



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

JULIANNY FREITAS RAFAEL

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE FAMÍLIAS PORTADORAS
DE CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA

RIO DE JANEIRO

2016



JULIANNY FREITAS RAFAEL

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE FAMÍLIAS PORTADORAS
DE CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Cardiovasculares, do
Instituto Nacional de Cardiologia,
como pré-requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Orientadores: Dr. Fernando Eugênio dos Santos Cruz Filho

Dr. Glauber Monteiro Dias

RIO DE JANEIRO

2016

R136c Rafael, Julianny Freitas.

Caracterização genotípica e fenotípica de famílias
portadoras de cardiomiopatia hipertrófica / Julianny Freitas
Rafael. – Rio de Janeiro, 2016.

104 f.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências
Cardiovasculares) Instituto Nacional de Cardiologia – INC

1. Cardiomiopatia hipertrófica. 2. Mutação genética. 3.
Genótipo. 4. Fenótipo I. Título.

CDU- 616-006

JULIANNY FREITAS RAFAEL

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE FAMÍLIAS PORTADORAS
DE CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Cardiovasculares, do
Instituto Nacional de Cardiologia,
como pré-requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Aprovada em: 26 de Fevereiro de 2016

Membros da Banca:

Prof Antônio Carlos Campos de Carvalho (Presidente)

Doutor em Ciências Biológicas, Instituto Nacional de Cardiologia/ Universidade
Federal do Rio de Janeiro

Prof Rodrigo Soares de Moura Neto

Doutor em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Bernardo Rangel Tura

Doutor em Clínica Médica, Instituto Nacional de Cardiologia

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação primeiramente a **Deus**, que me sustenta em todos os meus caminhos, me preparando para as conquistas e dificuldades, me abençoando e me mantendo firme em meus propósitos e a quem busco diariamente para me dar clareza e sabedoria em todas as minhas decisões.

A minha **mãe**, meu exemplo de luta, dedicação e trabalho, a quem devo a minha vida. Agradeço por não medir esforços para que eu cresça, por se manter presente em todo o meu caminho, pelas palavras, pelo ombro amigo, pelas suas orações, seu sono, sua preocupação e seu carinho. Obrigada pelo seu sacrifício, por nos colocar sempre em primeiro lugar e por ter me oferecido ensinamentos que me guiaram e construíram quem sou hoje. Serei eternamente grata a você.

A minha princesa, fonte de amor inesgotável, que dedicou a vida a cuidar da minha e me ofereceu todas as coisas boas que uma pessoa tem para oferecer para alguém. **Vó** você e mamãe me ensinaram o valor de um abraço, o amor que se doa e me ajudaram a saber a importância de se doar a alguém.

Aos meus irmãos **Loly e Rapha**, companheiros da minha vida, presentes enviados por Deus para que eu nunca fosse sozinha no mundo. Obrigada pelas palavras de apoio, pelos ensinamentos diários, pelas leituras dos meus textos nos seus tempos livres, pelo exemplo de dedicação, trabalho, estudo, amizade e família. Amo vocês.

Ao **Ro**, meu amor e parceiro de vida, meu alicerce no Rio de Janeiro, obrigada por ser quem me acalma, me ouve, me aconselha e me apoia. Te agradeço pelas noites sem sono divididas comigo, pelos finais de semana perdidos, pelas horas em que só estive ao meu lado só para que não me sentisse sozinha ou desanimasse. Por dividir a sua vida e a sua família comigo, obrigada. Te Amo!

Ao meu **Pai**, por ajudar a formar o meu caráter, por me ensinar a não me acomodar com o que me foi oferecido, a correr atrás por conta própria e não esperar pelas coisas. A você que mesmo distante está presente, meu muito obrigada.

Ao **Ayrton**, padrasto e amigo, presente em todos os momentos da minha vida, te agradeço pelos conselhos, pela torcida, pelo apoio e ajuda em todos os meus processos para morar no Rio. Obrigada por tudo.

E a **Patrícia, Álvaro e Dona Ana**, por me apoiarem, me acolherem em sua família, se preocuparem, se envolverem nas etapas desse desafio e por junto com o Ro atenuarem minha saudade de casa.

Dedico à vocês essa conquista!!!!

Obrigada por caminharem ao meu lado!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha família, meu amor, e a todas as pessoas que estiveram presentes de alguma forma nesses quatro anos em que estou nessa jornada no Rio de Janeiro.

Ao Dr Fernando Cruz, por acreditar em mim, me incentivar, me dar novas idéias e me apoiar há três anos. Pelos ensinamentos, oportunidades e pelo crescimento meu muito obrigada.

Ao Glauber pelas horas dedicadas, pela paciência, pela ajuda integral e pela parceria nas minhas horas de dificuldade. Esses dois anos de processo de criação dessa dissertação foram um aprendizado incrível e te agradeço por isso.

A Ana Catarina pela ajuda incansável (quase tive que colocar seu nome no projeto rs), pela amizade, pelo apoio e paciência, você é parte dessa dissertação.

Ao José Guilherme Cazelli, pelos textos, explicações, e-mails com ajuda a qualquer hora, gravações de imagens, pela amizade de 10 anos e pela parceria de plantão nesses quatro anos.

Ao Rio de Janeiro, por me receber, para que eu pudesse dar continuidade ao meu processo de aprendizagem, por me ensinar o que é viver sozinha e por me proporcionar novas experiências.

Ao INC, minha casa a quatro anos, onde tenho aprendido tudo sobre a Cardiologia, Arritmia e Pesquisa. Pelas oportunidades que me foram oferecidas aqui. Pela abertura de suas portas à mim, à minha formação e à minha dissertação. Pelas pessoas que aqui conheci. Serei eternamente grata e esta sempre será a minha casa.

Aos meus companheiros de mestrado pelo apoio, informações, torcida e dedicação conjunta. Estamos juntos nessa!!!!

À Casa de Saúde São José, ao Gustavo Gouvea e Ilan Gotllieb, pela disponibilidade de sua estrutura para realização das ressonâncias e acima de tudo pelo apoio à esse projeto. Meu muito obrigada.

E meu agradecimento todo especial aos pacientes e familiares participantes desse estudo, pela confiança depositada, por entregar sua história, seus anseios e medos, sua vida, para que esse projeto pudesse ser realizado. Meu mais sincero muito obrigada.

EPÍGRAFE

“O caminho mais longo de um percurso não é o mais distante
a ser percorrido, mas aquele que caminhamos sozinhos.””

Ataíde Lemos

RESUMO

Introdução: A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é uma doença genética, autossômica dominante, causada por mutações nos genes que codificam para as proteínas do sarcômero, sendo a principal causa de morte súbita cardíaca (MSC) em jovens e atletas de alto nível. Estudos têm demonstrado um pior prognóstico associado a mutações específicas. A relação entre o genótipo e o fenótipo da CMH, tem sido alvo de diversos estudos desde a descoberta do caráter genético da doença. O objetivo desse trabalho é caracterizar genotípica e fenotipicamente pacientes portadores de CMH e seus familiares. **Metodologia:** Os probandos com diagnóstico clínico de CMH foram submetidos ao diagnóstico genético através do sequenciamento direto dos três principais genes relacionados à essa patologia, *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2*. Através de entrevista foi construído heredograma. Os probandos e familiares foram examinados através de ecocardiograma transtorácico, eletrocardiograma e Holter de 24 horas, e as mutações encontradas nos probandos foram investigadas nos familiares. Foram avaliadas o risco de MSC dos indivíduos e a patogenicidade das mutações encontradas através de ferramentas computacionais. **Resultados:** Foram analisadas duas famílias de indivíduos portadores de CMH. No probando da família A foi identificado a mutação p.Arg453Cys na cadeia pesada da β -miosina,. Este era portador de CMH e possuía história de morte súbita cardíaca abortada, com implante de CDI para profilaxia secundária. Seu ecocardiograma evidenciava hipertrofia septal assimétrica do tipo curva reversa, sem gradiente de via de saída do ventrículo esquerdo. A análise da família demonstra alta incidência de CMH com indivíduos afetados em todas as gerações e alta mortalidade. Todos os indivíduos portadores do alelo mutado apresentavam fenótipo de CMH, exceto uma criança de 13 anos (alta penetrância). A hipertrofia septal tipo curva reversa como o tipo de hipertrofia predominante nesta família. No segundo probando (família B), com manifestação severa da doença, foi identificada uma dupla mutação em heterozigose no gene *MYBPC3*, Glu542Gln e Asp610His. Seu ecocardiograma demonstrava hipertrofia septal assimétrica, tipo curva reversa, com septo medindo 3,9 cm. Além disso havia relato de síncope, com implante de CDI para profilaxia primária, com alto risco de MSC. A análise de seus familiares demonstrou que os alelos Glu542Gln e Asp610His são de origem paterna

e materna, respectivamente. Nenhum dos familiares portadores dos alelos individuais apresentaram manifestação clínica de CMH. **Conclusão:** Nossos dados sugerem que a mutação Arg453Cys na cadeia pesada da β miosina é responsável pela manifestação e gravidade da expressão da CMH na família A, e que a dupla mutação no gene MYBPC3, seria determinante para o desenvolvimento da forma grave de CMH no probando B. A provável associação patogênica das mutações Glu542Gln e Asp6010His, foi primeiramente descrita neste estudo.

Palavras-chave: Cardiomiopatia hipertrófica; Mutação genética; Genótipo; Fenótipo.

ABSTRACT

Introduction: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a genetic disease, autosomal dominant, caused by mutations in the genes coding for sarcomere proteins, being the major cause of sudden cardiac death (SCD) in young high-level athletes. Studies have shown a worse prognosis associated with specific mutations. The relationship between genotype and phenotype of HCM has been the subject of several studies since the discovery of the genetic nature of the disease. The aim of this study is to characterize genotypic and phenotypic patients with hypertrophic cardiomyopathy and their families. **Methodology:** The probands with a clinical diagnosis of HCM underwent genetic diagnosis through direct sequencing of the three main genes related to this disease, *MYH7*, *MYBPC3* and *TNNT2*. Through interview it was built pedigree. The probands and family were examined by transthoracic echocardiography, electrocardiogram and Holter 24 hours, and the mutations found in probands were investigated in the family. We evaluated the risk of SCD of individuals and the pathogenicity of these mutations using computational tools. **Results:** We analyzed two families of individuals with HCM. In family's A proband was identified the p.Arg453Cys mutation in the β -myosin heavy chain. He had CMH and a history of SCD aborted with ICD implantation for secondary prophylaxis. His echocardiogram showed asymmetric septal hypertrophy type reverse curve without outflow tract gradient of the left ventricle. The family analysis shows high incidence of CMH with affected individuals in every generation and high mortality. All individuals carriers of the variant allele presented HCM phenotype, except a child of 13 years old (high penetrance). The reverse curve septal hypertrophy was the predominant type of hypertrophy. In the second proband (family B), with severe manifestation of the disease, a double heterozygous mutation was identified (p.Glu542Gln and p.Asp610His) in *MYBPC3*. His echocardiogram showed asymmetric septal hypertrophy, type reverse curve, with septum measuring 3,9cm. Also he had syncope report with ICD implantation for primary prevention with high risk of SCD. The family analysis showed that the Glu542Gln and Asp610His alleles have paternal and maternal origin, respectively. No family members carrier of individual alleles showed clinical signs of HCM. **Conclusion:** Our data suggest that p.Arg453Cys mutation in the β myosin heavy chain is responsible for the manifestation and severity of expression of HCM in the family A, and that the double heterozygous mutation in

MYBPC3 gene, would be crucial to the development of the severe form of HCM in the proband B. The probable pathogenic association of p.Glu542Gln and p.Asp601His mutations, was first described in this study.

Keywords: Hypertrophic cardiomyopathy; genetic mutation; Genotype; phenotype

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da anatomia cardíaca.....	20
Figura 2. Representação esquemática de um cardiomiócito.....	21
Figura 3. Representação esquemática da cadeia pesada de miosina....	22
Figura 4. Representação esquemática da proteína C de ligação `a miosina.....	23
Figura 5. Representação esquemática da troponina T.....	24
Figura 6. Representação esquemática do acoplamento da cabeça da miosina.....	25
Figura 7. Representação esquemática dos tipos de manifestação clínica.....	26
Figura 8. Preditor para escore de risco de morte súbita cardíaca em 5 anos.....	46
Figura 9. Algoritmo de seleção dos probandos.....	47
Figura 10. Identificação da mutação c.1357C>T (p.Arg453Cys) no gene <i>MYH7</i>	48
Figura 11. Ecocardiograma trasntorácico probando família A.....	49
Figura 12. Heredograma da família A.....	51
Figura 13. Eletrocardiograma familiar IV.8.....	52
Figura 14. Ecocardiograma trasntorácico familiar IV.8.....	53
Figura 15. Ecocardiograma trasntorácico familiar III.4.....	54
Figura 16.. Ecocardiograma trasntorácico familiar III.5.....	55

Figura 17. Eletrocardiograma do familiar III.15.....	56
Figura 18. Ecocardiograma trasntorácico familiar III.15.....	57
Figura 19. Ecocardiograma trasntorácico familiar III.19.....	58
Figura 20. Interrogação do CDI do probando.....	61
Figura 21. Análise da patogenicidade da mutação Arg453Cys, pela ferramenta PolyPhen-2.....	61
Figura 22. Alinhamento de sequências polipeptídicas da cadeia pesada da β -miosina.....	62
Figura 23. Domínios da B-MHC	63
Figura 24. Análise da B-MHC no programa <i>PredictProtein</i>	63
Figura 25. Identificação da mutação p.Asp610His no gene <i>MYBPC3</i>	64
Figura 26. Identificação da mutação p.Glu542Gln no gene <i>MYBPC3</i>	65
Figura 27. Ecocardiograma trasntorácico do probando da família B..	65
Figura 28. Heredograma da família B.....	67
Figura 29A. RMN cardíaca do familiar IV.3.....	69
Figura 29B. RMN cardíaca do familiar IV.6.....	69
Figura 29C. RMN cardíaca do familiar IV.2.....	69
Figura 30. Análise da patogenicidade da mutação p.Asp610His, pela ferramenta PolyPhen-2.....	71
Figura 31. Alinhamento de sequências polipeptídicas da MyBP-C....	72
Figura 32. Análise da MyBP-C no programa <i>PredictProtein</i>	73
Figura 33. Análise da patogenicidade da mutação Glu542Gln, pela ferramenta PolyPhen-2.....	74

Figura 34. Alinhamento de sequências polipeptídicas da MyBP-C.....	74
Figura 35. Análise da MyBP-C no programa <i>PredictProtein</i>	75
Tabela 1: Genes associados a CMH e suas respectivas proteínas.....	28
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados na análise do gene <i>MYH7</i>	39
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na análise do gene <i>MYBPC3</i>	41
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados na análise do gene <i>TNNT2</i>	42
Tabela 5: Dados epidemiológicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de escore de risco de MSC em cinco anos, família A.....	59
Tabela 6: Análise de patogenicidade da mutação c.1357C>T (p.Arg453Cys) no gene <i>MYH7</i>	62
Tabela 7: Dados epidemiológicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de escore de risco de MSC em cinco anos, família B.....	70
Tabela 8: Análise de patogenicidade da mutação c.1828G>C (p.Asp610His) no gene <i>MYBPC3</i>	72
Tabela 9: Análise de patogenicidade da mutação p.Glu542Gln.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Átrio esquerdo
AESP	Atividade elétrica sem pulso
Ao	Aorta
CDI	Cardiodesfibrilador implantável
CMH	Cardiomiopatia Hipertrófica
DDVE	Diâmetro Disfunção diastólica diastólica interno do ventrículo esquerdo
DESC	Desconhecido
DSVE	Diâmetro Disfunção sistólica sistólica interno do ventrículo esquerdo
ECG	Eletrocardiograma
ECOTT	Ecocardiograma transtorácico
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
INC	Instituto Nacional de Cardiologia
MSC	Morte súbita cardíaca
MYH7	Gene da cadeia pesada da beta miosina
MYPBC3	Gene da proteína C ligante de miosina
NNT	Número necessário para tratar
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PP	Parede posterior
RMN	Ressonância magnética nuclear
RT	Realce tardio
SIV	Septo interventricular
TNNT2	Gene da troponina T
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VE/Ao	Ventrículo esquerdo/Aorta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 O coração.....	20
2.2 As células musculares cardíacas.....	21
2.3 Processo de acomplamento excitação-contração.....	23
2.4 Cardiomiopatia hipertrófica.....	25
2.4.1 Genética na cardiomiopatia hipertrófica.....	27
2.4.2 Patogênese na cardiomiopatia hipertrófica.....	30
2.4.3 Diagnóstico clínico.....	31
2.4.4 Relação genótipo x fenótipo.....	32
2.4.5 Custo efetividade na análise genética.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo primário.....	33
3.2 Objetivo secundário.....	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Tipo de Estudo.....	34
4.2 População.....	34
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	34
4.3.1 Critérios de Inclusão.....	34
4.3.2 Critérios de Exclusão.....	35
4.4 Heredorama.....	35
4.5 Exames clínicos.....	35
4.5.1 Eletrocardiograma de superfície.....	35
4.5.2 Ecocardiograma transtorácico.....	36
4.5.3 Ressonância Magnética.....	37
4.5.4 Holter de 24 horas.....	38
4.6 Análise genética.....	39
4.7 Análise <i>in silico</i> das mutações encontradas.....	44
4.8 Determinação de escore de risco de morte súbita em pacientes com mutação.....	45
5. RESULTADOS	47
5.1 Família A.....	48
5.2 Família B.....	64
6.DISCOSSÃO.....	76

7. CONCLUSÃO.....	84
8. REFERÊNCIAS	85
9. APÊNDICES	93

1. INTRODUÇÃO

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é uma doença primária do músculo cardíaco de origem genética, definida pela presença de uma estrutura miocárdica anormal resultando em disfunção principalmente diastólica, na ausência de doença isquêmica ou condições anormais de carga hemodinâmica. Em crianças e adolescentes, a cardiomiopatia hipertrófica pode ter consequências severas, com até 40% dos indivíduos progredindo para morte (Arola et al., 1997; Towbin et al., 2006; Colan et al., 2007)

A CMH é a causa mais comum de morte súbita cardíaca (MSC) em jovens e atletas de alto nível, com grande impacto na saúde pública, visto que atinge indivíduos na sua maioria das vezes em sua fase laborativa e intelectual (Marian, 2010).

O diagnóstico molecular (genotipagem) é o padrão ouro para o diagnóstico da CMH por determinar com precisão a patologia apresentada, distinguindo-a de possíveis fenocópias, além de possibilitar o diagnóstico em indivíduos assintomáticos. Relatos na literatura apontam uma alta correlação entre o genótipo e a apresentação clínica e prognóstico da doença, o que pode levar a um melhor acompanhamento do paciente. Entretanto, há controvérsias se uma única mutação sarcomérica é suficiente para determinar precisamente o prognóstico de CMH. Ademais, ainda é questionado o benefício do diagnóstico molecular em pacientes com CMH, assim como o rastreamento genético de familiares assintomáticos. Por estes motivos, o estudo molecular e genético das cardiomiopatias desperta grande interesse em todo mundo e é objeto deste trabalho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 . O coração

O coração é um órgão muscular cavitário com formato de cone truncado, dividido em quatro cavidades: átrio esquerdo (AE), átrio direito (AD), ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD), que repousa sobre o diafragma, entre a porção inferior dos pulmões, no mediastino médio (Paulsen, Waschke. 2012)

É coberto ventralmente pelo esterno e partes adjacentes da terceira à sexta cartilagem costal. O coração do adulto mede cerca de 12 cm de comprimento por 8 a 9 cm de largura e 6 cm de espessura. Seu peso, no sexo masculino varia entre 280 a 340 gramas e no sexo feminino entre 230 a 280 gramas (Paulsen, Waschke, 2012).

Em sua maioria, o coração continua a crescer tanto em peso quanto em tamanho ao longo da vida até idades avançadas, porém este crescimento pode ocorrer secundário a doenças, sendo que nesses o crescimento ocorre de maneira não fisiológica (Li e Benjamin, 2004 e Paulsen, Waschke, 2012).

A parede do coração é composta por três camadas: epicárdio (externa), miocárdio (média) e endocárdio (interna). O epicárdio é a membrana serosa, também conhecido como pericárdio visceral. O miocárdio é composto de camadas e feixes de músculo cardíaco irrigado por artérias epicárdicas e entremeado por capilares intramusclos. Já o endocárdio reveste internamente o coração e é composto por células endoteliais escamosas sendo contínuo ao revestimento endotelial dos vasos sanguíneos (Figura 1) (Li e Benjamin, 2004).

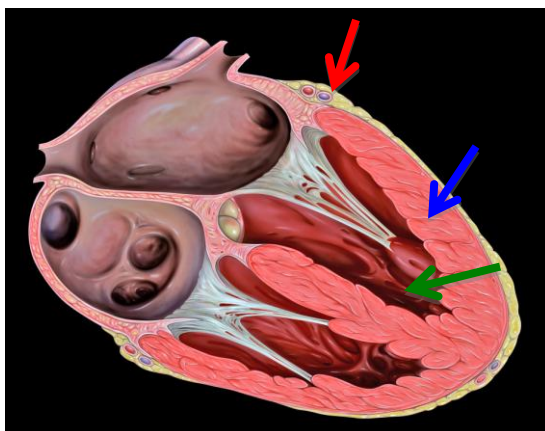


Figura 1. Representação esquemática da anatomia cardíaca. Corte longitudinal, evidenciando as três

camadas do coração, epicárdio (seta vermelha), miocárdio (seta azul), endocárdio (seta verde).
(Adaptado de <http://www.ufjf.br/anatomia/files/2012/04/SISTEMA-CIRCULATORIO-2013.pdf>).

2.2 As células musculares cardíacas

Aproximadamente 75% do volume do miocárdio é composto por cardiomiócitos, que são as células musculares cardíacas.(Li e Benjamin, 2004).

Essas células possuem uma forma cilíndrica com comprimentos que variam entre 80 e 100 nm, diâmetros entre 10 a 20 nm e são envoltas pela membrana celular, o sarcolema. O sarcoplasma (citoplasma) do cardiomiócito é constituído principalmente por miofilamentos, que são as proteínas contráteis. Existem dois tipos de miofilamentos, os filamentos finos (actina e os discos Z) e os filamentos grossos (miosina), que ocupam 45 à 60% do volume celular em ventrículo de mamíferos (Li e Benjamin, 2004).

Os miofilamentos estão organizados em unidades contráteis chamadas de sarcômeros, responsáveis pelas estriações transversais das fibras musculares. As estriações são formadas pela alternância das bandas I (bandas claras) e A (bandas escuras). A banda I possui uma linha transversal escura, a linha Z. O sarcômero se estende de uma linha Z à outra, compreendendo duas semi bandas I e uma banda A. No centro da banda A (centro do sarcômero) existe uma banda clara, a banda H. Os filamentos de miosina ocupam toda a banda A, já os filamentos finos (actina) se estendem da linha Z até ao início da banda H, se sobrepondo à miosina na banda A (Junqueira e Carneiro, 2008).

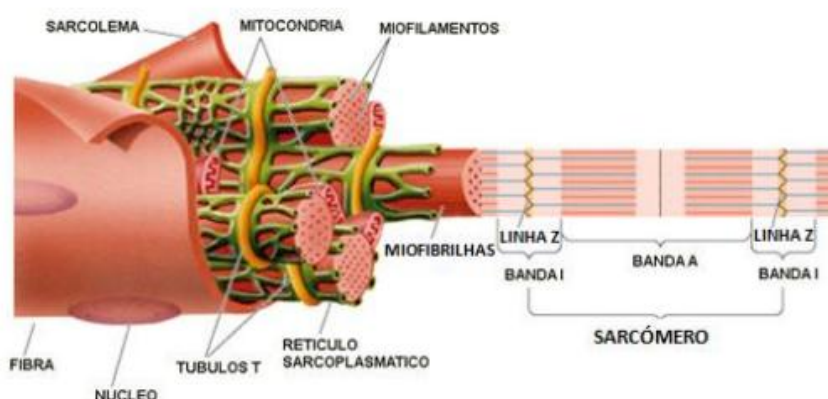


Figura 2. Representação esquemática de um cardiomiócito: as unidades de actina e miosina que se repetem ao longo da miofibrila são chamadas de **sarcômeros**. As faixas mais externas dos sarcômeros, claras, são denominadas de **banda I** e contêm apenas filamentos de actina. A faixa central mais escura é denominada **banda A**. As extremidades da banda A são formadas por

filamentos de actina e miosina sobrepostos, enquanto a sua região mediana mais clara, denominada **banda H**, contém apenas miosina.

(Adaptado de: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sustentacao7.php>)

O filamento de actina é um polímero constituído por duas cadeias de monômeros globulares de actina G torcidas uma sobre a outra. A actina G é uma proteína globular com sítios de ligação com a miosina. A proteína filamentosa tropomiosina se enrola ao longo do filamento de actina, bloqueando o sítio de ligação da actina com a miosina. Em cada molécula de tropomiosina encontra-se ligado o complexo troponina, que regula a interação miosina-actina (Opie, 2010, Junqueira e Carneiro, 2008). Este complexo é composto por três proteínas: a troponina C (que possui um local de ligação ao Ca^{2+}), a troponina I (subunidade inibitória do complexo) e a troponina T (responsável pela transmissão do sinal de Ca^{2+} à tropomiosina) (Sfichi-Duke *et al*, 2010).

A miosina é uma molécula grande (500 kDa) composta por duas cadeias pesadas, que possuem uma cabeça na região N-terminal e se entrelaçam pela região da cauda. Além das cadeias pesadas, o filamento grosso também é constituído por duas cadeias leves essenciais e duas cadeias leves regulatórias que estão localizadas próximas à cabeça da miosina (Figura 3). As cadeias pesadas se apresentam em duas isoformas, alfa e beta. A isoforma beta é a forma predominante no coração humano adulto (Opie, 2010).

A cadeia pesada de β -miosina (BMHC) é considerada o motor molecular do sarcômero e está associada a várias proteínas. A cabeça da BMHC possui um domínio de ligação à actina e um sítio de ligação ao ATP com atividade ATPásica, já o pescoço e a cauda estão ligados à proteína C ligante de miosina (MyBP-C) (Blankenfeldt *et al*, 2006).

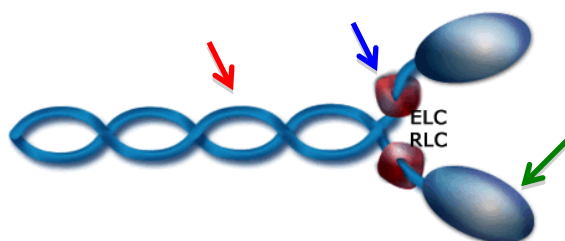


Figura 3. Representação esquemática da cadeia pesada de miosina com suas três regiões: cabeça (seta vermelha), pescoço (seta azul) e cauda (seta verde).

Adaptado de: (http://sambomed.co.kr/renewal/bbs/board.php?bo_table=products&wr_id=1073&sca=Hypermol+EK)

A MyBP-C é um polipeptídeo modular da família das imunoglobulinas que apresenta três isoformas: duas expressas no músculo esquelético e outra no músculo cardíaco (Fatkin e Graham, 2002). A MyBP-C possui sítio de ligação para a miosina, titina e actina, com três sítios de fosforilação acessíveis (Figura 4). Tem importante papel na manutenção da estrutura do sarcômero e na formação de miofibrilas, como resultado da ligação da miosina a titina durante a miofibrillogênese, além da regulação da contração através de fosforilação (Ababou *et al*, 2008).

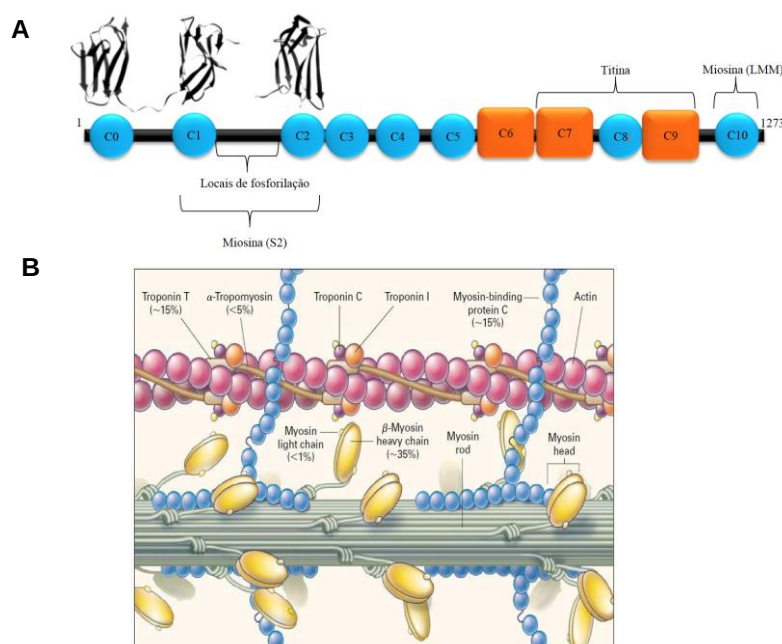


Figura 4. **A)** Representação esquemática da proteína C de ligação à miosina, onde se identificam os domínios IgI (azul) e FnIII (laranja), com indicação dos domínios de ligação da miosina (S2 e LMM) e da titina e os locais de fosforilação (Imagem adaptada de <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2k1m/pdb>; <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3cx2/pdb>; <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1pd6/pdb>, Janeiro 2011; van Dijk *et al*, 2009). **B)** Representação esquemática das proteínas sarcoméricas. A proteína C ligante de miosina (representada pelo cordão de bolas azuis), com ligação tanto na actina quanto na miosina. Adaptado de: Redwood C. *et al.*, 1999.

2.3 Processo acoplamento excitação-contração

Acoplamento excitação-contração é o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável até a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) com consequente contração da célula muscular (Opie, 2010 e Dulhunty, 2006).

Quando a concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) é baixa o complexo formado pelas três subunidades da troponina e a tropomiosina atua bloqueando a interação da actina com a miosina inibindo a contração (Opie, LH, 2010).

O desenvolvimento da contração acontece, quando os miócitos são despolarizados, fazendo com que os canais de cálcio do tipo-L presentes no sarcolema se ativem, ocorrendo um influxo de íons de cálcio o que aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular (Ogawa, 1994).

A entrada de cálcio no meio intracelular ativa receptores no retículo sarcoplasmático, um compartimento especializado em armazenar íons de cálcio, fazendo com que este libere mais cálcio no citoplasma. Esse processo é denominado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} e o seu resultado é um aumento significativo da concentração intracelular de Ca^{2+} (Fabiato, 1983).

A ligação de Ca^{2+} intracelular à troponina C promove a mudança de conformação da estrutura troponina-tropomiosina, deslocando a tropomiosina e desbloqueando os sítios de ligação da actina para a miosina (Figura 5) (Opie, 2010; Sfichi-Duke *et al*, 2010)

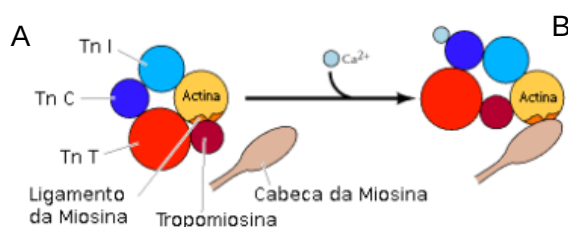


Figura 5. Representação esquemática da troponina T. **A)** Troponina I (círculo azul claro), troponina C (círculo azul escuro), troponina T (círculo vermelho). **B)** Nota-se o deslocamento da tropomiosina, liberando o sítio de ligação da actina para a miosina, na presença de cálcio.

Adaptado de: (<http://circres.ahajournals.org/content/108/6/751.full.pdf>)

No estado de repouso, o ATP está ligado ao sítio ATPásico da miosina, porém este está inativo. A hidrólise do ATP só ocorre quando a actina está ligada à cabeça da miosina. A energia liberada neste processo possibilita a mudança conformacional da cabeça e pescoço da miosina, aumentando sua dobra e movendo o filamento fino sobre o filamento grosso, gerando o encurtamento do sarcômero e contração muscular. Com a ligação de uma nova molécula de ATP à miosina, há perda da afinidade pela actina, desfazendo o complexo actomiosina, com consequente relaxamento (Opie, 2010; Junqueira e Carneiro, 2008) (Figura 6).

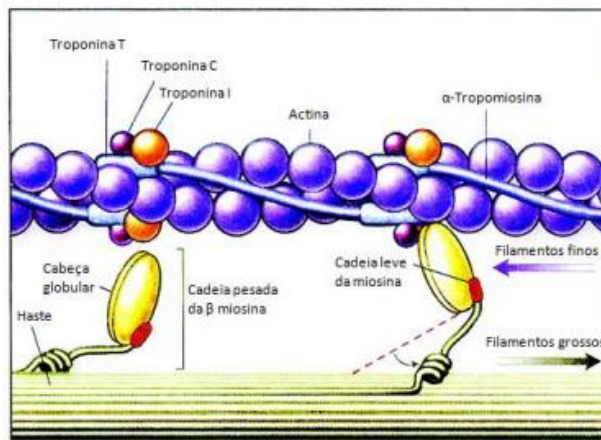


Figura 6. Representação esquemática do acoplamento da cabeça da miosina no sítio de ligação da actina, após mudança de conformação do complexo da troponina pela ligação do cálcio, com deslocamento da tropomiosina, promovendo a contração muscular.
Adaptado de: Adaptado de Seidman e Seidman, 2001)

2.4 Cardiomiopatia Hipertrófica

As cardiomiopatias são definidas como doenças do miocárdio, e podem ser classificadas em dilatada, restritiva, arritmogênica do VD e hipertrófica (Gersh BJ, et.al, 2011). A CMH é uma doença primária do coração, caracterizada por hipertrofia miocárdica, sem dilatação ventricular, na ausência de outras situações anormais, cardíacas ou sistêmicas, que possam levar à hipertrofia (Maron, 1997). Na maioria dos casos produz o espessamento da parede do ventrículo esquerdo (VE), especialmente no septo interventricular. A diminuição do volume da câmara ventricular prejudica a função diastólica. As características patológicas da CMH são diversas e incluem a hipertrofia e desarranjo dos miócitos, fibrose intersticial, espessamento das artérias coronárias intramural e disfunção endotelial da microcirculação miocárdica (Maron e Roberts, 1979).

A Hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) é em sua maioria assimétrica, com predomínio septal, podendo ainda ser apical, ou antero-lateral. Em poucos casos pode se apresentar de forma concêntrica. Alguns autores descrevem a forma de hipertrofia em sigmóide, curva reversa, apical ou neutra e as associam a presença ou não de mutação em genes dos miofilamentos (filamentos grossos e finos). A forma sigmóide ocorre em 40-50% dos casos e a curva reversa 30-40% dos casos.

Oitenta por cento (80%) dos pacientes com a forma curva reversa, possuem mutação nos genes que codificam os miofilamentos (Figura 7) (MartijnBos et. Al, 2009) .

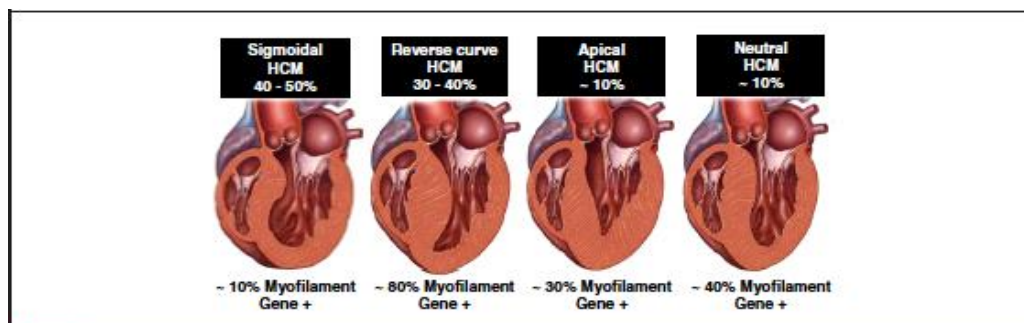


Figura 7. Representação esquemática dos tipos de manifestação clínica das hipertrofias do ventrículo esquerdo na cardiomiopatia hipertrófica. (MartijnBos et. Al, 2009) .

Em aproximadamente 30% dos pacientes com CMH, há obstrução da via de saída do VE em repouso, com gradiente sistólico máximo ≥ 30 mmHg, critério adotado para a identificação de formas obstrutivas. Gradientes inferiores a 30 mmHg, que se elevam acima deste nível com manobras provocativas, caracterizam os casos com obstrução latente. Formas não obstrutivas caracterizam-se por gradiente < 30 mmHg tanto em repouso como sob provocação (Gersh BJ, et al. 2011).

A hipertrofia é uma manifestação tardia da doença e também pode ser encontrada em indivíduos com outras doenças que não cardiomiopatia hipertrófica, como a hipertensão e doenças genéticas que levam ao depósito de glicogênio nas fibras musculares (gene PRKAG2).

As manifestações clínicas da CMH surgem algumas vezes tardiamente, e variam de um curso assintomático benigno à insuficiência cardíaca severa e morte súbita (Maron, 1997; Morimoto, 2008), que pode ser a primeira manifestação da doença. (Marian,2010).Os sintomas mais frequentes são angina e dispnéia de esforço podendo surgir ainda palpitações, arritmias e síncope (Marian, 2010; Brito, et al, 2008).

A CMH é a doença cardíaca genética mais comum, afetando 1 em cada 500 indivíduos na população geral (0,2%), e de 0,5% entre os portadores de cardiomiopatias (Maron et al., 1995). É a causa mais comum de MSC em jovens e atletas de alto nível (Marian e Roberts, 2001). Estima-se que a taxa de mortalidade anual dos pacientes com CMH seja de 1-2% (Markoul et al., 2011). Ainda há uma

grande dificuldade em determinar quais indicadores clínicos, como grau de hipertrofia ventricular esquerda, presença de arritmia ventricular e resposta pressórica anormal ao exercício, são mais eficazes em prever MSC. Alguns estudos sugerem ser a hipertrofia do VE marcador prognóstico na doença e observaram que a espessura da parede ventricular ≥ 30 mm estava associada com maior incidência de MSC na CMH (Elliott et al., 2001; Spirito et al., 2000).

2.4.1 Genética na cardiomiopatia hipertrófica

A CMH é causada por mutações nos genes que codificam para proteínas contráteis do sarcômero cardíaco ou seus meios reguladores (Tabela 1). Já foram identificados 33 genes responsáveis pelo desenvolvimento de CMH. Destes, 11 codificam para proteínas do sarcômero cardíaco, com mais de 1000 mutações descritas (Stenson et al., 2009 - HGMD; Ho, 2010A; Santos et al., 2011). Dentre estas, os genes da cadeia pesada da β -miosina (*MYH7*), proteína C ligante de miosina (*MYBPC3*) e troponina T (*TNNT2*) são os mais importantes representando aproximadamente 3/4 de todos os casos (Marian e Roberts, 2001).

A CMH tem padrão de transmissão autossômico dominante em que somente uma cópia mutada do gene é suficiente para causar a doença. A maior parte dos indivíduos afetados é heterozigótica para a mutação.

Diretrizes clínicas recentes para CMH recomendam a análise genética dos 5 genes principais (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *TPM1*) em pacientes (Ackerman et al., 2011). Entretanto, laboratórios nos EUA e em outros centros já oferecem painéis para CMH com uma ampla variedade de genes associados à patologia (<http://www.genetests.org> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr>).

Tabela 1: Genes associados a CMH e suas respectivas proteínas. Para cada gene encontra-se descrito a sua localização cromossômica, frequência nos casos de CMH e mutações descritas. Os genes sarcoméricos estão realçados em cinza. Fonte: Stenson et al., 2009 – HGMD (*Human Gene Mutation Database*) acesso em Junho de 2013.

Nome do gene	Nome da proteína	Localização cromossômica	Frequência	Nº de mutações associadas à CMH
MYH7	Cadeia pesada da β miosina	14q12	~35%	221
MYBPC3	Proteína C de ligação à miosina	11p11.2	~30%	169
TNNT2	Troponina T	1q32	~15%	31
TNNI3	Troponina I	19q13.4	~5%	27
TPM1	α -tropomiosina	15q22.1	~5%	11
MYL2	Cadeia leve regulatória da miosina	12q23-q24.3	<5%	10
MYL3	Cadeia leve essencial da miosina	3p21.3-p21.2	<5%	5
ACTC1	α -actina	15q11-q14	raro	9
TNNC1	Troponina C	3p21.3-p14.3	raro	5
MYH6	Cadeia pesada da α miosina	14q12	raro	2
TTN	Titina	2q31	Raro	2
MYOZ2	Miozenina 2	4q26	Raro	2
CSRP3	Proteína LIM do músculo cardíaco	11p15.1	Raro	7
TCAP	Teletonina	17q12	Raro	5

A investigação genética pode e tem sido usada para triar os pacientes com fenótipo resultante de mutações sarcoméricas, daqueles com outro tipo de hipertrofia cardíaca. A genotipagem também tem sido útil na identificação de portadores de mutações herdadas que ainda não manifestaram a hipertrofia (pré-clínico), contribuindo para a tomadas de condutas preventivas e aconselhamento genético.

A maioria das mutações causadoras de CMH são mutações do tipo *missense*, ou seja, causa a troca de um aminoácido na cadeia polipeptídica, originando uma proteína mutante com déficit de funcionalidade em relação à proteína normal (Cuda et al., 1993; Sata et al., 1996). A identificação de uma mutação sarcomérica descrita como maligna tem sido usada para prognosticar pacientes como de alto risco,

inclusive com risco de MSC. Entretanto, alguns pesquisadores, afirmam que a identificação de uma mutação em genes sarcoméricos não é marcador prognóstico suficientemente preciso em CMH (Ho, 2010B). Embora, a literatura apresente divergências neste ponto, sabe-se que é possível co-existir duas ou mais mutações num mesmo indivíduo no mesmo gene ou em genes diferentes, originando situações de: heterozigose composta – duas mutações no mesmo gene; dupla heterozigose – duas mutações heterozigóticas em dois genes diferentes; ou homozigose – a mesma mutação nos dois alelos para o mesmo gene (Girolami et al, 2010). Publicações recentes tem reportado que 2 ou mais mutações independentes em genes sarcoméricos, possam indicar manifestação severa da doença com grande risco de MSC (Maron et al. 2012B; Ho, 2010B; Kelly e Semsarian, 2009, Girolami et al, 2010; Tsoutsman et al., 2008) .

A gravidade da consequência das mutações depende das alterações que provocam na capacidade funcional das proteínas que codificam e do impacto dessa função no organismo.

As mutações podem ser aleatórias, neutras ou benéficas. Nas primeiras, esses efeitos relacionam-se com a penetrância que pode ser completa ou incompleta e precoce ou tardia) e com a expressividade. Em mutações neutras, o portador não é afetado e nas mutações benéficas, há vantagens evolutivas para o portador (Bertalanffy LV, 1999).

A penetrância de um alelo é dada pela proporção de indivíduos com manifestações da doença, num determinado universo de indivíduos portadores da mutação. Mais especificamente é uma medida quantitativa da frequência com que ocorre um determinado fenótipo, na presença de um genótipo (Bertalanffy LV, 1999).

É completa quando o alelo se exprime em 100% dos portadores e o alelo é não-penetrante quando não se expressa em heterozigose. Já penetrância incompleta ocorre, quando apesar do indivíduo possuir um determinado genótipo, o fenótipo esperado não é desenvolvido (Bertalanffy LV, 1999).

A penetrância também pode ser precoce ou tardia, de acordo com a idade média com que os indivíduos expressem o alelo em causa, podendo a idade de manifestação, variar ao longo das décadas. Além disso, a penetrância pode ser influenciada pela presença de outros genes ou por fatores ambientais, variando, portanto com as famílias (Bertalanffy LV, 1999).

Outro fator de importância para o desenvolvimento do fenótipo é a expressividade variável ou heterogeneidade clínica, quando um mesmo genótipo em diferentes indivíduos, produz diferentes fenótipos, inclusive dentro de uma mesma família (Bertalanffy LV, 1999).

2.4.2 Patogênese da cardiomiopatia hipertrófica

A patogênese da CMH ainda é bastante desconhecida, acredita-se que o desarranjo celular, hipertrofia e aumento da fibrose são secundários e se manifestam devido a perda do desempenho contrátil do sarcômero cardíaco, que para ser compensado, desencadeia a liberação de fatores de crescimento responsivos ao estresse, o que estimula a hipertrofia dos miócitos e a proliferação dos fibroblastos. (Marian e Roberts, 2001).

Estudos genéticos em grupos pré-clínicos têm colaborado para o entendimento da patogênese da CMH. O *déficit* diastólico foi identificado como uma consequência primária das mutações sarcoméricas, antecedendo à hipertrofia do VE (Ho et al., 2002). Em pacientes com a hipertrofia evidente o prejuízo da função diastólica foi mais acentuado. Trabalhos tem reportado anomalias na homeostase do Ca^{+2} intracelular em camundongos a partir de suposta redução dos níveis de Ca^{+2} sarcoplasmáticos como uma das primeiras manifestações das mutações sarcoméricas, antes mesmo das alterações diastólicas e sendo um dos principais mecanismos fisiopatológicos das arritmias cardíacas, responsável pela MSC (Fatkin et al., 2000; Semsarian et al., 2002).

Alterações nas funções bioquímicas do cardiomiócito, como o comprometimento do metabolismo energético e aumento da síntese de colágeno e fibrogênese, também foram detectadas em modelos animais pré-hipertrofia portadores de mutações sarcoméricas (Crilley et al., 2003; Kim et al., 2007). Com a descoberta destes novos fenótipos associados às mutações sarcoméricas, novos alvos terapêuticos podem surgir para prevenir ou alterar o desenvolvimento da doença, reforçando o papel do teste genético na detecção precoce da variantes gênicas da CMH (Ho, 2011).

As alterações a nível mecânico (cinética entre a actina e a miosina), bioquímico (sensibilidade ao Ca^{2+}) e bioenergético (atividade da ATPase da miosina)

promovem a ativação de moléculas sinalizadoras que levam à indução da hipertrofia dos cardiomiócitos e fibrose (Marian, 2010).

A depender da mutação e do gene afetado, diversas e distintas alterações a nível mecânico e bioenergético, podem ser responsáveis pelo fenótipo encontrado na CMH. As mutações no gene que codifica para a BMHC, levam ao aumento da atividade de ATPase, da geração de força e da velocidade de deslizamento da actina. Mutações nos genes que codificam o complexo troponina geram aumento de força e velocidade de deslizamento, por aumento da sensibilidade ao Ca^{2+} . Todas estas alterações tem como consequência a contração descoordenada dos sarcômeros, aumento do consumo de energia pelos cardiomiócitos e alteração do ciclo do Ca^{2+} (Morita *et al*, 2010).

2.4.3 Diagnóstico clínico

O diagnóstico, prognóstico e de acompanhamento da CMH é realizado através de eletrocardiograma, ecocardiograma, *holter* de 24 horas e em alguns casos a ressonância magnética nuclear (RMN) cardíaca, solicitados a um paciente com história familiar de MSC ou com sintomas sugestivos de CMH, entre eles síncope e parada cardiorespiratória revertida (Marian, 2010).

As alterações eletrocardiográficas não são alterações específicas para CMH, porém quando presentes sugerem fortemente a doença. O ecocardiograma transtorácico (ECOTT) é amplamente utilizado, sendo bastante útil na detecção da hipertrofia, do tipo de hipertrofia, do gradiente de via de saída de VE e recentemente a avaliação do *strain* (análise do grau de deformação do músculo cardíaco), como forma precoce de avaliação da CMH (Elliott *et al.*, 2001).

O *holter* 24 horas não fornece dados diagnósticos, porém pode fornecer dados prognósticos naqueles com diagnóstico já estabelecido, quando identifica a presença de taquicardias ventriculares. A RMN cardíaca, mesmo naqueles pacientes sem hipertrofia evidentes ao ECOTT, pode demonstrar hipertrofia ventricular e áreas de realce tardio, compatíveis com fibrose, sendo útil não só no diagnóstico, como também na estratificação de risco de MSC nesses pacientes (Briasoulis *et al*, 2015).

2.4.4 Relação genótipo x fenótipo

Devido a grande heterogeneidade e expressividade genética e clínica, a correlação de genótipo-fenótipo ainda é bastante controversa. Mutações no gene *MYH7* estão relacionadas à manifestação mais precoce e mais severa da doença (Ho, 2010A). Enquanto mutações no gene *MYBPC3* apresentam maior variabilidade de expressão, sendo nesse gene a maior frequência de mutações múltiplas (Ho, 2010A, Morita *et al*, 2010). Já mutações no gene *TNNT2* podem estar mais relacionadas a um maior risco de MSC e com hipertrofia de VE moderada (Ho, 2010A).

2.4.5 Custo efetividade da análise genética

Um estudo que analisou o custo efetividade da análise genética em pacientes com CMH, demonstrou ser esta uma abordagem custo-efetiva, tendo em vista que parentes com resultado genético negativo, poderiam ser dispensados de outras avaliações clínicas, além de possibilitar o diagnóstico precoce de indivíduos de risco, diminuindo o custo da triagem e favorecendo um acompanhamento precoce de pacientes com potencial para desenvolvimento da doença, sendo orientados a evitar fatores de risco, encorajados a hábitos de vida saudáveis e desencorajados a seguirem carreiras atléticas (Wordsworth S, 2010). As diretrizes americanas e europeias recomendam como classe I (um) de indicação, a triagem genética de todos os familiares de primeiro grau de pacientes com diagnóstico de CMH (Elliot *et al*, 2014, Gersh *et al*, 2011).

Esta dissertação tem por objetivo contribuir para a compreensão da patogênese da CMH, através da análise e correlação das características clínicas (fenótipo) e genéticas de famílias afetadas. Com isto, este trabalho contribui também para a consolidação do papel do diagnóstico molecular deste distúrbio genético na conduta terapêutica e acompanhamento familiar.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Compreender a patogênese da CMH, através da análise e correlação das características clínicas (fenótipo) e genéticas de famílias afetadas.

3.2 Objetivo secundário

- a) Caracterizar fenotípica e geneticamente pacientes (probandos) com CMH, analisando os três principais genes sarcoméricos associados à esta patologia.
- b) Realizar o rastreamento genético e clínico em cascata dos familiares do probando com genótipo positivo.
- c) Classificar as mutações encontradas quanto a sua patogenicidade por ferramentas de análise *in silico*.
- d) Análise da estratificação de risco de morte súbita cardíaca nas famílias estudadas.
- e) Contribuir para o estabelecimento do serviço de diagnóstico genético de cardiomiopatia hipertrófica no Instituto Nacional de Cardiologia através do estudo de famílias e correlação genótipo-fenótipo.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Estudo observacional transversal de série de casos.

4.2 População

Os probandos com diagnóstico clínico definitivo ou provável de cardiomiopatia hipertrófica definido no ambulatório de miocardiopatia do Instituto Nacional de Cardiologia (INC) ou para lá referenciados foram submetidos à análise genética como parte dos critérios de diagnóstico de rotina de cardiomiopatias hereditárias no Laboratório de Biologia e Diagnósticos Moleculares (LBDMol). O diagnóstico molecular é realizado mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo CEP-INC em 26 de junho de 2014 (ANEXO 2). Os resultados da análise genética ficam armazenados no banco de dados do laboratório.

Foram selecionadas duas famílias para inclusão na pesquisa a partir do genótipo do probando. Os probandos e seus familiares foram convidados a participar do estudo mediante assinatura do TCLE para a pesquisa clínica (ANEXO 1). Os TCLE foram obtidos pelas Dr. Julianny Freitas Rafael, Ana Luiza Sales e Fernando Cruz Filho durante entrevista com cada participante.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

4.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com critérios diagnósticos de cardiomiopatia hipertrófica pelo ecocardiograma ou ressonância magnética e com alteração genética identificada na análise molecular realizada no Laboratório de Biologia e Diagnósticos Moleculares do INC.
- Pacientes que concordarem em participar do estudo.
- Parentes dos pacientes participantes do estudo.

- Famílias com maior número de voluntários e com facilidade de acesso pelos pesquisadores.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes portadores de CMH que já participem de outro estudo
- Probandos cujos familiares foram de difícil acesso.

4.4 Heredograma

Todos os participantes foram submetidos à anamnese, através da qual se obteve a história familiar para construção do heredograma (árvore genealógica) das três famílias. Foram incluídos o maior número de gerações possíveis e os dados obtidos foram verificados através do cruzamento de informações entre os familiares. Foram representados todos os indivíduos possíveis da família, incluindo os mortos, natimortos e recém natos.

4.5 Exames Clínicos

Foram solicitados a todos os participantes eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma transtorácico (ECOTT). Àqueles com diagnóstico de CMH, foi solicitado também *holter* de 24 horas. Estes exames foram realizados nos setores específicos para os mesmos, dentro do INC. A RMN foi indicada para casos específicos e realizada em colaboração com a Casa de Saúde São José. Através da análise destes exames foi construído um perfil clínico para cada participante.

4.5.1 – Eletrocardiograma de superfície (ECG)

Foi realizado eletrocardiograma simples de doze derivações (DI, DII, DIII, aVL, aVF, aVR, V1, V2, V3, V4, V5, V6). A presença de sobrecarga ventricular esquerda foi definida pelos seguintes critérios: **Sokolow-Lyon** - voltagem da onda S em V1 + voltagem da onda R em V5 ou V6 ≥ 35 mm; **Cornell** – voltagem da onda R em aVL + voltagem da onda S em V3 >28 mm homens, >20 mm mulheres, onda R em aVL > 11 mm; **Escala Romhilt-Estes**(escore de pontos) – 1) Critérios de

voltagem (onda R ou S em derivações periféricas $>20\text{mm}$; onda S em V1 ou V2 $\geq 30\text{mm}$, onda R em V5 ou V6 $\geq 30\text{mm}$, valendo 3 pontos); 2) Alterações do segmento ST (ST-T oposto ao complexo QRS sem digitálico, valendo 3 pontos; ST-T oposto ao complexo QRS com digitálico, valendo 1 ponto); 3) Alterações da onda P (negatividade final da onda P em V1 $\geq 1\text{ mV}$ de profundidade ou $\geq 40\text{mseg}$ de duração, valendo 3 pontos - índice de Morris) 4) Outras alterações (rotação do eixo cardíaco para a esquerda, valendo 2 pontos; deflexão intrinsecóide em V5 ou V6 $> 0,05\text{seg}$, valendo 1 ponto; ou duração do QRS $\geq 0,09\text{seg}$, valendo 1 ponto). Pontuação ≥ 5 da Escala Romhilt-Estesé compatível com sobrecarga ventricular esquerda. O indivíduo que preencheu pelo menos um dos critérios citados acima (**Sokolow-Lyon**, **Cornell** ou **Escala Romhilt-Estes**), foi considerado como portador de sobrecarga ventricular esquerda pelo ECG. A sobrecarga atrial foi avaliada pelos seguintes critérios: onda P em DII com duração de 0,12 s ou mais; onda P com entalhe, bimodal, no qual os dois picos estão separados por mais de 0,04 s; componente terminal de P em V1 com duração $> 0,04\text{ s}$ e amplitude $> 1\text{ mm}$, ou seja, área da fase negativa terminal da P em V1, $\geq 0,04\text{mms}$ (índice de Morris); eixo elétrico de P acima de 30 graus; relação entre a duração da onda P e do seguimento P-R (P/PRs) em DII >6 (índice de Macruz). Preenchendo um desses critérios foi considerada sobrecarga atrial esquerda. Na CMH além dos critérios acima citados podem estar presentes ondas T invertidas e gigantes nas derivações precordiais e/ou ondas Q proeminentes nas derivações inferiores (DII, DIII e AVF) que ocorrem em 20 a 50% dos pacientes e são atribuídas a hipertrofia septal.

Os ECGs foram analisados por um profissional treinado e experiente na área.

4.5.2 – Ecocardiograma Transtorácico (ECOTT)

Foi utilizado o equipamento GE® E9, com transdutor multifrequencial, dotado de segunda harmônica e *doppler* tecidual, disponível no setor de ecocardiografia do INC. Todos os procedimentos foram conduzidos pelo mesmo examinador, com experiência de 10 anos de realização de exames. Os pacientes foram examinados em decúbito lateral esquerdo e os traçados registrados em expiração não forçada. Todas as medidas foram efetuadas durante a realização do ecocardiograma, na sequência já estabelecida pelo serviço.

Foram avaliadas as seguintes medidas baseadas nas recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia: diâmetro máximo do átrio esquerdo (AE); diâmetro diastólico interno do ventrículo esquerdo (DDVE); diâmetro sistólico interno do ventrículo esquerdo (DSVE); espessura diastólica do septo interventricular (SIV); espessura diastólica da parede posterior do VE (PP). Para o cálculo dessas medidas foi utilizado o Modo – M do aparelho.

Através do modo bidimensional, as imagens foram obtidas a partir das abordagens clássicas do ecocardiograma: corte para – esternal (eixo longo e eixo curto) e corte apical (quatro câmaras e cinco câmaras), com a angulação necessária para posicionamento adequado do cursor de Modo – M e *Doppler*.

Para avaliação da função diastólica do VE, foi utilizado o *doppler* pulsado com análise do fluxo mitral, velocidade máxima da onda inicial (E); velocidade máxima da onda atrial (A); razão E/A.

Também para detecção de disfunção diastólica do VE, foi utilizado o *doppler* tissular, que avalia as velocidades do miocárdio na sístole e na diástole, normalmente muito inferiores às velocidades dos fluxos. Com orientação através do corte apical quatro câmaras e *doppler* tecidual em cores, a amostra foi posicionada sobre a borda lateral do anel mitral e foram obtidos através do *doppler* pulsado a velocidade máxima longitudinal no início da diástole (Ea); a velocidade máxima longitudinal durante a sístole atrial (Aa) e a razão Ea / Aa.

A detecção de gradiente em via de saída do VE, foi realizada através do *doppler* contínuo que avaliou a velocidade máxima na via de saída do VE, alinhando-se o cursor ao longo dessa via, sendo calculado o gradiente automaticamente através da equação de Bernoulli ($\text{gradiente} = 4 \times V^2$). Para a medida da extensão e da velocidade de deformação segmentar do miocárdio, foi utilizado o *strain* bidimensional, que apresentam grande sensibilidade, mesmo na detecção de alterações subclínicas da função sistólica segmentar .

Associada às medidas, foi analisada a forma do ventrículo esquerdo por identificação visual direta, classificando-a em cardiomiopatia hipertrófica concêntrica, septal ou apical e em forma sigmoidal, curva reversa, apical ou neutra.

Todas as imagens foram gravadas para possíveis reavaliações posteriores.

4.5.3- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN foi empregada nos casos em que nenhuma alteração foi detectada ao ECOTT em indivíduos portadores de genótipo característico.

A RMN foi realizada em colaboração com a Casa de Saúde São José. Todos os pacientes realizaram RMN do coração em aparelho de 1,5 tesla (Essenza, Siemens Medical Systems; Erlangen, Alemanha).

As imagens foram obtidas durante pausas inspiratórias, com sincronização pelo eletrocardiograma. Cine-RM em SSFP - *Steady State Free Precession* foi realizada nos planos quatro câmaras (4ch), três câmaras ou via de saída do VE (VSVE), duas câmaras (2ch) e cine eixo curto do ventrículo esquerdo, com varredura desde o plano valvar mitral até o ápice.

As medidas dos volumes e massa do VE e volumes do VD foram obtidas delineando manualmente os contornos das bordas endocárdicas e epicárdicas do VE, e endocárdica do VD, no eixo curto do coração, tanto em diástole como em sístole. Os volumes cavitários do VE e VD e a massa do VE foram quantificados pelo método volumétrico. O volume atrial foi quantificado utilizando o método biplanar área-comprimento.

As imagens do realce tardio com gadolínio (RTG), para a avaliação de fibrose miocárdica, foram adquiridas 10 minutos após injeção do contraste na dose de 0,2 mmol/kg, e avaliadas nos eixos longos e curto do coração. RTG foi considerado significativo quando a diferença de intensidade de sinal era maior que 2 desvios padrões acima do restante do miocárdio.

Todas as imagens foram analisadas em softwares específicos por um médico examinador com pelo menos três anos de experiência.

4.5.4 Holter de 24 horas

O *Holter* de 24 horas foi realizado em aparelho disponível no setor de arritmia do hospital (Gravador digital de holter Cardio Flash + ® n registro ANVISA: 10361050009), com análise através do Analisador Cardio Smart (Cardios®), institucional CS 550 versão 5.0, por um único examinador treinado, com larga experiência.

4.6) Análise genética

Foram analisados os três principais genes associados à CMH (*MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2*) nos probandos e, as mutações encontradas foram rastreadas nos familiares.

A análise genética dos participantes foi realizada pelo corpo técnico do Laboratório de Biologia e Diagnósticos Moleculares, através do sequenciamento direto dos genes de interesse. Para tal, o DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico pelo método de *Salting out* (Miller *et al.* 1988) e quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro a 260 nm.

Regiões codificantes dos genes foram amplificadas através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando taq polimerase *hot start*, iniciadores (*primers*) específicos previamente descritos (Cardiogenomics), e outros desenhados por nós, além de temperaturas de anelamento otimizadas para cada reação (Tabelas 2, 3 e 4). O seguinte programa de amplificação foi utilizado para todas as reações: 95°C por 5 min (1 ciclo), 80°C por 30s (1 ciclo), 95°C por 20s, temperatura de anelamento por 30s, 72°C por 1 min (35 ciclos), 72°C por 5 min (1 ciclo). Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 2: Iniciadores utilizados na análise do gene *MYH7*.

Exon	Nome	Sequência	Amplicon ^b	T.A. ^c
3	bMHC 3F	TCTTGACTCTTGAGCATGGTGCTA	381 bp	62°C
	bMHC 3R	TCTGTCCACCCAGGTGTACAGGTG		
4	bMHC 4F	AGGAAGGAGGGAAAGCCCAGGCTG	380 bp	62°C
	bMHC 4R	TCTGCATGCACTCAATCTGAGTAA		
5	bMHC 5F	ATCTTTCTCTAACTCCCAAATCA	398 bp	60°C
	bMHC 5R	ACTCACGTGATCAGGATGGACTGG		
6	bMHC 6F	TGTCACCGTCAACCCTTACAAGTG	394 bp	62°C
	bMHC 6R	GAGGCTGAGTCTATGCCTCGGGG		
7	bMHC 7F	CTTGCTGGTCTCCAGTAGTATTGT	198 bp	62°C
	bMHC 7R	CTGCGGTACAGGACCTTGGAGGGC		
8	bMHC 8F	GCCCTCCAAGGTCCTGTACCGCAG	200 bp	62°C
	bMHC 8R	GTCCAAGTCCCAAGGCCAAGGTCA		
9	bMHC 9F	GACAACTCCTCCCGCTTCGTG	281 bp	62°C
	bMHC 9R	AACAGAGGGAGGGAGGGGAGAG		
10	bMHC 10F	CCTTTTGCTTGCTACATTTATCAT	252 bp	60°C
	bMHC 10R	GCCACAAGCAGAGGGGACCAG		
11	bMHC 11F	CTGCTTCCTCAGGCCATGTGCTGT	284 bp	62°C

	bMHC 11R	ACCAATGGCCAGAGTCTTAGCTCT		
12	bMHC 12F	CACAGGGATTAAGGAGACAAGTTT	273 bp	58°C
	bMHC 12R	TTACAGCTGCCCCAAGAATC		
13	bMHC 13F	AGTCATCTCTTTACCAACTTTGCTA	186 bp	62°C
	bMHC 13R	ATTATCATCTGAAGATGGACCCACC		
14	bMHC 14F	CAAGTTCACTCTTCCCAACAACCCT	258 bp	62°C
	bMHC 14R	ATGTGGGAGCGAGTGAGTGATTGTT		
15	bMHC 15F	ACTCACACCCACTTTCTGACTGCTC	247 bp	62°C
	bMHC 15R	GAATTCAGGTGGTAAGGCCAAAGAG		
16	bMHC 16F	ATAACTGTACTCAGAGCTGAGCCTA	578 bp	62°C
	bMHC 16R	TCCATCCCCTGAGTCTGTAAACCT		
17	bMHC 17F	GCAAATGCCAGCAAGGATGTAAAG	359 bp	58°C
	bMHC 17R	AGAGAAGGGAGATGGGAAGTAA		
18	bMHC 18F	CATCTCTGTGACTTCTCGAATTCT	300 bp	60°C
	bMHC 18R	CACTGTGGTGGTAGGTAGGGAGAT		
19	bMHC 19F	ACAAAGCCAGGATCAGAACCAGGA	323 bp	62°C
	bMHC 19R	GTCCAGAGTCACCCATGCTCTGCA		
20	bMHC 20F	TGGGTATGAGGGTGCACCAGAGCT	330 bp	62°C
	bMHC 20R	GCATCAGAGGAGTCAATGGAAAAG		
21	bMHC 21F	TAGGCTGTTACCCTTCCTAAGGTA	374 bp	62°C
	bMHC 21R	GCCTCTGACCCTGTGACTGCAGTG		
22	bMHC 22F	GGACCTCAGGTAGGAAGGAGGCAG	390 bp	62°C
	bMHC 22R	TGTGCAGGGAGGTGCAGGGTTGTG		
23	bMHC 23F	TCCTATTTGAGTGATGTGCCTCTC	390 bp	62°C
	bMHC 23R	ATGGTCTGAGAGTCCTGATGAGAC		
24	bMHC 24F	AGATGGCACCAAGCTGGTGACCTT	290 bp	62°C
	bMHC 24R	TCTGGGCACAGATAGACATGGCAT		
25	bMHC 25F	GGCAATCTCACAGTCCCCTAATAA	508 bp	60°C
	bMHC 25R	TTTTTGCCAGGGAGGACCATCTAA		
26	bMHC 26F	ACTCTTTACCTGTATCATTACCAT	306 bp	60°C
	bMHC 26R	GCCTCCATGGACACATAATCAGTT		
27 ^a	bMHC 27aF	AGCCGAGAGCCTTTTAGAGCCG	274 bp	64°C
	bMHC 27aR	GTCCCGCCGCATCTTCTGGA		
27 ^a	bMHC 27bF	TCCAGAAGATGCGGCGGGAC	266 bp	64°C
	bMHC 27bR	AGGGGAGGTGGGAGGAGGAAGT		
28	bMHC 28F	TCCCACTTCCCTTCCTCTGCCT	438 bp	56°C
	bMHC 28R	CAGCACTCCTCTCTATCCCCACCT		
29	bMHC 29F	GGTGGGGATAGAGAGGAGTGCTGA	315 bp	64°C
	bMHC 29R	TGTGGCAGGGTTTGGGCTGT		
30	bMHC 30F	GAGAAGGGCAAGGGTGGGGT	422 bp	58°C
	bMHC 30R	CCTGAGAGGAGAAGGAGGTGGG		
31	bMHC 31F	TTGTCCCCATCCACACCCTCCA	469 bp	56°C
	bMHC 31R	GCTCCGACTGCGACTCCTCATACT		
32	bMHC 32F	GCTGAAGAGTGAGCCTTGTCCC	396 bp	56°C
	bMHC 32R	TCCGCTGGAACCCAACTGCT		
33	bMHC 33F	AGTATGAGGAGTCGCAGTCGGA	500 bp	60°C
	bMHC 33R	GGGGATGAGAACAGGGAGCCAA		
34	bMHC 34F	CTGCCCTGTGCCCTGACTGT	500 bp	64°C
	bMHC 34R	CCAGCCTCGGTTCCCTTCACT		

35	bMHC 35F	GTGAAGGGAACCGAGGCTGGC	364 bp	62°C
	bMHC 35R	GTTGGGCAGAGCAGGAAAAGCA		
36	bMHC 36F	TCCGTGCCAACGACGACCTGAA	497 bp	60°C
	bMHC 36R	GTCCTCACACACTTGCTGCCCCA		
37	bMHC 37F	TGGGCAGCAAGTGTGTGAGGA	391 bp	62°C
	bMHC 37R	GGTTGTCACTGTGGCTATGGTGC		
38 e 39	bMHC 38/39F	ACCTTCTATGACTGTGCCATCTTCAC	464 bp	62°C
	bMHC 38/39R	GTTTGAGGGTGTCTGTCTGG		
40	bMHC 40F	ATGCCCTGTCCCTGCCCAATAC	268 bp	60°C
	bMHC 40R	TTTCCACCTCCCCTATGCCAGACC		

a. exon com mais de um par de iniciador

b. tamanho do fragmento amplificado

c. Temperatura de anelamento

Tabela 3: Iniciadores utilizados na análise do gene *MYBPC3*

Exon	Nome	Sequência	Amplicon ^a	T.A. ^b
2	MYBPC 2F	GACCTCAGCTCTCTGGAATTCATC	311 bp	----
	MYBPC 2R	GCTCAGAGGCCACGTCTCGTCAA		
3	MYBPC 3F	GTGCACGCTCCAACCAG	429 bp	65°C
	MYBPC 3R	CAGCAAAGGCAAGAAAAGTGTG		
4	MYBPC 4F	CTGGGACGGGGAGGAGAATGTG	385 bp	62°C
	MYBPC 4R	GCTTTTGAGACCTGCCCTGGAC		
5	MYBPC 5F	GGGCACCTGCGGTCCCAGCTAACT	378 bp	---
	MYBPC 5R	ACGCGGGCTGAGAAGGTGATG		
6	MYBPC 6F	CTACCCCTGGAGCCCCCGATGACC	449 bp	62°C
	MYBPC 6R	TGCCTCCCAGATTCCCCACACC		
7	MYBPC 7F	CTGGAGCTCCTGGTCTTATGTGAT	528 bp	---
	MYBPC 7R	GGAGCCGTGACACCAAGATGATAA		
8	MYBPC 8F	GCTTCTCAAACGGCCCCCTCTG	213 bp	62°C
	MYBPC 8R	AGCTCCGCCCCGCAAATCATCC		
9	MYBPC 9F	GGGCTGGGGATGATTTG	226 bp	63°C
	MYBPC 9R	GGAGGGAGAAAGGGACACTA		
10	MYBPC 10F	AATCTGGCTAGTGTCCCTTTCTCC	322 bp	62°C
	MYBPC 10R	AGCCCTTTAACTCCTTCCACACTG		
11	MYBPC 11F	TCGGCCCAACTGACTTA	389 bp	58°C
	MYBPC 11R	CCCATGGGCCTTTACTT		
12	MYBPC 12F	CGGCTCCCCACGGACAG	405 bp	67°C
	MYBPC 12R	CCCAGGCCAGGCAGGACT		
13	MYBPC 13F	TCCCCAGCCCCTCTTCA	515 bp	62°C
	MYBPC 13R	GCCGGA CTCCGCTCTTT		
14	MYBPC 14F	GGCGGCACAGAGGGGATTG	402 bp	62°C
	MYBPC 14R	ACCGGCAGGAGCAAAAAGGATG		
15	MYBPC 15F	ATCCGGCTGACCGTGGAAT	375 bp	65° C
	MYBPC 15R	CAGTGCGCCCCGTGATAATC		
16	MYBPC 16F	AACACTTCAACGGCCCCCTTCTG	451 bp	62°C
	MYBPC 16R	GCCCCCTCCTCCGATACTTCACAC		
17	MYBPC 17F	CGGACGACGCAGCCTACCACT	366 bp	62°C
	MYBPC 17R	GTCAGCTCCACCCCGTCCTTCA		
18	MYBPC 18F	GGAGGAGGGGGCGCAAGTCAAAT	400 bp	62°C

	MYBPC 18R	GTCAAAGGCCCAAGGTCACAGAGG		
19	MYBPC 19F	ACAGGCACACGTGTTTTTAC	345 bp	61°C
	MYBPC 19R	CAGTCTCCACCTGTCCCATC		
20	MYBPC 20F	AGAATACCAACAAGCCAGGACAAG	402 bp	62°C
	MYBPC 20R	GCGGGAAAGTGAGCAGAACC		
21	MYBPC 21F	TGCCTTTGCCCCCGTGCTACTTG	187 bp	62°C
	MYBPC 21R	GCCCCAGGACCCCCACTTTTGAT		
22	MYBPC 22F	TCCTCCTGGCTCTCCCGTTTCTCT	379 bp	62°C
	MYBPC 22R	GCGCCCCCTCTGCTGCTTCTTC		
23	MYBPC 23F	GCTCCTCTGCTCCCTACTTCC	310 bp	62°C
	MYBPC 23R	ATGGCCATCAGCACACTTCAC		
24	MYBPC 24F	TCGGTGCCACAGAGATGATTTTGA	367 bp	62°C
	MYBPC 24R	GGCTGCCCCCTCTGTGTTCTCCA		
25	MYBPC 25F	CCTGTGGCGGTTAGTTGG	350 bp	62°C
	MYBPC 25R	CACCGGTAGCTCTTCTTCTTCTTG		
26	MYBPC 26F	CCGAGGGAAGGTGGTGTGG	404 bp	62°C
	MYBPC 26R	TCTGTAAAATGCGGCTGAGTATCC		
27	MYBPC 27F	GGAAGTGCCCCCTATGT	457 bp	62° C
	MYBPC 27R	TCGCACTGCTCAAAGAAG		
28	MYBPC 28F	TCAGAGGAGTGGGCAGTGGGAGTG	292 bp	62°C
	MYBPC 28R	CTGGGGTGTCATGGCGGGTCTT		
29	MYBPC 29F	GCCTGGAGTTGCTGTGTTAG	467 bp	62°C
	MYBPC 29R	GGCTGCCCCCTCTTTGGTC		
30	MYBPC 30F	GCGGCCGCGCCCTTGGAGT	356 bp	62°C
	MYBPC 30R	TGGAAAATGTGAGCTGTGGGTTGG		
31	MYBPC 31F	GCATTACAGGCACTTACCAGGTGACG	527 bp	---
	MYBPC 31R	CACGGTGAGGACAGTGAAGGGTAGC		
32	MYBPC 32F	GGCCGCAGCTACCCTTCAC	392 bp	65°C
	MYBPC 32R	GGCCCCTCTCCCTGTTCC		
33	MYBPC 33F	GGCCTCTCGGTACCAAGTCCTGTC	232 bp	65°C
	MYBPC 33R	CAACGTCGGGGCCTGTGAGC		
34	MYBPC 34F	GCAGGGCCATGGTACTCACTCTTG	404 bp	62°C
	MYBPC 34R	CCGCCCGCTCTTCCCATCTC		
35	MYBPC 35F	CACAGTGACATGGCCTCCTCTTCT	159 bp	62°C
	MYBPC 35R	GCCCCTACAGCCTCCCATTACT		

a. tamanho do fragmento amplificado

b. Temperatura de anelamento

Tabela 4: Iniciadores utilizados na análise do gene *TNNT2*

Exon	Nome	Sequência	Amplicon ^a	T.A. ^b
2	TRPNT 2F	ACAGCTCATGAGGGGTGGAATA	376 BP	65°C
	TRPNT 2R	GTGCTCTGCCTGGGATCTACAACC		
3 e 4	TRPNT 3/4F	ATGAGAACGGCAGGCCAGGCTAGTG	506 BP	65°C
	TRPNT 3/4R	GTTTGCCTCAAGACCCGAGCAACC		
5	TRPNT 5F	GTGGCGGGAGGTAGCCGACAGT	403 BP	65° C
	TRPNT 5R	TGGGCAATCAATGGTTGAATCTTA		
6	TRPNT 6F	TTGACCCAGCGCTTCTCTTGTGTC	449 BP	65° C
	TRPNT 6R	ACTGGGTGCCACCAATGCAACTTC		

7	TRPNT 7F	CCAGTGCCGGGAGGGACTCAC	262 BP	65° C
	TRPNT 7R	CAGCCCGTGTCCACTGCACCATAC		
8	TRPNT 8F	GGATCAGGGGCCCTGCCTGTCCTGACA	538 BP	62° C
	TRPNT 8R	TCCTCCTCCTCTTTCTTCTGTTCT		
9	TRPNT 9F	GCCAGGCCCTGCCAGAGGTCTT	494 BP	70° C
	TRPNT 9R	CCCTGGGGGAGGCCTGAAACAG		
10	TRPNT 10F	ACGTCCGTGGAGCTGGTTGAAAGT	373 BP	62° C
	TRPNT 10R	CCCGGCCAATATTGTCTCTTGA		
11	TRPNT 11 F	TGGGAGCTACCCTCTCAGAA	369 BP	60° C
	TRPNT 11 R	CACAGCAGCTGGGAATCTCT		
12	TRPNT 12 F	GTAAACCCGGCTGACTACAG	258 BP	62° C
	TRPNT 12 R	AGCCAGCCCAATCTCTTCAC		
13	TRPNT 13 F	CAGGGGGTTTGGGGAGGGTTAG	402 BP	60° C
	TRPNT 13 R	GTGGGGCACCTGCTCAGTTCTCT		
14	TRPNT 14F	GGAGGGCCCTTTCTTACTGGAC	207 BP	68° C
	TRPNT 14R	CCGGACCCAGTGAACCAGGAGGAG		
15	TRPNT 15F	GCCCCTCCTGACCCTTA	353 BP	62° C
	TRPNT 15R	CGGAGGAGCCAGAGAAGGAAACCT		
16	TRPNT 16F	GGGGGTGAAATGTGGGGCGGAGAA	383 BP	62° C
	TRPNT 16R	GTGTGGGGGCAGGCAGGAGTGGTG		

a. tamanho do fragmento amplificado

b. Temperatura de anelamento

Após a análise eletroforética, os produtos da PCR foram incubados com o reagente ExoSAP-IT (Affymetrix) conforme instruções do fabricante para limpeza da amostra, para só então, serem colocados numa placa de 96 poços com seus respectivos iniciadores a 3,2 μ M. Uma vez plaqueados o produto da PCR com os iniciadores senso e antissenso separadamente, adicionou-se a mistura de reação de sequenciamento do BigDye® Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific), para, então serem levados ao termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific) onde cumpriu-se a seguinte ciclagem: 96°C por 1 min (1 ciclo), 96°C por 15s, 60°C por 15s, 60°C por 4 min (30 ciclos). Após a reação, os produtos gerados foram purificados pelo método de precipitação por etanol/EDTA, descrito no protocolo do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ou utilizando o kit de purificação BigDye® XTerminator (Thermo Fisher Scientific) e, logo, analisadas por eletroforese capilar no analisador genético ABI 3500xL (Thermo Fisher Scientific). As sequências obtidas foram analisadas individualmente com auxílio do *software* Geneious® v.6.1.6 (Biomatters), onde foram comparadas com sequências referência de cada gene obtidas no GenBank (MYH7 - M57965; MYBPC3 - HSU9162; TNNT2 - NG_007556).

4.7) Análise *in silico* das mutações encontradas

A pesquisa das variantes encontradas foi inicialmente feita nos bancos de variantes genéticas em humanos que guardam relação com a saúde, como o CLINVAR e o HGMD (Human Gene Mutation Database). Em seguida, as variantes foram submetidas à análises *in silico* de predição de patogenicidade, principalmente aquelas sem anotação nos bancos pesquisados.

A predição da patogenicidade das mutações foi realizada pelas ferramentas *on line* PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Provean e SIFT (<http://provean.jcvi.org/index.php>). PolyPhen-2 é uma ferramenta que prediz o possível impacto de uma substituição de aminoácidos na estrutura e função de uma proteína humana utilizando considerações físicas e comparativos simples. Foram usadas as sequências P12883 e A5YM48 do banco UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) para a análise dos genes MYH7 e MYBPC3, respectivamente, no PolyPhen-2.; Provean, uma ferramenta de software que prevê se uma substituição de aminoácido tem um impacto sobre a função biológica de uma proteína e SIFT, uma ferramenta que se baseia no grau de conservação de resíduos de aminoácidos em alinhamentos de sequências derivadas de sequências estreitamente relacionadas, recolhidos através de PSI - BLAST para prever se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína.

Além dessas ferramentas, foi utilizado o programa *PredictProtein*, disponível no site www.predictprotein.org/home, para analisar a estrutura das proteínas e os possíveis impactos da substituição dos aminoácidos na estrutura da mesma. A análise das mutações pontuais realizada por esse programa, toma como base a análise do alinhamento de múltiplas sequências, das características estruturais da proteína como sua estrutura secundária e sensibilidade a solventes. Através dessa análise, é gerado um escore que varia de -100 a 100, sendo que o quanto mais positivo é o escore (próximo de 100) mais impacto na estrutura da proteína a substituição de aminoácido provoca e *vice-versa*. Foram utilizadas as sequências P12883 (MYH7) e Q14896 (MYBPC3), disponível no banco UniProtKB.

As alterações encontradas foram classificadas conforme seu potencial patogênico e correlacionadas com o quadro clínico.

4.8) Determinação do escore de risco de morte súbita em pacientes com mutação.

A estratificação de risco foi realizada através da definição de baixo, intermediário ou alto risco, definida pelo modelo de predição de risco individual de morte súbita cardíaca em cinco anos sugerido pela Diretriz europeia de diagnóstico e tratamento de cardiomiopatia hipertrófica da ESC (*European Society of Cardiology*) (Elliot et al. 2014).

Esse escore de risco foi criado através de um estudo multicêntrico europeu realizado em seis centros, com 3675 pacientes e um segmento médio de 5,7 anos. Nesse estudo no qual, 198 pacientes apresentaram morte súbita cardíaca ou parada cardiorrespiratória revertida, foram identificados oito preditores que foram incluídos no modelo final do escore: idade, espessura máxima da parede do ventrículo esquerdo, diâmetro do átrio esquerdo, diâmetro do ventrículo esquerdo, gradiente da via de saída de VE, história familiar de MSC, taquicardia ventricular não sustentada e síncope inexplicada.

Foi utilizado o preditor desenvolvido nesse estudo, disponível no site <http://doc2do.com/hcm/webHCM.html> (figura 8).

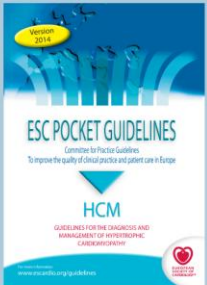
Não são submetidos a esse escore: indivíduos com idade menor que 16 anos, atletas de elite, doenças metabólicas associadas a hipertrofia ventricular ou síndromes, paciente com história prévia de morte súbita cardíaca abortada ou arritmia ventricular sustentada que devam ser tratadas com CDI para prevenção secundária. Deve ser empregado com cuidado em pacientes que foram submetidos a miectomia ou alcoolização e depende de mais estudos em pacientes com espessura de parede maiores ou iguais a 3,5cm.

Pacientes que possuem risco de MSC em cinco anos menor do que 4% são considerados de baixo risco. Aqueles que possuem risco entre 4 a 6%, são considerados de risco intermediário e aqueles com risco maior do que 6% em cinco anos são considerados como de alto risco.



**EUROPEAN
SOCIETY OF
CARDIOLOGY®**

HCM Risk-SCD Calculator



Age **Years**

Maximum LV wall thickness **mm**

Left atrial size **mm**

Max LVOT gradient **mmHg**

Family History of SCD ☐ No ☐ Yes

Non-sustained VT ☐ No ☐ Yes

Unexplained syncope ☐ No ☐ Yes

Age at evaluation

Transthoracic Echocardiographic measurement

Left atrial diameter determined by M-Mode or 2D echocardiography in the parasternal long axis plane at time of evaluation

The maximum LV outflow gradient determined at rest and with Valsalva provocation (irrespective of concurrent medical treatment) using pulsed and continuous wave Doppler from the apical three and five chamber views. Peak outflow tract gradients should be determined using the modified Bernoulli equation: Gradient= 4V², where V is the peak aortic outflow velocity

History of sudden cardiac death in 1 or more first degree relatives under 40 years of age or SCD in a first degree relative with confirmed HCM at any age (post or ante-mortem diagnosis).

3 consecutive ventricular beats at a rate of 120 beats per minute and <30s in duration on Holter monitoring (minimum duration 24 hours) at or prior to evaluation.

History of unexplained syncope at or prior to evaluation.

Risk of SCD at 5 years (%):

ESC recommendation:

2014 ESC Guidelines on Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy (Eur Heart J 2014 – doi:10.1093/eurheartj/ehu284)

O'Mahony C et al Eur Heart J (2014) 35 (30): 2010-2020

Figura 8. Preditor para escore de risco de morte súbita cardíaca em 5 anos.

5. RESULTADOS

O banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular é composto atualmente por 112 probandos encaminhados para análise genética. Destes 22 probandos foram submetidos a análise genética dos genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2*, sendo identificados 7 probandos com mutação no gene *MYH7*, 7 probandos com mutação no gene *MYBPC3* e mais dois probandos com dupla mutação nos genes *MYH7* e *MYBPC3*.

Destes, foram selecionados 2 probandos para participarem do estudo a partir dos critérios de inclusão: um com uma mutação em *MYH7* (Família A), outro com mutação no gene *MYBPC3* (Família B) (Figura 9).

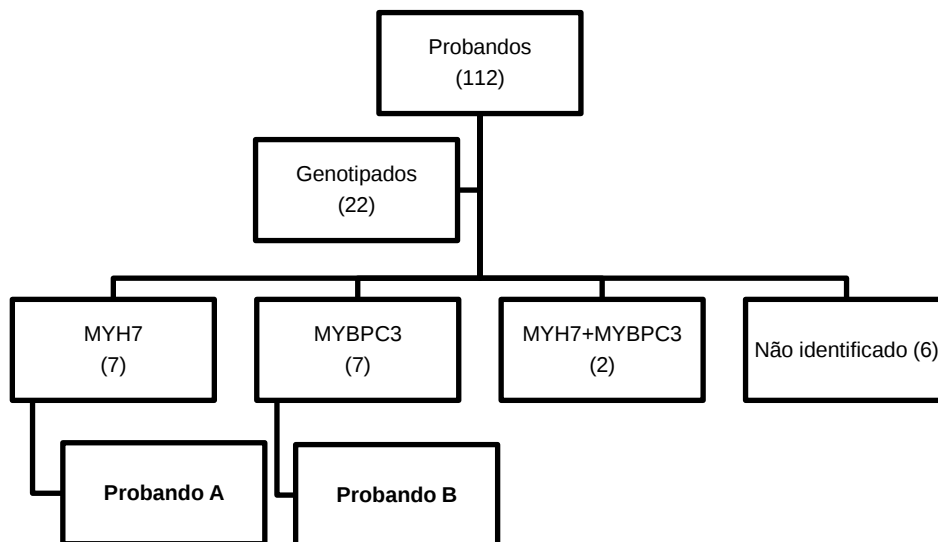


Figura 9. Algoritmo de seleção dos probandos

5.1 Família A

A probanda da família A (**III.17** na figura 6) é uma paciente do sexo feminino, com 39 anos, portadora de CMH diagnosticada após uma parada cardiorrespiratória revertida, que a deixou com sequelas motoras e indicou o implante de CDI como profilaxia secundária de MSC, assintomática antes do primeiro episódio.

A probanda, três anos após o implante do CDI apresentou nova parada cardíaca em fibrilação ventricular, recebendo choque apropriado do desfibrilador, porém evoluiu com assistolia e óbito. A análise genética identificou a mutação c.1357C>T em heterozigose no gene *MYH7* que causa a alteração Arg453Cys na cadeia pesada da β -miosina (Figura 10).

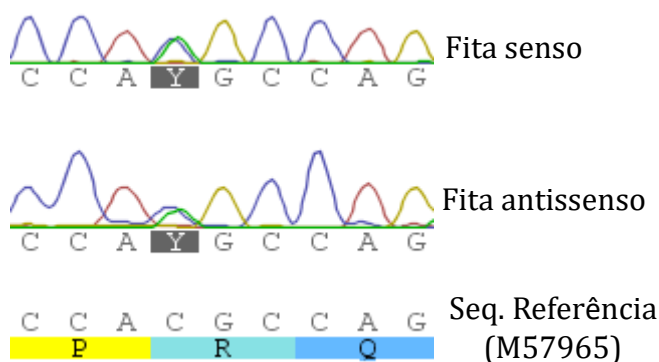


Figura 10. Identificação da mutação c.1357C>T (p.Arg453Cys) no gene *MYH7*.

O ECG era normal, sem sinais de sobrecarga ventricular ou atrial esquerda. Ao ECOTT foi visualizada hipertrofia septal assimétrica tipo curva reversa com septo interventricular medindo 1,47 cm, função sistólica de VE preservada, com fração de ejeção de VE de 55%, sem alteração na contratilidade segmentar, disfunção diastólica tipo II, com gradiente máximo de VE / Aorta de 25,09 mmHg, sem movimento sistólico anterior da válvula mitral, sem obstrução do trato de saída de VE. AE aumentado, medindo 5,57 cm (Figura 11). O *holter* de 24 horas era normal, sem arritmias ventriculares documentadas.

Não se aplica o escore de risco para essa paciente em questão pois a mesma já apresentou um episódio de MSC, o que já indica CDI para profilaxia secundária.

Porém se antes do episódio de MSC o escore fosse aplicado, o mesmo seria considerado de baixo risco (3,74%), não sendo indicado implante de CDI.

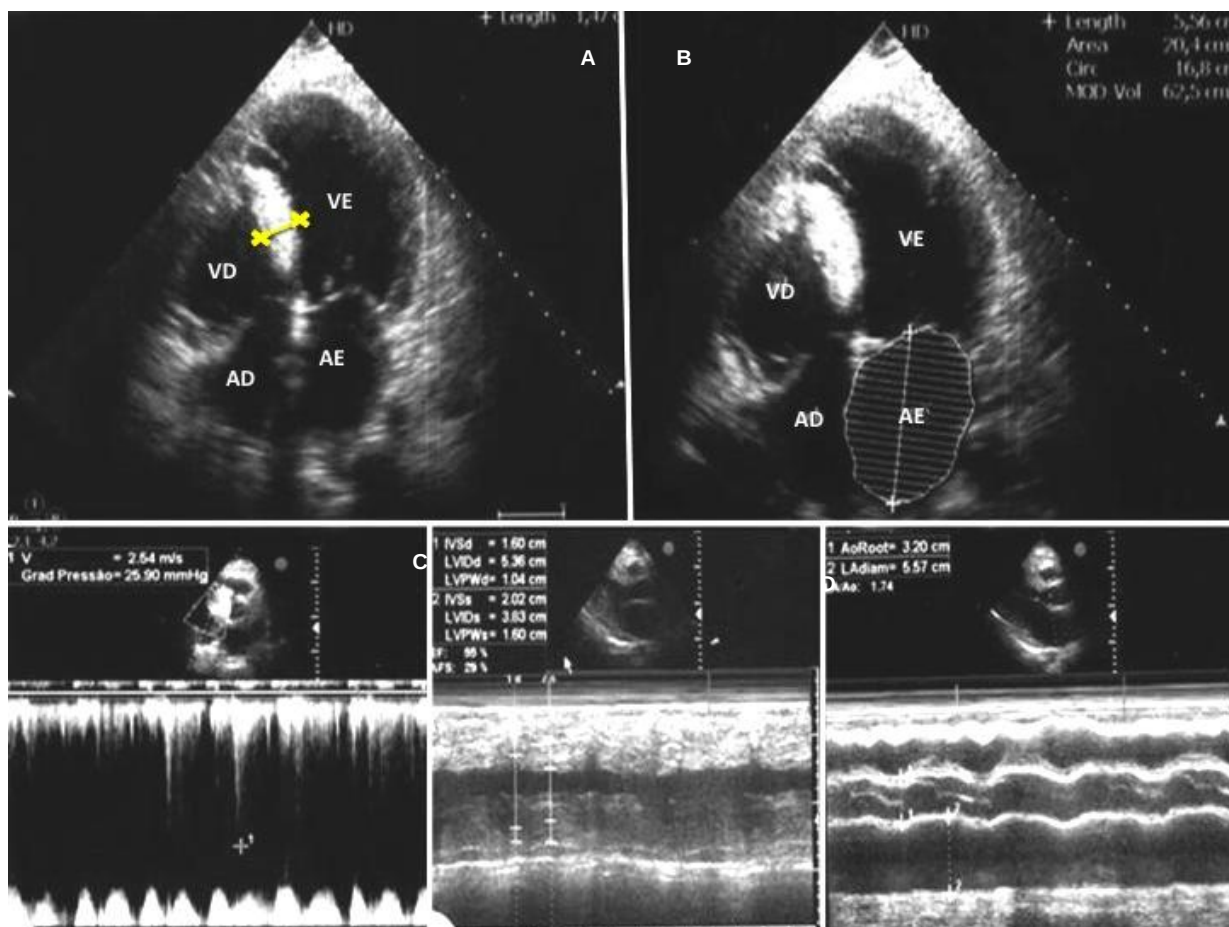


Figura 11. ECOTT, probando família A. **A)** corte apical de quatro câmaras com septo interventricular tipo curva reversa. **B)** corte apical quatro câmaras com aumento de AE. Medida do volume de AE (62,5mL) **C)** Medida do gradiente de via de saída de VE pelo *doppler* contínuo em 25,09 mmHg. **D)** Medida da função de VE pelo modo M, evidenciando a fração de ejeção de VE de 55%. **E)** Medida do tamanho de AE e Ao pelo modo M: AE de 5,57cm e Ao de 3,2cm.

A análise detalhada da história familiar proporcionou a construção do heredograma (Figura 12), no qual se observam duas famílias, unidas por um ancestral comum (**I.2**) totalizando 44 membros, distribuídos em quatro gerações. Desses, 17 indivíduos apresentavam diagnóstico clínico de CMH e oito faleceram em decorrência da doença e um apresentou morte por outras causas. Além dos pacientes com diagnóstico prévio de CMH, foram identificados dois indivíduos jovens, que faleceram em decorrência de MSC, sem diagnóstico prévio de CMH.

O primeiro era um indivíduo do sexo masculino com 19 anos (**IV.1**), que apresentava ECOTT, ECG e *holter* de 24 horas normais e sofreu um evento de MSC durante uma partida de futebol. O laudo da necrópsia evidenciou um VD dilatado, com microscopia demonstrando a presença de hipertrofia de fibras miocárdicas,

pequenas áreas de fibrose miocárdica e degeneração vacuolar das fibras miocárdicas. Já o segundo jovem que veio a óbito era um indivíduo de 12 anos do sexo feminino, que apresentou MSC enquanto caminhava. Ambos os pacientes faleceram antes do estudo, portanto não foi possível a coleta de material para análise genética.

FAMÍLIA A

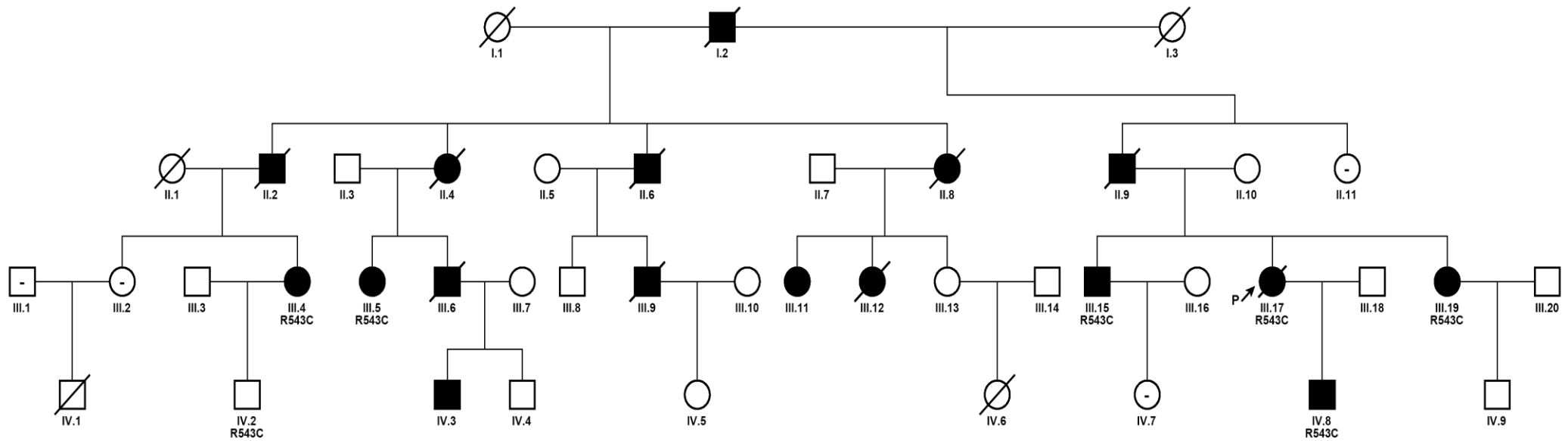


Figura 12. Heredograma da família A. Os símbolos preenchidos em preto mostram os indivíduos com diagnóstico clínico de CMH e os símbolos brancos não possuem CMH. Os símbolos com um traço vertical, mostram os indivíduos que faleceram por todas as causas. O probando está identificado por uma seta (P). Os indivíduos portadores da mutação p.Arg453Cys (R453C) estão identificados e os indivíduos submetidos à análise genética, nos quais não foi encontrada a mutação estão marcados com o sinal (-).

A partir do heredograma, foram selecionados indivíduos com fenótipo de hipertrófica e outros assintomáticos como controle. Foi possível a avaliação clínica e genética de dez familiares, dos quais 4 apresentavam o diagnóstico clínico de CMH e os outros seis eram, até então, assintomáticos.

A análise genética do filho da probanda (**IV.8**), sexo masculino, 17 anos, com história de síncope e portador de CDI, foi positiva para mutação a Arg453Cys. O ECG mostrou sobrecarga atrial e ventricular esquerda, além de inversão de onda T de V3 a V6 (Figura 13) e *holter* de 24 horas normal. O ECOTT evidenciou hipertrofia septal assimétrica tipo curva reversa, com septo interventricular medindo 2,1 cm, maior em sua porção inferior, sem gradiente de via de saída de VE, com discreto movimento sistólico anterior da válvula mitral. Função sistólica de VE preservada, com fração de ejeção de 70%, sem alteração da contratilidade segmentar. Disfunção diastólica tipo I. Com *Strain* -15. Pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP) 42 mmHg. AE medindo 4,2 cm (Figura 14). Escore de risco de MSC em 5 anos alto (10,51%).

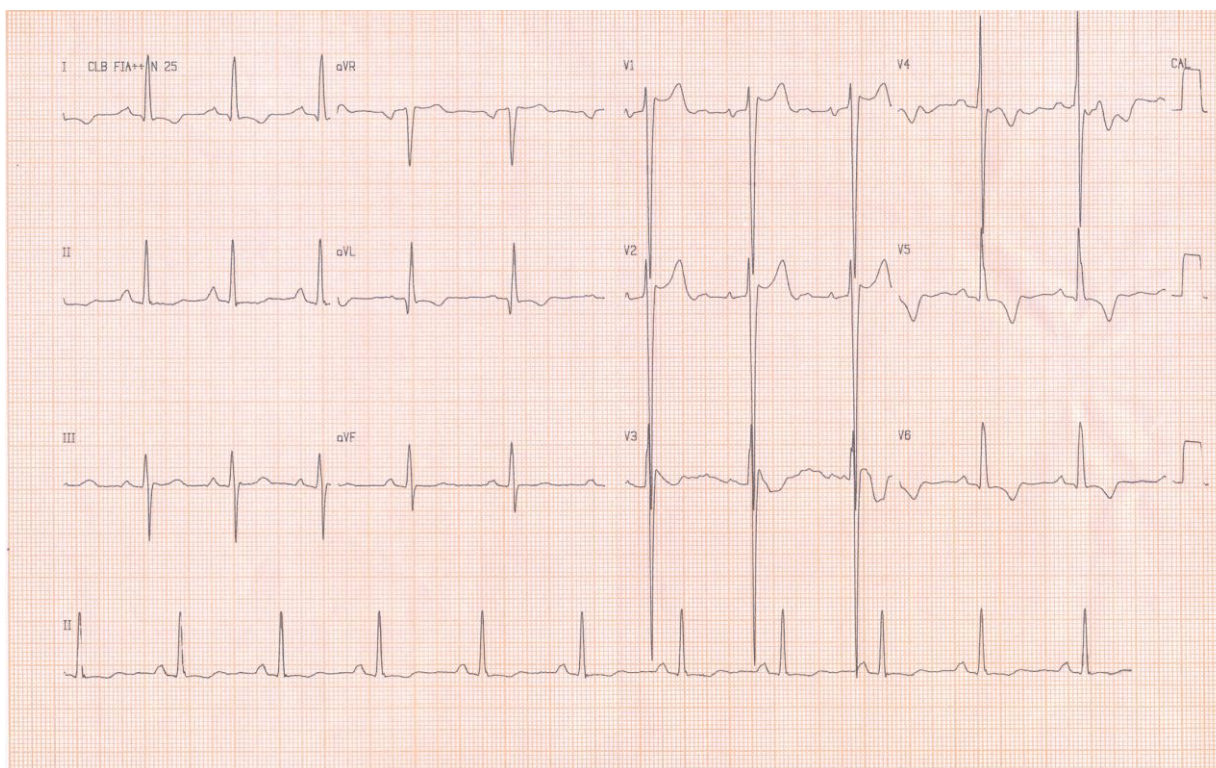


Figura 13. Eletrocardiograma, familiar IV.8, evidenciando sobrecarga atrial e ventricular esquerda com onda T invertida de V3 a V6.

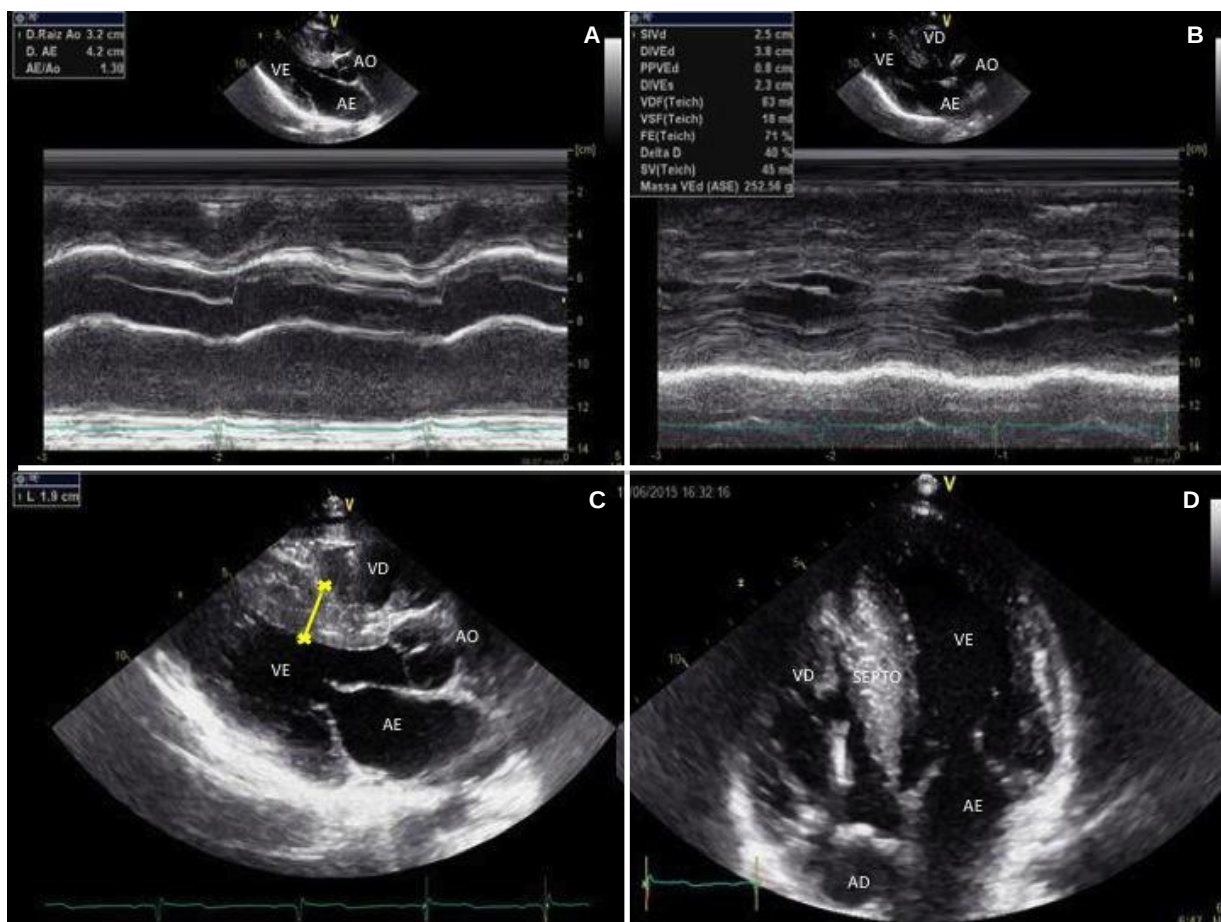


Figura 14. ECOTT familiar IV.8. **A)** Medida do átrio esquerdo (4,2 cm) e raiz da aorta (3,7 cm) pelo modo M. **B)** Medida da fração de ejeção (71%) pelo modo M. **C)** Corte longitudinal com medida do septo interventricular (1,9 cm). **D)** Corte apical quatro câmaras com hipertrofia septal tipo curva reversa.

A análise genética do familiar **II.11**, do sexo feminino, com 59 anos, assintomática, foi negativa para a encontrada na probanda. Seus exames complementares mostram ECG normal, assim como *holter* de 24 horas e ECOTT, com septo interventricular medindo 1,0 cm função sistólica do VE preservada, tamanho de AE normal (2,8 cm) sem evidências de CMH, com *doppler* tissular normal.

A análise genética do familiar **III.2**, do sexo feminino, 45 anos, assintomática, também não identificou a mutação da probanda. ECG, *holter* de 24 horas e ECOTT normais, com função sistólica de VE preservada, átrio esquerdo normal medindo 3,2 cm, septo de 0,8 cm, sem sinais de CMH com *doppler* tissular normal. Contraditoriamente, este familiar é mãe do jovem IV.1 vitimado pela MSC no campo

de futebol. O pai do indivíduo IV.1 (III.1), que também é assintomático, não possui o alelo alterado.

No familiar **III.4**, sexo feminino, 45 anos, apresentou hipertrofia septal assimétrica do tipo curva reversa ao ECOTT com septo interventricular medindo 2,4 cm e movimento sistólico anterior da válvula mitral, com gradiente VE/AO máximo de 8 mmHg e 14 mmHg com manobra de valsalva., Apresentou, também, função sistólica de VE preservada, disfunção diastólica tipo I, sem aumento de AE, medindo 3,6 cm (Figura 15). O alelo contendo a mutação Arg453Cys foi encontrado na análise molecular. Seu ECG foi normal e *holter* de 24 horas sem taquicardia ventricular não sustentada. O escore de risco de MSC em 5 anos calculado foi considerado baixo (3,16%).

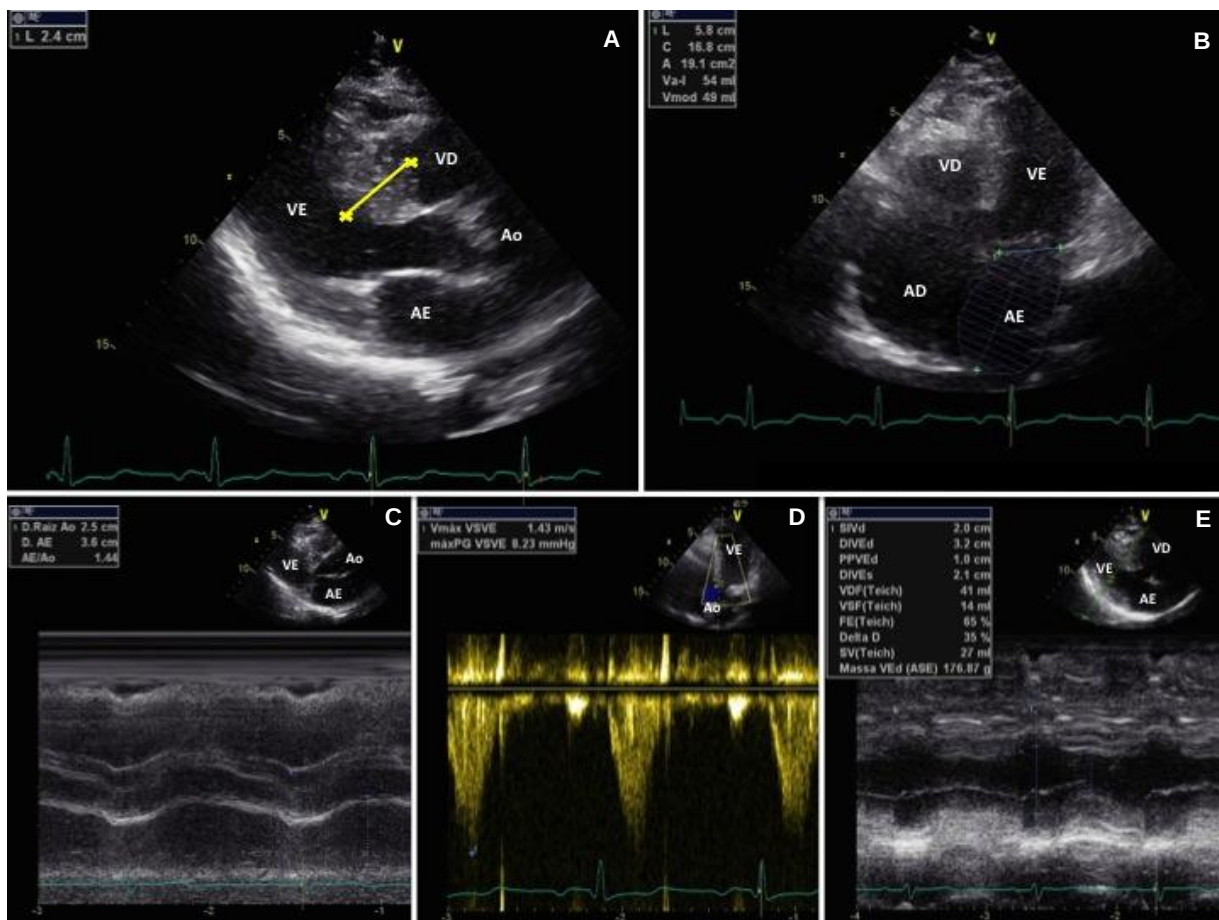


Figura 15. ECOTT familiar III.4. **A)** Corte longitudinal com medida do septo interventricular (2,4 cm). **B)** Corte apical quatro câmaras com medida de volume de átrio esquerdo (54 mL). **C)** Medida do AE (3,6 cm) e raiz da aorta (2,5 cm) pelo modo M **D)** Medida do gradiente de via de saída do VE. **E)** Medida da fração de ejeção (65%) pelo modo M.

A análise genética do indivíduo **IV.2**, sexo masculino, 13 anos, assintomático, revelou a herança do alelo mutante da mãe (III.4). No entanto, o ECG e *holter* de 24 horas foram normais e o ECOTT sem evidência de hipertrofia, com septo interventricular medindo 0,8 cm, sem aumento de AE (3,7 cm). A função sistólica e diastólica do VE também foram normais. O escore de risco não pôde ser calculado pois o indivíduo tem idade inferior a 16 anos.

A familiar **III.5**, sexo feminino, 50 anos, apresentou, recentemente, história de palpitação e lipotímia. Tanto o ECG, quanto o *holter* de 24 horas foram normais. O ECOTT com hipertrofia septal basal e anterior basal, diâmetro máximo de 1,4 cm, sem gradiente de via de saída do VE, sem movimento sistólico anterior da válvula mitral. A função sistólica do VE estava preservada, sem alteração segmentar, o AE media 5,2 cm e o *strain* global, -22,6%. Foi detectada disfunção diastólica grau I e o diagnóstico molecular confirmou a mutação p.Arg453Cys (Figura 16). O escore de risco calculado foi considerado baixo (2,58%).

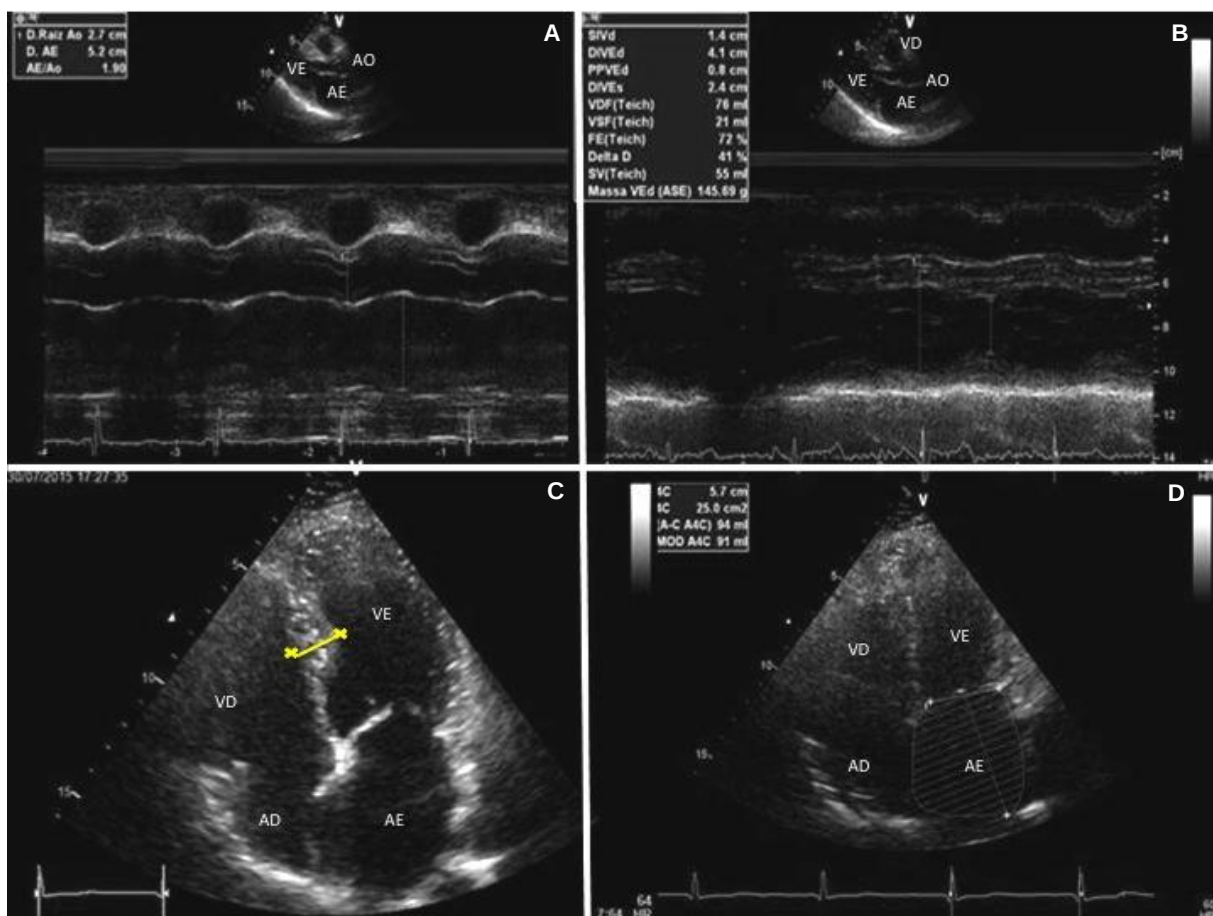


Figura 16.. ECOTT familiar III.5. **A)** Medida do átrio esquerdo (5,2 cm) e raiz da aorta (2,7 cm) pelo modo M. **B)** Medida da fração de ejeção (72%) pelo modo M. **C)** Corte apical quatro câmaras com

hipertrofia septal tipo curva reversa. **D)** Corte apical quatro câmaras com medida de volume de AE (91 mL).

No familiar **III.15**, sexo masculino 41 anos, portador de CDI por profilaxia primária, foi identificada a mutação p.Arg453Cys. O ECG não apresenta evidências de sobrecarga atrial e de VE, com onda T invertida em parede lateral (Figura 17). ECOTT evidenciando hipertrofia septal assimétrica tipo curva reversa, com predomínio em septo inferior (1,4 cm), sem sinais de obstrução de via de saída de VE em repouso. Função sistólica de VE preservada com fração de ejeção de 56% e disfunção diastólica de VE tipo I. *Strain* -15,4. PSAP 34 mmHg. Aumento atrial esquerdo medindo 5,5 cm (Figura 18). *Holter* 24 horas com episódios de taquicardia ventricular não sustentada. Risco calculado de MSC em 5 anos alto (8,89%).

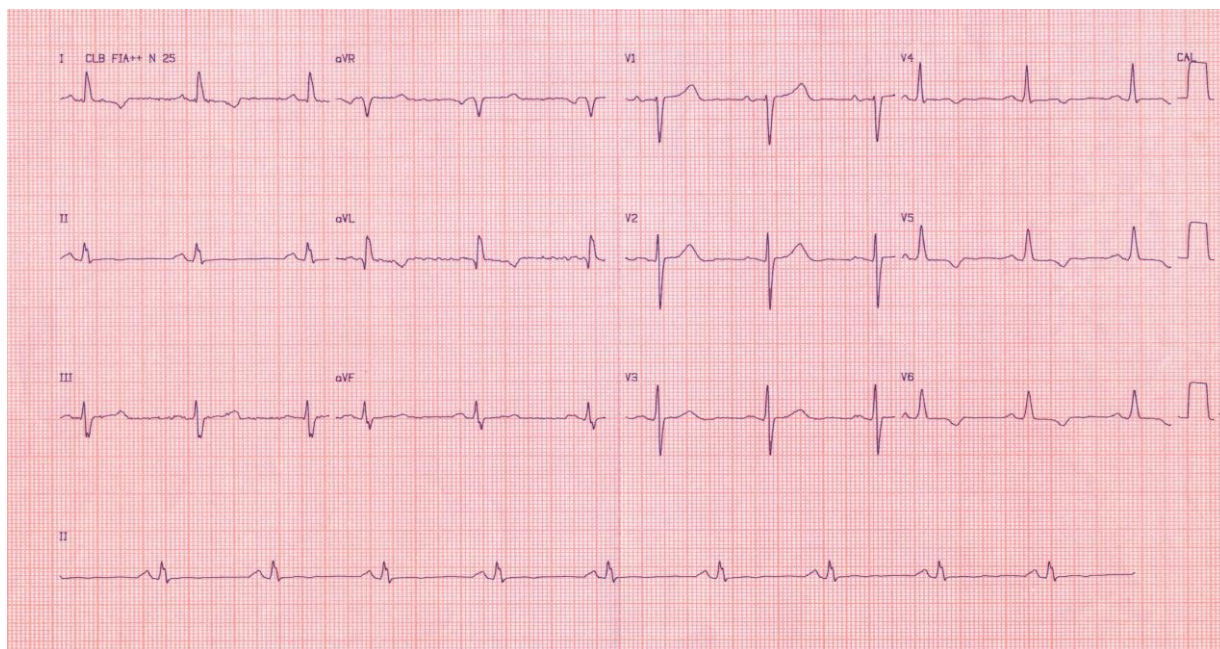


Figura 17. Eletrocardiograma do familiar III.15, evidenciando onda T invertida de V4 e V6.

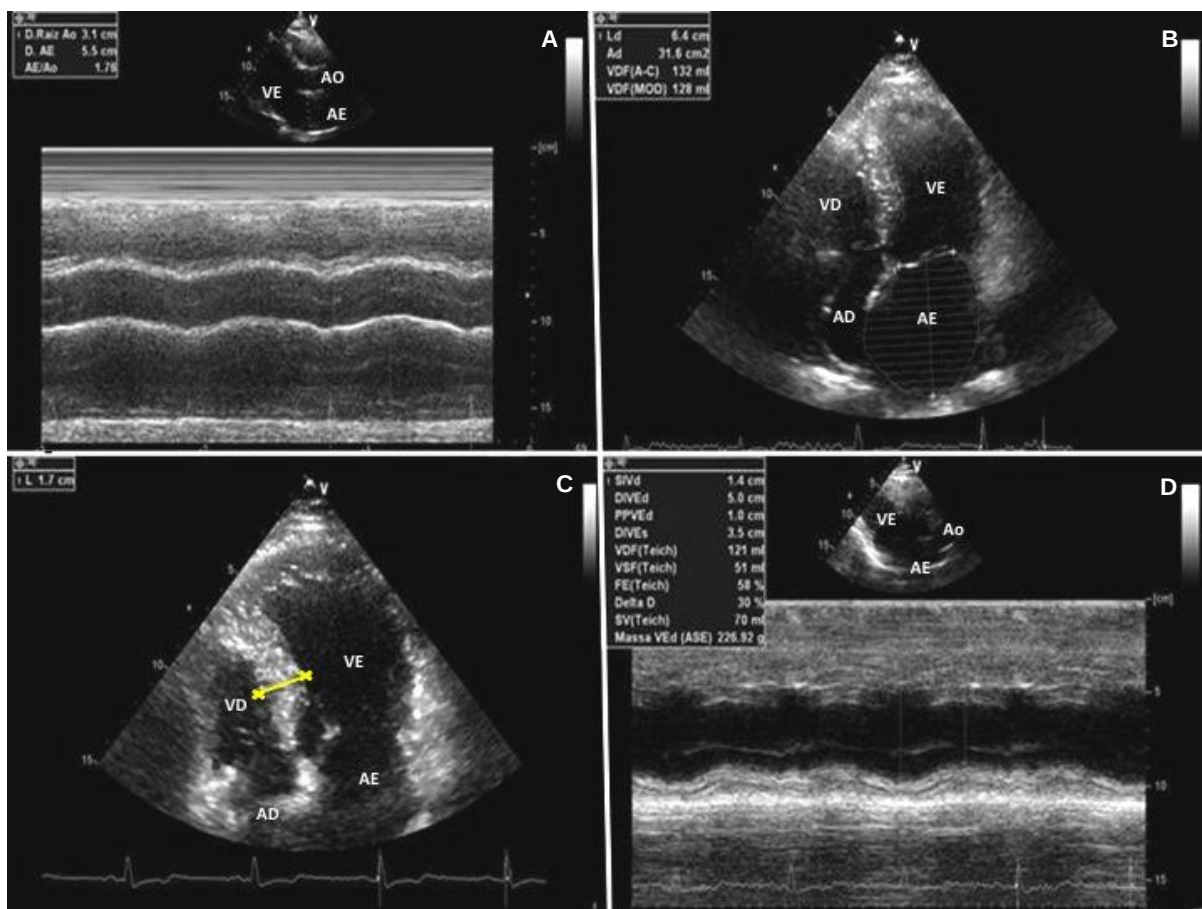


Figura 18. ECOTT, familiar III.15. **A)** Medida do AE (5,5 cm) e raiz da aorta (3,1 cm) pelo modo M. **B)** Corte apical quatro câmaras com medida de volume de AE (128ml). **C)** Corte apical quatro câmaras com hipertrofia septal tipo curva reversa e medida do septo interventricular (1,7 cm). **D)** Medida da fração de ejeção (58%) pelo modo M.

Já o indivíduo **IV.7**, sexo feminino, 2 anos de idade, ECG, *holter* de 24 horas e ECOTT normais não herdou o alelo mutante do pai (III.15).

O familiar **III.19**, é um indivíduo do sexo feminino, 28 anos, inicialmente assintomática com ECG e *holter* de 24 horas normais, cuja análise genética foi positiva para mutação p.Arg453Cys. O ECOTT mostrou hipertrofia da parede antero-lateral do VE medindo 1,6 cm e afinamento do septo anterior basal (possível comunicação interventricular muscular fechada ou com mínimo *shunt*). Função sistólica do VE preservada e função diastólica do VE normal. Sem aumento de AE (3,7 cm) e sem gradiente de via de saída de VE (Figura 19). Escore de risco baixo, calculado de 2,99%.

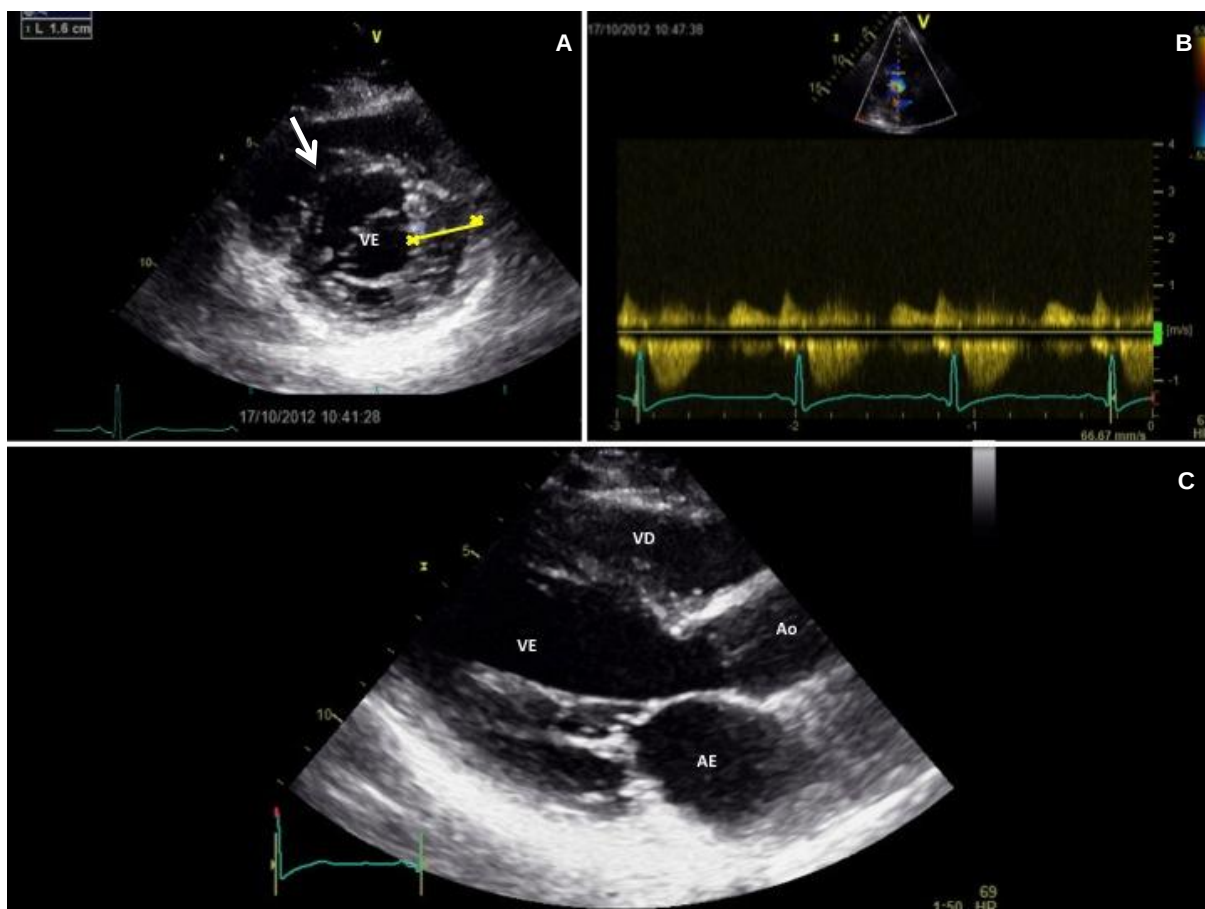


Figura 19. ECOTT, familiar III.19. **A)** Corte subcostal transversal com hipertrofia em parede antero-lateral, (linha amarela) medindo 1,6 cm e afinamento (seta) do septo anterior basal (0,5 cm). **B)** Medida do gradiente de via de saída do VE. **C)** Corte longitudinal hipertrofia lateral e ausência de hipertrofia septal.

Os dados epidemiológicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de escore de risco de morte súbita em cinco anos, se encontram na tabela 5.

Tabela 5: Dados epidemiológicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de escore de risco de MSC em cinco anos, família A.

Dados Epidemiológicos							Dados Eletrocardiográficos							Dados Ecocardiográficos							Escore	
Id	Idade do Exame	Sexo	CMH	Mutação encontrada	Óbito pela Dç	Idade do Óbito	PCR	Síncope	CDI	Sobrecarga de AE	Sobrecarga de VE	Onda T invertida	HVE	Tipo de HVE	Forma da HVE	Espessura da parede (cm)	Gradiente VE/Ao (mmHg)	DSVE	DDVE	MSAM	Tamanho de AE (cm)	Escore de Risco (%)
							Abortada															
II.11	67	F	Não	Não	-	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	0,9	Não	Não	Não	Não	2,8	-
III.2	47	F	Não	Não	-	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	0,8	Não	Não	Não	Não	3,2	-
III.4	43	F	Sim	Arg453Cys	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Septal	Curva reversa	2,4	14	Não	Tipo I	Não	3,6	3,16
III.5	50	F	Sim	Arg453Cys	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Septal	Curva Reversa	1,4	Não	Não	Não	Não	5,2	2,58
III.15	38	M	Sim	Arg453Cys	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Septal	Curva Reversa	1,7	Não	Não	Tipo I	Não	5,5	8,89
III.17	39	F	Sim	Arg453Cys	Sim	43	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Septal	Curva Reversa	1,47	Não	Não	Tipo II	Não	5,57	(*)
III.19	27	F	Sim	Arg453Cys	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Antero-lateral	-	1,6	Não	Não	Não	Não	3,7	2,99
IV.2	13	M	Não	Arg453Cys	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	0,8	Não	Não	Não	Não	3,7	-
IV.7	3	F	Não	Não	Não	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	0,8	Não	Não	Não	Não	2,7	-
IV.8	15	M	Sim	Arg453Cys	Não	-	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Septal	Curva reversa	2,1	Não	Não	Tipo I	Sim	4,2	10,56

(Dg) Diagnóstico; (PCR) parada cardiorespiratória; (Dç) Doença; (CDI) cardiodesfibrilador implantável; (CMH) cardiomiopatia hipertrófica. (-) Não avaliado/ Não foi possível avaliar; (Id) Identificação, (AE) Átrio esquerdo; (VE) Ventrículo esquerdo, (VE/Ao) ventrículo esquerdo/ aorta; (DSVE) Disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; (DDVE) Disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, avaliado (*) possui CDI por prevenção secundária. * Não há dados do familiar IV.3, há informação por parte da família de que o mesmo é portador de CMH diagnosticada pelo ECOTT. porém não conseguimos contato com o mesmo para a realização dos nossos exames.

Dos 11 indivíduos genotipados, 7 possuíam o alelo mutante p.Arg453Cys.. Destes, seis manifestavam clinicamente a doença e 1 não possuía fenótipo para CMH. Todos os quatro pacientes negativos, não apresentavam evidências de hipertrofia. A faixa etária média dos indivíduos portadores de CMH avaliados de estudo foi de 35,3 anos e o único indivíduo positivo para a mutação sem fenótipo possuía 13 anos de idade.

Quanto aos critérios eletrocardiográficos, dois indivíduos portadores do alelo mutante apresentavam alteração, sendo um deles (18 anos) com sobrecarga atrial, ventricular e inversão de onda T e o outro (45 anos) somente com inversão de onda T sem sinais de sobrecarga ao ECG.

Quanto aos critérios ecocardiográficos, dos seis indivíduos com CMH, cinco possuíam hipertrofia septal assimétrica, sendo todos do tipo curva reversa com média de espessura septal de 1,81 cm e um indivíduo possuía septo medindo 1,0 cm, porém com hipertrofia antero-lateral, com 1,6 cm de espessura de parede. Nenhum indivíduo apresentava CMH de caráter obstrutivo. A média do diâmetro atrial esquerdo foi de 4,62 cm e dos seis pacientes com CMH ao ECOTT, três possuíam disfunção diastólica tipo I e um disfunção diastólica tipo II.

Dois indivíduos com CMH possuíam escores de risco de MSC altos, os quais foram indicados CDI, ambos parentes diretos da probanda, que apesar de possuir CDI para prevenção de morte súbita secundária, evoluiu com fibrilação ventricular, recebendo choque apropriado pelo CDI, porém com saída de fibrilação ventricular em atividade elétrica sem pulso, sem reversão após manobras de ressuscitação, sendo constatado o óbito (Figura 20). Três indivíduos possuem risco de MSC calculada como baixo. Estes até o momento não apresentaram eventos ou foram indicados para implante de CDI.

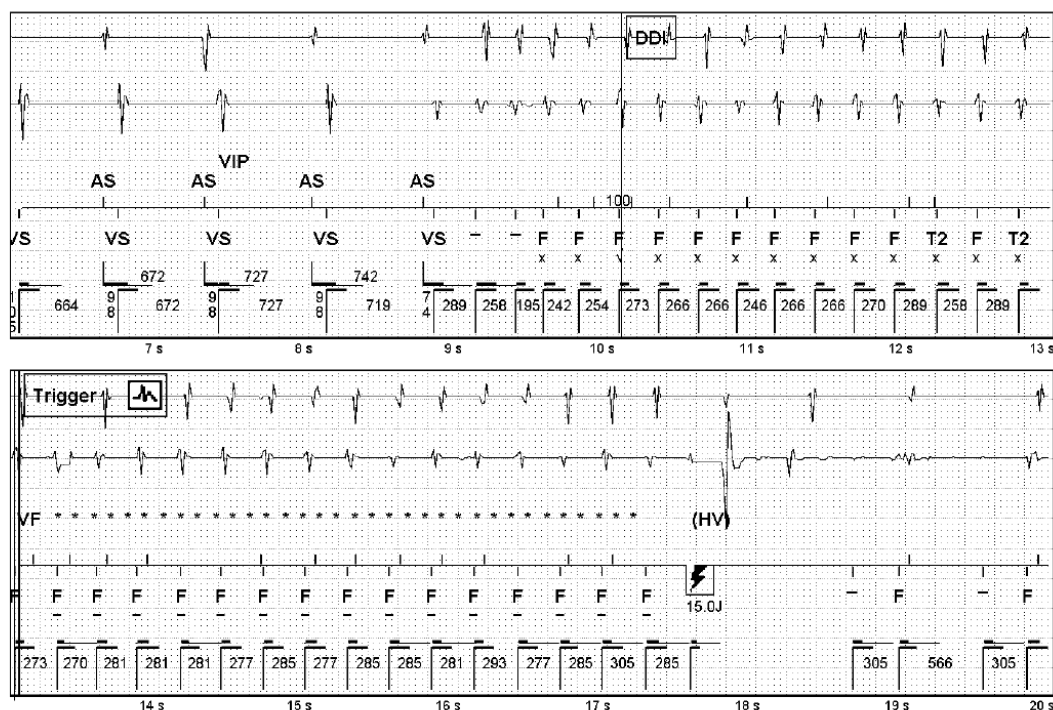


Figura 20. Interrogação do CDI do probando. Nota-se fibrilação ventricular, marcada pelas letras F, seguido de um choque apropriado (marcado pelo raio em preto), porém com saída em atividade elétrica sem pulso (AESP, marcada pela presença de estimulação do marcapasso (linhas verticais nas duas primeiras linhas), porém nesse momento a paciente já não apresentava mais pulso, sendo constatado o óbito.

A mutação p.Arg453Cys na B-MHC foi pesquisada nos bancos de variantes genômicas afim de verificar se era uma mutação já descrita com associação patogênica. O banco CLINVAR a classifica como uma mutação patogênica, enquanto o HGMD associa esta mutação ao fenótipo de CMH. A análise *in silico* realizada no PolyPhen-2 classifica a troca da arginina 453 pela cisteína como potencialmente danosa (Figura 21) e apresenta o alinhamento múltiplo de sequencias polipeptídicas da cadeia pesada da β -miosina de espécies diferentes, no qual se observa a natureza conservada da Arginina 453 nesta proteína (Figura 22).

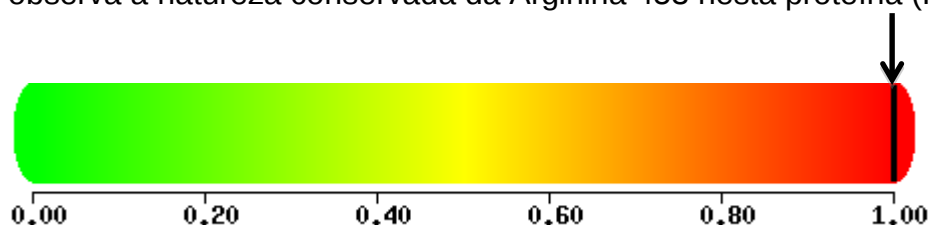


Figura 21. Análise da patogenicidade da mutação Arg453Cys, pela ferramenta PolyPhen-2. Escore de **1.00** (marcado pela seta), o que sugere que a mutação é potencialmente danosa.

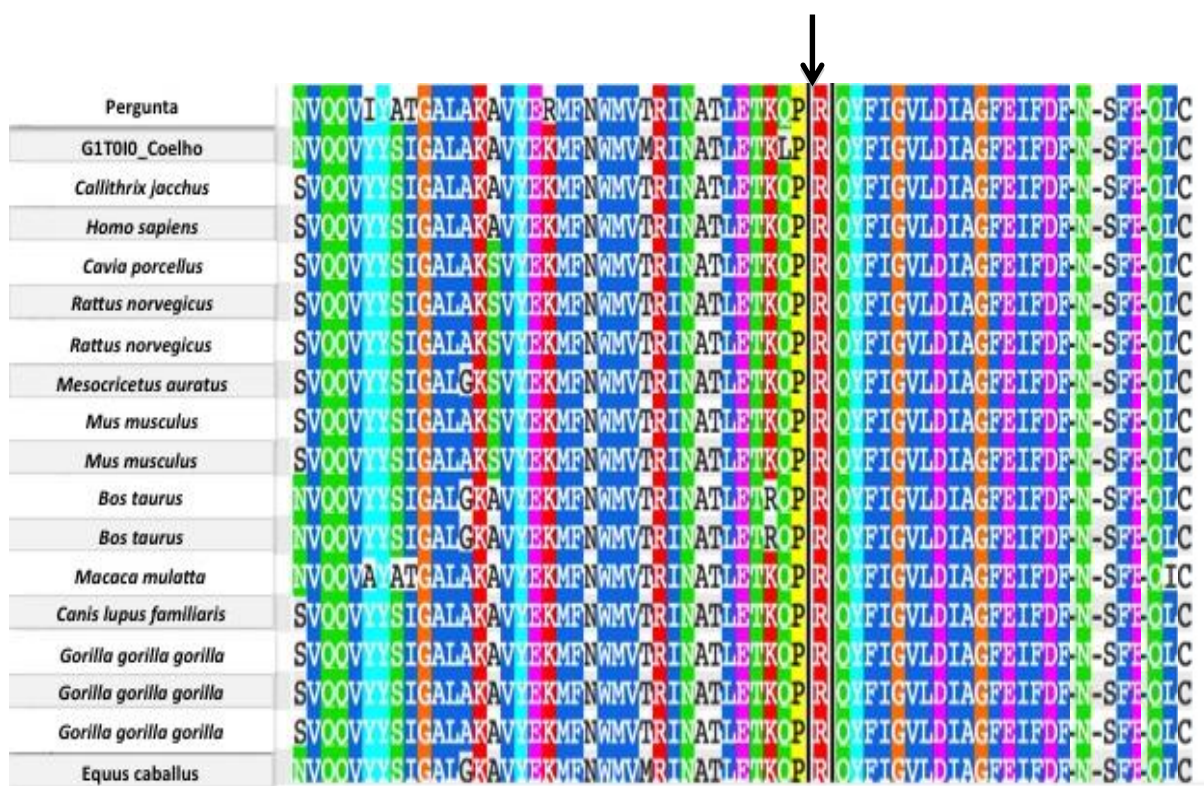


Figura 22. Alinhamento de sequências polipeptídicas da cadeia pesada da β -miosina de diferentes espécies mostrando 75 aminoácidos ao redor do ponto da mutação (seta).

A análise de predição utilizando as ferramentas Provean e SIFT classificam esta mutação como deletéria e danosa, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6: Análise de patogenicidade da mutação c.1357C>T (p.Arg453Cys) no gene *MYH7*, pelas ferramentas Provean e SIFT.

PREDIÇÃO PROVEAN		PREDIÇÃO SIFT		Anotação
Escore	Predição (ponto de corte=-2.5)	Escore	Predição (ponto de corte=0.05)	Dbsnp_id
-7.17	Deletéria	0.000	Danosa	rs121913625

A figura 23 mostra a posição dos domínios mais importantes da B-MHC na cadeia polipeptídica através da análise da sequência P12883 pelo UniProtKB, como a cabeça da miosina, e os sítios de ligação de ATP e actina.

A análise pelo PredictProtein, mostrou que a arginina da posição 453 está localizada próxima a uma folha- β e a 49 resíduos de um ponto de ligação de proteína (Fig 24A). Se nota também que a região da cabeça da miosina, mais próxima do N-terminal é mais sensível às mutações *missense*, apresentando predominância de pontos vermelhos em relação à cauda da miosina (Fig 23 e 24B).

dentro da estrutura da proteína (não estão expostos) e os losangos laranjas os sítios de ligação de proteínas. Mostrado pela seta preta, está o resíduo 453. **B e C)** Mapa de pontos mostrando as possibilidades de substituições pontuais para cada posição da cadeia polipeptídica. Na coluna horizontal estão os aminoácidos que compõe originalmente a cadeia e na coluna vertical os aminoácidos possíveis de estar em substituição, nota-se também o correspondente escore de efeito estrutural de cada "mutação". Marcado pelas setas pretas, pode-se observar a substituição da arginina (R), pela cisteína (C) na posição 453, com um escore de 40.

5.2 Família B

O probando da família B (**V.2**) é um paciente do sexo masculino, portador de CMH diagnosticada aos 3 anos de idade e que apresentou o primeiro episódio de síncope aos 15 anos quando lhe foi indicado e implantado um CDI. O sequenciamento dos três genes principais identificou as variantes c.1624G>C e c.1828G>C, ambas em heterozigose, no gene *MYBPC3*, que codifica a MyBP-C. Estas variantes pontuais causam as substituições do ácido glutâmico 542 pela glutamina (p.Glu542Gln) e do ácido aspártico 610 pelo resíduo básico histidina (p.Asp610His), respectivamente (Figuras 25 e 26).

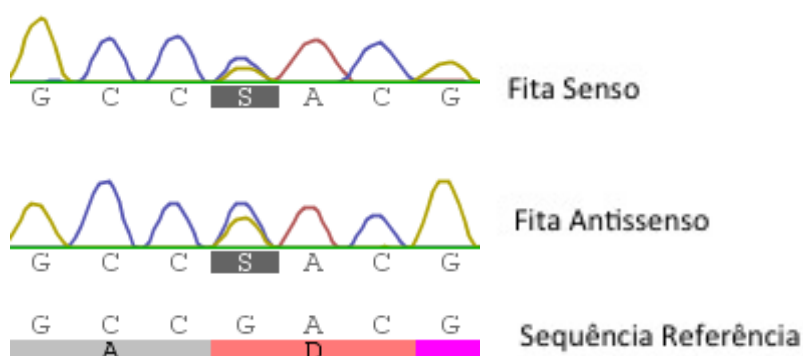


Figura 25. Identificação da mutação p.Asp610His no gene *MYBPC3*

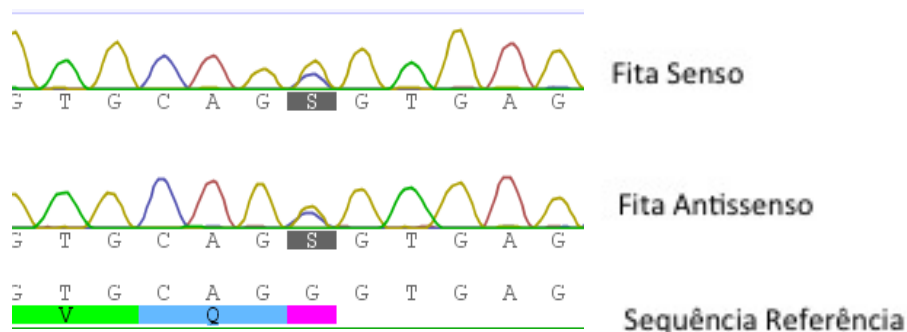


Figura 26. Identificação da mutação p.Glu542Gln no gene *MYBPC3*

O seu ECG era normal. Ao ECOTT foi diagnosticado hipertrofia septal assimétrica, tipo curva reversa, com septo interventricular medindo 3,9 cm, função sistólica de VE preservada com fração de ejeção de VE de 69%, sem alteração na contratilidade segmentar, disfunção diastólica tipo II, com gradiente máximo VE/Ao de 25 mmHg, com movimento sistólico anterior da válvula mitral e com obstrução do trato de saída de VE. O AE se mostrou aumentado, medindo 4,6 cm (Figura 27) e o *holter* de 24 horas, sem presença de taquicardia ventricular. Escore de risco de MSC em cinco anos, alto (7,69%).

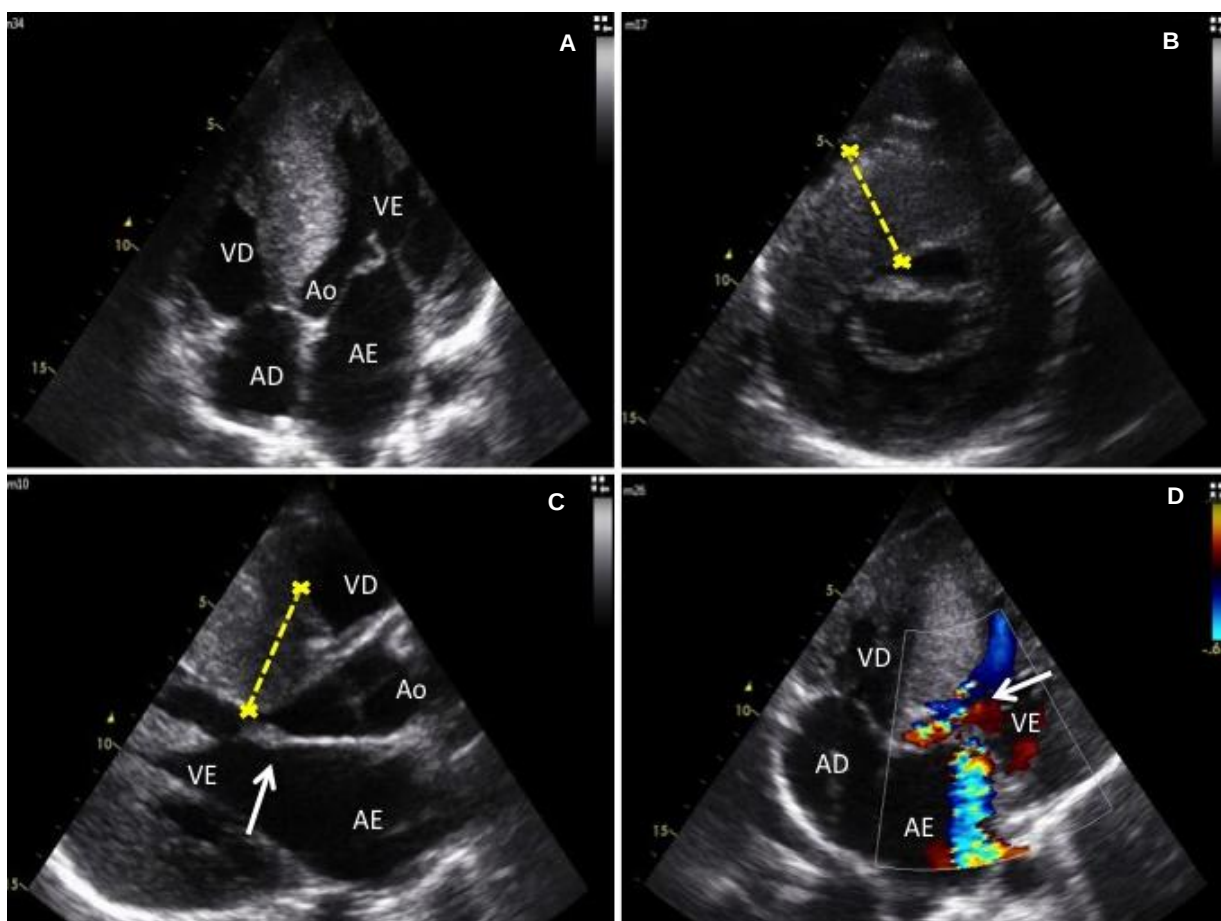


Figura 27. ECOTT do probando da família B. **A)** Corte apical de cinco câmaras do probando, evidenciando hipertrofia septal assimétrica do tipo curva reversa e aumento de AE. **B)** Corte parasternal transversal evidenciando hipertrofia de VE com predomínio na região do septo interventricular **C)** Corte parasternal longitudinal evidenciando hipertrofia ventricular esquerda, movimento sistólico anterior da válvula mitral (seta), aumento de AE e hipertrofia ventricular esquerda com predomínio em septo interventricular **D)** Corte apical de cinco câmaras, evidenciando turbilhonamento na via de saída do VE, denotando presença de obstrução no trato de saída do VE, além de insuficiência mitral moderada.

A análise detalhada da história familiar proporcionou a construção do heredograma (Figura 28), no qual se observa uma família com 30 membros distribuídos em cinco gerações. Foi identificada somente uma história de MSC, em um indivíduo da família materna, (III.1), do sexo feminino, com 30 anos, sem história de CMH e uma morte em um indivíduo do sexo masculino, sendo desconhecida a causa e a idade da morte. Além disso, nenhum dos familiares possui fenótipo de CMH.

FAMÍLIA B

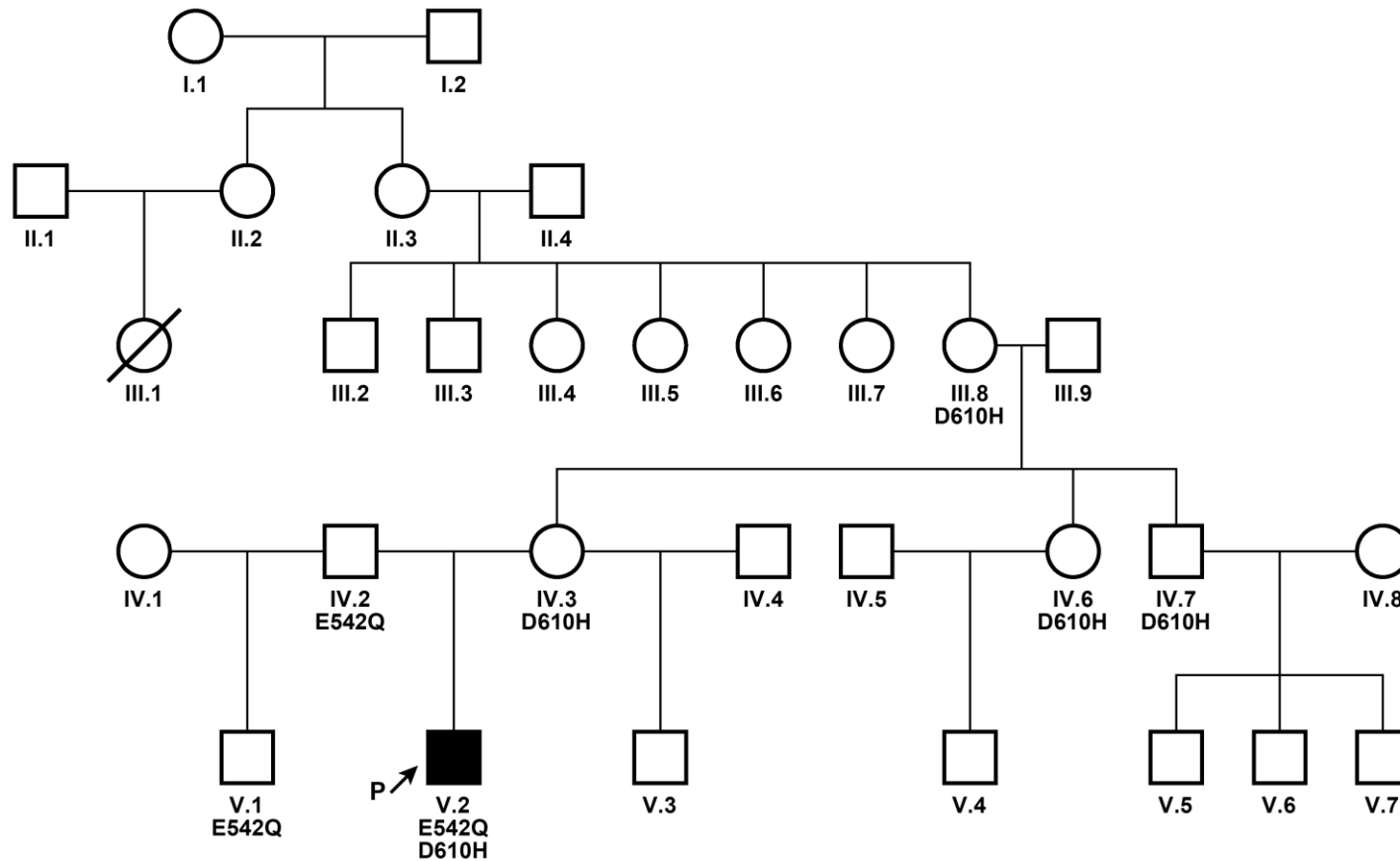


Figura 28. Heredograma família B. Os símbolos preenchidos em preto mostram os indivíduos com diagnóstico clínico de CMH e os símbolos brancos não possuem CMH. Os símbolos com um traço vertical, mostram os indivíduos que faleceram por todas as causas. O probando está identificado por uma seta (P). Os indivíduos portadores da mutação p.Glu542Gln (E542Q) e os portadores da mutação p.Asp610His (D610H) estão identificados.

Foram analisados, além do probando, seis familiares, quatro do lado materno e dois do lado paterno. Todos os parentes maternos, a mãe (IV.3) a tia (IV.6), o tio (IV.7) e a avó (III.8) de 59 anos eram assintomáticos com ECG normais e ECOTT sem sinais de hipertrofia miocárdica, com funções sistólica e diastólica do VE preservadas. As duas variantes encontradas no probando foram investigadas nos ascendentes e a mutação p.Asp610His foi identificada em todos os familiares maternos avaliados. Por outro lado, só o alelo p.Glu542Gln foi encontrado no pai (IV.2) e no irmão paterno (V.1) do probando, ambos assintomáticos e sem alterações ao ECG e ECOTT.

Uma vez que não foi detectada hipertrofia cardíaca ao ECOTT, foi indicado a avaliação por RMN com o objetivo de investigar a presença de alteração subclínicas, como a presença de fibrose miocárdica. Se submeteram a este exame o pai, a mãe e a tia.

As RMN cardíacas da mãe (IV.3) e da tia (IV.6) do probando não revelaram alterações estruturais, com septos medindo 0,8 cm, paredes laterais de 0,7 cm e átrios de tamanho normais. Realce tardio do miocárdio normais sem evidência de necrose/fibrose (Figuras 29 A e 29 B).

A RMN realizada no pai (IV.2) confirmou a ausência de hipertrofia (maior espessura de septo de 0,8 cm e parede lateral medindo 0,7 cm), com volumes cavitários de tamanhos normais e diâmetro normal de AE. Sem a presença de realce tardio e sem evidência de necrose/fibrose (Figura 29 C).

A tabela 7 apresenta os dados epidemiológicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de escore de risco de morte súbita em cinco anos.

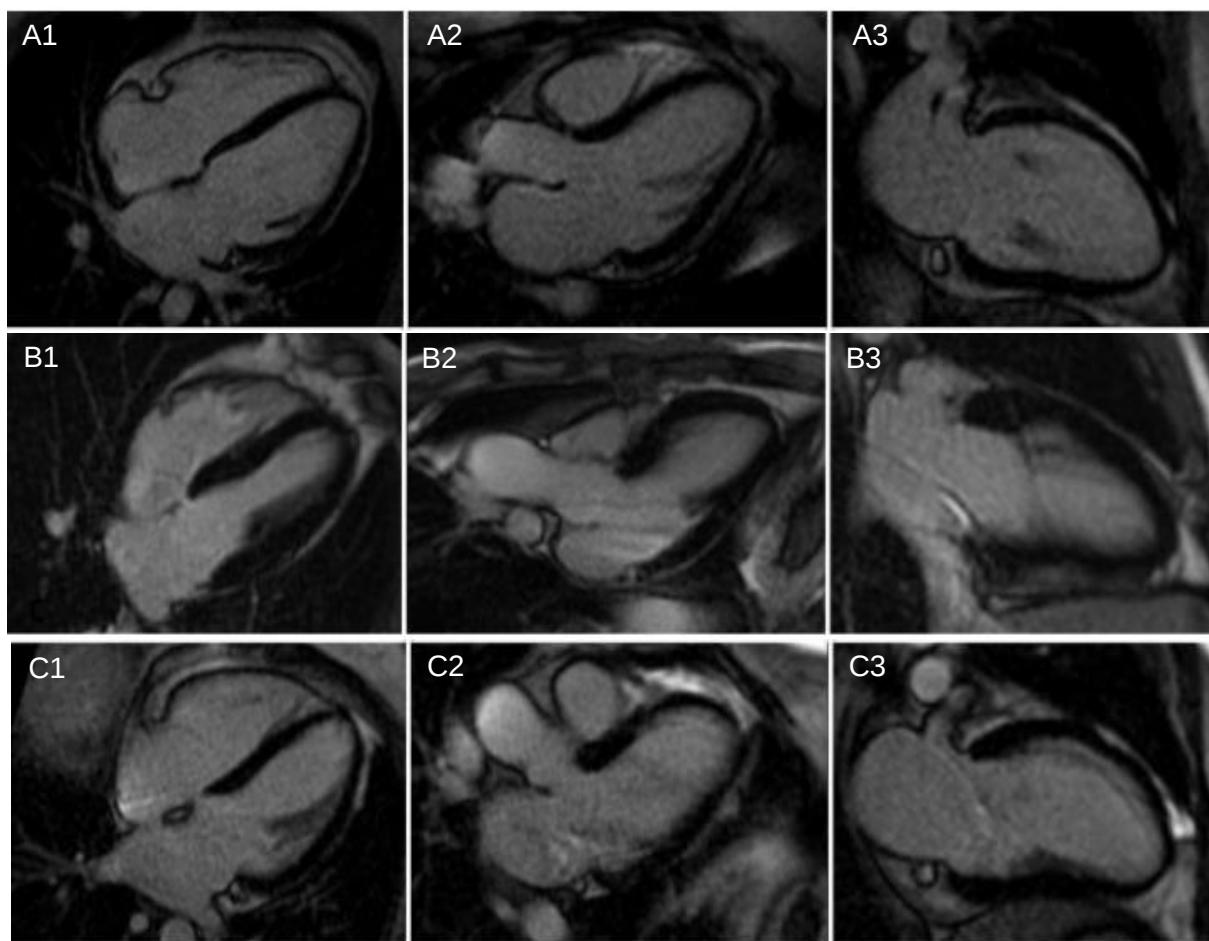


Figura 29. **A)** RMN cardíaca do familiar IV.3. Imagens de RM na sequência *inversion-recovery* (realce tardio) nos eixos 4CH (A1), VSVE (A2) e 2CH (A3). Nota-se ausência de fibrose ou hipertrofia ventricular. **B)** RMN cardíaca do familiar IV.6. Imagens de RM na sequência *inversion-recovery* (realce tardio) nos eixos 4CH (B1), VSVE (B2) e 2CH (B3). Nota-se ausência de fibrose ou hipertrofia ventricular. **C)** RMN cardíaca do familiar IV.2. Imagens de RM na sequência *inversion-recovery* (realce tardio) nos eixos 4CH (C1), VSVE (C2) e 2CH (C3). Nota-se ausência de fibrose ou hipertrofia ventricular.

Tabela 7: Dados epidemiológicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de escore de risco de MSC em cinco anos, família B.

Dados Epidemiológicos										Dados Eletrocardiográficos				Dados Ecocardiográficos							Escore	
Id	Idade do exame	Sexo	CMH	Mutação encontrada	Óbito pela Dç	Idade do Óbito	PCR Abortada	Síncope	CDI	Sobrecarga de AE	Sobrecarga de VE	Onda T invertida	HVE	Tipo da HVE	Forma da HVE	Espessura da parede	Gradiente VE/Ao (mmHg)	DSVE	DDVE	MSAM	Tamanho de AE (cm)	Escore de Risco (%)
III.8	59	F	Não	Asp610His	-	-	-	-	-	Não	Não	Não	Não	-	-	1	Não	Não	Não	Não	2,8	0,67
IV.2	40	M	Não	Glu542Gln	-	-	-	-	-	Não	Não	Não	Não	-	-	0,9	Não	Não	Não	Não	3,5	-
IV.3	39	F	Não	Asp610His	-	-	-	-	-	Não	Não	Não	Não	-	-	0,9	Não	Não	Não	Não	3,7	-
IV.6	29	F	Não	Asp610His	-	-	-	-	-	Não	Não	Não	Não	-	-	0,8	Não	Não	Não	Não	3,2	-
IV.7	35	M	Não	Asp610His	-	-	-	-	-	Não	Não	Não	Não	-	-	0,8	Não	Não	Não	Não	3,6	-
V.1	8	M	Não	Glu542Gln	-	-	-	-	-	Não	Não	Não	Não	-	-	0,7	Não	Não	Não	Não	3,7	-
V.2	17	M	Sim	Asp610His Glu542Gln	Não	-	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Septal	Curva Reversa	3,9	25	Não	Tipo I	Não	5,57	7,69

(Dg) Diagnóstico; (PCR) parada cardiorespiratória; (Dç) Doença; (CDI) cardiodesfibrilador implantável; (CMH) cardiomiopatia hipertrófica. (-) Não avaliado/ Não foi possível avaliar; (Id) Identificação, (AE) Átrio esquerdo; (VE) Ventrículo esquerdo, (VE/Ao) ventrículo esquerdo/ aorta; (DSVE) Disfunção sistólica do ventrículo esquerdo; (DDVE) Disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, avaliado (*) possui CDI por prevenção secundária.

Dos 7 indivíduos avaliados, o probando apresentou uma mutação dupla em *trans* no gene *MYBPC3*, ou seja uma mutação em cada um dos alelos homólogos que ele herdou do seu pai e da sua mãe. Os quatro indivíduos da família materna são portadores da mutação p.Asp610His e os indivíduos da família paterna (pai e irmão), possuem o alelo p.Glu542Gln.

O único a apresentar alteração fenotípica foi o probando, com alterações eletrocardiográficas sugestivas de sobrecarga atrial e ventricular e inversão de onda T e ECOTT com importante aumento septal (3,9 cm), gradiente de via de saída de VE (25 mmHg) e aumento atrial esquerdo (5,57 cm). Nenhum outro familiar do probando genotipado, tanto materno quanto paterno, apresentou fenótipo para CMH, inclusive os que realizaram RMN.

O probando possui 17 anos. O indivíduo mais novo analisado possui 8 anos e o mais velho 59 anos, com média de idade de 32,4 anos. O risco de MSC calculado para o probando foi alto, enquanto o risco de MSC para o familiar III.8 foi baixo. Os demais indivíduos não possuíam critérios para cálculo de risco de MSC.

No CLINVAR a mutação p.Asp610His é classificada como de significância incerta e no HGMD esta mutação é tida com provável relação com o fenótipo de CMH, porém ainda de forma questionável. A análise *in silico* pelo PolyPhen-2, prediz que esta mutação provavelmente seja patogênica (Figura 30), e um dos fatores para esta conclusão é a natureza conservada do ácido aspártico 610 na MyBP-C (Figura 31).

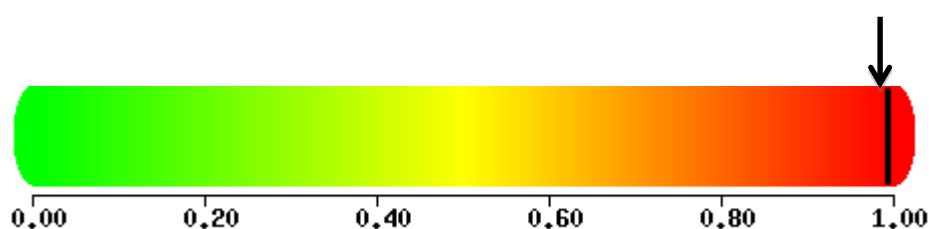


Figura 30. Análise da patogenicidade da mutação p.Asp610His, pela ferramenta PolyPhen-2. Escore de **0.994** (sensibilidade: **0.46**; especificidade: **0.96**), sugerindo ser essa mutação potencialmente danosa.

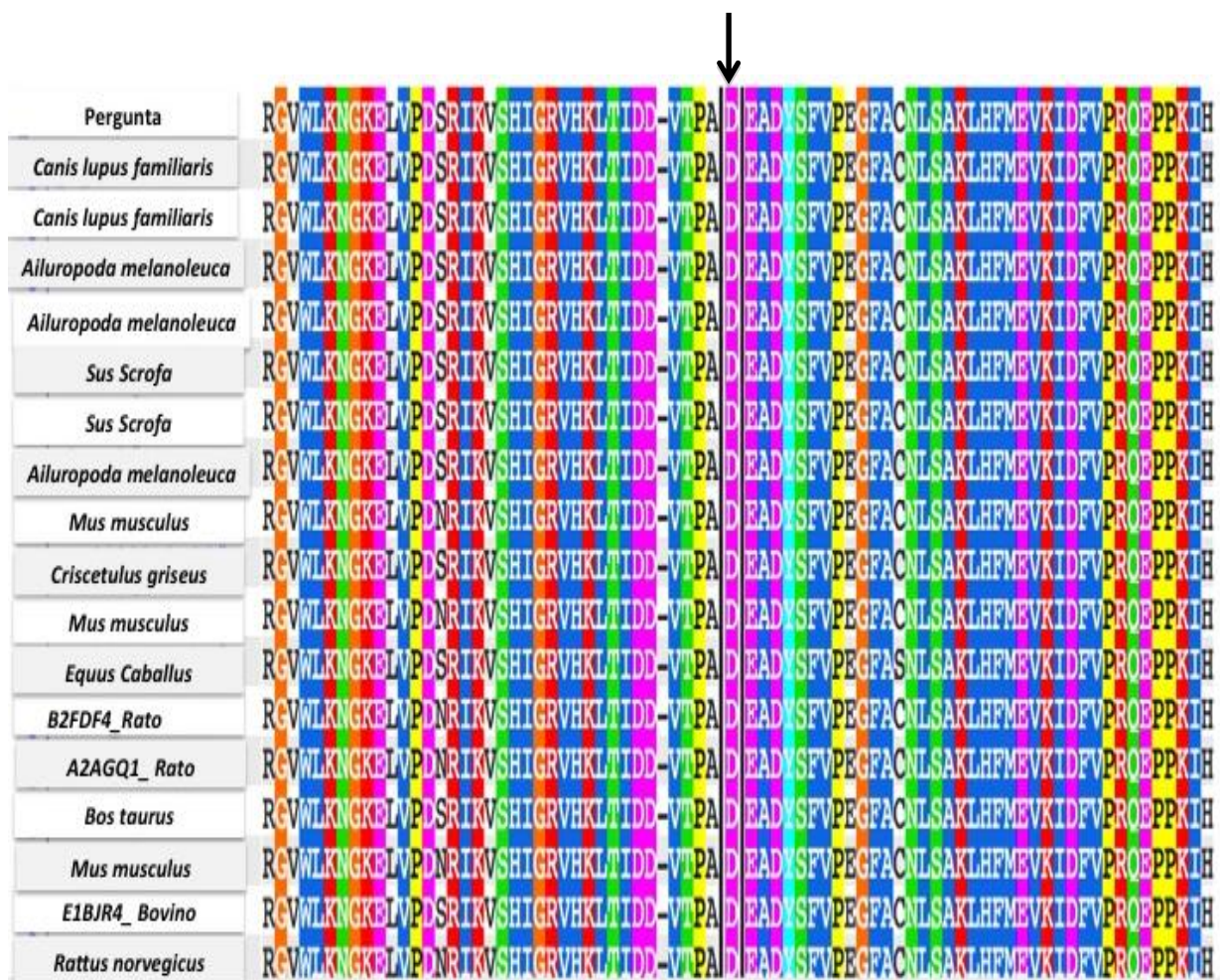


Figura 31. Alinhamento de sequências polipeptídicas da MyBP-C de diferentes espécies mostrando 75 aminoácidos ao redor do ponto da mutação (seta).

A análise de predição utilizando as ferramentas Provean e SIFT classificam esta mutação como deletéria e danosa, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 8: Análise de patogenicidade da mutação c.1828G>C (p.Asp610His) no gene MYBPC3, pelas ferramentas Provean e SIFT.

PREDIÇÃO PROVEAN		PREDIÇÃO SIFT		Anotação
Escore	Predição(ponto de corte=-2.5)	Escore	Predição (ponto de corte=0.05)	Dbsnp_id
-6,20	Deletéria	0.001	Danosa	

A análise da MyBP-C, através do PredictProtein, mostrou uma proteína composta quase que exclusivamente por folhas- β , com diversos sítios de ligação específicos. A posição 610, está localizada em um folha- β e a análise do impacto da troca do aspartato (D), por uma histidina (H), sugere um impacto significativo na estrutura da proteína, com escore de 74 (Figura 32).

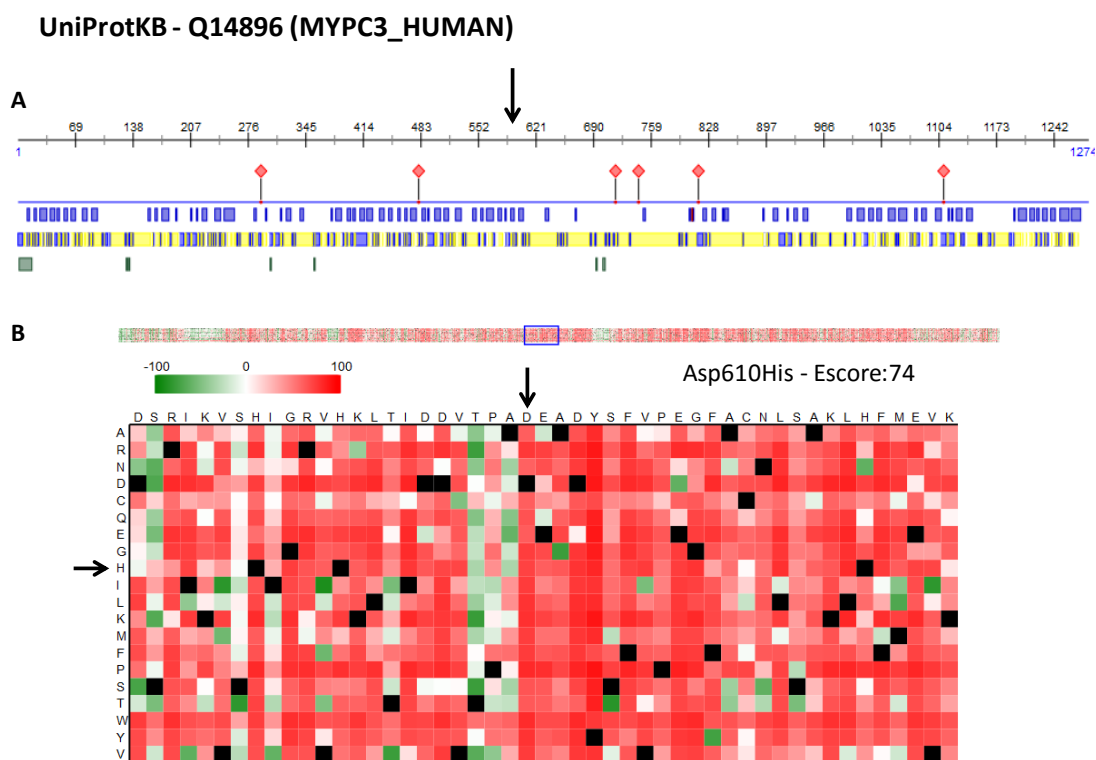


Figura 32. Análise da MyBP-C no programa *PredictProtein*. **A)** Estrutura secundária da cadeia polipeptídica da MyBP-C. Os retângulos azuis representam as folhas- β e os losangos laranjas, os sítios de ligação. Mostrado pela seta preta, está a posição 610. **B)** Mapa de pontos mostrando as possibilidades de substituições pontuais para cada posição da cadeia polipeptídica e o correspondente escore de efeito estrutural de cada "mutação". Marcado pelas setas pretas, pode-se observar a substituição do ácido aspártico (D), pela histidina (H) na posição 610, com um escore de 74.

Já a mutação p.Glu542Gln é classificada como uma mutação patogênica no CLINVAR e HGMD. A análise *in silico* realizada no PolyPhen-2, a classifica como possivelmente danosa (Figura 33). O alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas da MyBP-C de espécies diferentes, demonstra a natureza conservada do ácido glutâmico 542 nesta proteína (Figura 34).

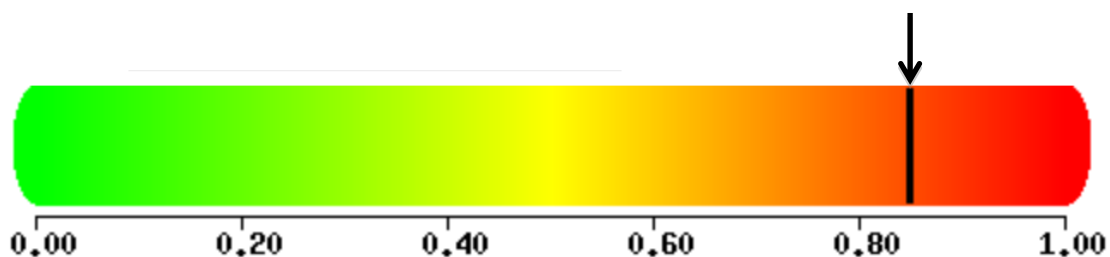


Figura 33. Análise da patogenicidade da mutação Glu542Gln, pela ferramenta PolyPhen-2. Escore de **0.848** (sensibilidade: **0.73**; especificidade: **0.88**), a considerando como possivelmente danosa.

Pergunta	QRHHLIINEATLEDAGHYALCTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLMVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Canis lupus familiaris</i>	QRHHLIINEATLEDAGHYALRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Canis lupus familiaris</i>	QRHHLIINEATLEDAGHYALRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	QRHHLIINEATLEDAGHYALRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	QRHHLIINEATLEDAGHYALRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Sus Scrofa</i>	QKHHLIINEATLEDAGHYALHTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Sus Scrofa</i>	QKHHLIINEATLEDAGHYALHTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	QRHHLIINEATLEDAGHYALRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Mus musculus</i>	RKHHLIINEATLEDAGHYAVRTSGGQSLAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Crisetulus griseus</i>	RKHHLIINKATLEDAGHYAVRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Mus musculus</i>	RKHHLIINEATLEDAGHYAVRTSGGQSLAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Equus Caballus</i>	QRHHLIINEATLEDAGHYALHTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>B2FDF4_Rato</i>	RKHHLIINEATLEDAGHYAVRTSGGQSLAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>A2AGQ1_Rato</i>	RKHHLIINEATLEDAGHYAVRTSGGQSLAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Bos taurus</i>	QKHHLIINEATLEDAGHYALRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGSKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Mus musculus</i>	RKHHLIINEATLEDAGHYAVRTSGGQSLAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>E1BJR4_Bovino</i>	QKHHLIINEATLEDAGHYALRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLTVGSKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK
<i>Rattus norvegicus</i>	RKHHLIINEATLEDAGHYAVRTSGGQALAEIVQ	EKK-LEVYOSIADLVGAKDOAVFK	EVSDENVRCVWLK

Figura 34. Alinhamento de sequências polipeptídicas da MyBP-C de diferentes espécies mostrando 75 aminoácidos ao redor do ponto da mutação (seta).

Diferentemente do PolyPhen-2, a análise de predição utilizando as ferramentas Provean e SIFT classificam esta mutação como neutra e tolerável, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 9: Análise de patogenicidade da mutação p.Glu542Gln pelas ferramentas Provean e SIFT.

PREDIÇÃO PROVEAN		PREDIÇÃO SIFT		Anotação
Escore	Predição(ponto de corte=-2.5)	Escore	Predição (ponto de corte=0.05)	Dbsnp_id
-1,64	Neutra	0.193	Tolerável	rs121909374

O ácido glutâmico 542 faz parte de uma folha-β e a análise do impacto da sua substituição pela glutamina, revelou ser de baixo efeito na estrutura da proteína (escore 12) (Figura 35).

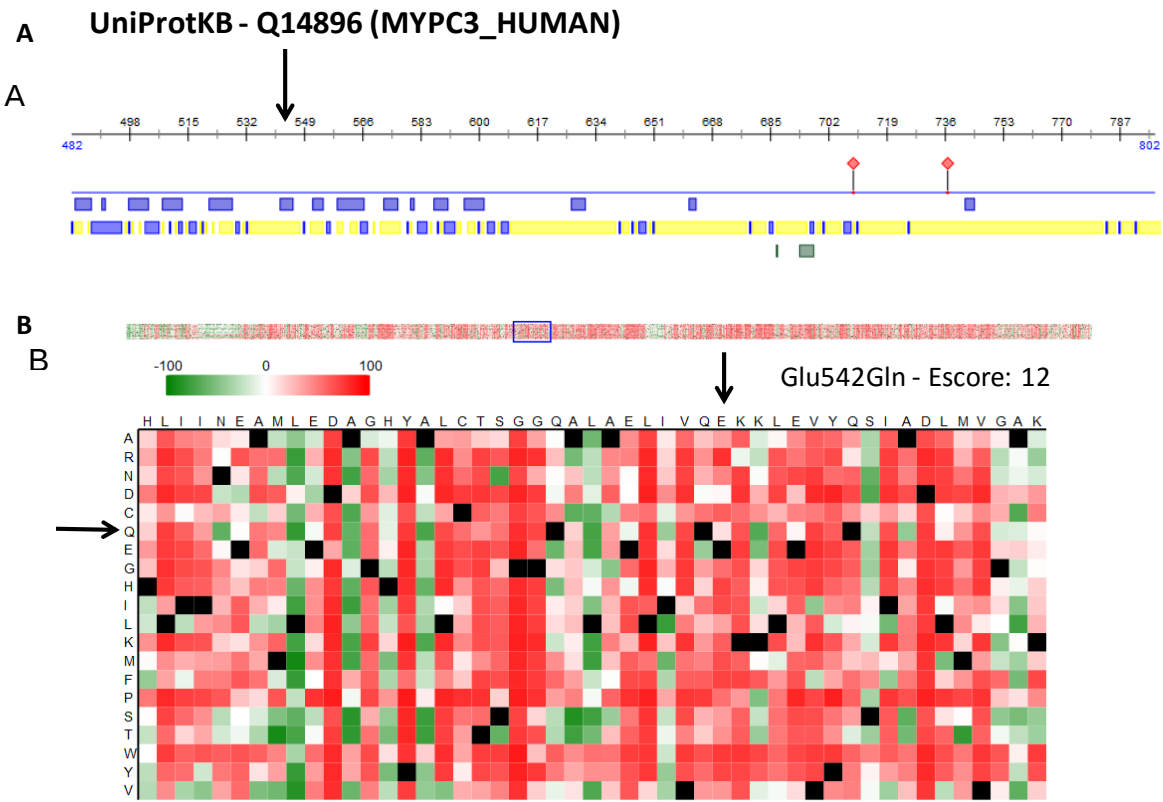


Figura 35. Análise da MyBP-C no programa *PredictProtein*. **A)** Estruturas secundárias da cadeia polipeptídica da MyBP-C entre as posições 482 e 802. Os retângulos azuis representam as folhas-β e os losangos laranjas, os sítios de ligação **B)** Mapa de pontos mostrando as possibilidades de substituições pontuais para cada posição da cadeia polipeptídica e o correspondente escore de efeito estrutural de cada "mutação". Marcado pelas setas pretas, pode-se observar a substituição do ácido glutâmico (E) pela glutamina (Q) na posição 542, com um escore de 12.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi apresentada a caracterização de duas famílias (família A e família B) acometidas pela CMH. Nas duas famílias apresentadas, a determinação clínica da doença, foi baseada nos critérios clássicos (ECOTT), tal como descrito na literatura (Charron et al, 1997). Ambos os probandos possuíam hipertrofia septal assimétrica e características malignas da doença.

O diagnóstico foi confirmado através de análise genética dos genes que codificam para as proteínas sarcoméricas, conforme recomendações de consensos internacionais. A diretriz europeia de diagnóstico e tratamento da cardiomiopatia hipertrófica, orienta como indicação classe I a análise genética do probando para o diagnóstico definitivo de CMH, assim como, a análise genética para rastreamento dos familiares de primeiro grau (Elliott et al., 2014 e Gersh et al, 2011). Diversas doenças do miocárdio podem cursar com hipertrofia miocárdica, sendo confundidas com CMH, como as doenças causadas por erros inatos do metabolismo (ex.: doença de Fabry) e doenças do depósito de glicogênio, como síndrome de Pompe e Danon, entre outras (Elliott et al., 2014). Neste contexto, a avaliação genética é importante no diagnóstico diferencial de doenças fenotipicamente semelhantes.

Através dos probandos, pôde ser realizado um estudo de famílias, na tentativa de melhor entender a patogênese, prognóstico, risco de MSC e desenvolvimento de fenótipo da CMH e a relação com o genótipo.

Mutações no gene *MYH7* vem sendo descritas como de caráter maligno, com alta penetrância, manifestações precoces da doença, alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas importantes e alto risco de MSC (Marian et al. 2003; Geisterfer-Lowrance, et al, 1990 e Arteaga, 1998). A mutação p.Arg453Cys na B-MHC, identificada na família A foi descrita por Watkins e colaboradores (1992) como maligna, com prognóstico ruim e 20% de sobrevida a partir dos 60 anos.

No entanto, a classificação das mutações quanto ao seu caráter, vem sendo questionada por diversos autores (Anan, et al, 1994; Fannapazir e Epstein, 1994; Ho, 2010). Um estudo realizado com duas famílias em Portugal mostrou que a mesma mutação no gene *MYH7*, se comportava com alta penetrância e melhor prognóstico em uma família e na outra apresentava baixa penetrância, porém, com pior prognóstico naqueles que desenvolveram a doença, exemplificando a heterogenicidade fenotípica das mutações (Brito et al, 2003).

A família A consiste de duas famílias distintas unidas por um ancestral em comum (I.2), ambas com alta incidência de indivíduos com CMH e MSC. A análise do heredograma sugere uma doença com herança autossômica dominante, uma vez que em todas as gerações houveram indivíduos afetados. Estas características sugerem como causa desta patologia uma mutação de caráter maligno e com alta penetrância.

Além disso, dos sete indivíduos com genótipo positivo para a mutação p.Arg453Cys, seis apresentavam o fenótipo para a doença (85,7%) o que indica uma alta penetrância. Nenhum indivíduo com genótipo negativo apresentou alterações fenotípicas. O único indivíduo portador da mutação que não havia manifestado fenótipo tinha 13 anos de idade.

Apesar da idade média de diagnóstico ser de 35,3 anos, sugerindo um desenvolvimento precoce da doença, ao observarmos individualmente, encontramos familiares onde a doença se manifestou aos 15 anos e familiares com manifestação da doença somente aos 50 anos. Isto demonstra uma grande heterogeneidade intra-familiar quanto a idade da manifestação da doença.

A ausência de expressão fenotípica no familiar de 13 anos, pode ser em decorrência da pouca idade para o desenvolvimento da doença. Sabe-se que o fenótipo se modifica com a idade, mais frequentemente se manifestando na adolescência, acompanhando o crescimento pôndero estatural (Maron, 1997).

Além disso, ausência de hipertrofia miocárdica, pode corresponder a uma variação da CMH sem hipertrofia ou pré-clínica (Ho, 2009), onde apesar da hipertrofia ausente, pode ser observada, alterações no relaxamento ventricular, disfunção diastólica, alterações da válvula mitral ou alterações subvalvares, dilatação do átrio esquerdo ou maior complexidade das trábeculas cardíacas (Captur et al, 2014).

O familiar em questão, não apresentou nenhuma dessas alterações cardíacas descritas, portanto acreditamos se tratar de uma CMH genótipo positivo / fenótipo negativo até o momento. Outros exames clínicos como a RMN pode ser útil na diferenciação dessas duas classificações para esse indivíduos, pois pode identificar algumas alterações não visualizadas ao ECOTT, como hipertrofias sutís, principalmente em parede lateral, segmento apical ou segmento basal posterior e a presença de criptas que apesar de não ter valor prognóstico e diagnóstico definido,

pode ser útil na identificação de CMH pré-clínica em portadores assintomáticos (Maron et al, 2012A).

De acordo com a literatura, um paciente com genótipo positivo que ainda não apresente manifestações clínicas da doença, deve ser mantido em acompanhamento, pela possibilidade de desenvolvimento posterior da doença, (Elliott et al., 2014) sendo mais frequente o surgimento de hipertrofia na segunda década de vida, porém há a possibilidade de manifestações em idades avançadas, quando a mutação possuir penetrância tardia (Lewis e Maron, 1994).

A forma de apresentação da hipertrofia miocárdica foi heterogênea, visto que dos seis pacientes com CMH, um apresentou hipertrofia em parede antero-lateral. Porém, a forma predominante nos indivíduos da família A foi a septal, tipo curva reversa (83%). A forma septal é a forma de maior incidência nos pacientes com CMH, entre 80 a 90% (Wynne e Braunwald, 1997 e Wigle et al, 1985) e o tipo curva reversa é a segunda apresentação mais comum de hipertrofia miocárdica (30 a 40% dos casos). Entretanto, o tipo curva reversa é a forma mais frequentemente relacionada (80%) à mutações em genes que codificam proteínas dos miofilamentos (MartijnBos et. Al, 2009). A forma lateral de CMH encontrada em apenas um indivíduo da família, é responsável por somente 1 a 2 % das formas de hipertrofia (Wynne e Braunwald, 1997 e Wigle et al, 1985). O indivíduo que apresentou hipertrofia antero-lateral, possuía um ECOTT com septo afilado, sugerindo comunicação interventricular (CIV) residual, podendo ser este o motivo para a divergência na forma de apresentação da doença.

Tem sido observado que quanto mais cedo há a manifestação da doença em indivíduos portadores de mutações no gene *MYH7*, mais grave ela se apresenta, com maior hipertrofia miocárdica e maior risco de MSC (Wang et al, 2008). Estudos relatam ser a MSC infrequente em pacientes que não apresentem hipertrofia de VE, com exceção de alguns casos em pacientes portadores de mutação na troponina T (Pasquale, 2012). A associação entre a idade de início da doença e sua gravidade pôde ser observada no filho da probanda que aos 15 anos apresentou hipertrofia septal (2,1 cm), síncope e possui alto risco de MSC em cinco anos (10,86%). Por outro lado, familiares, nos quais a doença se apresentou tardiamente (aos 50 anos) apresentaram septo de 1,4 cm, sem arritmias ventriculares ou síncope até o momento e baixo escore de risco de MSC (2,58%). Essa manifestação tardia e com menores repercussões para o familiar, pode ser em decorrência de uma penetrância

tardia e/ou incompleta, presença de outras mutações com potencial protetor e genes modificadores (Marian, 2003).

Alguns autores descrevem que 90% dos pacientes com diagnóstico clínico de CMH, apresentam alterações eletrocardiográficas, sejam elas, sinais de sobrecarga ventricular esquerda ou sobrecarga atrial, ondas Q patológicas em parede lateral e inferior, alterações de repolarização tipo isquemia e arritmias cardíacas (Bittencourt et al, 2010). Contraditoriamente, de seis indivíduos da família A com diagnóstico de CMH que participaram do estudo, apenas dois apresentaram alterações eletrocardiográficas

Dois familiares que apresentaram MSC em idades precoces, não possuíam diagnóstico clínico prévio de CMH e faleceram antes do estudo, impossibilitando a coleta de material genético para análise. A necropsia de um desses jovens, apresentou, alterações teciduais características de CMH, levantando a hipótese de que o mesmo fosse portador de CMH não manifesta ao ECOTT. Porém, a análise genética da mãe e do pai foi negativa para o genótipo encontrado na família. Portanto, se as relações de parentesco estão corretas, o jovem não poderia herdar o alelo mutante da família e faleceu por outro motivo que não CMH. Outra possibilidade é que ele tivesse herdado outra mutação ou uma mutação “de novo”, que pudesse causar a hipertrofia ventricular (Richard et al., 2003).

As análises *in silico* da patogenicidade da mutação p.Arg453Cys, confirmaram o seu potencial deletério, observado na caracterização fenotípica desta família. A mutação Arg453Cys é descrita e conhecida na literatura como causadora de CMH (Watkins et al., 1992). Porém, o mecanismo molecular de geração da doença continua incerto e estudos em camundongos tem sido realizados na tentativa de entendê-lo (Palmer et al, 2004; Debold et al., 2007).

Recentemente, Sommese et al. (2013), utilizando a B-MHC humana purificada com a mutação p.Arg453Cys, demonstrou um aumento de aproximadamente 50% na força intrínseca da molécula, que pode ser responsável pela hipercontratilidade cardíaca. Estes autores postulam que a localização do resíduo 453 próximo à uma folha β pregueada e próximos aos sítio de ligação de ATP e actina, contribuam para a função motora da proteína, e portanto alterações nesta posição prejudicariam o bom funcionamento da molécula.

Ao analisar o heredograma da família B, observamos uma família composta por 30 membros, onde somente o probando era portador de CMH, com um único

caso de MSC em um membro jovem da família, porém sem diagnóstico prévio de CMH. Inicialmente pode-se pensar, que neste caso, a CMH pudesse ser causada por alelos autossômicos recessivos ou tratar-se de uma mutação "de novo" que desencadeou o fenótipo. Entretanto, o exame molecular revelou uma dupla mutação no gene *MYBPC3*. A varredura genética dos pais mostrou que cada um é portador de uma das duas mutações, portanto a dupla mutação foi herdada pelo probando apresenta configuração *trans*.

Além dos pais, mais quatro familiares participaram do estudo. Os três parentes maternos são portadores do alelo Asp610His e o imão paterno herdou a mutação Glu452Gln. Nenhum deles, incluindo os pais apresentam qualquer fenótipo de CMH, mesmo a avó materna de 59 anos.

De acordo com a literatura, mutações no gene *MYBPC3*, costumam apresentar penetrância incompleta (ou seja, o fenótipo daquele alelo nem sempre é expresso), hipertrofia ventricular leve, baixo risco de MSC e evolução clínica benigna, apresentando de maneira frequente indivíduos portadores do genótipo, mas sem manifestação fenotípica (Nimura et al, 1998, Cardim et al., 2005 e Charron et al. 2015). Porém, alguns estudos tem identificado mutações específicas com manifestação precoce da doença, marcada hipertrofia e disfunção sistólica e diastólica, como as mutações IVS23+1G>A, Gln689His e IVS6+5G>A (Oliva-Sandoval et al., 2010; Briona et al., 2010; Van Driest et al., 2004 e Ortiz et al., 2009).

Nossos dados corroboraram o comportamento benigno das mutações do gene *MYBPC3*, com exceção do probando no qual foi observada apresentação clínica desfavorável da doença, com diagnóstico precoce de CMH, aos 3 anos de idade, hipertrofia ventricular severa (septo 4,2 cm), história de síncope, implante de CDI e alto risco de MSC em cinco anos (7,69%).

Estudos revelam que a presença de múltiplas mutações está associada a uma maior hipertrofia da parede ventricular, com manifestação mais severa da doença (Zou et al, 2013, Ingles et al., 2005), entretanto, há trabalhos que não encontraram tal relação (Marsiglia et al, 2013).

Além disso, a ausência de doença nos demais membros da família com genótipo positivo para uma das mutações em *MYBPC3*, pode ser explicada pela penetrância incompleta, uma vez que somente 58% dos portadores de mutações neste gene expressam, efetivamente, hipertrofia ventricular antes dos 50 anos (Nimura et al, 1998). Inclusive, até os 59 anos de idade, a portadora do alelo

Asp610His, não apresentou sinais de CMH. Outra hipótese para explicar tal fato é a de que a célula miocárdica consegue manter seu bom funcionamento, com metade das proteínas alteradas.

Sendo assim, nossos dados nos permitem propor que a manifestação da patologia no probando e de forma severa, se deveu à presença da dupla mutação na configuração *trans* e a manifestação dos dois alelos mutados, produza 100% de proteínas defeituosas, produzindo doença, com uma expressão fenotípica mais acentuada.

Mutações nesse gene, são, em conjunto com mutações nos genes da MYH7, as causas mais frequentes de CMH, sendo responsáveis por mais de 60% dos casos onde uma causa genética foi identificada (Xu et al., 2010).

As análises de predições de patogenicidade da mutação p.Glu542Gln foram divergentes, variando entre neutra e potencialmente danosas. Apesar disso, esta mutação tem sido associada à CMH na literatura e em bancos de variantes. Poucos estudos demonstram a presença dessa mutação em pacientes com CMH, porém em todos eles, há relação com a presença de hipertrofia ventricular e manifestação favorável da doença (Marsiglia et al. 2013, Ingles et al., 2005, Fokstuen et al. 2010 e Rodríguez-García et al. 2010).

No nosso estudo, os indivíduos que apresentaram essa mutação de forma isolada, não apresentaram a manifestação fenotípica da doença, pelo menos até a quarta década de vida (pai com 39 anos).

Por outro lado, a mutação p.Asp610His, após as análises *in silico*, foi classificada como potencialmente danosa, embora, a pesquisa no CLINVAR mostre que esta mutação tem efeito incerto. Praticamente, não existem relatos desta variante na literatura. Encontramos somente um estudo que cita essa mutação. Nesse estudo, ela esteve presente em um único paciente portador de CMH, porém, os dados ainda são poucos para se afirmar a patogenicidade da mesma (Olivotto et al. 2011). No nosso estudo, a presença dessa mutação por si só não manifesta qualquer fenótipo clínico associado à CMH.

O escore de risco de MSC em cinco anos foi desenvolvido pela ESC em 2014 para estratificar o risco de ocorrência de eventos malígnos e auxilia na indicação de implante de CDI. Entretanto, há controvérsias quanto a sua eficácia e precisão.

No nosso estudo, a probanda da família A havia sofrido uma parada cardiorespiratória e possuía um CDI implantado. Se o escore de risco fosse aplicado

no momento do diagnóstico de CMH (onde a paciente ainda não havia apresentado MSC abortada) o mesmo não indicaria implante de CDI, dado baixo risco de MSC em cinco anos. Uma coorte retrospectiva realizada por Maron et al. (2015) avaliou 1629 pacientes com idade acima de 16 anos, onde 35 apresentaram MSC, 46 indivíduos tiveram choques apropriados pelo CDI e 414 indivíduos receberam choque inapropriado pelo CDI, nos quais foi aplicado o escore de risco de MSC, sendo observado que dos 35 pacientes com MSC 60% obteve risco baixo calculado pelo escore.

Diante desta evidências, acreditamos que sejam necessárias ferramentas de reclassificação, quando os pacientes forem considerados de baixo ou intermediário risco pelo escore, considerando as características genéticas do indivíduo, como a presença de mutações potencialmente patogênicas e dados de RMN cardíaca. Diversos estudos indicam que a quantidade de fibrose (avaliada pelo realce tardio) está diretamente ligada ao maior risco de MSC (Bruder et al. 2010, O'Hanlon et al, 2010 e Shiozaki et al., 2013).

Esse estudo contribuiu para um melhor entendimento da CMH, ao apresentar duas famílias com características bem definidas relacionadas à doença, possibilitando uma análise aprofundada das mutações e características clínicas encontradas e deu suporte para a consolidação de um serviço de análise e aconselhamento genético no Instituto Nacional de Cardiologia, visto que hoje no Rio de Janeiro é a única instituição pública a realizar esse serviço.

Todos os participantes do estudo passaram por consultas genéticas onde foram orientados quanto aos riscos e limitações associados à mutação patogênica e transmissão dos alelos mutantes. Além disso, aqueles que apresentaram genótipo positivo independente ou não da manifestação do fenótipo, foram encaminhados para acompanhamento regular no próprio serviço.

Já se tem constatado que análise genética possui um bom custo benefício na saúde pública, visto que permite a descontinuação do acompanhamento com exames clínicos daqueles familiares nos quais a análise genética foi negativa, diminuindo o custo dos serviços, além de permitir melhor orientação àqueles nos quais o genótipo foi positivo (Wordsworth S, 2010).

Através do nosso estudo, ficou claro a necessidade de uma equipe multidisciplinar treinada para o aconselhamento genético e familiar, baseado na

percepção do impacto que essa doença causa às famílias. Idealmente esta equipe deveria ser formada por cardiologista, geneticista, assistente social e psicólogo.

Uma das limitações encontradas, foi o número de familiares voluntários à participar do estudo. Apesar de famílias numerosas, não foi possível o acesso a alguns familiares e nem todos atenderam ao nosso convite. Ainda são poucos os estudos genéticos da CMH no Brasil, sendo a maioria dos dados sobre o assunto advinda de populações européias e americanas, o que reforça a importância de estudos desenvolvidos com a população brasileira.

7. CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que a mutação p.Arg453Cys na cadeia pesada da β miosina é responsável pela manifestação e gravidade da expressão da CMH na família A, e que a dupla mutação no gene MYBPC3, seria determinante para o desenvolvimento da forma grave de CMH no probando da família B.

A provável associação patogênica das mutações p.Glu542Gln e p.Asp6010His, foi primeiramente descrita neste estudo.

Acreditamos que a aplicação do escore de risco de morte súbita cardíaca necessite de novos critérios de reclassificação, como a análise genética e ressonância magnética, para os pacientes classificados como baixo e intermediário risco.

8. REFERÊNCIAS

Arola A, Jokinen E, Ruuskanen O, et al. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathies in children and adolescents. A nationwide study in Finland. *Am J Epidemiol.* 1997; 146: 385-393.

Ababou A, Rostkova E, Mistry S, et al. Myosin binding protein C positioned to play a key role in regulation of muscle contraction: structure and interactions of domain C1. *J Mol Biol.* 2008; 384: 615-630.

Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm.* 2011; 8: 1308-1339.

Arteaga E. Cardiomiopatia hipertrófica: estudo da sobrevida e fatores prognósticos. São Paulo, 1998; 67p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Anan R, Greve G, Thierfelder L, et al. Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutation that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1994; 93: 280-285.

Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *JACC.* 2009; 54: 200-211.

Brito D, Richard P, Isnard R, et al. Miocardiopatia hipertrófica familiar: A mesma mutação, diferente expressão fenotípica. Estudo comparativo de duas famílias. *Rev Port Cardiol.* 2003; 22: 1445-1461.

Bertalanffy LV, O sistema genético: As leis da herança de Mendel e ligação genética, IN: Pasternark JJ. Genética Molecular Humana. Ed. Manole. 1 ed. 1999; Cap 3, 69-70.

Blankenfeldt W, Thoma NH, Wray JS, et al. Crystal structures of human cardiac-myosin II S2 – provide insight into the functional role of the S2 subfragment. *PNAS.* 2006; 103: 17713-17717.

Briasoulis A, Mallikethi-Reddy S, Palla M, et al. Myocardial fibrosis on cardiac magnetic resonance and cardiac outcomes in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis. *Heart.* 2015; 101: 1406-1411.

Brito D, Richard P, Isnard R, et al. Miocardiopatia hipertrófica familiar: A mesma mutação, diferente expressão fenotípica. Estudo comparativo de duas famílias. *Rev Port Cardiol*. 2003; 22: 1445-1461.

Bittencourt MI, Rocha RM, Filho FMA. Cardiomiopatia hipertrófica. *Rec Bras Cardiol*. 2010; 23: 17-24.

Briona M, Allegue C, Gil R, et al. Identification of a Novel MYBPC3 Gene Variant in a Patient With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Ann of Clin & Lab Scien*. 2010; 40: 285-289.

Bruder O, Wagner A, Jensen CJ, et al. Myocardial scar visualized by cardiovascular magnetic resonance imaging predicts major adverse events in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56: 875-887.

Cuda G, Fananapazir L, Zhu WS, et al. Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1993; 91: 2861–2865.

Crilly JG, Boehm EA, Blair E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 1776–1782.

Captur G, Lopes L, Patel V, et al. Abnormal Cardiac Formation in Hypertrophic Cardiomyopathy - Fractal Analysis of Trabeculae and Preclinical Gene Expression. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014; 7: 241-248.

Charron P, Dubourg O, Desnos M, et al. Diagnostic value of electrocardiography and echocardiography for familial hypertrophic cardiomyopathy in a genotype adult population. *Circulation*. 1997; 96: 2145-2149.

Cardim N, Perrot A, Santos S, et al. Miocardiopatia Hipertrófica em População Portuguesa: mutações da proteína C que liga a miosina. *Rev Port Cardiol*. 2005; 21: 1463-1476.

Colan SD, Lipshultz SE, Lowe AM, et al. Epidemiology and cause-specific outcome of hypertrophic cardiomyopathy in children: findings from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Circulation*. 2007; 115: 773-781

Dulhunty AF. Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin and Exp Pharm and Phys*. 2006; 33: 763-772.

Elliot P, Anastasakis A, Borger MA, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Euro Heart J*. 2014; 35: 1-55

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic-reticulum. *Am J of Physiol.*1983; 245: 1-14.

Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev.* 2002; 82: 945-980.

Fannapazir L, Epstein ND. Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta myosin heavy chain gene mutations. *Circulation*, 1994; 89: 22-32.

Fokstuen S, Munoz A, Melacini P, et al. Rapid detection of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy by custom DNA resequencing array in clinical practice. *J Med Genet.* 2001; 48: 572-576.

Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for the Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 58: 212-260.

Genomics of Cardiovascular Development, Adaptation, and Remodeling. NHLBI Program for Genomic Applications, Harvard Medical School. URL: <http://www.cardiogenomics.org>.

Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell.* 1990; 62: 999-1006.

Girolami F, Ho CY, Semsarian C, et al. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55: 1444–1453.

Ho CY. Hypertrophy cardiomyopathy. *Heart Fail Clin.* 2010a; 6: 141–159.

Ho CY. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2010b; 122: 2430-2440.

Ho CY, Sweitzer NK, McDonough B, et al. Assessment of diastolic function with doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2002; 105: 2992–2997.

Ho CY. New paradigms in hypertrophic cardiomyopathy: insights from genetics. *Progr in Ped Cardiol.* 2011; 31: 93-98.

Ho CY. Hypertrophic cardiomyopathy: Preclinical and Early Phenotype. *J of Cardiovasc Trans Res.* 2009; 2: 462-470.

Ingles J, Doolan A, Chiu C. et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counseling. *J Med Genet*. 2005; 42-59.

Junqueira LCU, Carneiro J. Tecido Muscular. IN Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008; p. 177 – 190.

Kim JB, Porreca GJ, Song L, et al. Polony multiplex analysis of gene expression (PMAGE) in mouse hypertrophic cardiomyopathy. *Science*. 2007; 316: 1481–1484.

Lewis JF, Maron BJ. Clinical and morphological expression of hypertrophic cardiomyopathy in patients with >65 years of age. *Am J Cardiol*. 1994; 73: 1105-1111.

Li DY, Benjamin IJ. Structure and function of the normal heart and blood vessels. IN: Andreoli and Carpenter's Cecil essentials of medicine. Ed. Saunders Elsevier. 2004; p. 29-31.

Marian AJ. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. *Eur J Clin Invest*. 2010; 40: 1365-2362.

Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33: 655-670.

Marian AJ. On predictors of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 994–996.

Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 1997; 350: 127-133.

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

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*. 1995; 92: 785-789.

Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol* . 2012a; 60: 705–715.

Maron MS, Rowin EJ, Lin D, et al. Prevalence and clinical profile of myocardial crypts in hypertrophic cardiomyopathy. *Circul Cardiovasc Imag*. 2012b; 5: 441-447.

Maron BJ, Casey SA, Chan RH, et al. Independent Assessment of the European Society of Cardiology Sudden Death Risk model for hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2015; 16: 757-764.

Markoul M, Ackerman MJ, Atkins DL, et al. Clinical Spectrum in a family with tropomyosin-mediated hypertrophic cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Pediatr Cardiol*. 2011; 32: 215-220.

Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*. 2008; 77: 659-666.

Marsiglia JDC, Credidio FL, Oliveira TGM, et al. Screening of MYH7, MYBPC3 and TNNT2 genes in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2013; 166: 775-782.

Morita H, Nagai R, Seidman JG, et al. Sarcomere gene mutations in hypertrophy and heart failure. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010; 3: 297-303.

Niimura H, Bachinski L, Sangwatanaroj S, et al. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1248-1257.

Ogawa Y. Role of ryanodine receptors. *Critic Rev in Bioch and Mol Biol*. 1994; 29: 229-274.

Opie LH. Mecanismos de contração e relaxamento do coração. IN: Libby P. et al. Braunwald tratado de doenças cardiovasculares. Ed Saunders Elsevier. 8 ed. 2010; 509-514.

Oliva-Sandoval MJ, Ruiz-Espejo F, Monserrat L, et al. Insights into genotype–phenotype correlation in hypertrophic cardiomyopathy. Findings from 18 spanish families with a single mutation in *MYBPC3*. *Heart*. 2010; 96: 1980-1984.

Ortiz MF, Rodríguez-García MI, Hermida-Prieto M, et al. 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*. 2009; 62: 572-575.

Olivotto I, Girolami F, Sciagrà R et al. Microvascular function is selectively impaired in patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomere myofilament gene mutations. *JACC*. 2011; 58: 839-848.

O'Hanlon R, Grasso A, Roughton M, et al. Prognostic Significance of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56: 867-874.

Paulsen F, Waschke J. Sobotta - Atlas de anatomia humana: Órgãos Internos. Ed Guanabara. 23 ed. 2012; 4-16

Pasquale F, Syrris P, Kaski JP, et al. Long-term out-comes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012; 5: 10–17.

Palmer BM, Fishbaugher DE, Schmitt JP, et al. Differential cross-bridge kinetics of FHC myosin mutations R403Q and R453C in heterozygous mouse myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: 91–99.

Perry M, Elliott AA, Michael A. et al. ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2014; 35: 2733–2779.

Richard P, Charron P, Carrier L, et al. Genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003; 107: 2227–2232.

Rodríguez-Gardía MI, Monserrat L, Ortiz M, et al. Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *BMC Med Genet*. 2010; 11: 67.

Sata M, Matsuura M, Ikebe M. Characterization of the motor and enzymatic properties of smooth muscle long S1 and short HMM: role of the two headed structure on the activity and regulation of myosin motor. *Biochemistry*. 1996; 35: 11113–11118.

Santos S, Lança V, Oliveira H, et al. Genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry DNA arrays and high resolution melting. *Rev Port Cardiol* . 2011; 30: 7-18.

Semsarian C, Ahmad I, Giewat M, et al. The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1013–1020.

Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001; 104: 557-567.

Sfichi-Duke L, Garcia-Cazarin ML, Sumandea CA, et al. Cardiomyopathy-causing deletion K210 in cardiac troponin T alters phosphorylation propensity of sarcomeric proteins. *J Mol and Cell Cardiol*. 2010; 48: 934-942.

Shiozaki AA, Senra T, Arteaga E, et al. Myocardial fibrosis detected by cardiac CT predicts ventricular fibrillation/ventricular tachycardia events in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2013; 7: 173-181.

Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med.* 2009; 1:13.- 13.5.

Sommese RF, Sung J, Nag S, et al. Molecular consequences of the R453C hypertrophic cardiomyopathy mutation on human β -cardiac myosin motor function. *PNAS.* 2013; 110: 12607-12612.

Spirito P, Bellone P, Harris KM, et al. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1778-1785.

Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA.* 2006; 296:1867-1876

Tsoutsman T, Kelly M, Ng DC, et al. Severe heart failure and early mortality in a double-mutation mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2008; 117: 1820-1831.

Watkins H, Rosenweig A, Hwang D, et al. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1992; 326: 1108-1114.

Wang S, Zou Y, Fu C, et al. Worse prognosis with gene mutations of beta-myosin heavy chain than myosin-binding protein C in chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol.* 2008; 31: 114-118.

Winne K, Braunwald E. The cardiomyopathies and myocarditis - hypertrophic cardiomyopathy IN: Braunwald E, Heart Disease – A textbook of Cardiovascular Medicine, 5 ed. Ed WB Saunders, 1997: 1414-1426.

Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA et al. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and extent of hypertrophy. *A Review Prog Cardiovasc Dis.* 1985; 28: 1-83.

Wordsworth S, Leal J, Blair E, et al. DNA testing for hypertrophic cardiomyopathy: a cost-effectiveness model. *Eur Heart J.* 2010; 31: 926-935.

Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44: 1903- 1910.

Xu Q, Dewey S, Nguyen S, et al. Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48: 899–909.

Zou Y, Wang J, Liu X, et al. Multiple gene mutations, not the type of mutation, are the modifier of left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mal Biol Rep*. 2013; 40: 3969-3976.

9. APÊNDICES

Caracterização Clínica de Pacientes com Cardiomiopatias Herdadas

Instituição: Instituto Nacional de Cardiologia

Investigadores: Glauber Monteiro Dias (Responsável)

Fernando E. S. Cruz Filho

Ana Luisa Sales

Julianny Freitas Rafael

Telefones para contato em emergências: (21) 3037-2431 / (27) 98121- 4488
/ (21) 97835-0705 / (21) 99416-9402

Endereço: Instituto Nacional de Cardiologia - Rua das Laranjeiras, 374 -
Laranjeiras, Rio de Janeiro - RJ, 22240-006

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa: Rua das Laranjeiras, 374 -
Laranjeiras, Rio de Janeiro - RJ, 22240-006

Telefone: **(21) 3037-2421**

1. Introdução

Você está sendo convidado a participar de um estudo que procura avaliar as características clínicas de pacientes com suspeita de doença do músculo cardíaco. Antes de você aceitar participar deste estudo é importante que você leia as explicações a seguir e, em, caso de alguma dúvida, pergunte e as esclareça com o pesquisador. O investigador do estudo discutirá com você essas dúvidas permitindo que seu consentimento seja livre e esclarecido.

2. Proposta do Estudo

Esse estudo tem como o objetivo analisar as características clínicas de pacientes com doenças do músculo cardíaco e seus familiares, portadores de alterações genéticas, além de relacionar a presença dessas alterações às manifestações no eletrocardiograma, ecocardiograma, Holter e ressonância magnética. As cardiopatias hereditárias são doenças herdadas dos pais. As

instruções para a “fabricação” de cada componente do nosso organismo estão armazenadas sob a forma de um código (código genético) em uma substância chamada DNA, presente em todas as células que compõe seu corpo. Essa substância é como uma grande biblioteca, com milhares de livros (genes) cada um com milhares de letras (A, G,T,C). As instruções guardadas nestes “livros” são fatores determinantes de muitas das nossas características como por exemplo a cor dos olhos e o tipo sanguíneo, A “biblioteca” de cada indivíduo é única: quando somos gerados, herdamos cópias da metade dos “livros” que compõe a “biblioteca” de nosso pai e nossa mãe, que sem combinam em uma única “biblioteca” exclusiva que fazem o novo indivíduo.

Algumas trocas de letras não causam problemas, entretanto outras causam doença.

3. Duração do estudo

Você e seus familiares serão uma das diversas famílias que irão participar desde estudo, o qual será realizado no Instituto Nacional de Cardiologia. A duração esperada deste estudo é de aproximadamente 48 meses. Mulheres com possibilidade de engravidar podem participar do estudo, assim como as que estão utilizando métodos anticoncepcionais. Não existe restrição para mulheres em fase de amamentação ou gestantes.

4. Procedimentos a serem realizados

O período deste estudo clínico é de aproximadamente 48 meses e você e sua família serão solicitados a comparecer a este hospital para se submeter a diversos exames clínicos e laboratoriais, Os exames não invasivos são exame de sangue, eletrocardiograma convencional, eletrocardiograma de 24 horas (Holter), ecocardiograma e quando necessário ressonância magnética. O exame de sangue é uma coleta de sangue simples com agulha e seringa de preferência na veia do braço. O eletrocardiograma é realizado com doze plaquinhas ligadas a fios e são colocados no seu peito, braços e pernas, enquanto estiver deitado e que registra as informações em um aparelho. O Holter é semelhante ao eletrocardiograma com a diferença de que ele fica 24 horas em você e o aparelho que registra as informações é portátil. O

ecocardiograma é um ultrassom do coração, realizado com você deitado, através de um aparelho que é deslizado sobre o peito e registra as informações. A ressonância cardíaca magnética é um exame onde o paciente deitado em uma maca, entra em um tubo, onde são retiradas "fotos" do seu coração. Não significa que fará todos esses exames, mas quando necessário alguns poderão ser repetidos. Há um pequeno desconforto durante a coleta de sangue, com risco discreto de hematoma no local da punção, os demais exames não trazem risco ou desconforto para você. Você será sempre orientado pelos investigadores do estudo e nada lhe será cobrado. Você poderá ser chamado por telefone ou correio para comparecer o ambulatório outras vezes ou para repetir alguns exames acima descritos. Você terá acompanhamento pelo seu médico assistente que será informado dos resultados de todos os exames que você se submeteu. Os doadores envolvidos na pesquisa poderão doar novas amostras de sangue para análise das mutações, além do coletado para diagnóstico genético. Todo material doado será destinado exclusivamente para a pesquisa e descartado após a pesquisa.

É importante que você informe ao seu médico qualquer problema que lhe ocorra durante o estudo, incluindo novos ou antigos sintomas ou queixas que se manifestem, incluindo melhora ou regressão desses sintomas. Não haverá informações coletadas de seu prontuário, todas as informações serão obtidas com você durante a entrevista com os investigadores.

5. Riscos e Desconfortos

A coleta de sangue implica em uma dor leve durante a introdução da agulha na pele e na veia do braço. Pode surgir vermelhidão no local da picada imediatamente após a coleta ou mesmo se mantendo por até 3 dias. Nas pessoas mais sensíveis, ou com medo, a coleta por si só pode causar desmaios.

Os demais exames (Eletrocardiograma, Ecocardiograma e Holter 24h), não trazem desconforto ou risco para você.

A ressonância cardíaca magnética é um exame que não envolve dor, mas pode haver um desconforto relacionado à sensação de claustrofobia em pessoas

sensíveis. Outro fator de desconforto é o ruído do aparelho, que em algumas partes do exame pode ser bem alto, mas, para minimizar esse inconveniente, oferecemos protetores e fones de ouvido com música. necessário o uso de Nesse exame é necessário o uso de contraste. Esse contraste é diferente dos contrastes à base de iodo usado nos exames de raio-x, e mais seguro. Para evitar reações ao contraste será perguntado a você se tem alergia a gadolínio (tipo de constraste usado no exame).

6. Exclusão do estudo

Existem neste estudo critérios de inclusão e exclusão que serão discutidos com você. Você será excluído do estudo caso o investigador ache necessário, mesmo sem seu conhecimento, pelas seguintes razões: devido a desobediência as orientações do estudo como faltar as consultas de avaliação ou dos exames. Você pode pedir para sair do estudo a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo para seu tratamento.

7. Possíveis benefícios deste estudo

Esse estudo permitirá um melhor conhecimento da doença investigada. Este fato pode beneficiar seu tratamento atual e futuro e de outras pessoas portadoras da doença. O custo de todas as consultas e exames necessários neste estudo serão cobertos, sem nenhum custo para você e seus familiares.

É possível entretanto, que nenhum benefício a sua saúde ocorra durante ou após este estudo completado.

8. Confidencialidade

As informações de seu histórico médico são confidenciais (secretas entre você e a equipe médica) e serão tomados todos os cuidados para mantê-las assim, a menos que seja requerido judicialmente, apenas os investigadores e auditores médicos terão acesso aos dados confidenciais do estudo.

Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em alguma parte.

Assinando este consentimento você estará autorizando para estas pessoas o acesso a seu prontuário e aos seus dados.

Todo o material biológico coletado será utilizado para este estudo.

9. Novos Achados

Durante o estudo você será informado de qualquer nova descoberta significativa sobre o resultado dos exames, que possam alterar sua vontade de continuar participando deste estudo.

10. Respostas a perguntas sobre este estudo

Se durante o estudo você tiver problemas ou gostaria de esclarecer alguma dúvida sobre a conduta deste estudo, entre em contato nesse numero (27) 98121- 4488.

11. Participação voluntária

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode recusar a participar bem como desistir a qualquer momento, antes ou durante o período do estudo sem qualquer prejuízo para seu tratamento. Caso você decida descontinuar do estudo após seu início, para sua própria segurança você deverá retornar ao hospital para conversar com o médico do estudo para que ele possa orientá-lo sobre as possíveis opções. É garantido por parte dos investigadores o ressarcimento das despesas associadas a transporte e alimentação, quando vierem ao hospital realizar procedimentos relacionados a pesquisa. Caso haja algum dano decorrente da participação na pesquisa, você tem direito de solicitar indenização por meios legais.

12. Consentimento para participar deste estudo

Eu,,
recebi uma via deste acordo de consentimento livre e esclarecido, li e compreendi este documento, na qual foram me informados todos os dados importantes sobre a conduta deste estudo. Me foi oferecido ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram

totalmente. Se eu não puder participar ou se eu decidir suspender minha participação neste estudo, não serei penalizado e não renunciarei de quaisquer direitos legais. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Data: ____/____/____

Assinatura do paciente

Documento de identificação:

Assinatura e carimbo do investigador

TERMO DE ASSENTIMENTO **(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012- CNS/CONEP)**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada **Caracterização Clínica de Pacientes Com Cardiomiopatias Herdadas** sob minha responsabilidade e do **Dr. Fernando Eugênio Cruz Filho**, cujo objetivo é **verificar a relação entre a presença alterações genéticas em pacientes com doenças do músculo cardíaco e a forma como ela se apresenta em exames como ecocardiograma, Holter e eletrocardiograma.**

Para realização deste trabalho usaremos os seguintes métodos: exame de sangue, eletrocardiograma convencional, eletrocardiograma de 24 horas (Holter) e ecocardiograma. O exame de sangue é uma coleta de sangue simples com agulha e seringa de preferência na veia do braço. O eletrocardiograma é realizado com doze plaquinhas ligadas a fios e são colocados no seu peito, braços e pernas, enquanto estiver deitado e que registra as informações em um aparelho. O Holter é semelhante ao eletrocardiograma com a diferença de que ele fica 24 horas em você e o aparelho que registra as informações é portátil. O ecocardiograma é um ultrassom do coração, realizado com você deitado, através de um aparelho que é deslizado sobre o peito e registra as informações.

Seu nome assim como todos os dados que lhe identifiquem serão mantidos sob sigilo absoluto, antes, durante e após o término do estudo.

Quanto aos riscos e desconfortos: A coleta de sangue implica em uma dor leve durante a introdução da agulha na pele e na veia do braço. Pode surgir vermelhidão no local da picada imediatamente após a coleta ou mesmo se mantendo por até 3 dias. Nas pessoas mais sensíveis, ou com medo, a coleta por si só pode causar desmaios. Os demais exames (Eletrocardiograma, Ecocardiograma e Holter), não trazem desconforto ou risco para você.

Caso você venha a sentir algo dentro desses padrões, comunique ao pesquisador para que sejam tomadas as devidas providências.

Os benefícios esperados com o resultado desta pesquisa são, entender melhor como as doenças do músculo cardíaco se apresentam, para ajudar no tratamento, aconselhamento e acompanhamento de pacientes com a mesma doença.

No curso da pesquisa você tem os seguintes direitos: a) garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta; b) liberdade de abandonar a

pesquisa a qualquer momento, mesmo que seu pai ou responsável tenha consentido sua participação, sem prejuízo para si ou para seu tratamento (se for o caso); c) garantia de que caso haja algum dano a sua pessoa, os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores ou pela instituição responsável inclusive acompanhamento médico e hospitalar (se for o caso).

Caso haja gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelo pesquisador. Nos casos de dúvidas você deverá falar com seu responsável, para que ele procure os pesquisadores, a fim de resolver seu problema. Segue abaixo o contato dos pesquisadores em caso de dúvida ou emergência:

Glauber Monteiro Dias (Responsável)

Fernando E. S. Cruz Filho

Ana Luisa Sales

Julianny Freitas Rafael

Telefones para contato em emergências: (21) 3037-2431 / (27) 98121- 4488 / (21) 97835-0705 / (21) 99416-9402

Endereço: Instituto Nacional de Cardiologia - Rua das Laranjeiras, 374 - Laranjeiras, Rio de Janeiro - RJ, 22240-006

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa: Rua das Laranjeiras, 374 - Laranjeiras, Rio de Janeiro - RJ, 22240-006

Telefone: **(21) 3037-2421**

Assentimento Livre e Esclarecido

Eu _____ após ter recebido todos os esclarecimentos e assinado o TCLE, confirmo que o (a) menor _____ recebeu todos os esclarecimentos necessários, e concorda em participar desta pesquisa. Desta forma, assino este termo, juntamente com o pesquisador, em duas vias de igual teor, ficando uma via sob meu poder e outra em poder do pesquisador.

Local, data

Assinatura do responsável

Para menores de 18 anos a autorização é assinada pelo Pai ou responsável

Assinatura do pesquisador



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Fenotípica de pacientes com cardiomiopatias hereditárias

Pesquisador: Glauber Monteiro Dias

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 44740415.7.0000.5272

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

Patrocinador Principal: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.098.182

Data da Relatoria: 12/05/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo clínico observacional de pacientes portadores de cardiomiopatia hipertrofia acompanhados no ambulatório da especialidade do INC assim com seus parentes. Será realizado estudo genético assim como ECG, Holter, Ecocardiografia e Ressonância magnética dos pacientes e familiares que concordarem em participar do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as características clínicas de indivíduos portadores de mutações gênicas causativas de cardiomiopatias hereditárias, correlacionando fenótipo de genótipo.

Objetivo Secundário:

a) Caracterizar o fenótipo dos probandos e familiares portadores de mutações por exames clínicos e de imagem. b) Correlacionar mutação gênica à expressão clínica (fenótipo) da doença no probando e em seus familiares. c) Classificar as mutações encontradas quanto a sua patogenicidade. d)

Caracterizar molecularmente as mutações potencialmente patogênicas.

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

Fax: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.098.182

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue periférico implica em uma dor leve durante a introdução da agulha na pele. Pode surgir vermelhidão no local da picada imediatamente após a coleta ou mesmo se manter por 3 dias. Nas pessoas mais sensíveis pode causar desmaios. Os demais exames (Eletrocardiograma, Ecocardiograma e Holter 24h), não trazem desconforto ou risco para você. A ressonância cardíaca magnética é um exame que não envolve dor, mas pode haver um desconforto relacionado à sensação de claustrofobia em pessoas sensíveis. Outro fator de desconforto é o ruído do aparelho, que em algumas partes do exame pode ser bem alto, mas, para minimizar esse inconveniente, oferecemos protetores e fones de ouvido com música. Nesse exame é necessário o uso de contraste. Esse contraste é diferente dos contrastes à base de iodo usado nos exames de raio-x, e mais seguro. Para evitar reações ao contraste será perguntado a você se tem alergia a gadolínio (tipo de contraste usado no exame).

Benefícios:

O projeto propõe uma avaliação clínica ampla dos pacientes portadores de cardiomiopatias hereditárias e seus familiares, que inclui a história familiar, eletrocardiograma, exames de imagem e dados de análise genética. Os pacientes não terão seu acompanhamento clínico modificado ou prejudicado devido a condição de participante do projeto, nem serão submetidos a exames complementares além dos necessários para o acompanhamento de sua doença. Também não serão submetidos a intervenções terapêuticas. Os pacientes e seus familiares terão garantido o acompanhamento em ambulatório especializado em cardiomiopatias, além de aconselhamento genético e exames regulares para acompanhamento da doença. Esse estudo permitirá o conhecimento melhor da doença investigada e beneficiar o tratamento da mesma.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa de grande relevância uma vez que permitirá uma melhor compreensão da

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

Fax: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.098.182

patologia estudada, correlacionando achados clínicos com o diagnóstico molecular

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os documentos obrigatórios.

O TCLE assim como o Termo de Assentimento são adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS/MS 466/12 Capítulo XI Item 2.d cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e final ao Comitê de Ética em que foi submetido o projeto.

RIO DE JANEIRO, 09 de Junho de 2015

Assinado por:
monica moura de vasconcellos
(Coordenador)

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

Fax: (21)3037-2307

E-mail: cepinclaranjeiras@gmail.com