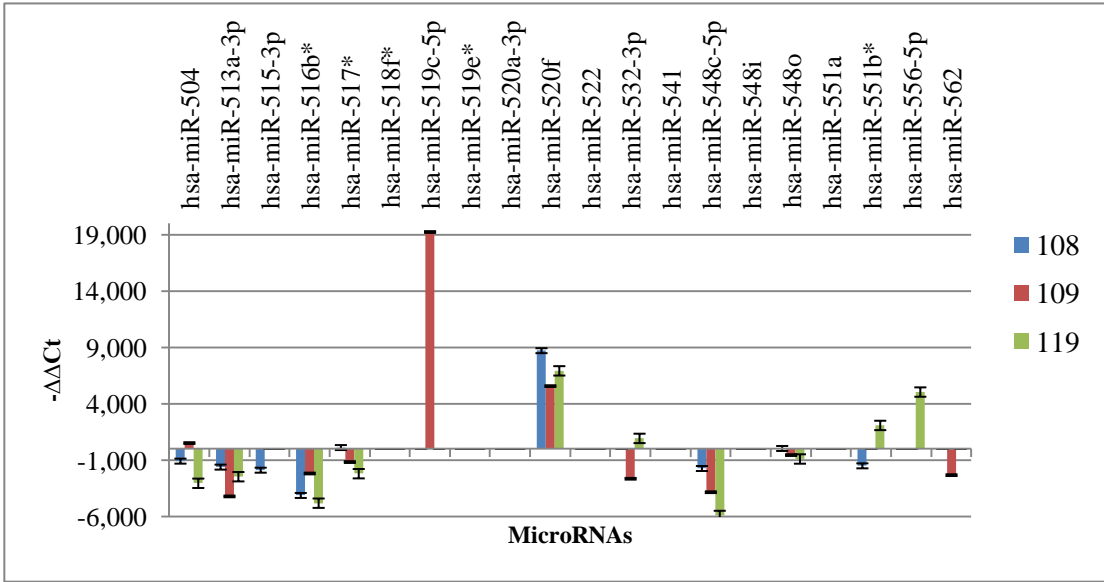
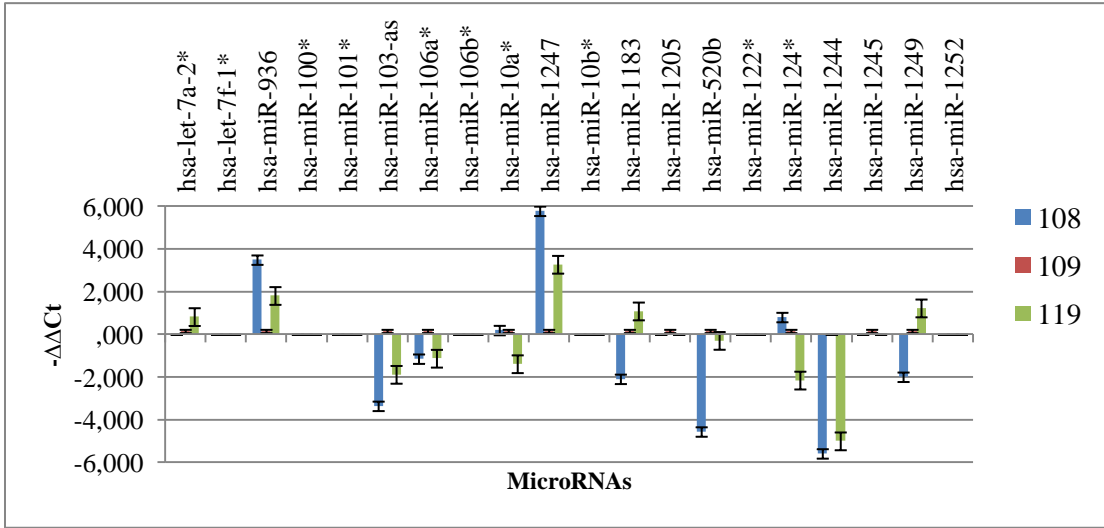


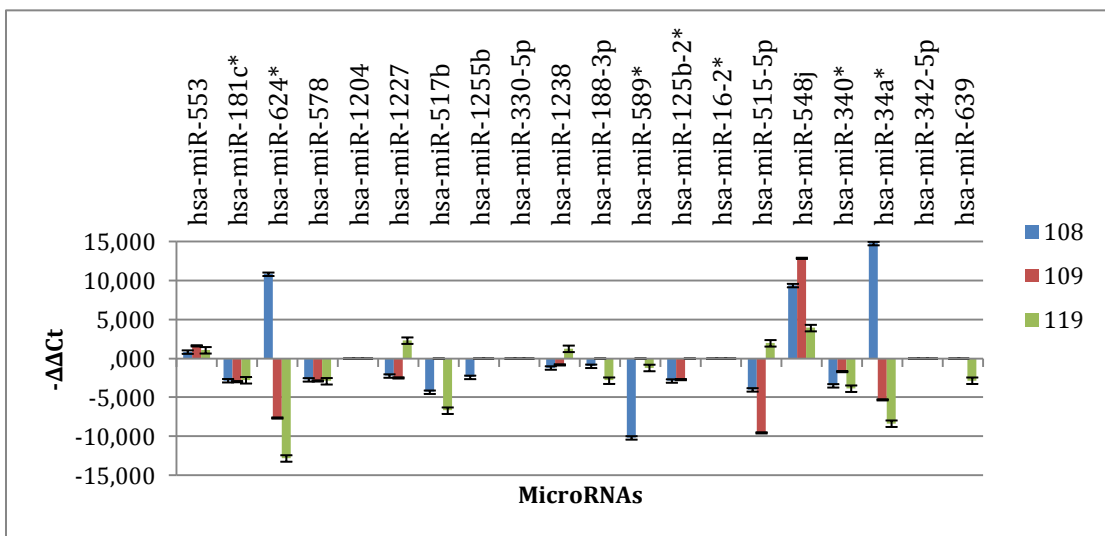
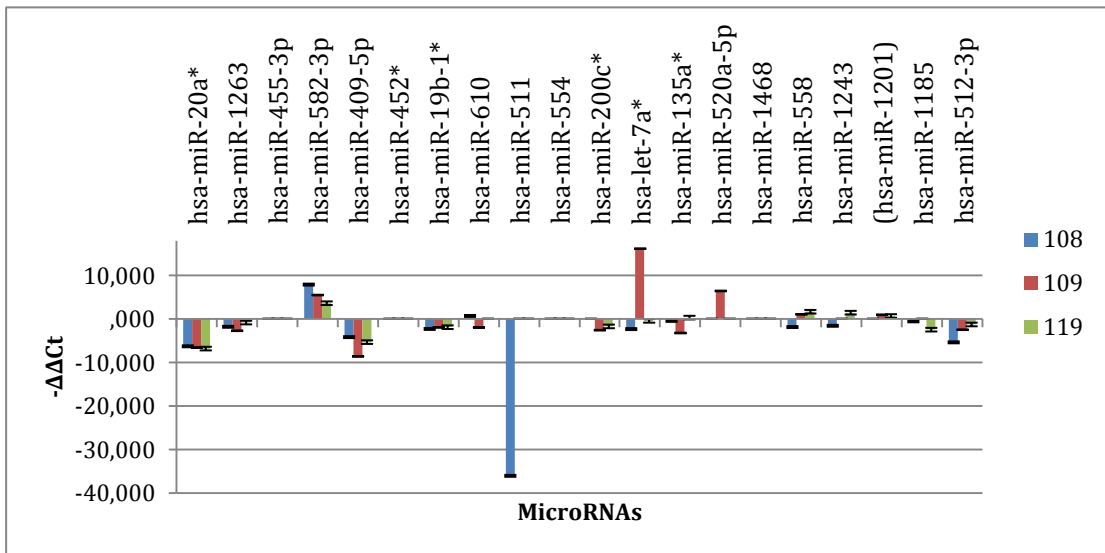
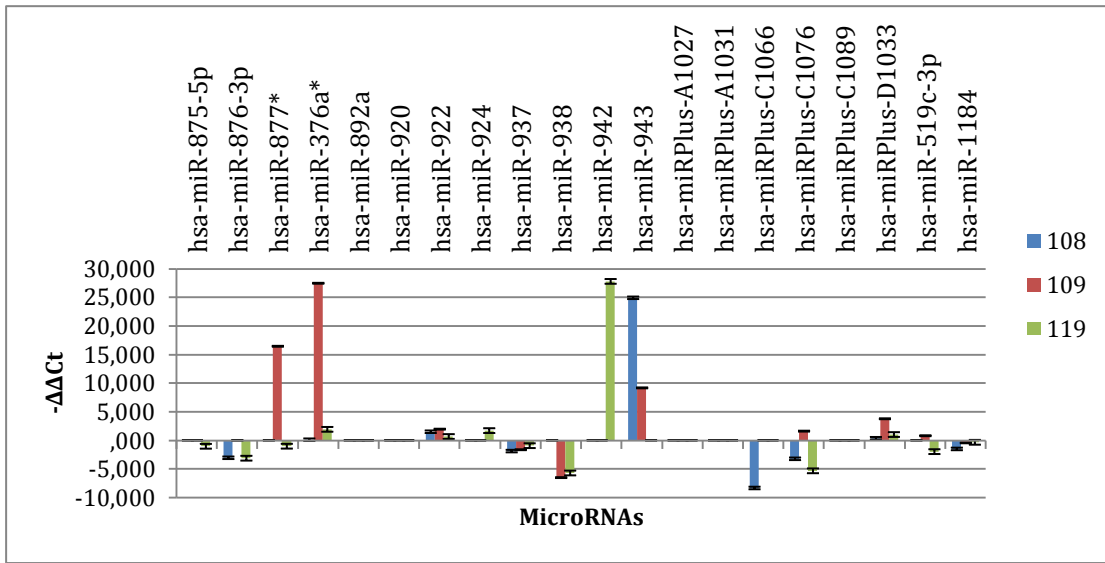


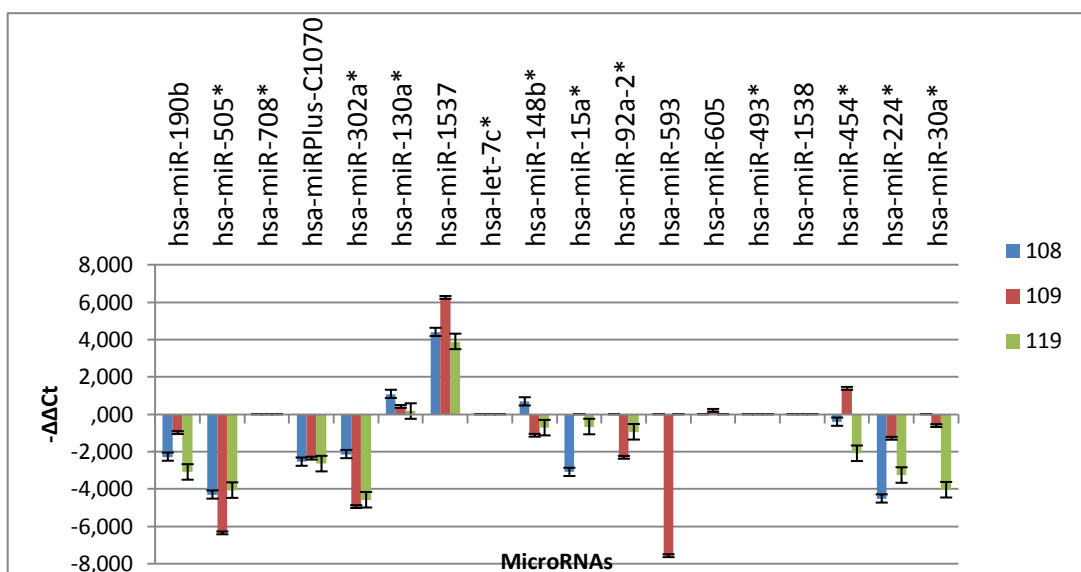
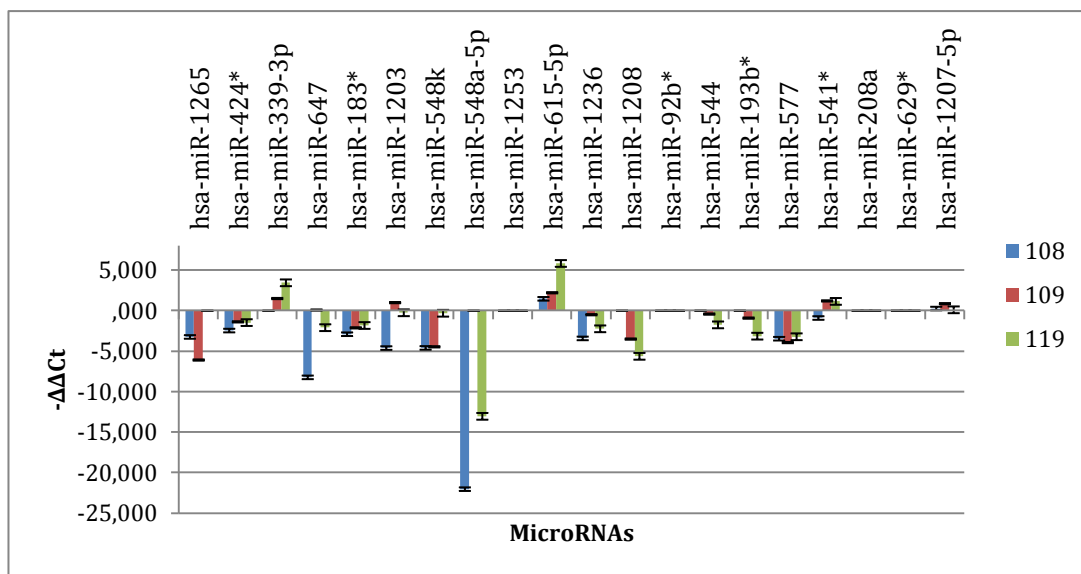
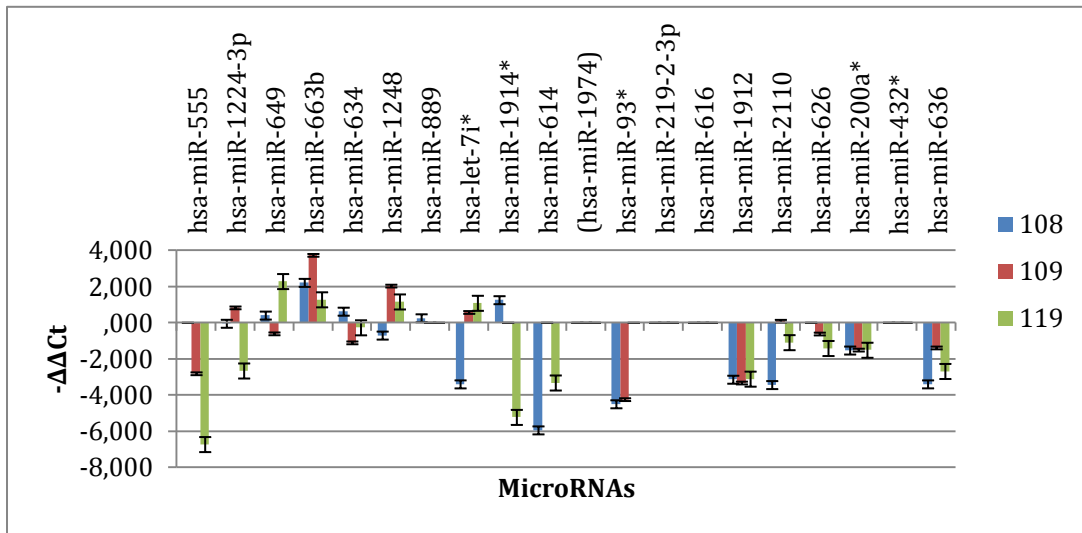


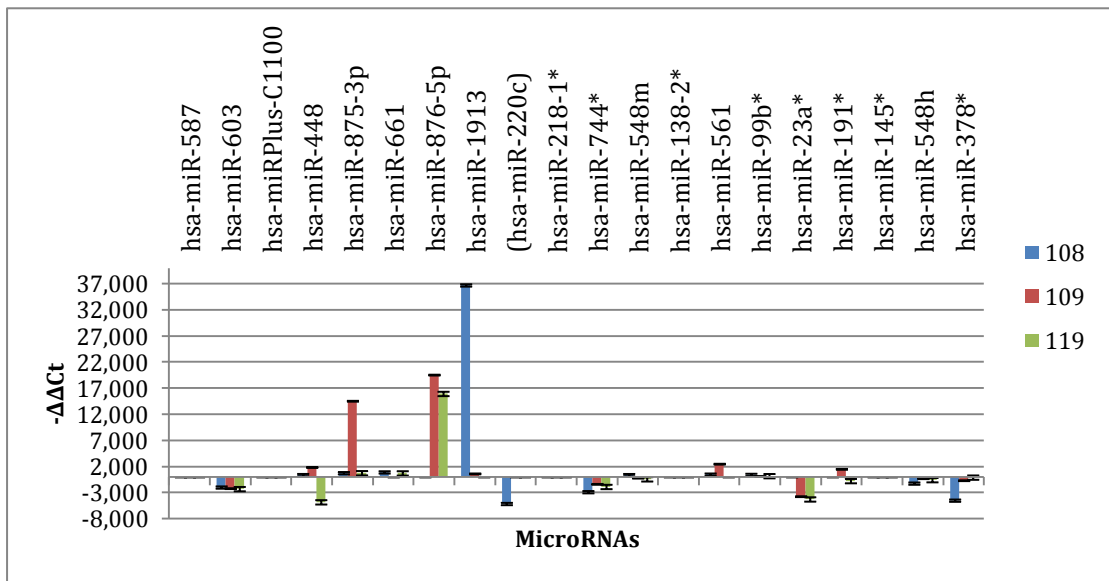
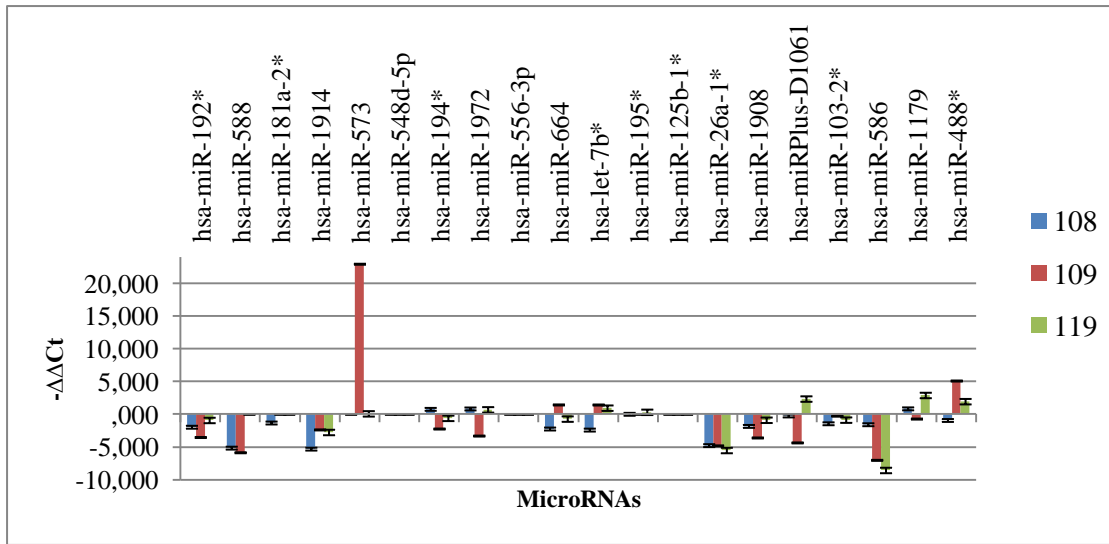
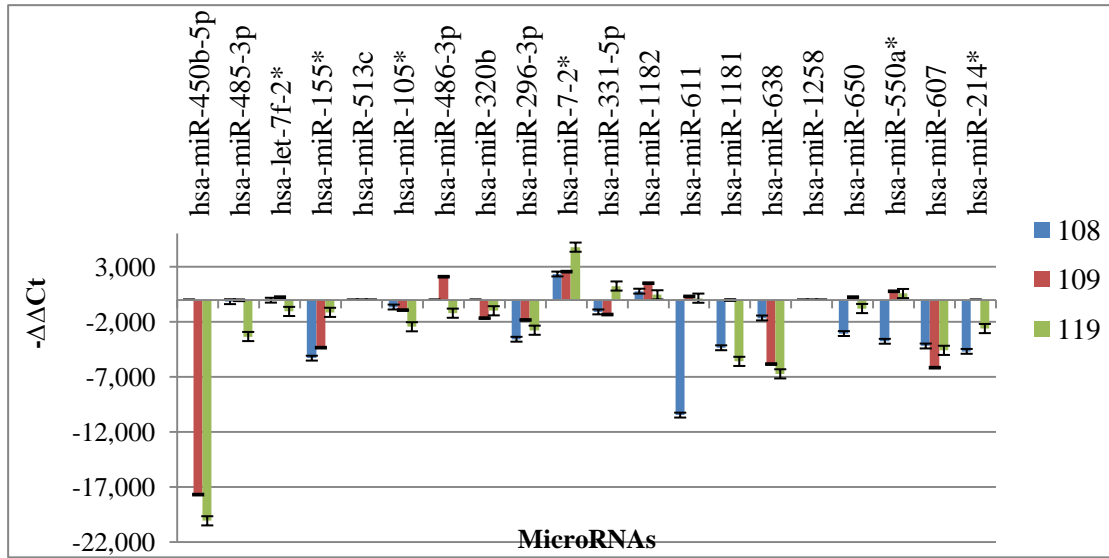












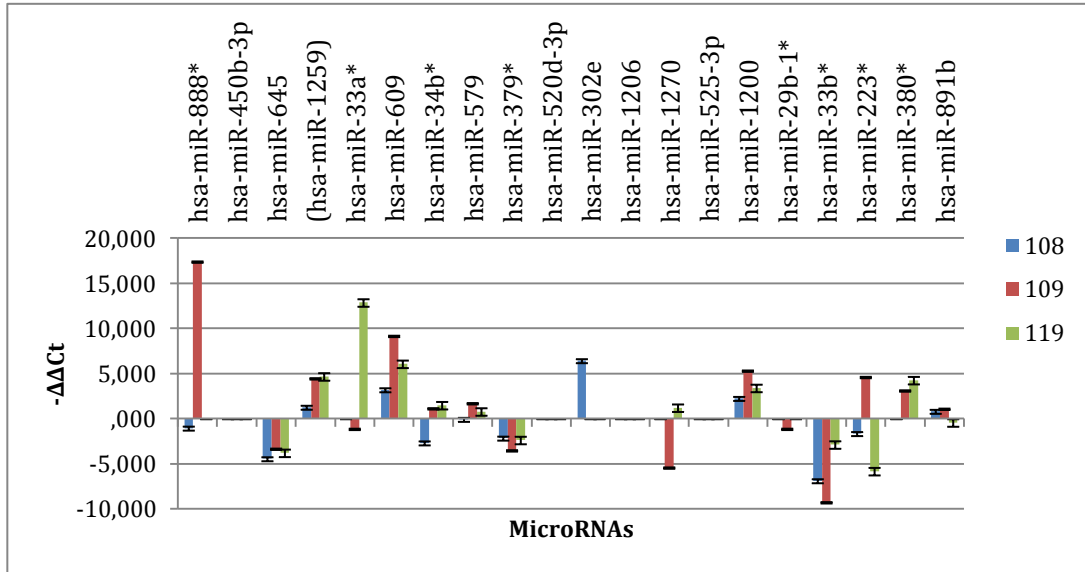


Figura 6.1 – Gráficos relativos à expressão genética de todos os miRNAs que constam neste estudo nos doentes SIV108 (azul), SIV109 (vermelho) e SIV119 (verde). Por facilidade de nomenclatura designam-se os doentes nas figuras sem indicação do tipo de tecido (SIV).

ANEXOS

Anexo I - Painéis de miRNAs usados nos ensaios de expressão por RT-PCR

miRNAs presentes no Painel I.

	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	hsa-miR-379	hsa-miR-217	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-328	hsa-miR-374b*	hsa-miR-143	hsa-miR-623	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-557	hsa-miR-218	hsa-miR-136	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-31*	hsa-miR-20b*	hsa-miR-325	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-210	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-194	hsa-let-7g	hsa-miR-203	hsa-miR-181a*	hsa-miR-934
B	hsa-miR-551b	UniSp6 CP	hsa-miR-524-3p	hsa-miR-7	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-30c	hsa-miR-301b	hsa-miR-128	hsa-miR-329	hsa-miR-224	hsa-miR-487b	hsa-miR-130a	hsa-miR-138	hsa-miR-26a-2*	hsa-miR-378	hsa-miR-381	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-521	hsa-miR-221	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-132	hsa-miR-424	UniSp3 IPC	hsa-miR-374a
C	hsa-miR-532-5p	hsa-miR-99a	hsa-miR-92a-1*	hsa-miR-125b	hsa-miR-185	hsa-miR-25	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-20a	hsa-miR-765	hsa-miR-24	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-425	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-760	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-130b	hsa-let-7e	hsa-miR-133b	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-23a	hsa-miR-193b	UniSp3 IPC	hsa-miR-518c*	hsa-miR-204
D	hsa-miR-933	SNORD49 A	hsa-miR-452	hsa-miR-215	hsa-miR-141	hsa-miR-374b	hsa-miR-668	hsa-miR-33a	hsa-miR-101	hsa-miR-30c-2*	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-340	hsa-miR-196a	hsa-miR-888	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-570	hsa-miR-518c	hsa-miR-200a	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-26a	hsa-miR-99b	hsa-miR-431	hsa-miR-23b	hsa-miR-367
E	hsa-miR-505	hsa-miR-18a	hsa-miR-92a	hsa-miR-500a	hsa-miR-887	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-126	hsa-miR-622	hsa-miR-376b	hsa-miR-302c	hsa-miR-185*	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-873	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-181d	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-129-5p	hsa-miR-492	hsa-miR-519d	UniSp3 IPC	hsa-miR-302d	hsa-miR-346	hsa-miR-151-3p
F	hsa-miR-493	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-99a*	hsa-miR-10a	hsa-miR-202	hsa-miR-10b	hsa-miR-503	hsa-miR-890	hsa-miR-30d	hsa-miR-514	hsa-miR-16	hsa-miR-150	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-545	hsa-miR-29b-2*	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-92b	hsa-miR-665	hsa-miR-506	hsa-miR-363	hsa-miR-663	hsa-miR-651	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-432
G	hsa-miR-154*	hsa-miR-27a	hsa-miR-376c	hsa-miR-940	hsa-miR-22*	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-18b	hsa-miR-187	hsa-miR-516b	hsa-miR-302c*	hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-186	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-155	hsa-miR-107	hsa-miR-302b	hsa-miR-662	hsa-miR-30a	hsa-miR-302d*	hsa-miR-484	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-494
H	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-103	hsa-miR-144	hsa-miR-184	hsa-miR-631	hsa-miR-519a	hsa-miR-211	hsa-miR-802	hsa-let-7f	hsa-miR-625*	hsa-miR-34a	hsa-miR-744	hsa-miR-518e	hsa-miR-29b	hsa-miR-658	hsa-miR-572	hsa-let-7a	hsa-miR-30e	hsa-miR-433	hsa-miR-660	hsa-let-7c	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-219-5p
I	hsa-miR-19b	hsa-miR-526b	hsa-miR-720	hsa-miR-30b	hsa-miR-637	hsa-miR-422a	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-335	hsa-miR-134	hsa-miR-21	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-26b	hsa-miR-214	hsa-miR-32	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-488	hsa-miR-371-5p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-891a	hsa-miR-549	hsa-miR-205	hsa-miR-518b	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-454
J	hsa-miR-15a	hsa-miR-191	hsa-miR-608	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-497	hsa-miR-19a	hsa-miR-187*	hsa-miR-620	hsa-let-7i	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-652	hsa-miR-1979	hsa-miR-30e*	hsa-miR-181c	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-152	hsa-miR-93	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-29c	hsa-miR-372	hsa-miR-133a	hsa-miR-124	hsa-miR-190
K	hsa-miR-302a	hsa-miR-595	hsa-miR-602	hsa-miR-223	hsa-miR-627	hsa-miR-34b	hsa-miR-410	hsa-miR-17	hsa-miR-376a	hsa-miR-877	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-449a	hsa-miR-498	hsa-miR-148b	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-598	hsa-miR-96	hsa-let-7d	hsa-miR-135b	hsa-miR-495	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-34c-3p	hsa-miR-596	hsa-miR-126*
L	hsa-miR-145	SNORD38 B	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-421	hsa-miR-96*	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-550a	hsa-miR-766	hsa-miR-200b	hsa-miR-298	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-449b	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-192	hsa-miR-29a	hsa-miR-18a*	hsa-miR-383	hsa-miR-9	hsa-miR-202*	hsa-miR-363*	hsa-miR-147b	hsa-miR-197	hsa-miR-597
M	hsa-miR-326	hsa-miR-15b	hsa-miR-105	hsa-miR-196b	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-20b	hsa-miR-147	hsa-miR-198	hsa-miR-375	hsa-miR-517a	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-21*	hsa-miR-220a	hsa-miR-518f	hsa-miR-222	hsa-miR-617	hsa-miR-154	hsa-miR-708	hsa-let-7b	hsa-miR-95	hsa-miR-517c	hsa-miR-151-5p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-345
N	hsa-miR-509-3p	U6	hsa-miR-382	hsa-miR-373	hsa-miR-200c	hsa-miR-9*	hsa-miR-181b	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-195	hsa-miR-183	hsa-miR-135a	hsa-miR-30b*	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-1	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-584	hsa-miR-377	hsa-miR-216a	hsa-miR-206	hsa-miR-921	hsa-miR-513a-5p
O	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-181a	hsa-miR-122	hsa-miR-106a	hsa-miR-182	hsa-miR-370	hsa-let-7d*	hsa-miR-425*	hsa-miR-450a	hsa-miR-411	hsa-miR-216b	hsa-miR-106b	hsa-miR-886-3p	hsa-miR-510	hsa-miR-212	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-583	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-33b	hsa-miR-193a-3p
P	hsa-miR-153	Blank (H2O)	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-22	hsa-miR-629	hsa-miR-365	hsa-miR-429	hsa-miR-98	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-137	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-539	hsa-miR-148a	hsa-miR-146a	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-373*	hsa-miR-149	hsa-miR-642a	hsa-miR-31	hsa-miR-451	hsa-miR-100	hsa-miR-27b	hsa-miR-523	Blank (H2O)

miRNAs presentes no Painel II.

	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	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-543	hsa-miR-1245	hsa-miR-522	hsa-miR-571	hsa-miR-323-5p	hsa-miR-592	hsa-miR-487a	hsa-miR-1249	hsa-miR-25*	hsa-miR-922	hsa-miR-124*	hsa-miR-1264	hsa-miR-504	hsa-miR-138-1*	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-490-5p	hsa-miR-567	hsa-miR-18b*	hsa-miR-125a-3p	hsa-miRPlus-A1027	hsa-miR-129*	hsa-miR-148a*
B	hsa-miR-412	Blank (H2O)	hsa-miRPlus-C1066	hsa-miR-548o	hsa-miR-143*	hsa-miR-513a-3p	hsa-miR-943	hsa-miR-196b*	hsa-miR-200b*	hsa-miR-551b*	hsa-miR-942	hsa-miR-515-3p	hsa-miRPlus-C1076	hsa-miR-653	hsa-miR-24-2*	hsa-miR-1539	hsa-miR-27b*	hsa-miR-1909	hsa-miR-770-5p	hsa-miR-548l	hsa-miR-376a*	hsa-miR-1247	hsa-miR-520b	hsa-miR-936
C	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-875-5p	hsa-miR-551a	hsa-miR-1183	hsa-miR-758	hsa-miR-1244	hsa-miR-566	hsa-miR-1256	hsa-miR-516b*	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-496	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-659	hsa-miR-135b*	hsa-miR-641	hsa-miR-616*	hsa-miR-489	hsa-miR-335*	hsa-miR-892a	hsa-miR-10b*	hsa-miR-122*	hsa-miR-100*
D	hsa-miR-769-3p	UniSp6 CP	hsa-miR-519c-5p	hsa-miR-938	hsa-miR-937	hsa-miR-1911*	hsa-miR-640	(hsa-miR-220b)	hsa-miR-29c*	hsa-miR-449b*	hsa-let-7f-1*	hsa-miR-297	hsa-miRPlus-A1031	hsa-miR-144*	hsa-miR-106a*	hsa-miR-1254	hsa-miR-580	hsa-miR-1252	hsa-miR-643	hsa-miR-30c-1*	hsa-miR-221*	hsa-miR-103-as	hsa-miR-411*	hsa-miR-519e*
E	hsa-miR-338-5p	hsa-miRPlus-C1089	hsa-miR-323b-5p	hsa-miR-548l	hsa-miR-541	hsa-miR-1272	hsa-miR-1205	hsa-miR-1266	hsa-miR-431*	hsa-miR-621	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-1267	hsa-miR-141*	hsa-miR-1269	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-15b*	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-222*	hsa-miR-601	hsa-miR-924	hsa-miR-29a*	hsa-let-7a-2*	hsa-miR-520f	hsa-miR-101*
F	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-517*	hsa-miR-380	hsa-miR-1296	hsa-miR-2053	hsa-miR-920	hsa-miR-1471	hsa-miR-196-2*	hsa-miR-10a*	hsa-miR-106b*	hsa-miR-365*	hsa-miR-619	hsa-miR-518*	hsa-miR-17*	hsa-miR-2113	hsa-miR-877*	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-3180-3p	hsa-miR-7-1*	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-562	hsa-miRPlus-D1033	hsa-miR-300
G	hsa-miR-604	hsa-miR-130b*	hsa-miR-149*	hsa-miR-1271	hsa-miR-520h	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-612	hsa-miR-1237	hsa-miR-527	hsa-miR-1260	hsa-miR-182*	hsa-miR-632	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-671-3p	hsa-miR-941	hsa-miR-23b*	hsa-miR-591	hsa-miR-26b*	hsa-miR-519b-3p	hsa-miR-30d*	hsa-miR-526a	hsa-miR-675b	hsa-miR-520e	hsa-miR-646
H	hsa-miR-519e	hsa-miR-103	hsa-miR-26a-1*	hsa-miR-1908	hsa-miRPlus-D1061	hsa-miR-103-2*	hsa-miR-586	hsa-miR-1179	hsa-miR-488*	hsa-miR-208b	hsa-miR-192*	hsa-miR-588	hsa-miR-181a-2*	hsa-miR-1914	hsa-miR-573	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-194*	hsa-miR-1972	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-664	hsa-let-7b*	hsa-miR-195*	hsa-miR-125b-1*	Blank (H2O)
I	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-554	hsa-miR-558	hsa-miR-1243	(hsa-miR-1201)	hsa-miR-1185	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-587	hsa-miR-603	hsa-miR-1184	hsa-miR-20a*	hsa-miR-1263	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-582-3p	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-452*	hsa-miR-196-1*	hsa-miR-610	hsa-miR-511	hsa-miR-200c*	hsa-let-7a*	hsa-miR-135a*	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-1468
J	hsa-miRPlus-C1100	hsa-miR-191	hsa-miR-145*	hsa-miR-548h	hsa-miR-378*	hsa-miR-553	hsa-miR-181c*	hsa-miR-624*	hsa-miR-578	hsa-miR-448	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-661	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-1913	(hsa-miR-220c)	hsa-miR-218-1*	hsa-miR-744*	hsa-miR-548m	hsa-miR-138-2*	hsa-miR-561	hsa-miR-99b*	hsa-miR-23a*	hsa-miR-191*	Blank (H2O)
K	hsa-miR-1204	hsa-miR-548j	hsa-miR-555	hsa-miR-1224-3p	hsa-miR-649	hsa-miR-663b	hsa-miR-634	hsa-miR-1248	hsa-miR-889	hsa-miR-1227	hsa-miR-517b	hsa-miR-1255b	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-1238	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-589*	hsa-miR-125b-2*	hsa-miR-16-2*	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-340*	UniSp3 IPC	hsa-miR-34a*	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-639
L	hsa-let-7f*	SNORD38 B	hsa-miR-645	(hsa-miR-1259)	hsa-miR-33a*	hsa-miR-609	hsa-miR-34b*	hsa-miR-579	hsa-miR-379*	hsa-miR-1914*	hsa-miR-614	(hsa-miR-1974)	hsa-miR-93*	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-616	hsa-miR-1912	hsa-miR-2110	hsa-miR-626	hsa-miR-200a*	hsa-miR-432*	hsa-miR-636	hsa-miR-888*	hsa-miR-450b-3p	Blank (H2O)
M	hsa-miR-520d-3p	hsa-miR-1265	hsa-miR-1203	hsa-miR-548k	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-1253	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-1236	hsa-miR-1208	hsa-miR-302e	hsa-miR-1206	hsa-miR-1270	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-1200	hsa-miR-29b-1*	hsa-miR-33b*	hsa-miR-223*	hsa-miR-380*	hsa-miR-891b	hsa-miR-424*	hsa-miR-339-3p	UniSp3 IPC	hsa-miR-647	hsa-miR-183*
N	hsa-miR-92b*	U6	hsa-miR-146a*	hsa-miR-1911	hsa-miR-593*	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-767-3p	hsa-miR-518d-3p	hsa-miR-24-1*	hsa-miR-544	hsa-miR-193b*	hsa-miR-577	hsa-miR-541*	hsa-miR-208a	hsa-miR-629*	hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-630	hsa-miR-384	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-675*	hsa-let-7g*	hsa-miR-526b*	UniSp3 IPC	Blank (H2O)
O	hsa-miR-552	hsa-miR-513c	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-1182	hsa-miR-611	hsa-miR-1181	hsa-miR-638	hsa-miR-1258	hsa-miR-650	hsa-miR-1178	hsa-miR-600	hsa-miR-599	hsa-miR-520g	hsa-miR-564	hsa-miR-132*	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-485-3p	hsa-let-7f-2*	hsa-miR-155*	hsa-miR-105*	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-320b	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-7*
P	hsa-miR-550a*	SNORD49 A	hsa-miR-593	hsa-miR-605	hsa-miR-493*	hsa-miR-1538	hsa-miR-454*	hsa-miR-224*	hsa-miR-30a*	hsa-miR-607	hsa-miR-214*	hsa-miR-190b	hsa-miR-505*	hsa-miR-708*	hsa-miRPlus-C1070	hsa-miR-302a*	hsa-miR-130a*	hsa-miR-1537	hsa-let-7c*	hsa-miR-148b*	hsa-miR-15a*	Blank (H2O)	hsa-miR-92a-2*	Blank (H2O)

Anexo II – Poster apresentado no EuroPrevent, May 3-5 2012,
Dublin, Irlanda.

S. Santos^{1,2}, V. Marques^{2,6}, M. Pires², AC. Nunes², IM. Gaspar³, D. Brito⁴, H. Madeira⁴, I. Carreira⁵, C. Monteiro⁶, AR. Fernandes^{1,2,7}

(1) Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Lisbon, Portugal; (2) Universidade Lusófona, Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal; (3) Cardiogenética, Cardiologia Pediátrica, Hospital Santa Cruz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Portugal; (4) Hospital Santa Maria, Lisbon, Portugal; (5) Fac. Medicina, Universidade de Coimbra, Lisbon, Portugal; (6) Fac. Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal; (7) Departamento Ciências da Vida, Faculdade Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal.

PURPOSE

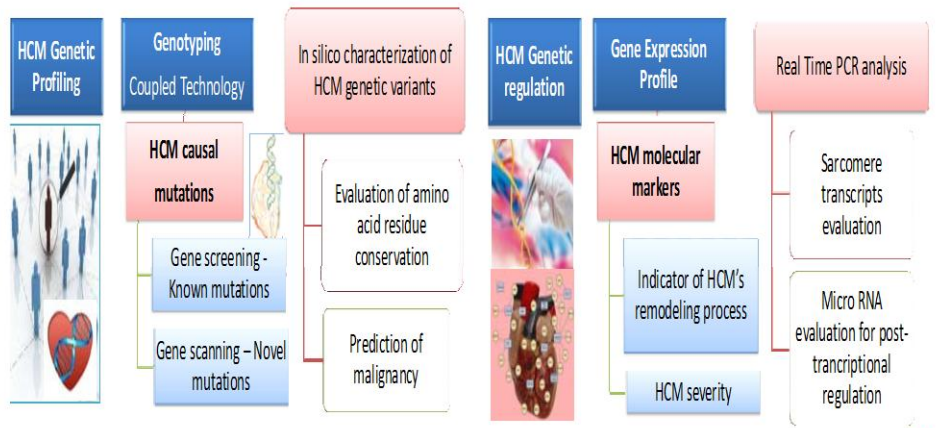


Hypertrophic cardiomyopathy (HCM), the most common hereditary cardiovascular disease has a prevalence of 1:500 individuals in the general population. HCM is typically characterized by **genetic and allelic heterogeneity** due to the more than 1000 mutations in 31 genes that have been associated with HCM.

The heterogeneity denoted in HCM patients cannot always be explained with the **mutational profile**, but instead may be due to **altered gene expression**. Also, **microRNAs (miRs)** have recently emerged as regulators of tissue remodelling and HCM pathological process.

Our main goal was to contribute to **enlighten the genetic basis of HCM being an outcome to identify pathological biomarkers that in last instance will contribute to correlation with the clinical profile**. In this regard the **genetic and transcriptional profiles** were analysed from a cohort of HCM patients.

HCM molecular evaluation: Contribution to a Genotype-Phenotype Correlation + Accurate HCM diagnosis and Prognosis



METHODS

1. HCM Genetic Profiling

- DNA samples: peripheral blood of 120 HCM patients from the Portuguese population.
- Gene screening for HCM known variations: iPLEX MassArray (Sequenom) / Gene scanning: High Resolution Melting (HRM) using LightCycler 480® platform (Roche). Novel variants in sarcomeric and Z-disk genes: confirmed by automated sequencing.

2. In silico characterization of HCM genetic variants

- Evaluation of amino acid residue conservation between species: Uniprot: <http://www.uniprot.org/>
- Prediction of malignancy: PolyPhen-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>

3. Sarcomere gene expression analysis

- RNA samples: 40 cardiac biopsies, from interventricular septum (IVS) and right auricular appendix (RA), of diagnosed HCM patients.
- MYH7, MYBPC3, TNNT2 and TNNT3 gene expression analysis: Real-Time PCR using deltaCt method
- Statistical analysis was executed using unsupervised machine learning methods; namely complete link hierarchical clustering and K-means with several K, both using Pearson correlation measure to distinguish differences between groups of patients, tissues and genes.

4. MicroRNA profiling

- RNA samples: cardiac biopsies from 2 healthy individuals and 4 patients with obstructive HCM screened for a panel of 739 miRs (Exiqon®).

RESULTS

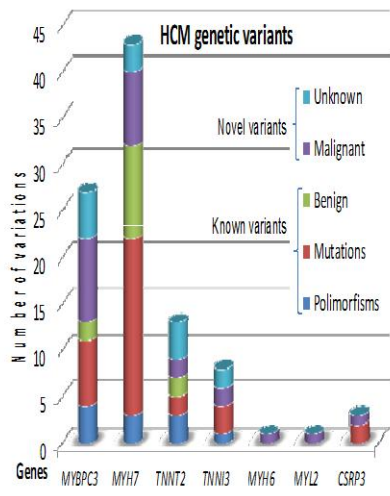


Fig. 1 - Genotyping results obtained from iPLEX Massarray and HRM analysis. 85 out of the 120 genotyped patients presented genetic alterations. HRM analysis allowed identification of 14 novel mutations in sarcomeric and disk Z genes. The most frequently mutated genes were MYH7, MYBPC3 and TNNT2.

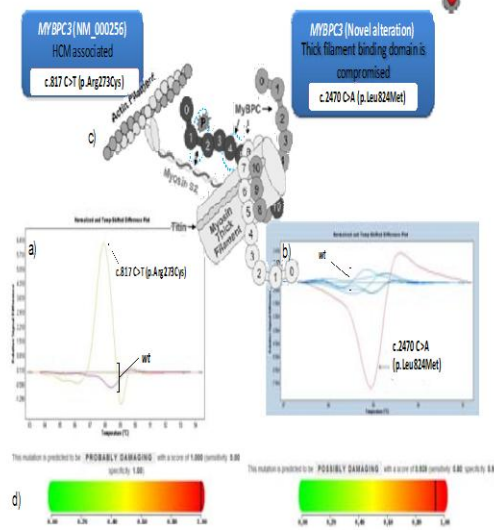


Fig. 3 - HRM gene scanning results. Melting curves of exon 8 (a) and exon 23 (b) of MYBPC3 gene. The arrows indicate the different DNA profiles from a patient (red curve) in comparison to DNA of healthy controls used as reference curves (blue).

c) Schematic representation of the sarcomere proteins interaction. The protein regions affected by the identified alterations are demarked with a blue dotted circle. p.Leu824Met alters the polarity of the protein at a fragment involved in the interaction between myosin binding protein C and the myosin.

d) PolyPhen software analysis regarding MYBPC3 p. Arg273Cys and MYBPC3 p. Leu824Met alterations being both predicted as probably damaging

CONCLUSIONS

By coupling Mass Spectrometry Genotyping (MSG) and High Resolution Melting (HRM) as a new strategy for HCM diagnosis we were able to identify HCM known mutations and several new mutations.

All novel mutations affected highly conserved residues being probably the cause of the HCM clinical phenotype, nevertheless, functional studies are in course.

An explanation of the adverse consequences of complex genotypes is that multiple abnormal myofilament proteins might result in more profound disarrangement of sarcomere mechanics, myocardial energetics and cardiomyocyte dysfunction.

Expression profile, highlighted sarcomere transcripts as valuable candidates for recognition of HCM. In addition, highlighting key deregulated miRNAs associated with HCM remodelling may be crucial for the identification of novel pathological biomarkers.

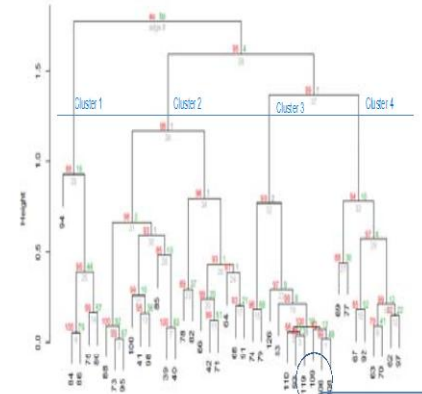


Fig. 2 - Cluster dendrogram obtained from transcriptional analysis (Real Time PCR) in cardiac tissue for MYH7, MYBPC3 and TNNT3 genes. au p-value = approximately unbiased p-value, bp = bootstrap probability. A statistical correlation analysis was obtained via Spearman and Pearson calculation. Through clustering analysis it was possible to identify 4 clusters regarding gene expression patterns. The obtained gene expression patterns are most probably related to different morphologic HCM features and genetic alterations (data not shown)

Down regulated	Up regulated
miR-30a	miR-195*
miR-26b	miR-27b*
miR-1	miR-23b*
miR-133a	miR-214*
miR-9	
miR-29a	
miR-133b	
miR-150	
miR-125a-5p	
miR-181b	

Table 1 - Annotated human miRNAs obtained from interventricular septum from selected HCM patients (cluster 3, fig. 2). miRNA expression pattern from patients was markedly different obtained from cardiac control healthy samples. These results are being validated using 10 HCM samples and 4 normal cardiac biopsies in order to evaluate miRNA as reflective of disease status

Anexo III – Poster apresentado no II Florence International
Symposium on Advances in Cardiomyopathies,
September 26-09-2012, Florence

TRANSCRIPTOMIC SIGNATURE PATTERN FOR HCM REMODELING

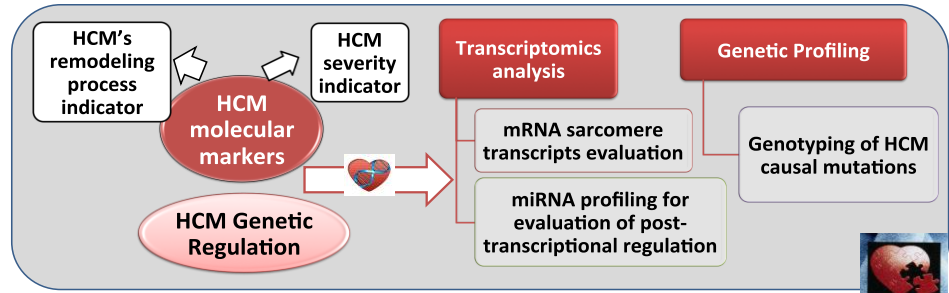


Fernandes AR^(1,2,3); Marques V^(2,4); Nunes AC⁽²⁾; Freitas AT⁽⁵⁾; Gouveia MR⁽⁶⁾; Antunes M⁽⁷⁾; Carreira IM⁽⁸⁾; Gaspar IM⁽⁹⁾; Monteiro C⁽⁴⁾; Santos S^(1,2,4)

¹Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Portugal; ²CB3, FEEN, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; ³Departamento Ciências da Vida, FCT, New University of Lisbon, Caparica, Portugal; ⁴Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal; ⁵INESC_ID/IST, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal; ⁶Cardiologia, Hospital Santa Cruz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (CHLO); ⁷Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal; ⁸Un. Citogenética e Diag. Pré-Natal, Fac. Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; ⁹Cardiogenética, Cardiologia Pediátrica, Hospital Santa Cruz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (CHLO)

PURPOSE

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is characterized by unexplained thickening of the myocardial wall in the absence of any known cause of hypertrophy. HCM clinical heterogeneity suggests other factors apart from the gene mutation in modifying the clinical phenotype. We hypothesized that sarcomere gene transcripts represent molecular markers for HCM evaluation. Also, given the emerging roles of microRNAs (miRNAs) in transcriptional regulation of cellular phenotypes, we investigate the potential involvement of miRNAs in cardiac hypertrophy.



The understanding of the genetic basis of HCM, namely the identification of new pathological biomarkers that could contribute to genotype-phenotype correlations is of extreme importance in explaining HCM heterogeneity

METHODS

HCM genetic profiling : sarcomeric and Z-disk genes genotyping: DNA samples were obtained from peripheral blood of 40 HCM patients from the Portuguese population. Gene screening for HCM known variations was performed through iPLEX MassArray (Sequenom) and Gene scanning for detection of novel variants was performed through High Resolution Melting (HRM) using LightCycler 480® platform (Roche). New variants were identified by automated sequencing.

In silico characterization of HCM genetic variants:

Evaluation of amino acid residue conservation between species were performed through Uniprot : <http://www.uniprot.org/> and prediction of malignancy was evaluated through PolyPhen-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>

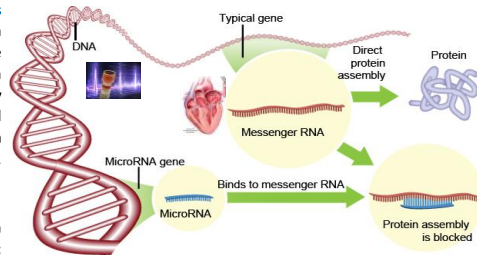


Fig. 1. DNA sequence analysis and mRNA and microRNA profile evaluation should be correlated in order to understand the biological events inherent to a disease. Figure adapted from - Gary Taubes and Steve Karp, Discover Magazine, 2009

Gene expression analysis of sarcomere genes : RNA samples were extracted from interventricular septum and right auricular appendix biopsies obtained during cardiac surgery from 40 HCM patients. Unsupervised machine learning methods were used to distinguish differences between patients, tissues and genes.

miRNA profiling : Based in Real-Time-PCR clustering analysis, 3 samples (out of 10) were selected for further investigation of miRNAs profile. Interventricular septum from these samples and from 1 healthy control were screened for a panel of 739 microRNAs (Exiqon®) divided by two plates. Three small RNA (U6snRNA, SNORD38B, SNORD49A) and three microRNAs (miR-103, miR-191 and miR-423-5p) reference genes have been included on both plates of the panel. The differential expression analysis of this set of microRNAs was performed using the open source clustering software CLUSTER 3.0. A standard hierarchical clustering using average linkage and Euclidean distance was performed. The U6snRNA reference gene was used for inter-plate calibration and to obtain a normalized microRNA signal useful for the clustering analyses

RESULTS

Real Time analysis revealed distinction between 5 main clusters (Fig.2) that could be due to the differences regarding the genetic profile (Table 1) and HCM different morphologic features between patients.

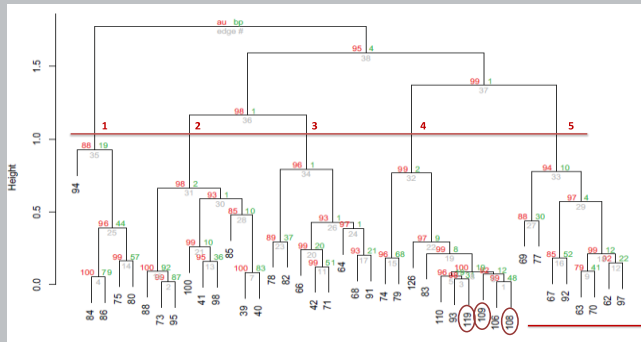


Fig. 2 - Cluster dendrogram obtained from transcriptional analysis (Real Time PCR) in cardiac tissue for MYH7, MYBPC3 and TNNT2 genes. au p-value = approximately unbiased p-value, bp = bootstrap probability. A statistical correlation analysis was obtained via Spearman and Pearson calculation.

Table 1 – Genotyping results obtained from iPLEX Massarray and HRM analysis for patients 108, 109 and 119 patients. 35 out of the 40 genotyped patients presented genetic alterations (data not shown). The most frequently mutated genes were MYH7, MYBPC3 and TNNT2.

Patient	Gene	Nucleotide and protein alteration	Database, bibliographic reference or PolyPhen prediction
108	TNNT2+	Intron 3 Del CTCT	HGMD; Komamura et al., 2004: predisposition to prominent left ventricular hypertrophy.
109	TNNT2+	c.833 A>T; p.Asn278Ile, Homozygous	HGMD; PolyPhen: Probably damaging (score 0,99)
119	MYH7+	c.4472 C>G; p.Ser1491Cys	HGMD; Roncarati et al., 2011: benign unless in homozygoty

Regarding miRNA profiling each patient was independently analysed. In 2 samples (108 and 119) it was possible to identify 2 miRNAs that were up-regulated (100x) and 6 miRNAs that were down-regulated (100-1000x) in cardiac tissue (Table 2). One patient sample (109) was excluded from the data analysis due to the high variability presented in the expression of a number of reference genes. Nevertheless, most of the highly expressed miRNAs presented an opposite differential expression when compared to the other two patients. Interesting, this patient was slightly different with a syncope episode. The results obtained from the samples under analysis are now being validated using 8 HCM new samples and 3 normal cardiac biopsies in order to evaluate miRNA as reflective of disease.

Table 1 – Annotated human miRNAs obtained from interventricular septum from selected HCM patients (cluster 4, Fig. 2). miRNA expression pattern from patients was markedly different obtained (100X-100X) from cardiac control healthy samples. miRNAs target genes were predicted through bioinformatic tools (Diana Micro-T v.3.0, Tarbase 6.0, a miRTarBase, September 2012) or via bibliographic references. All the identified target genes are expressed in heart (Gene Note data - Affymetrix GeneChips HG-U95A-E)

miRNA	Down / Upregulated	Target gene (highest score)	Protein	Biological function (heart related)
miR-371-3p	1000 X	ZNF213	Zinc finger 213	Transcriptional regulation, ZNF genes are regulated via GATA4 that control cardiac development
miR-617	1000 X	NTRK3	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	Regulates cardiac myocyte proliferation during early heart development
miR-647	1000 X	CZORF86	WD repeat-containing and planar cell polarity effector protein fritz homolog	Regulation of embryonic cell shape and protein localization
miR-220b	100 X	GGT3	Gamma-glutamyltransferase 3	Transferase activity
miR-451	100 X	ABCB1	ATP-dependent efflux pump	Drug metabolism, including cardiac drugs
miR-10e	100 X	HOXA1	Homeobox A1	HOXA1 gene mutations are related with cardiac abnormalities
miR-518f*	100 X	CBX8	Chromobox homolog 8	Single-stranded RNA binding, ubiquitin-protein ligase activity, methylated histone residue binding
miR-518c*	100 x	TNK2	Tyrosine kinase, non-receptor, 2	Cellular transition from hyperplastic to hypertrophic growth
mir-1	2,5 X	Calmodulin, MEF2A, GATA4, Twf1, IGF-1	Calmodulin, myocyte enhancer factor 2A, GATA binding protein 4, twinfilin, actin-binding protein, insulin-like growth factor 1	Calmodulin : Calcium signaling mediator; MEF2 and GATA4: Cardiac transcription factors (myocyte enhancer factor regardin hypertrophy); Twf1: cytoskeleton-regulator; IGF-1: regulates cardiac growth, stimulates myocardial contractility
mir-133	2,5 X	Cdc42, Rho-A, Nelf-A/WHSC2	Cdc42, Rho-A, Nelf-A/WHSC2	Myofilaments and sarcomeric units assembly, cytoskeleton rearrangements during cardiac hypertrophy
mir-499	2,5 X	Egr1, Egr2 and Fos, Myh7, Acta1	early stress response genes, β-myosin heavy chain, skeletal muscle actin,	Transcriptional regulation; cardiac hypertrophy and cardiac dysfunction
mir-208	2,5 X	THRAP1	thyroid hormone receptor associated protein 1	Transcriptional regulation, regulator of cardiac hypertrophy
mir-454	2,5 X	RWD2	Ring finger and WD repeat domain 2, E3 ubiquitin protein ligase	Ubiquitin pathway

CONCLUSIONS

This study highlights that sarcomere transcripts and specific miRNAs could be responsible for the hypertrophic growth in cardiac myocytes inducing HCM pathological cardiac remodeling. It will be important to extend this study to a higher number of HCM and control healthy samples in order to truly evaluate the identified miRNA as HCM biomarkers. The establishment of a correlation of the clinical-genetic-transcriptional profile could have important implications for HCM clinical management and prognosis.