



Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**ESTUDO DE GENÉTICA MOLECULAR DE
CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA**

ARTIGO DE REVISÃO

MICAELA FERREIRA OLIVEIRA

Abril 2011

Coimbra

Índice

Resumo	pág. 2
Abstract	pág. 4
Introdução	pág. 6
Histopatologia	pág. 7
Fisiopatologia	pág. 8
Apresentação clínica	pág. 12
Estratificação do risco e prevenção de morte súbita	pág. 13
Diagnóstico	pág. 15
Tratamento	pág. 16
Abordagem prática do doente e testes genéticos	pág. 17
Aspectos genéticos	pág. 21
Relação genótipo/fenótipo	pág. 23
Materiais e Métodos	pág. 26
Resultados	pág. 30
Discussão/ Conclusão	pág. 36
Bibliografia	pág. 39

Resumo

A cardiomiopatia hipertrófica familiar é uma doença de hereditariedade autossómica dominante, com expressão variável, caracterizada por hipertrofia ventricular esquerda, com envolvimento predominante do septo interventricular, de etiopatogenia inexplicada. É a doença cardiovascular genética mais frequente com uma prevalência na população de 1:500. Em cerca de 55% dos casos há história familiar evidente, apresentando, no entanto, grande variedade inter e intra-familiar, variando entre formas benignas e malignas de elevado risco de insuficiência cardíaca e morte súbita.

O diagnóstico desta doença faz-se geralmente na infância e em adultos jovens. Os indivíduos afectados podem ser assintomáticos e o diagnóstico faz-se por achados num electrocardiograma e/ou num ecocardiograma de rotina. Quando existentes, os sintomas são muito variáveis e inespecíficos.

Apesar de até ao momento não haver cura para a cardiomiopatia hipertrófica familiar, existe a possibilidade de tratamento farmacológico e cirúrgico. Os fármacos são geralmente a abordagem de primeira linha. Pretende-se que haja melhoria dos sintomas e a redução das complicações.

Uma vez que se trata da doença cardiovascular genética mais frequente e que a mutação detectada pode influenciar o prognóstico, possibilitar uma melhor prevenção e, conseqüentemente, um melhor tratamento, é importante uma caracterização molecular pormenorizada.

Actualmente, conhecem-se 32 genes cujas mutações são responsáveis por esta patologia. Neste trabalho, através da recolha dos resultados dos estudos genéticos de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica referenciadas da consulta de Genética Médica do Hospital Pediátrico de Coimbra, foi calculada a incidência das mutações associadas a esta patologia.

Em semelhança a estudos já publicados, concluiu-se que os genes com maior frequência de detecção de mutações são o MYBPC3, MYH7 e TNNT2.

Palavras-chave

Cardiomiopatia Hipertrófica Familiar; MYBPC3; MYH7; TNNT2; mutações; polimorfismo;

Abstract

The hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a disease of autosomal dominant inheritance, with inconsistent expression, characterised by left ventricular hypertrophy, with the predominant involvement of the interventricular septum, and of unexplained etiopathogeny. It is also the most common genetic cardiovascular disease with a prevalence of about 1:500 in the population. In 55% of cases there is a known family history, showing however *inter* and *intra-family* significant differences ranging from benign and malignant forms with high risk of heart failure and sudden death.

The diagnosis of this disease is usually done in children and young adults. Affected individuals may be asymptomatic and the diagnosis is made by either electrocardiogram and / or by routine echocardiogram findings. When present, the symptoms are very changeable and nonspecific.

Although to date there is no cure for familial hypertrophic cardiomyopathy, there is the possibility of pharmacological treatment and surgery. The drugs are usually the first-line approach. The aim of this work is to improve the symptoms and reduce the complications.

Since this is the most common genetic cardiovascular disease and taking into consideration that detected mutation may influence the prognosis, to allow better prevention and therefore a better treatment, it is important to obtain a detailed molecular characterization.

Nowadays it is known that there are at least 32 genes whose mutations are responsible for this pathology.

In the present study, the incidence of mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy was calculated from the data of the genetic studies developed in the patients referenced by the Genetic consultation of the Paediatric Hospital of Coimbra.

The results of this study had shown that the most frequent mutated genes were the MYBPC3, MYH7 and TNNT2, in accordance with published studies.

Keywords

Familial Hypertrophic Cardiomyopathy; MYBPC3; MYH7; TNNT2; mutations; polymorphism

Introdução

O termo cardiomiopatia foi usado pela primeira vez em 1957 e, desde então, o conhecimento acerca deste grupo de doenças cardíacas complexas tem aumentado significativamente. Actualmente, a American Heart Association usa a definição proposta em 2006: “cardiomiopatias fazem parte de um grupo heterogéneo de doenças do miocárdio em que se verifica disfunção mecânica e/ou eléctrica que usualmente (mas não invariavelmente) se manifestam por hipertrofia ou dilatação ventricular e que é, frequentemente, devida a causas genéticas (Alves *et al*, 2010).

Nos últimos vinte anos, vários estudos sobre fisiopatologia, genética, história natural, causas e factores de risco de morte da Cardiomiopatia Hipertrófica (CMH) levaram a uma melhor compreensão da doença pela comunidade médica o que se tem traduzido por um número crescente de pacientes diagnosticados com CMH (Hagège, Desnos, 2009).

A CMH, caracterizada por hipertrofia ventricular esquerda, é uma doença autossómica dominante e de etiopatogenia desconhecida. É a doença genética cardiovascular mais frequente (Ho, Seidman, 2006) com uma prevalência de cerca de 1:500 (Charron *et al*, 2004). Para além dos factores genéticos, também os ambientais, entre outros, parecem ter um papel determinante na expressão, gravidade e curso da doença. Esta patologia tem uma grande variabilidade inter e intra-familiar, podendo variar entre formas de apresentação benigna e maligna (Maron, 2002; Gonçalves, 2003).

Histopatologia

O ventrículo é, em cerca de 75%, formado por células musculares estriadas, os miócitos. Cada miócito tem um comprimento que pode variar entre 60 a 140 µm e um diâmetro de 17 a 25 µm (Fauci *et al*, 2009).

A CMH caracteriza-se histopatologicamente por hipertrofia, desorganização dos miócitos e fibrose intersticial (fig. 1) (Monteiro *et al*, 2007, Ho, 2009).

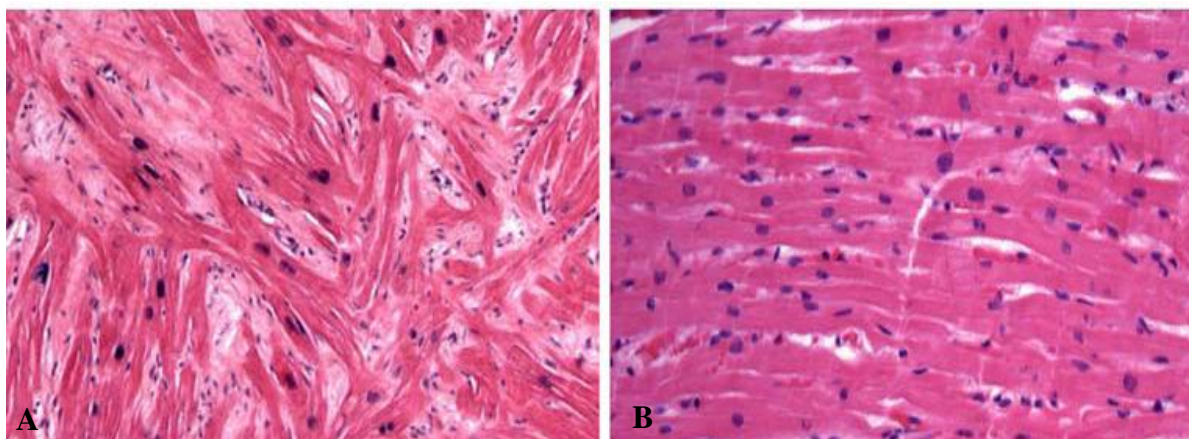


Fig. 1 – Achados macro e microscópicos de miocárdio de doentes com CMH (A) em comparação com pessoas normais (B). Amostras, com ampliação de 100x, coradas com H&E: demonstram desordem dos miócitos e fibrose (A), em contraste com o miocárdio normal, ordenado e sem áreas de fibrose (B) (adaptado de Ho, 2009).

Em pacientes com CMH são encontradas diferentes morfologias ventriculares, podendo a hipertrofia ventricular ser focal ou difusa, assimétrica ou concêntrica, obstrutiva ou não obstrutiva (Xu *et al*, 2010).

Fisiopatologia

A CMH foi definida como uma doença do sarcómero (Chiu *et al*, 2010).

O sarcómero é a unidade estrutural e funcional da contracção, encontra-se entre duas linhas escuras adjacentes, linhas Z. A distância entre as linhas Z varia com o grau de contracção, variando entre 1,6 a 2,2 μm . Dentro dos limites do sarcómero encontram-se alternadas as bandas claras e escuras, o que dá às fibras do miocárdio o aspecto estriado. No centro do sarcómero há uma banda escura, de comprimento constante de 1,5 μm , a banda A. De cada lado desta banda, há uma banda clara, banda I, cujo comprimento é variável. O sarcómero é formado por dois conjuntos de miofilamentos entrelaçados. Os filamentos mais grossos, compostos principalmente pela proteína miosina, atravessam a banda A. Estes filamentos têm cerca de 10 nm de diâmetro e as suas extremidades são afuniladas. Os filamentos mais finos, compostos principalmente por actina, partem da linha Z atravessando a banda I para a banda A. Têm aproximadamente 5nm de diâmetro e 1 μm de comprimento. Assim, os filamentos finos e grossos sobrepõem-se apenas dentro da banda A, ao contrário da banda I que contém apenas filamentos finos. Com microscopia electrónica, podem ser observadas pontes estendendo-se entre filamentos grossos e finos dentro da banda A. Estas pontes compreendem cabeças de miosina ligadas a filamentos de actina (Fauci *et al*, 2009).

O disco-Z do sarcómero é uma região crítica, visto que representa a interface entre o aparelho contráctil e o citoesqueleto (Frank *et al*, 2006). A alfa-actina-2 (ACTN2) é a componente principal do disco-Z e tem uma importância biológica fundamental na organização e interacção entre o citoesqueleto do sarcómero e da membrana muscular (fig. 2) (Sjoblom *et al*, 2008, Rodríguez *et al*, 2009).

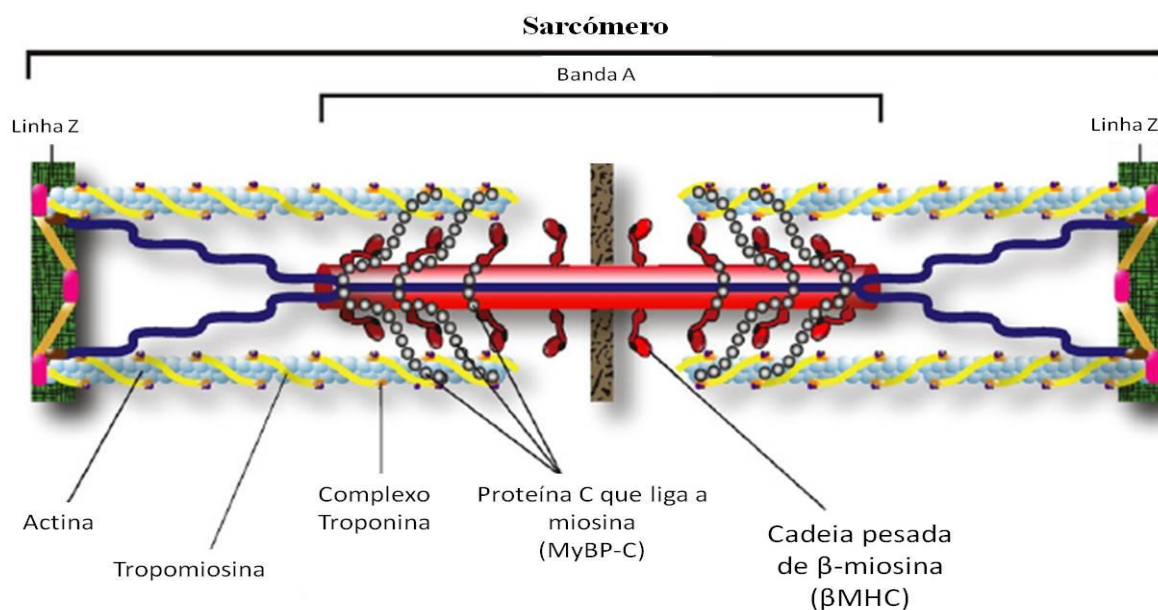


Fig. 2 – Esquema representativo das proteínas do sarcômero do miocárdio. As proteínas mais comumente mutadas na CMH são MyBP-C, β-MHC, e troponina T (adaptado de Rodríguez *et al*, 2009).

O sarcômero apresenta uma estrutura complexa, com múltiplos locais de interação com as proteínas constituintes. Têm sido avançados inúmeros mecanismos, nomeadamente ao nível do processo da contração muscular. Depois da despolarização o cálcio intracelular liga-se ao complexo da troponina permitindo que a cabeça da miosina se ligue à actina e, após hidrólise do ATP, seja deslocada ao longo do filamento fino. Os filamentos finos e espessos deslizam entre si, conduzindo ao encurtamento do sarcômero e consequentemente contração muscular (Monteiro *et al*, 2007).

O papel da proteína C que liga a miosina permanece pouco claro, mas presume-se que pode participar na constituição do filamento espesso pela ligação à cadeia pesada de miosina e troponina, podendo apresentar ainda alguma função reguladora (Flashman *et al*, 2004).

Existem estudos em modelos animais que evidenciaram que o aumento da contractilidade dos miócitos se deve à elevação da actividade da ATPase na miosina e ao aumento da interacção actina-miosina. A consequência deste ganho de função traduz-se em aumento do trabalho e do consumo de energia, que pode favorecer a depleção de energia, morte de miócitos e substituição por fibrose (Monteiro *et al*, 2007).

Por outro lado, existem também estudos em modelos animais que verificaram que a hipocontractilidade advém de uma redução da sensibilidade ao cálcio, que, conseqüentemente, conduz a uma menor interacção actina-miosina (Crisley *et al*, 2003). A hipocontractilidade leva à produção de cinases sinalizadoras de stress e de factores tróficos, que estimulam a hipertrofia dos miócitos. Esta cronologia é suportada pelo facto do compromisso funcional (anomalia diastólica) preceder o desenvolvimento de hipertrofia (Nagueh *et al*, 2004).

Em 2005, num estudo realizado com o género *Drosophila*, foi descrito que a superexpressão do mutante humano cMyBP-C na *Drosophila* está associada a sub-regulação de vários genes codificadores de proteínas do sarcómero e a alteração na expressão dos genes envolvidos em múltiplas vias metabólicas, compatíveis com a hipótese da depleção de energia (Vu Manh *et al*, 2005).

O mecanismo pelo qual uma mutação leva a um fenótipo específico, as vias de sinalização activadas, o papel da genética e dos factores ambientais que influenciam o fenótipo permanecem por esclarecer. Nas últimas duas décadas, vários estudos têm demonstrado que a CMH e a cardiomiopatia dilatada (CMD) resultam sobretudo de alterações genéticas nos genes que codificam proteínas do sarcómero e do disco-Z, mas também de alterações que

envolvem proteínas do citoesqueleto, do retículo sarcoplasmático, da membrana nuclear e de processos metabólicos e de transcrição alterados (Alves *et al*, 2010) (tabela I).

Tabela I – Proteínas afectadas na CMH e gene correspondente (adaptado de Bos *et al*, 2009)

CMH	Proteína	Gene
Miofilamentos	Proteína C que liga a miosina	MYBPC3
	Cadeia pesada de miosina – isoforma β	MYH7
	Cadeia pesada de miosina – isoforma α	MYH6
	Troponina Cardíaca T	TNNT2
	Troponina Cardíaca I	TNNI3
	Tropomiosina α	TPM1
	Cadeia leve reguladora da miosina ventricular	MYL2
	Cadeia leve essencial da miosina ventricular	MYL3
	Troponina C	TNNC1
	α - actina	ACTC
	Tinina	TTN
Disco Z	Proteína LIM que liga domínio 3	LBD3
	Proteína LIM muscular	CSRP3
	Teletonina	TCAP
	Vinculina/ Metacinculina	VCL
	α - actina 2	ACTN2
	Miozenina 2	MYOZ2
Concentração Ca^{2+}	<i>Junctophilin 2</i>	JPH2
	<i>Phospholamban</i>	PLN

Particularmente no gene MYBPC3, as mutações nulas (*frame-shift* e *nonsense*), tem sugerido um mecanismo de haplo insuficiência, pela produção de uma cópia instável e/ou de uma proteína alterada incapaz de incorporar o sarcómero (Richard *et al*, 2006).

No gene MYH7, a maioria das mutações heterozigóticas é *missense*, verificando-se a substituição de um aminoácido por outro, o que origina uma proteína mutada. Esta proteína alterada interfere com a função normal, tendo efeito dominante negativo (Christiaans *et al*, 2010), e, quando incorporada no sarcómero, pode interferir com a proteína nativa, actuando como um polipeptídeo tóxico (Olsson *et al*, 2004). Esta incorporação conduz a um prejuízo de função e/ou montagem anormal do sarcómero levando a uma desorganização miofibrilar (Monteiro *et al*, 2007).

Apesar das teorias propostas e das alterações observadas nos modelos animais a fisiopatologia da MCH ainda não está totalmente esclarecida.

Apresentação Clínica

A CMH é provavelmente a doença cardíaca mais heterogénea no que respeita ao fenótipo, sintomas e consequências (Efthimiadis *et al*, 2010).

Clinicamente pode variar desde formas totalmente assintomáticas até manifestações cardiovasculares graves, tais como insuficiência cardíaca, síncope e morte súbita (Ramaraj, 2008).

Aproximadamente 50% dos indivíduos diagnosticados com CMH são assintomáticos. Dos indivíduos assintomáticos, 25% são diagnosticados incidentalmente e outros 25% são diagnosticados na sequência da realização de testes familiares onde um parente já tinha sido diagnosticado com CMH (Wordsworth *et al*, 2010).

Nos pacientes sintomáticos, a queixa mais frequente (90%) é a dispneia de esforço (Wigle *et al*, 1995). Cerca de 25 a 30% referem pré-cordialgia (Elliott *et al*, 1996), 15 a 25% sofreram pelo menos um episódio de síncope e 20% referem quadro de pré-síncope (Cotiga *et al*, 2006). Podem ocorrer arritmias e culminar com morte súbita (Medeiro *et al*, 2006). O risco de morte súbita é, anualmente, de cerca de 1%, mas aumenta para cerca de 5% se existirem factores de risco (Christiaans *et al*, 2010). O estilo de vida, fármacos anti-arrítmicos e o cardiodesfibrilhador implantável (CDI) são opções para a redução deste risco (Wordsworth *et al*, 2010).

Estudos têm mostrado que as três principais causas de morte em pacientes com CMH são: morte súbita cardíaca devido a arritmias ventriculares, insuficiência cardíaca, muitas vezes precedida de fibrilhação auricular, e AVC (Hagège, Desnos, 2009).

Estratificação do risco e prevenção de morte súbita

A morte súbita é a complicação mais temida da CMH podendo ser a única manifestação da doença em indivíduos assintomáticos (Monteiro *et al*, 2007). Em 75% dos casos ocorre em indivíduos assintomáticos ou em indivíduos classificados segundo a New York Heart

Associação (NYHA) em classe NYHA I ou II, em 15% durante a prática de exercício físico e, às vezes, até mesmo durante o repouso (Hagège, Desnos, 2009).

O progresso da CMH está acelerado durante a puberdade e o risco de morte súbita atinge o máximo entre os 9 e os 16 anos (Östman-Smith *et al*, 2008). Contudo é importante salientar que apenas uma pequena percentagem dos doentes com CMH têm um risco elevado de morte súbita (Monteiro *et al*, 2007).

Assim, é crucial a identificação dos indivíduos com um elevado risco de morte súbita, uma vez que basta modificações no estilo de vida (Bratt *et al*, 2010) e medicação com fármacos antiarrítmicos (Wordsworth *et al*, 2010) para diminuir este risco e a implantação do CDI para prevenir a sua ocorrência (Monteiro *et al*, 2007).

Na definição do perfil de risco são considerados factores *major* e factores de avaliação individual (tabela II).

O valor preditivo positivo atribuído individualmente a cada um dos factores de risco é baixo, mas na presença de dois ou mais factores o risco de morte súbita está calculado entre 3 a 5% (Elliott *et al*, 2000). Neste sentido, apesar da implantação do CDI ser a terapêutica mais eficaz e segura para a prevenção da morte súbita, a selecção de doentes com apenas um factor de risco é ainda controversa (Monteiro *et al*, 2007).

Tabela II – Factores de risco de morte súbita em doentes com CMH (adaptado de Monteiro *et al*, 2007)

Critério Major	Crítérios de Avaliação Individual
<ul style="list-style-type: none"> • Paragem cardíaca (fibrilhação ventricular) • Taquicardia Ventricular mantida espontânea • Hipertrofia ventricular esquerda $\geq 30\text{mm}$ relacionada com CMH • Síncope de etiologia desconhecida • História Familiar de morte súbita prematura • Resposta anormal da tensão arterial durante o esforço • Taquicardia ventricular não mantida (Holter – pelo menos 3 batimentos, com frequência $\geq 120\text{bpm}$) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrilhação auricular • Isquémia miocárdica • Obstrução da câmara de saída do ventrículo esquerdo • Mutação de alto risco • Exercício físico intenso (competição)

Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se na presença de hipertrofia ventricular esquerda, na ausência dilatação ventricular e de outra causa cardíaca e/ou sistémica (Christiaans *et al*, 2010). Uma espessura $\geq 12\text{mm}$ na parede septal anterior ou ventricular posterior e $\geq 15\text{mm}$ na região posterior do septo ou na parede ventricular livre é critério de diagnóstico (Maron *et al*, 2003).

O diagnóstico pode também ser feito através do estudo histológico de tecido cardíaco em que estejam presentes as alterações histológicas patognomónicas desta patologia (Cirino, Ho, 2009).

Numa família com CMH, com mutação(ões) conhecida(s) é possível realizar biópsia das vilosidades coriônicas a partir das 12 semanas de gestação e a amniocentese realizada entre as 15 as 18 semanas permitem o diagnóstico pré-natal de CMH (Cirino, Ho, 2009).

O desenvolvimento da biologia molecular e os estudos genéticos actualmente efectuados permitem um diagnóstico cada vez mais precoce.

Tratamento

No que concerne ao tratamento desta patologia, é consensual que o tratamento de primeira linha é farmacológico.

O tratamento médico é sintomático e assenta em β -bloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e de sódio (Alves *et al*, 2010), fármacos anti-arrítmicos e diuréticos (Cirino, Ho, 2009).

Altas doses de β -bloqueadores têm evidenciado uma redução da mortalidade de crianças com CMH (Bratt *et al*, 2010). Se fibrilhação auricular, o risco trombótico aumenta e a anticoagulação torna-se fundamental, sendo também importante a prevenção de morte com CDI (Cirino, Ho, 2009).

Quando os sintomas são refractários à terapêutica médica adequadamente instituída, pode optar-se por Ablação Alcoólica do Septo e miectomia. Em alguns casos é mesmo necessário recorrer a transplante cardíaco (Cirino, Ho, 2009).

É de ter especial atenção e, conseqüentemente, implementar um tratamento rigoroso e cuidado, nas mulheres grávidas com CMH, dadas as alterações hemodinâmicas associadas a este estado e ao próprio momento do parto.

Pacientes em que a componente obstrutiva está presente o risco de endocardite infecciosa aumenta, sendo, por isso, necessário considerar individualmente o recurso a profilaxia antibiótica (Wilson *et al*, 2007).

Estudos em animais transgênicos mostraram que a utilização de antagonistas dos receptores da angiotensina (Yamazaki *et al*, 2007) e de estatinas (Senthil *et al*, 2005) era eficaz na prevenção da hipertrofia ventricular esquerda.

No futuro, poderá a terapia génica ser a cura para a CMH.

Abordagem prática do doente e testes genéticos

Depois de um indivíduo ser diagnosticado com CMH é importante que este seja seguido e avaliado regularmente, aconselhando-se que seja seguido por um cardiologista e que realize regularmente electrocardiograma e ecocardiograma (Maron *et al*, 2003).

É de notar que este acompanhamento não pode ser estático, visto que esta avaliação apenas permite avaliar o estado clínico actual. Assim, salienta-se a importância de um acompanhamento iniciado na infância e contínuo até durante a vida adulta. Este acompanhamento, apesar de se estimar que realmente só seja necessário para 50% dos indivíduos, acarreta um importante impacto financeiro e emocional para o indivíduo e a sua família. Para contornar esta questão, os testes genéticos são, actualmente, o único meio disponível para determinar exactamente os indivíduos afectados e que, portanto, necessitam acompanhamento e vigilância médica (Fitzgerald-Butt *et al*, 2010).

Por outro lado, como a CMH também pode ser causada por erros inatos do metabolismo, por síndromes de malformação e doenças neuromusculares, uma criança e os seus familiares beneficiam dos testes genéticos, visto que se exclui um risco múltiplo de doença e se explica a CMH do paciente (Fitzgerald-Butt *et al*, 2010).

A Sociedade Europeia de Cardiologia e a American Heart Association recomendam a triagem familiar em famílias identificadas com CMH (Corrado *et al*, 2005). Numa família com diagnóstico clínico ou imagiológico de CMH é importante proceder ao estudo molecular do indivíduo, aconselhamento genético e avaliação dos familiares em primeiro grau (progenitores, irmãos e descendentes). Existem vários protocolos de avaliação dos indivíduos em risco (tabela III) (Venâncio, informação pessoal).

Se do estudo molecular resultar informação aplicável ao estudo familiar, dever-se-á continuar com a avaliação clínica seriada. Se o estudo for negativo são desnecessárias avaliações clínicas subsequentes (van Langen *et al*, 2004).

Tabela III - Protocolos de avaliação dos indivíduos em risco

Familiares em 1º grau (descendentes, progenitores e irmãos)	<u>Rastreio</u> - Exame físico, ecocardiografia e eletrocardiograma
<12 anos	- Achados clínicos evidentes de doença - Rastreio pode ser opcional, excepto se história familiar grave ou quando o indivíduo pratica desporto de competição ou tem hipertrofia ventricular esquerda de início precoce <u>Ponderar rastreio a cada 5 anos</u>
Entre 12 a 22 anos	<u>Rastreio a 12 a 24 meses</u>
≥ 23 anos de idade	<u>Repetir a cada 5 anos</u> ou até quando o estudo molecular confirmar o diagnóstico.

A utilização dos teste genéticos permite identificar os membros da família com mutação(ões) e que, conseqüentemente, virão a desenvolver doença, apesar de poderem ainda não apresentar sinais e/ou sintomas. Define-se, assim, um conjunto de indivíduos num estado “pré-clínico” (fig. 3).

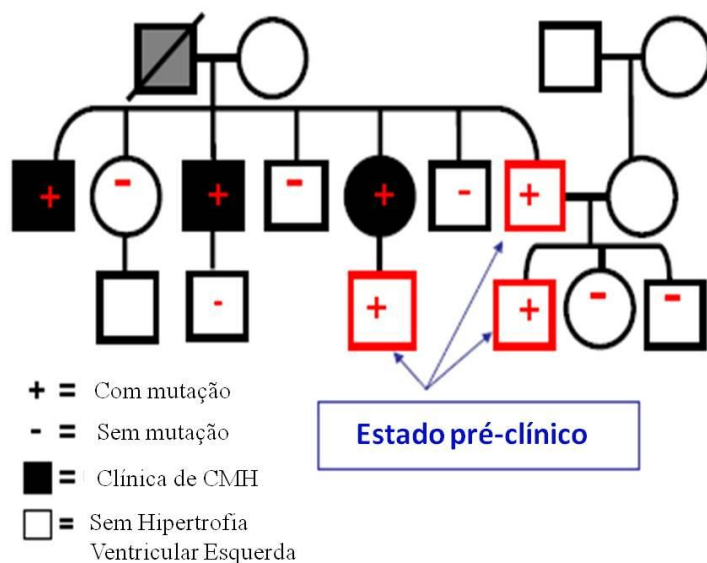


Fig. 3 – Estado “pré-clínico”. Os testes genéticos, no contexto da doença familiar, permitem a identificação de indivíduos com CMH ainda no estado pré-clínico. Estes indivíduos são parentes que são portadores da mutação responsável por causar HCM na família, mas ainda não desenvolveu as características clínicas de diagnóstico da CMH (adaptado de Ho, 2009).

O estudo deste grupo de pessoas pode permitir entender melhor a fisiopatologia da CMH, caracterizar melhor a componente bioquímica desta patologia, bem como caracterizar os fenótipos intermediários que antecedem manifestações clínicas e identificar parâmetros de resposta ao tratamento para futuros ensaios, com vista a atenuar e, idealmente, evitar o desenvolvimento da CMH (Ho, 2009).

Os testes genéticos constituem um dilema ético. O teste genético é uma questão familiar. Não só os testes genéticos para um indivíduo, muitas vezes, inevitavelmente revelam os riscos para os membros da família, como também os membros da família, por vezes, têm de contribuir para o diagnóstico genético de um indivíduo (Geelen *et al*, 2010).

No contexto médico, assume-se que não só os pacientes têm o direito de saber, mas que também os seus familiares têm o direito de conhecer o risco familiar. Essas informações

podem permitir antecipar futuros problemas de saúde e preveni-las. Alguns pacientes, no entanto, alegam que estas informações têm de ser privadas (Geelen *et al*, 2010).

Com o objectivo de descobrir como lidar com a genética no contexto da família, a Sociedade Americana de Genética Humana, por exemplo, explorou "o potencial de conflitos no relacionamento profissional-paciente se o paciente se recusa a avisar os parentes em situação de risco"(Declaração ASHG, 1998, p. 474). De acordo com esta declaração, os profissionais só são autorizados a contactar directamente com os familiares e prestar-lhes informações do paciente em casos excepcionais, particularmente se há disponíveis medidas terapêuticas e/ou preventivas perante a mutação identificada. Este dilema ético tem sido um tema de discussão na última década (Geelen *et al*, 2010).

Uma boa comunicação médico-doente e a tónica constante na perspectiva bio-psico-social do doente é uma boa solução para dilemas éticos, no que respeita, em particular, à informação genética e a sua importância.

Aspectos genéticos

A CMH é uma doença com grande heterogeneidade genética, conhecendo-se actualmente 32 genes envolvidos nesta patologia (Santos *et al*, 2011).

Estudos genéticos têm mostrado que esta patologia é causada por mais de 600 mutações, especialmente em genes que codificam proteínas sarcoméricas (Santos *et al*, 2011).

É de salientar que estes dados estão em constante actualização na base de dados genética: *Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Mutation Database*.

A densidade anormalmente elevada de mutações encontradas no genes associados ao desenvolvimento de CMH sugere que os mecanismos de promoção de mutabilidade podem ter um papel importante na prevalência desta doença. Um dos mecanismos mais conhecidos é a desaminação da citosina metilada num dinucleotídeo CpG e a posterior transição para uma timina, resultando a alteração em C> T ou G> A (Krawczak *et al*, 1998).

Cerca de 49% das mutações associadas a CMH são consistentes com um mecanismo de desaminação (Meurs, Kuan, 2010).

Embora este mecanismo seja bem conhecido, ele não pode ocorrer com muita frequência, visto que a presença de CpGs em toda a região codificadora de um gene é geralmente baixa (Cooper, Krawczak, 1999). No entanto, a informação acerca da variabilidade dos níveis de metilação dentro das regiões codificantes de genes específicos é ainda escassa (Issa, 2002).

As mutações são mais frequentemente encontradas nos genes MYBPC3, MYH7 e o TNNT2 (Maron, 2002) (tabela IV).

A penetrância incompleta do gene MYBPC3 leva a uma subvalorização da sua associação com a CMH, sendo, ainda assim, o gene mais frequentemente responsável por esta patologia (Ho, Seidman, 2006).

A maior parte das mutações descritas foram identificadas nos seguintes genes: dois genes codificadores de proteínas *assembly*: proteína C que liga a miosina (MYBPC3) e titina (TTN); quatro genes codificadores das proteínas do filamento grosso - isoformas beta e alfa da cadeia

pesada da miosina (MYH7- β e MYH6- α), cadeias leves (reguladora e essencial) da miosina ventricular (MYL2 e MYL3); cinco genes codificadores da estrutura de filamentos finos: troponina T cardíaca (TNNT2), troponina I cardíaca (TNNI3), α -actina (ACTC), α -tropomiosina (TPM1), troponina C (TNNC1); dois genes codificadores das proteínas da banda Z: teletonina (TCAP) e proteína LIM muscular (CRP3). Foram também encontradas mutações raras, em genes que codificam proteínas associadas como a vinculina e a metavinculina (Monteiro *et al*, 2007).

Tabela IV - Genes associados a CMH (adaptado de Wheeler *et al*, 2009)

Gene	Prevalência
MYBPC3	15 - 45%
MYH7	15 - 45%
TNNT2	5 - 7%
TNNI3	5%
TPM1	2,5 - 5%
MYL2	2%
MYL3	1%
ACTC	1%
TCAP	< 1%
CSR3	< 1%
LBD3	< 1%

Relação genótipo/fenótipo

Apesar do amplo espectro de manifestações clínicas e das várias mutações associadas à CMH, é possível estabelecer alguma relação entre certas mutações e a clínica.

As mutações podem ser classificadas em benignas/leves e malignas/moderadas. As primeiras estão associadas a pacientes com ou sem história familiar, sintomas leves (classificação I de New York Heart Association – NYHA I), e sem ocorrência de morte súbita ou outros acontecimentos cardíacos graves. As mutações malignas estão associadas a um diagnóstico em idade mais precoce, em pacientes com sintomas moderados a graves (NYHA III – IV) e que podem sofrer um episódio de morte súbita. Em alguns casos, as mutações não podem ser classificadas num único grupo e foram classificadas como indeterminadas (Xu *et al*, 2010).

A maioria dos pacientes com HCM têm uma mutação heterozigótica, mas em 3 a 5% dos casos, os pacientes têm duas mutações no mesmo gene: em ambas as cópias do gene (homozigoto) ou em genes diferentes (digénica). Estas últimas alterações estão, geralmente, associadas a um fenótipo mais grave, com uma idade de início mais precoce (muitas vezes antes dos 10 anos) e a morte súbita (Christiaans *et al*, 2010).

Apesar de mutações no gene MYBPC3 estarem geralmente associadas a casos mais ligeiros, podem também ocorrer fenótipos mais graves (Niimura *et al*, 2002; Ho, Seidman, 2006). Pacientes com mutações neste gene, podem apresentar exame físico normal, mas alterações no ECG (alterações na repolarização), no ecocardiograma (hipertrofia do septo, com uma espessura máxima de 24 mm, sem obstrução sub-aórtica, fracção de ejeção do ventrículo esquerdo de cerca de 50%, sem dilatação ventricular e com disfunção diastólica grave) e no Holter (períodos de taquicardia ventricular não mantida) (Ortiz *et al*, 2009)

Estudos revelam que o gene MYH7 está geralmente associado a fenótipos mais exuberantes (hipertrofia ventricular esquerda e severidade marcadas, penetrância completa e diagnóstico feito em idades mais jovens) (Ho, Seidman, 2006); o gene TNNT2 associado a uma menor

hipertrofia, maior desorganização miocitária (Varnara *et al*, 2001) e um maior risco de morte súbita (Gandjbakhch *et al*, 2010).

Geralmente, pacientes com mutação genética conhecida associada a CMH têm uma hipertrofia ventricular mais grave e sintomas em idade mais jovem quando comparados com pacientes sem causa genética identificada (Van Driest *et al*, 2005).

Estudos revelaram que famílias com mais de uma mutação apresentam um início precoce de sintomas, disfunção cardíaca mais marcada e uma maior incidência de eventos de morte súbita (Xu *et al*, 2010).

Estudos sobre a relação genótipo-fenótipo revelaram que, numa família com uma mutação conhecida, nem todos os portadores da mutação têm o mesmo fenótipo. Isto sugere a existência de genes modificadores (genes que afectam a expressão de outro gene), que modulam a expressão fenotípica da doença e com penetrância incompleta (Christiaans *et al*, 2010).

Mutações de novo e mosaicismo de linhagem germinativa são raras na CMH (Christiaans *et al*, 2010).

Material e Métodos

No presente estudo foram incluídos os indivíduos referenciados da consulta de genética médica do Hospital Pediátrico de Coimbra e que foram estudados no Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias do Centro de Neurociências (CNC) de Coimbra.

Foram estudados 50 indivíduos, 22 dos quais com estudos familiares associados.

A classificação clínica utilizada determinou a ordem dos genes estudados, em que os casos foram divididos em três grupos (tabela V). Os indivíduos com quadro de apresentação grave em idade adulta ou infantil foram incluídos no grupo I, iniciando-se o estudo pelo gene MYH7. Indivíduos com apresentação da doença em idades mais avançadas foram incluídos no grupo II sendo o seu estudo iniciado pelo gene MYBPC3. No grupo III foram incluídos indivíduos com história familiar de morte súbita associada a CMH e o gene estudado em primeiro lugar é o TNNT2.

Assim, a pesquisa de mutações nos casos índice começa pelos genes mais frequentes, de acordo com o grupo em que se incluem (tabela V). Sequencia-se inicialmente os exões onde estão descritas as mutações mais comuns no gene MYH7 (grupo I) ou MYBPC3 (grupo II), e, caso não seja encontrada alteração, sequenciam-se então os exões do gene MYBPC3 ou MYH7, respectivamente, e, posteriormente do gene TNNT2, TNNI3 e o MYL2.

Tabela V – Classificação clínica dos indivíduos estudados.

Grupo	Características do grupo	Primeiro Gene estudado
I	Adultos e crianças com quadro de CMH grave	MYH7
II	Adultos com quadro de CMH	MYBPC3
III	Morte Súbita em familiares	TNNT2

O estudo molecular de cada indivíduo é feito a partir de DNA extraído de sangue periférico, colhido em EDTA. Laboratorialmente foram aplicadas técnicas de biologia molecular, nomeadamente: extracção de DNA, reacção de PCR, eletroforese em gel de agarose, sequenciação e purificação.

Após a recepção das amostras de sangue, efectua-se a extracção de DNA (Kit JetQuick MidiPrep da Genomed), conforme as instruções do fabricante.

Após a extracção de DNA quantificam-se os ácidos nucleicos da amostra no NanoDrop® de espectro completo (220-750nm). Os ácidos nucleicos absorvem radiação ultravioleta entre os 220nm e os 320 nm, em que o pico de absorção máximo se encontra aos 260nm. A absorção de radiação ultravioleta pelos ácidos nucleicos é essencialmente devida às duplas ligações conjugadas dos anéis heterocíclicos das bases azotadas.

As amostras de DNA são posteriormente submetidas a reacção de PCR. Faz-se um *mix* com água, tampão, dNTPs, cloreto de magnésio, primer F e R para os exões em estudo e taq polimerase. A este *mix* adiciona-se o DNA de cada amostra. Faz-se um controlo negativo com substituição de DNA por água.

Para verificação dos produtos amplificados, faz-se uma electroforese em gel de agarose que separa fragmentos de DNA de acordo com o seu tamanho. O controlo negativo quando analisado em gel de agarose não deve apresentar qualquer banda, caso contrário as reacções de PCR correspondentes a esse procedimento ficam invalidadas.

A reacção de sequenciação é com o GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit, é baseada na incorporação de análogos de nucleótidos terminadores de cadeia (ddNTPs) pela polimerase de DNA, cada um deles marcado com um fluorocromo diferente. Durante a reacção de sequenciação, os ddNTPs marcados são incorporados sequencialmente na extremidade 3' de uma cadeia de DNA nascente, em que a elongação desta é terminada selectivamente em A, T, C ou G, porque os ddNTPs não têm extremidade 3'-OH. Cada reacção de sequenciação é feita num só tubo, para cada *primer* e produz uma série de moléculas de DNA de tamanho variável, cada uma terminando numa base diferente com fluorescência diferente. Cada amostra é colocada no termociclador e sujeita a 30 ciclos de 20 segundos a 96°C, 20 segundos a 50°C e 40 minutos a 60°C.

Os produtos resultantes da reacção de sequenciação devem ser armazenados a -20°C ou então imediatamente purificados.

A purificação das reacções de sequenciação faz-se por precipitação das reacções com etanol com a remoção dos sais residuais, dNTPs marcados com fluorocromos em excesso que não

foram incorporados e que ainda possam existir. Esta remoção dos sais e dos dNTPs marcados é fundamental pois podem interferir com os resultados das sequências principalmente numa fase inicial da leitura.

O resultado final da sequenciação apresenta-se de forma gráfica – cromatograma. Cada registo gráfico tem de ser cuidadosamente analisado e interpretado (fig. 4).

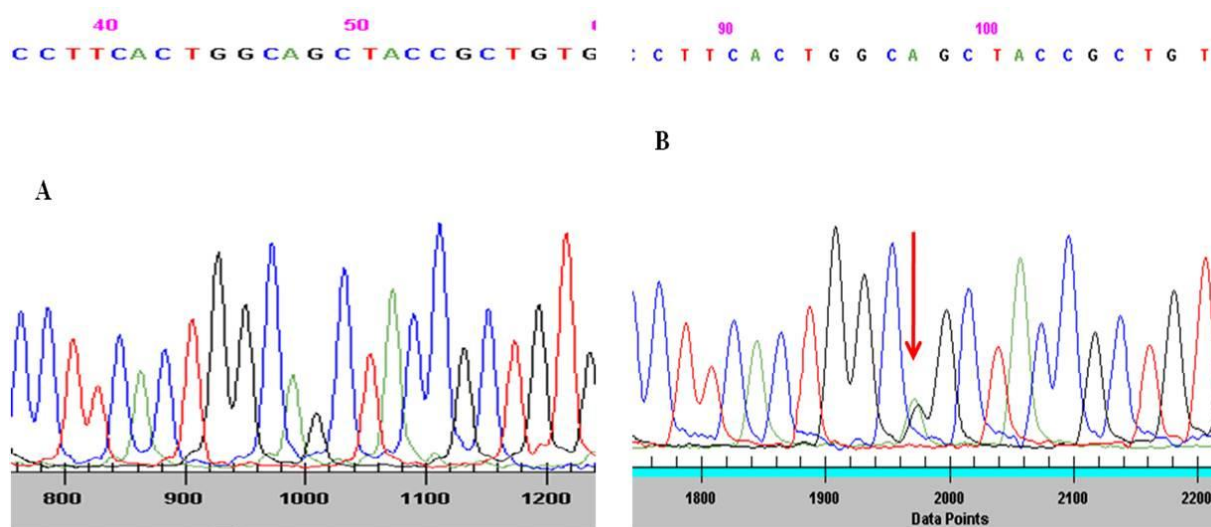


Fig. 4 – Cromatogramas (A) – registo de uma sequenciação sem alterações genéticas; (B) – registo de uma sequenciação, do exão 6, que resulta na substituição de serina por glicina na posição 236 da sequência do aminoácido da proteína.

Resultados

Dos 50 casos índice estudados, 40 (80%) apresentam alterações genéticas, havendo alguns com mais que uma alteração. Todos os casos são seguidos em consulta de genética e nos positivos foi feita a história familiar de modo a identificar os familiares de risco. Neste estudo já foram avaliadas 22 famílias.

Tabela VI – Total de alterações encontradas nos 50 casos índice.

Gene	Alteração	Mutação/ Polimorfismo	Casos	% gene	% total alterações
MYBPC3	E258K	Mutação	15	30,61%	19,23%
	L487L	Polimorfismo	4	8,16%	5,13%
	W890stop	Mutação	3	6,12%	3,85%
	E1096E	Polimorfismo	14	28,57%	17,95%
	S236G	Mutação	7	14,29%	8,97%
	R495Q	Mutação	4	8,16%	5,13%
	dela	Mutação	1	2,04%	1,28%
Ala562Thr	Alteração não descrita	1	2,04%	1,28%	
MYH7	F244F	Polimorfismo	4	19,05%	5,13%
	T63T	Polimorfismo	12	57,14%	15,38%
	K375F	Mutação	2	9,52%	2,56%
	A1701A	Polimorfismo	2	9,52%	2,56%
	G354G	Polimorfismo	1	4,76%	1,28%
TNNT2	I106I	Polimorfismo	5	83,33%	6,41%
	E173K	Mutação	1	16,67%	1,28%
TNNI3	K253R	Mutação	1	50%	1,28%
	R68R	Polimorfismo	1	50%	1,28%

Neste estudo foram encontradas mutações já descritas na literatura como patológicas da CMH (~46,2%), polimorfismos, alterações que não levam a alteração dos aminoácidos (~52,6%) e uma alteração genética ainda não descrita na literatura (~1,2%).

No geral dos 50 casos, conclui-se que os três genes mais frequentemente afectados são MYBPC3, MYH7 e TNNT2, com uma incidência de mutações de 66%, 26% e 12%, respectivamente, havendo casos com mutação em mais que um gene (gráfico 1).

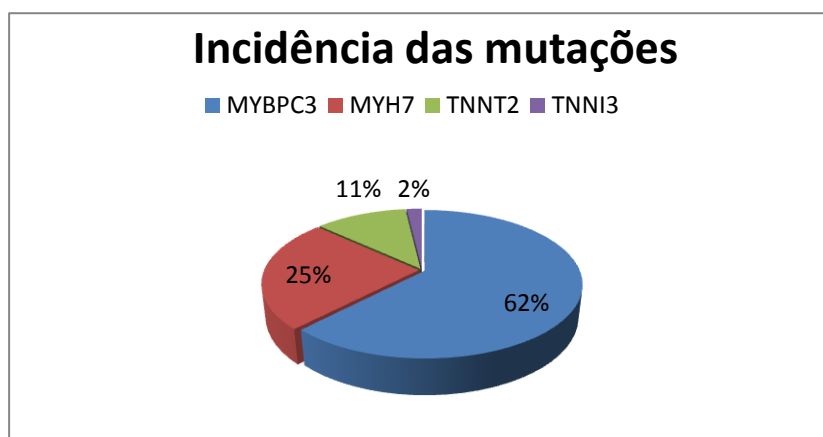


Gráfico 1 – Representação gráfica da incidência de mutações por genes no estudo realizado.

Para cada um destes genes foi ainda calculada e registada graficamente (gráficos 2, 3 e 4) a incidência de cada mutação encontrada nestes indivíduos.

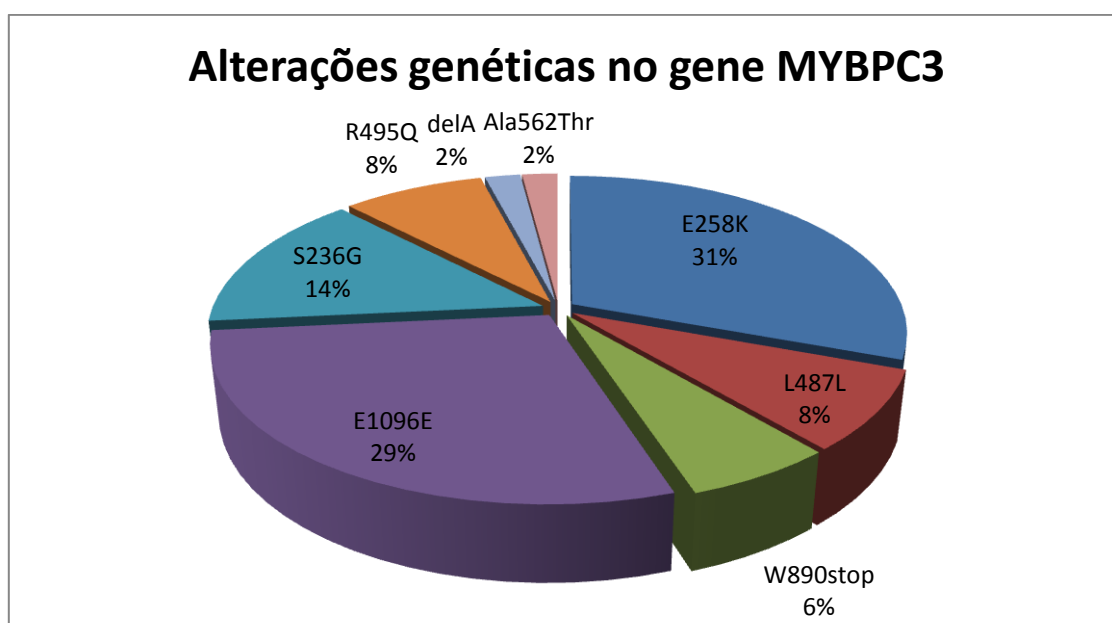


Gráfico 2 – Percentagem das alterações genéticas encontradas no gene MYBPC3

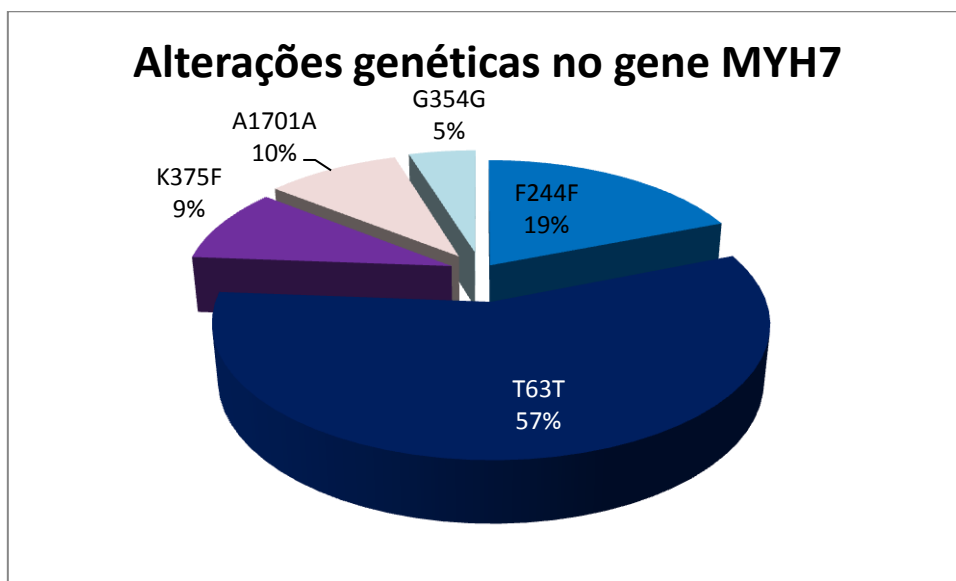


Gráfico 3 – Percentagem das alterações genéticas encontradas no gene MYH7

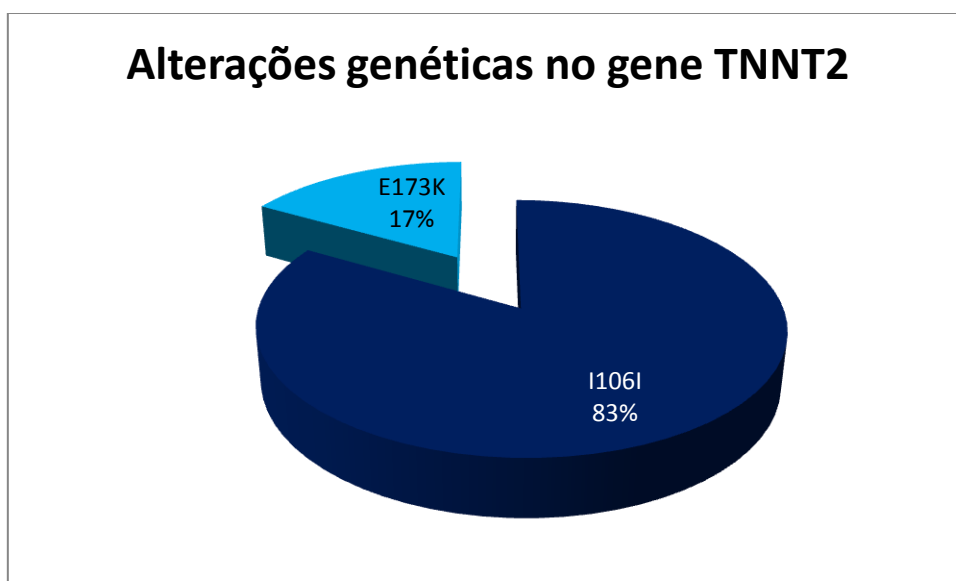


Gráfico 4 – Percentagem das alterações genéticas encontradas no gene TNNT2

No gráfico 5 está representada a incidência de cada uma das alterações genéticas no total das alterações encontradas.

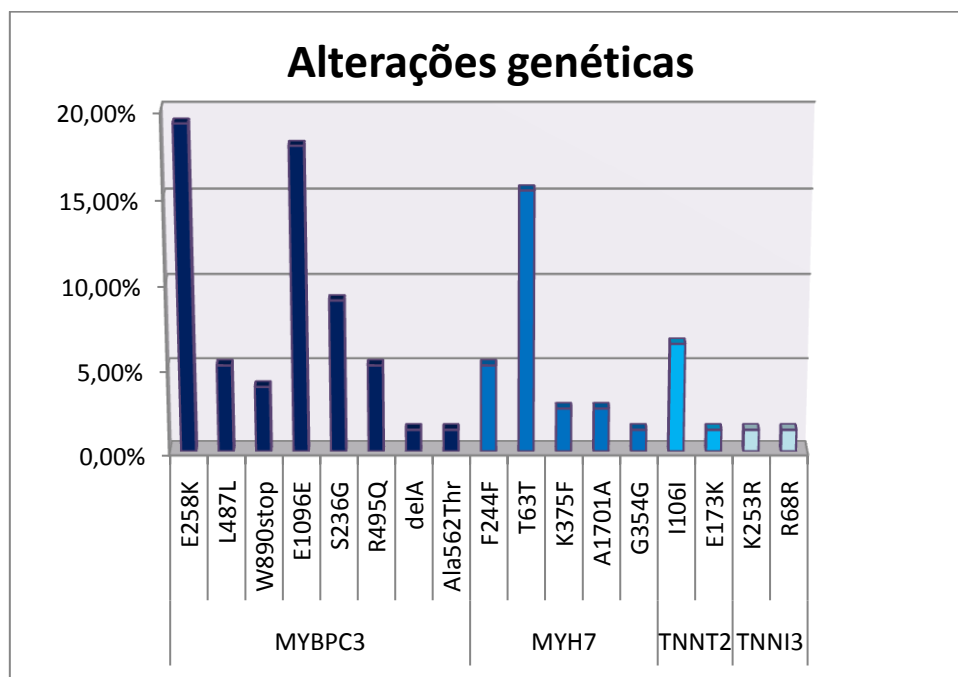


Gráfico 5 – Percentagem das alterações genéticas encontradas nos casos índice em todos os genes estudados.

O método de sequenciação é laborioso, demorado e dispendioso, dado que é necessário estudar separadamente cada exão de cada gene. Nos casos familiares apenas se estudam as mutações encontradas e confirmadas no caso índice. No que diz respeito à relação genótipo/fenótipo verifica-se a heterogeneidade característica desta patologia, variando desde indivíduos assintomáticos até casos graves de disfunção cardíaca.

A título exemplificativo da estratégia clínico-laboratorial seguida apresenta-se a seguinte situação (fig. 5).

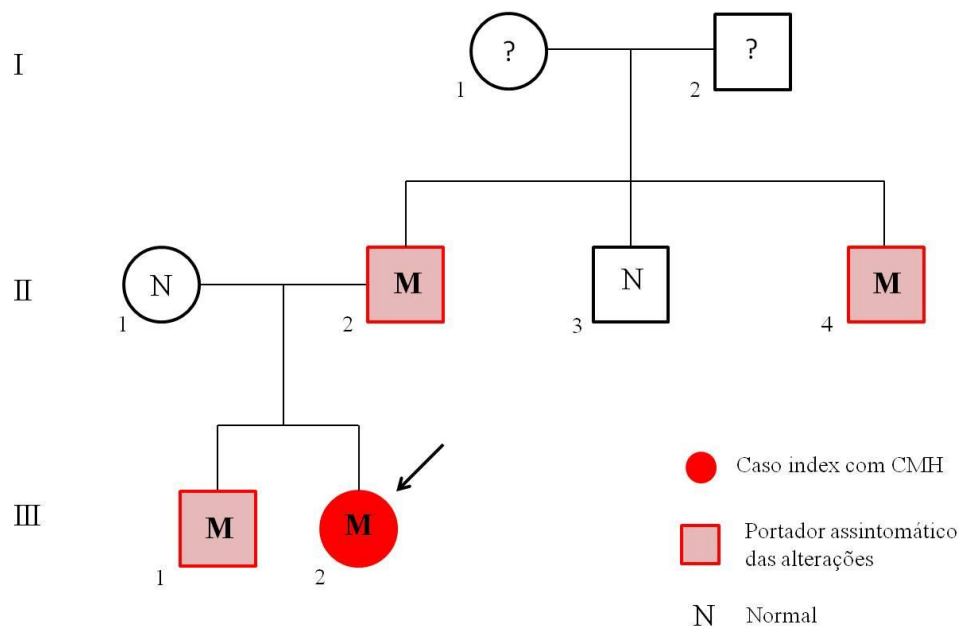


Figura 5 - Árvore genealógica de uma família com CMH e com mutações genéticas no gene MYBPC3.

O estudo genético do caso índice (III – 2) revelou a existência de 2 alterações no gene MYBPC3. Uma das alterações (exão 30 (20412) E1096E, heterozigótico) não resulta na substituição de aminoácidos da proteína e ainda não foi referida anteriormente na literatura, pelo que não se pode inferir sobre a sua patogenicidade. A outra mutação (exão 6 (5190) S236G, heterozigótico) é uma mutação já descrita na literatura e identificada como patológica na CMH que resulta na substituição de serina por glicina na posição 236 da sequência do aminoácido da proteína.

Após a identificação destas alterações foram efectuados estudos aos progenitores (II – 1 e II – 2) de modo a aferir se a mutação era herdada ou *de novo*. Foi possível concluir a herança paterna que foi também transmitida ao filho mais velho do casal.

Após estes resultados foram estudados os tios paternos do caso índice (II – 3 e II – 4) em que se identificou a mesma mutação no gene MYBPC3 num deles, concluindo-se portanto que esta mutação ocorreu em pelo menos três gerações.

Apesar dos adultos portadores (pai e tio) serem ambos assintomáticos e sem sinais imagiológicos característicos de CMH, foram encaminhados, após aconselhamento genético, para consultas de cardiologia.

O irmão do caso índice (III – 1), actualmente com 8 anos e assintomático, é seguido em consultas de cardiologia, e tem avaliação por ecocardiograma normal.

O elemento referenciado como caso índice, sintomático, apresenta clinicamente um bom estado geral. Ao exame físico tem uma auscultação cardíaca arritmica e um sopro sistólico grau II/VI audível no bordo esternal esquerdo. A auscultação pulmonar e o restante exame objectivo eram normais. Na última avaliação cardíaca realizada por ecocardiograma apresentava hipertrofia ventricular esquerda concêntrica, insuficiência mitral ligeira e não havia presença de trombos. No Holter apresentava alterações significativas compatíveis com CMH. Trata-se de uma paciente polimedicada com diurético, anti-hipertensor (inibidor da enzima de conversão da angiotensina - IECA), antiagregante plaquetar e digitálico.

É de salientar a importância do acompanhamento dos indivíduos cujo estudo genético revelou mutações patogénicas para CMH, do aconselhamento genético para futuras gestações deste casal, bem como o estudo molecular dos familiares.

Uma vez que se conhecem as mutações é possível oferecer-se Diagnóstico Pré-Natal. No caso de se confirmar a presença de mutação no feto os pais podem, caso seja essa a sua opção e a gestação não tenha ultrapassado as 24 semanas, requerer a interrupção médica da gravidez.

Discussão / Conclusão

A CMH, doença primária do sarcómero, é uma doença frequente, associada a uma grande heterogeneidade genética, fenotípica e clínica e cujo prognóstico pode ser estabelecido de acordo com o gene afectado e/ou mutação(ões) encontrada(s).

Assim, é de extrema importância a identificação de mutações patogénicas, sendo o estudo molecular um pilar fundamental à prática clínica, proporcionando terapêuticas mais individualizadas, melhores estratégias para prevenção de complicações e uma vigilância mais adequada.

Neste estudo concluiu-se, tal como já descrito anteriormente, que os genes mais frequentemente afectados são MYBPC3, MYH7 e TNNT2.

A frequência das mutações causais da CMH varia de estudo para estudo, variando de 30 a 61% em pacientes com a doença clinicamente definida. Esta variabilidade prende-se com as diferenças das populações estudadas, as idades dos pacientes analisados e a natureza dos pacientes referidos, entre outras (Rodríguez *et al*, 2009).

Foram encontradas mutações já descritas na literatura como patológicas, mas também alterações genéticas que não levam a alteração do aminoácido.

Foi encontrada num dos casos index uma alteração ainda não descrita na literatura, no gene MYBPC3, no exão 18 (Ala562Thr) que é de origem familiar.

Impõem-se futuramente um estudo destas alterações na população normal para que se possa concluir se são mutações ou polimorfismos.

Caso se trate de uma mutação patológica é importante o seu registo na base de dados (*Human Gene Mutation Database* e *Familial Hypertrophic Cardiomyopathy mutation database*) e o acompanhamento clínico cuidado destes indivíduos, para que se possa, eventualmente, estabelecer uma relação genótipo/fenótipo.

Devido ao elevado número de genes e mutações envolvidas nesta doença, estes estudos estão limitados pelos consideráveis custos das estratégias de diagnóstico genético, actualmente assentes na sequenciação automática.

A sequenciação automática é considerada actualmente em Portugal o teste genético diagnóstico de CMH *gold standard*. Tem um custo elevado, uma baixa sensibilidade para detectar variações no número de cópias ou inserções/delecções e não inclui genes que codificam as proteínas relacionadas com a contracção do miocárdio (Santos *et al*, 2011).

Um estudo recente demonstrou que o recurso à técnica iPLEX Genotipagem por Espectrometria de Massa (GEM) e Desnaturação de Alta Resolução (DAR) para diagnóstico genético de CMH é vantajoso. A GEM, quando comparada com outras tecnologias de microarray, tem a vantagem de detectar inserções e delecções a um custo comportável. A aplicação conjunta de GEM e DAR tem mostrado ser uma estratégia promissora, possibilitando a baixo custo o diagnóstico preciso e rápido de CMH (Santos *et al*, 2011).

Numa perspectiva futura, é de extrema importância o desenvolvimento e a aplicação de novas tecnologias mais sensíveis, rápidas e acessíveis para o *screening* de mutações, a criação de uma base de dados nacional de CMH, de onde faça parte informação molecular, clínica e imagiológica e a realização de estudos internacionais com critérios comuns e uniformes de diagnóstico e *follow-up*.

Dado tratar-se de uma doença complexa, salienta-se a importância dos pacientes serem seguidos por uma equipa multidisciplinar, nomeadamente, no que respeita aos serviços de genética e cardiologia.

Bibliografia

1. Alves ML, Robert DG, Beata MW (2010) Rescue of familial cardiomyopathies by modifications at the level of sarcomere and Ca²⁺ fluxes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48: 834–842
2. Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ (2009) Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications of Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 54: 201-211
3. Bratt EL, Östman-Smith I, Sparud-Lundin C, Axelsson BA (2010) Parents' experiences of having an asymptomatic child diagnosed with hypertrophic cardiomyopathy through family screening. *Cardiology in the Young* 21, 8–14
4. Charron P, Heron D, Gargiulo M *et al.* (2004) Prenatal molecular diagnosis in hypertrophic cardiomyopathy: report of the first case. *Prenat Diagn* 24: 701-703
5. Chiu C, Richard D, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald, JA, Jormakka M, Lind JM, Semsarian C (2010) Mutations in Alpha-Actinin-2 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy A Genome-Wide Analysis. *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 55: 1127 - 1135
6. Christiaans I, Birnie E, van Langen IM, van Spaendonck-Zmarts KY, van Tintelen JP, van den Berg MP, Atsma DE, *et al.* (2009) The yield of risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy myosinbinding protein C gene mutation carriers: focus on predictive screening. *European Heart Journal* 31: 842–848

7. Christiaans I, Nannenberg EA, Dooijes D, Jongbloed RJ, Michels M, Postema PG, Majoor-Krakauer D, van den Wijngaard A, Mannens MM, van Tintelen JP, van Langen IM, Wilde AM (2010) Founder mutations in hypertrophic cardiomyopathy patients in the Netherlands. *Netherlands Heart Journal*, Vol 18: 248-254
8. Cirino AL, Ho C (2009) Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Overview GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. 2008 Aug 05 [updated 2009 May 26].
9. Cooper DN, Krawczak M (1999) Single base pair substitutions. In: *Human Gene Mutations*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited. pp 109–162
10. Corrado D, Pelliccia A, Bjornstad HH, *et al.* (2005) Cardiovascular preparticipation screening of young competitive athletes for prevention of sudden death: proposal for a common European protocol. Consensus Statement of the study group of sport cardiology of the working group of cardiac rehabilitation and exercise physiology and the working group of myocardial and pericardial diseases of the European society of cardiology. *European Heart Journal* 26 5: 516–524
11. Cotiga D, Ehlert F, Sherrid M (2006) Syncope, other risk factors, and the implantable defibrillator for sudden death prevention in hypertrophic cardiomyopathy. *Anadolu Kardiyol Derg; Suppl 2*: 55-60
12. Crilley JG, Boehm EA, Blair E, *et al.* (2003) Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*;41:1776-82

13. Dimitrow PP, Chojnowska L, Rudzinski T, Piotrowski W, *et al.* (2010) Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: old risk factors re-assessed in a new model of maximalized follow-up. *European Heart Journal*
14. Efthimiadis GK, Parcharidou D, Pagorelias ED, *et al.* (2010) Prevalence and Clinical Outcomes of Incidentally Diagnosed Hypertrophic Cardiomyopathy. *Am J Cardiol*; 105:1445–1450
15. Elliott PM, Kaski JC, Prasad K, *et al.* (1996) Chest pain during daily life in patients with hypertrophic cardiomyopathy: an ambulatory electrocardiographic study. *Eur Heart J*. 87: 649-657
16. Elliott PM Poloniecki J, Dickie S, Sharma S, Monserrat L, Varnava A, Mahon NG, McKenna WJ. (2000) Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol.*;36:2212-2218
17. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J (2009) Harrison - Medicina Interna (17ª Edição), Vol. II, pp1364-1374
18. Fitzgerald-Butt SM, Byrne L, Gerhardt CA, Vannatta K, Hoffman TM, McBride KL (2010) Parental Knowledge and Attitudes Toward Hypertrophic Cardiomyopathy Genetic Testing. *Pediatr Cardiol* 31:195–202
19. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. (2004) Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res* 2004;94:1279-89
20. Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N. (2006) The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med*;84:446–68
21. Gandjbakhch E, Gackowski A, Montcel ST, Isnard R, Hemroun A, Pascale R, Komajda M, Charron P (2010) Early identification of mutation carriers in familial

- hypertrophic cardiomyopathy by combined echocardiography and tissue Doppler imaging. *European Heart Journal* 31: 1599–1607
22. Geelen E, Hoyweghen IV, Horstman K (2010) Making genetics not so important: Family work in dealing with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Social Science & Medicine* 1 - 8
23. Gonçalves LM. (2003) Familial hypertrophic cardiomyopathy; a complex disease in which even the same can be different. *Rev Port Cardiol* 22: 1465-1469
24. Hagège AA, Desnos M (2009) New trends in treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Archives of Cardiovascular Disease* 102, 441- 447
25. Ho CY, Seidman CE (2006) A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 113: 3858-862
26. Ho, CY (2009) Hypertrophic Cardiomyopathy: Preclinical and Early Phenotype. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2:462–470
27. Issa JP (2002) Epigenetic variation and human disease. *J Nutr* 132:2388S–2392S
28. Krawczak M, Ball EV, Cooper DN (1998) Neighboring nucleotide effects on the rates of germ-line single base pair substitution in human genes. *Am J Hum Genet* 63:474–488
29. Maron BJ (2002) Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *Jama*; 287: 1308-1320
30. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, *et al.* (2003) American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the

American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 42:1687–1713

31. Medeiros Pde, Martinelli M, Arteaga E, *et al.* (2006) Hypertrophic cardiomyopathy: the importance of arrhythmic events in patients at risk for sudden cardiac death. *Arq Bras Cardiol*; 87: 649-657
32. Meurs K, Kuan M (2010) Differential Methylation of CpG Sites in Two Isoforms of Myosin Binding Protein C, an Important Hypertrophic Cardiomyopathy Gene. *Environmental and Molecular Mutagenesis* Volume 52, Issue 2, pages 161–164
33. Monteiro S, Costa S, Monteiro P, Gonçalves L, Providência LA (2007) Miocardiopatia Hipertrófica - Estado da Arte em 2007 [48]. *Rev Port Cardiol*; 27 (5): 625-637
34. Nagueh SF, Chen S, Patel R, *et al.* (2004) Evolution of expression of cardiac phenotypes over a 4-year period in the beta-myosin heavy chain-Q403 transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*;36:663-73
35. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, *et al.* (2002) Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 105: 446-451
36. Olsson MC, Palmer BM, Stauffer BL, Leinwand LA, Moore RL (2004) Morphological and functional alterations in ventricular myocytes from male transgenic mice with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*;94:201-7
37. Ortiz MF, Rodríguez-García MI, Hermida-prieto M, Fernández X, Veira E, Barriales-Villa R, Castro-Beiras A, Monserrat L (2009) A homozygous MYBPC3 gene

- mutation associated with a severe phenotype and a high risk of sudden death in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 62: 572-575
38. Östman-Smith I, Wettrell G, Keeton B, *et al.* (2008) Age- and genderspecific mortality rates in childhood hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*; 29: 1160–1167
39. Ramaraj R (2008) Hypertrophic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Cardiol Rev* 2008;16:172–180
40. Richard P, Villard E, Charron P, Isnard R (2006) The Genetic Bases of Cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*;48:A79-89
41. Rodríguez JE, MCCudden CR, Willis MS (2009) Familial hypertrophic cardiomyopathy: Basic concepts and future molecular diagnostics. *Clinical Biochemistry* 42 755–765
42. Santos S, Lança V, Oliveira H, Branco P, Silveira L, Marques V, Brito D, Madeira H, Bicho M, Fernandes AR (2011) Genetic diagnosis of Hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry DNA arrays and high resolution melting [1]. *Rev Port Cardiol* 2011; 30 (01): 7-18
43. Senthil V, Chen SN, Tsybouleva N, *et al.* (2005) Prevention of cardiac hypertrophy by atorvastatin in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 97:285 - 292
44. Sjoblom B, Salmazo A, Djinovic-Carugo K (2008) Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci*;65:2688 –701
45. Van Driest SL, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ (2005) Yield of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc*;80:739 – 744

46. van Langen IM, Hofman N, Tan HL, Wilde AA (2004) Family and population strategies for screening and counselling of inherited cardiac arrhythmias. *Ann Med*; 36 Suppl 1: 116-124
47. Varnara AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ (2001) Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation*; 104: 1380-1384
48. Vu Manh TP, Mokrane M, Georgenthum E, *et al.* (2005) Expression of cardiac myosin-binding protein-C (cMyBP-C) in *Drosophila* as a model for the study of human cardiomyopathies. *Hum Mol Genet* 2005;14:7-17
49. Wheeler M, Pavlovic A, DeGoma E, Salisbury H, Brown C, Ashley EA (2009) A New Era in Clinical Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2:381–391
50. Wigle ED, Rakowski H, Kimball BP, Williams WG (1995) Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical spectrum and treatment. *circulation*; 92: 1680-1692
51. Wilson W, Taubert KA, Gewiszt M, *et al.* (2007) Prevention of Infective Endocarditis. Guidelines from the American Heart Association. A Guideline From the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *J Am Dent Assoc.* 2007; 138: 739 - 745

52. Wordsworth S, Leal J, Blair E, Legood R, Thomson K, Seller A, Taylor J, Watkins H (2010) DNA testing for hypertrophic cardiomyopathy: a cost-effectiveness model. *European Heart Journal* 31, 926–935
53. Xu, Q, Dewey S, Nguyen S, Gomes AV (2010) Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: Insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48: 899–909
54. Yamazaki T, Suzuki J, Shimamoto R, *et al.* (2007) A new therapeutic strategy for hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy in humans. A randomized and prospective study with an angiotensin II receptor blocker. *Int Heart J*;48:715 - 724
55. Familial Hypertrophic Cardiomyopathy mutation database
(www.angis.org.au/databases/heart/)
56. Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff
(www.hgmd.ef.ac.uk)