

## Prevalência e Expressão Fenotípica das Mutações nos Genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2* em Famílias com Cardiomiopatia Hipertrófica no Sul do Brasil: Um Estudo Transversal

*Prevalence and Phenotypic Expression of Mutations in the MYH7, MYBPC3 and TNNT2 Genes in Families with Hypertrophic Cardiomyopathy in the South of Brazil: A Cross-Sectional Study*

Beatriz Piva e Mattos<sup>1</sup>, Fernando Luís Scolari<sup>2</sup>, Marco Antonio Rodrigues Torres<sup>1</sup>, Laura Simon<sup>3</sup>, Valéria Centeno de Freitas<sup>2</sup>, Roberto Giugliani<sup>4</sup>, Úrsula Matte<sup>5</sup>

Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Serviço de Cardiologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>1</sup>; Serviço de Cardiologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>2</sup>; Centro de Terapia Gênica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>3</sup>; Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>4</sup>; Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Unidade de Análise de Moléculas e Proteínas – Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>5</sup>, RS – Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Mutações em genes do sarcômero são encontradas em 60-70% dos indivíduos com formas familiares de cardiomiopatia hipertrófica. (CMH). Entretanto, essa estimativa refere-se a populações de países do hemisfério norte. O perfil genético-molecular da CMH foi tema de poucos estudos no Brasil, particularmente na região sul do país.

**Objetivo:** Realizar a pesquisa de mutações dos genes sarcoméricos *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2* numa coorte de CMH estabelecida no extremo sul do Brasil, assim como avaliar as associações genótipo-fenótipo.

**Métodos:** Sequenciamento direto do DNA de todas as regiões codificantes dos três genes sarcoméricos foi realizada em 43 indivíduos consecutivos de dez famílias não-relacionadas.

**Resultados:** Mutações para CMH foram encontradas em 25 (58%) indivíduos de sete (70%) das dez famílias estudadas, sendo 14 (56%) deles fenótipo-positivos. Todas as mutações eram *missense*, quatro (66%) no gene *MYH7* e duas (33%) no gene *MYBPC3*. Não foram encontradas mutações no gene *TNNT2*. Mutações em *MYH7* foram identificadas em 20 (47%) indivíduos de seis (60%) famílias. Duas delas não haviam sido previamente relatadas. Mutações de *MYBPC3* foram detectadas em sete (16%) membros de duas (20%) famílias. Dois (5%) indivíduos apresentaram dupla heterozigose com mutações em ambos os genes. As mutações acometeram distintos domínios das proteínas codificadas e produziram expressão fenotípica variável. História familiar de CMH foi identificada em todos os indivíduos genótipo-positivos.

**Conclusões:** Nessa primeira análise genético-molecular da CMH realizada no sul do Brasil, foram encontradas mutações nos genes sarcoméricos *MYH7* e *MYBPC3* em 58% dos indivíduos. Doença relacionada ao gene *MYH7* foi identificada na maioria dos casos com mutação. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(3):257-265)

**Palavras-chave:** Mutação / genética; Cardiomiopatia Hipertrófica; Epidemiologia; Sarcômeros; Etnia e Saúde.

### Abstract

**Background:** Mutations in sarcomeric genes are found in 60-70% of individuals with familial forms of hypertrophic cardiomyopathy (HCM). However, this estimate refers to northern hemisphere populations. The molecular-genetic profile of HCM has been subject of few investigations in Brazil, particularly in the south of the country.

**Objective:** To investigate mutations in the sarcomeric genes *MYH7*, *MYBPC3* and *TNNT2* in a cohort of HCM patients living in the extreme south of Brazil, and to evaluate genotype-phenotype associations.

**Methods:** Direct DNA sequencing of all encoding regions of three sarcomeric genes was conducted in 43 consecutive individuals of ten unrelated families.

**Results:** Mutations for CMH have been found in 25 (58%) patients of seven (70%) of the ten study families. Fourteen (56%) individuals were phenotype-positive, of seven (70%) of the ten families of the study. All mutations were *missense*, four (66%) in *MYH7* and two (33%) in *MYBPC3*. We have not found mutations in the *TNNT2* gene. Mutations in *MYH7* were identified in 20 (47%) patients of six (60%) families. Two of them had not been previously described. Mutations in *MYBPC3* were found in seven (16%) members of two (20%) families. Two (5%) patients showed double heterozygosity for both genes. The mutations affected different domains of encoded proteins and led to variable phenotypic expression. A family history of HCM was identified in all genotype-positive individuals.

**Conclusions:** In this first genetic-molecular analysis carried out in the south of Brazil, we found mutations in the sarcomeric genes *MYH7* and *MYBPC3* in 58% of individuals. *MYH7*-related disease was identified in the majority of cases with mutation. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(3):257-265)

**Keywords:** Mutation / genetics; Cardiomyopathy, Hypertrophic; Epidemiology; Sarcomeres; Ethnicity and Health.

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

Correspondência: Beatriz Piva e Mattos •

HCPA – UFRCGS - Serviço de Cardiologia. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Sala 2060, Rio Branco. CEP 90035-903, Porto Alegre, RS – Brasil

E-mail: bpmattos@cardiol.br

Artigo recebido em 21/12/15; revisado em 11/02/16; aceito em 24/05/16

DOI: 10.5935/abc.20160133

## Introdução

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é a doença cardiovascular de origem genética mais prevalente, acometendo um em cada 200 indivíduos.<sup>1-3</sup> Apresenta distribuição geográfica universal, incidindo em diversos grupos étnicos, sem distinção de gênero.<sup>3</sup> É transmitida predominantemente por herança autossômica dominante com penetrância incompleta, idade e gene-dependentes.<sup>4,5</sup> Na atualidade, já foram descritas mais de 1500 mutações causadoras que, em sua maioria, envolvem 11 genes codificantes de proteínas do sarcômero e de discos Z.<sup>4-6</sup> Mais recentemente, foram identificadas mutações em proteínas de outras estruturas celulares relacionadas ao sarcômero, cuja patogênicidade ainda não foi comprovada.<sup>5,6</sup> Mutações causadoras costumam ser identificadas em 60-70% dos pacientes com formas familiares e em 30-40% dos casos esporádicos.<sup>2,4,6-10</sup> O acometimento dos genes codificantes da cadeia pesada da  $\beta$ -miosina cardíaca (*MYH7*) e da proteína C de ligação à miosina (*MYBPC3*) é evidenciado em, respectivamente, 25% a 35% dos casos avaliados no hemisfério norte.<sup>4,6,10,11</sup> O gene da troponina T (*TNNT2*) seria responsável por 5% dos pacientes, sendo que aos demais, atribui-se reduzida frequência individual, < 1%.<sup>5,6</sup>

O substrato molecular heterogêneo e a expressão fenotípica variável, características da CMH, podem ser influenciados por fatores étnicos e geográficos. Todavia, o perfil genético da doença foi definido com base em estudos desenvolvidos predominantemente em populações do hemisfério norte.<sup>7-9,12-30</sup> Enquanto que, no hemisfério sul, análises semelhantes são em número ainda restrito.<sup>31-34</sup> A população urbana brasileira, em relação à de outros países, apresenta estrutura genética definida por alto grau de miscigenação entre ancestrais europeus, africanos e indígenas.<sup>35</sup> Características étnicas próprias do sul do Brasil, expressas por reduzido grau de miscigenação entre indivíduos de ancestralidade diversa, justificam nosso interesse em definir o perfil genético da CMH nessa região.<sup>36</sup>

O objetivo deste estudo é realizar a pesquisa de mutações nos genes sarcoméricos *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2* e avaliar as associações genótipo-fenótipo numa coorte de CMH estabelecida no extremo sul do Brasil.

## Métodos

### Seleção de pacientes e avaliação clínica

Foi realizado um estudo transversal em uma amostra de conveniência de 43 indivíduos consecutivos, pertencentes a 10 famílias não-relacionadas, registrados no Ambulatório de CHM de um hospital terciário no sul do Brasil. Os familiares em primeiro grau incluídos no estudo correspondem àqueles que primeiro se apresentaram para avaliação no período de recrutamento. Todos os indivíduos integrantes desta análise eram originários desta região do país.

O fenótipo foi definido pela identificação ao ecocardiograma de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) assimétrica, expressa por espessura parietal máxima  $\geq 15$  mm em qualquer segmento com razão septo/parede posterior  $\geq 1,3$  na ausência de

dilatação da câmara e outras condições capazes de determinar alterações semelhantes. Na avaliação dos familiares, o critério adotado para identificação da doença foi de espessura parietal máxima do ventrículo esquerdo (VE)  $\geq 13$  mm no septo anterior ou parede posterior. Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação cardiovascular incluindo eletrocardiograma convencional em repouso e ecocardiograma. Dez pacientes foram submetidos à cineangiocoronariografia. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição, e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

### Análise genético-molecular

A extração de DNA do sangue periférico foi realizada de acordo com a técnica descrita por Miller et al.<sup>37</sup> A amplificação de todas as regiões codificantes dos genes sarcoméricos *MYH7* (38 exons), *MYBPC3* (33 exons) e *TNNT2* (15 exons) foi realizada por PCR.<sup>38</sup> Os fragmentos foram purificados por meio de Exo-SAP, de acordo com instruções do fabricante (USB Corporation, USA), seguido de sequenciamento direto com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA) e eletroforese capilar analisada por meio de *ABI3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA). As sequências obtidas foram comparadas às consideradas de referência: *MYH7* – NM\_000257, NP\_000248; *MYBPC3* – NM\_000256, NP\_000247; *TNNT2* – NM\_000364, NP\_000355. A nomenclatura para a descrição das variações de sequências seguiu a recomendação do *Human Genome Variation Society*.<sup>39</sup> Em alguns casos, a análise de cosegregação da mutação e dos dados clínicos foi efetuada para definição da patogênicidade.

A análise *in silico* foi aplicada para avaliar o efeito da substituição de um aminoácido da proteína com base na conservação das regiões afetadas por meio dos seguintes sistemas computacionais: PolyPhen2,<sup>40</sup> SIFT,<sup>41</sup> PROVEAN,<sup>42</sup> MutationTaster<sup>43</sup> e MutPred.<sup>44</sup> O sistema MutPred foi utilizado como gerador de hipótese sobre as propriedades estruturais e funcionais da mutação. Mutações sinônimas e substituições intrônicas em exons codificantes, não relatados como polimorfismos (SNPs) ou encontrados no *1000 Exome Variant Server (EVS) database*, foram também submetidas à análise *in silico* para identificação de possível alteração do tipo *splice site*. *NetGene2*<sup>45</sup> e *Human Splicing Finder*<sup>46</sup> foram adotados para cálculo dos valores de consenso de potenciais sítios de *splice*.

### Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos por média e desvio-padrão, e as variáveis categóricas por frequências relativas e absolutas. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a diferença entre dois grupos baseada em variáveis contínuas e simétricas pelo teste t de Student para amostras independentes. Variáveis categóricas foram comparadas por meio do teste qui-quadrado. Os dados foram processados utilizando o *software SPSS*, versão 18.0 (*SPSS Inc., Chicago Illinois, USA*). O nível de significância estatística adotado foi de  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Perfil clínico e genético-molecular

A população estudada foi constituída por 10 probandos consecutivos de famílias não-relacionadas e 33 familiares em primeiro grau. Todos eram caucasianos. As características clínicas da coorte estão apresentadas na tabela 1.

Mutações causadoras foram encontradas em 25 indivíduos (58%), compreendendo sete (70%) probandos e 18 (54%) familiares, pertencentes a sete (70%) das dez famílias avaliadas. Nas famílias com mutação conhecida, 18 (82%) dos 22 familiares examinados apresentavam mutação, mas somente sete (32%) eram fenótipo-positivos. Todos os familiares genótipo-negativos (n = 15;45%) apresentavam-se normais à avaliação clínica. Em todos os 11 (33%) carreadores de mutação sem evidências de HVE ao ecocardiograma, foram identificadas

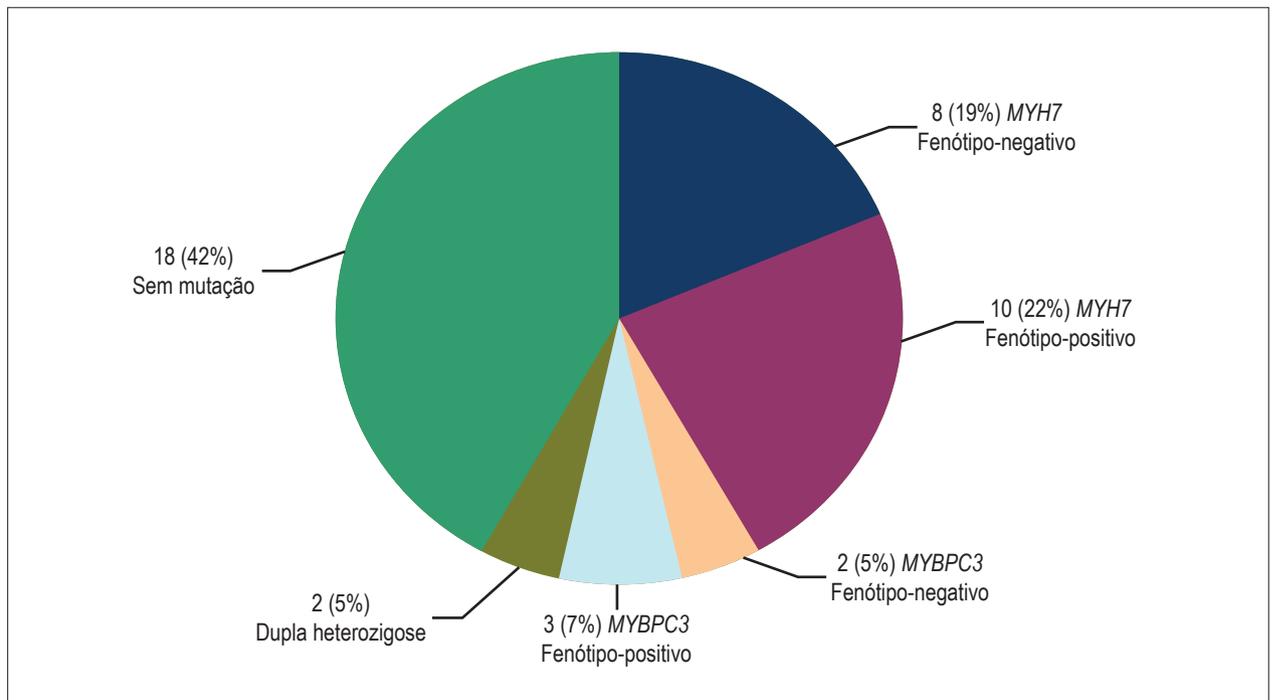
anomalias eletrocardiográficas incluindo ondas Q patológicas  $\geq 3$  mm e/ou  $> 40$  ms em duas ou mais derivações, com exceção de aVR (n = 10;90%), bloqueios fasciculares (n = 6; 54%), ondas S profundas em V2  $> 25$  mm (n = 3;27%) e ondas T negativas  $> 3$  mm (n = 1;1%).

Todas as mutações encontradas eram *missense*, quatro (66%) no gene *MYH7* e duas (33%) em *MYBPC3*. Não foram identificadas mutações em *TNNT2*. Duas das mutações do gene *MYH7* não haviam sido previamente relatadas na literatura. Mutações desse gene foram identificadas em 20 (47%) indivíduos de seis (60%) famílias, afetando os probandos e 14 familiares. As mutações do gene *MYBPC3* foram detectadas em sete (16%) indivíduos de duas (20%) famílias, acometendo os probandos e cinco familiares. Em uma única família, dois (5%) membros, o probando e um familiar, apresentaram dupla heterozigose com mutações simultaneamente nos genes *MYH7* e *MYBPC3* (Figura 1). Nas três (30%) famílias genótipo-negativas, todos familiares

**Tabela 1 – Características clínicas de uma coorte de cardiomiopatia hipertrófica no sul do Brasil constituída por 10 probandos não-relacionados e 33 familiares**

Características	Probandos (n = 10)	Familiares (n = 33)	
		Fenótipo-positivo (n = 7)	Fenótipo-negativo (n = 26)
Idade (anos)	53 ± 7	42 ± 20	32 ± 17
<b>Grupo racial</b>			
Caucasianos	10 (100%)	7 (100%)	26 (100%)
Gênero feminino	5 (50%)	4 (57%)	17 (65%)
<b>História familiar</b>			
CMH	7 (70%)	7 (100%)	15 (58%)
Morte súbita cardíaca	2 (20%)	4 (57%)	8 (30%)
Idade de início da doença (anos)	44 ± 12	39 ± 20	-
<b>Classe funcional NYHA</b>			
I/II	5 (50%)	5 (71%)	-
III/IV	5 (50%)	2 (29%)	-
<b>Ecocardiograma</b>			
Diâmetro do átrio esquerdo (mm)	46 ± 5	38 ± 8	32 ± 7
Diâmetro diastólico final do VE (mm)	43 ± 5	47 ± 5	45 ± 4
Diâmetro sistólico final do VE (mm)	25 ± 3	26 ± 3	25 ± 3
Espessura parietal máxima do VE (mm)	20 ± 4	20 ± 5	9 ± 7
Fração de ejeção %	72 ± 6	74 ± 5	71 ± 5
Obstrução da via-de-saída do VE	7 (70%)	-	-
Obstrução médio-ventricular esquerda	1 (10%)	2 (29%)	-
Gradiente na via-de-saída do VE (mmHg)	45 ± 33	-	-
<b>Tratamento</b>			
Ablação alcoólica do septo	3 (30%)	-	-
Miectomia	1 (10%)	-	-
Marca-passo de dupla-câmara	4 (40%)	-	-
Cardiodesfibrilador automático implantável	2 (20%)	1 (14%)	-

Dados apresentados como média ± desvio padrão. CMH: cardiomiopatia hipertrófica; NYHA: New York Heart Association; VE: ventrículo esquerdo.



**Figura 1** – Distribuição das mutações dos genes sarcoméricos MYH7 e MYBPC3 numa população com cardiomiopatia hipertrófica. Indivíduos com dupla heterozigose foram incluídos exclusivamente neste subgrupo.

eram clinicamente normais, enquanto que, nas sete famílias com mutação, 32% dos familiares avaliados eram fenótipo-positivos. As características das mutações encontram-se descritas na tabela 2 e a análise de patogenicidade na tabela 3.

### Mutações do gene MYH7

Nas seis (60%) famílias com doença causada pelo gene MYH7, somente 11 (55%) eram fenótipo-positivos, o probando e cinco familiares. Nos indivíduos fenótipo-positivos, a espessura parietal máxima do VE apresentou variação de 13 a 26 mm, média de  $20 \pm 4$  mm. Nesse gene, foram mapeadas quatro mutações. A substituição p.Ile263Thr foi identificada em apenas uma família, afetando exclusivamente o probando. O único familiar submetido à genotipagem era clinicamente normal e não exibia mutação. A mutação p.Ala797Thr foi detectada somente em dois indivíduos de uma família, no probando e em um familiar, fenótipo-negativo. Essa substituição, considerada patogênica apenas pelo sistema *MutPred*, foi relatada no 1000 EVS com a frequência alélica de 0,0002 na população afro-americana. Ambas as mutações associaram-se à HVE de grau leve ou moderado e às formas obstrutivas. A mutação p.Met877Ile, não descrita previamente, foi identificada em três indivíduos de uma família de quatro membros. A mutação foi considerada como uma alteração benigna por quatro dos cinco sistemas computacionais consultados. Entretanto, mostrou cosegregação com o fenótipo da CMH nos indivíduos com a doença, o que sugere seu efeito patogênico. O probando apresentava fenótipo moderado com obstrução de via-de-saída do VE. Obstrução médio-ventricular grave foi evidenciada em um dos membros da família e HVE

leve em outro. Nenhuma dessas três mutações relacionou-se à história familiar de morte súbita. A mutação p.Glu1468Lys, identificada em três famílias, não apresentava registro prévio na literatura ou nas bases de dados EVS e SNP. No entanto, todos os programas consultados favoreceram seu potencial patogênico. A análise de cosegregação demonstrou que todos os membros das famílias afetadas com exceção de um, considerado normal, eram carreadores da mutação. Em uma das famílias, a mutação foi encontrada no probando e em seis dos sete familiares avaliados, mas somente três eram fenótipo-positivos. O probando e um dos familiares apresentavam formas não-obstrutivas com HVE moderada. Obstrução médio-ventricular foi identificada em outro membro desta família, posteriormente acometido por morte súbita aos 66 anos durante o período de seguimento. Em outra família com essa mutação, o probando e os quatro familiares examinados apresentavam o genótipo, mas apenas dois eram fenótipo-positivos. Dois membros, o probando e um familiar jovem fenótipo-negativo, exibiam dupla heterozigose com mutação nos genes MYH7 e MYBPC3. O probando evidenciava HVE moderada e obstrução grave da via-de-saída, enquanto que o familiar com mutação isolada de MYH7, demonstrava forma leve não-obstrutiva. Na terceira família acometida, o probando e um familiar jovem fenótipo-negativo eram carreadores dessa mutação, a qual se associou à HVE moderada e obstrução grave da via-de-saída do VE.

### Mutações do gene MYBPC3

Nas duas (20%) famílias com mutações do gene MYBPC3, quatro (57%) dos carreadores eram fenótipo-positivos, os probandos e dois familiares. As mutações determinaram

Tabela 2 – Mutações dos genes sarcoméricos *MYH7* e *MYBPC3* na população em estudo

Gene/Exon	Mutação/Domínio	Alteração do aminoácido	Famílias	No. de indivíduos afetados fenótipo + / fenótipo –	Cosegregação	Fenótipo
<b>MYH7</b>						
9	Missense/Cabeça	p.Ile263Thr	IX	1/0	NT	HVE leve, forma obstrutiva
21	Missense/Domínio IQ	p.Ala797Thr	VI	1/1	NT	HVE moderada, forma obstrutiva
22	Missense/Pescoço	p.Met877Ile	V	3/0	Sim	HVE leve à grave, formas não-obstrutivas ou com obstrução de via-de-saída ou médio-ventricular
32	Missense/Haste	p.Glu1468Lys	IV, VIII, X	6/8*	Sim	HVE leve à moderada, formas não-obstrutivas ou com obstrução de via-de-saída ou médio-ventricular, morte súbita tardia
<b>MYBPC3</b>						
18	Missense/C4	p.Arg495Gln	III	3/2	Sim	HVE moderada à maciça, formas não-obstrutivas de início precoce, morte súbita prematura
25	Missense/C6	p.Val896Met	VIII	1/1**	NT	HVE moderada, formas obstrutivas

Domínio IQ: domínio de ligação à calmodulina; NT: não testado; HVE: hipertrofia ventricular esquerda; \*associada à p.Val896Met (*MYBPC3*), n = 2; \*\*associada à p.Glu1468Lys (*MYH7*), n = 2.

Tabela 3 – Análise da patogenicidade das mutações em *MYH7* e *MYBPC3*

Mutação	PolyPhen2	SIFT	PROVEAN	MutationTaster	MutPred
p.Ile263Thr	Benigno	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
p.Ala797Thr	Benigno	Benigno	Benigno	Benigno	Deletério
p.Met877Ile	Benigno	Benigno	Benigno	Deletério	Benigno
p.Glu1468Lys	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério	Deletério
p.Arg495Gln	Deletério	Benigno	Benigno	Deletério	Deletério
p.Val896Met	Benigno	Deletério	Benigno	Benigno	Deletério

HVE com marcada variação inter- e intrafamiliar, expressa por espessura parietal máxima do VE de 17 a 34 mm, média  $23 \pm 7$  mm. A mutação p.Arg495Gln foi identificada em uma família, no probando e em quatro dos cinco membros submetidos à genotipagem, dois dos quais eram fenótipo-positivos. A análise de cosegregação nessa família e três sistemas computacionais favoreceram o seu papel patogênico na CMH. A mutação relacionou-se à HVE de moderada à maciça, em formas não-obstrutivas de início precoce, associadas à história familiar de morte súbita prematura. A mutação p.Val896Met foi encontrada em dois indivíduos de uma família de seis membros, os quais eram também carreadores da mutação p.Glu1468Lys no gene *MYH7*. Dois programas distinguem o caráter patogênico desta variante, relatada no EVS com uma frequência alélica de 0,0015 e 0,0048 em indivíduos de origem africana e europeia, respectivamente.

A comparação de variáveis clínicas entre os indivíduos genótipo-positivos e genótipo-negativos demonstrou que

história familiar de CMH e/ou morte súbita foi mais frequente naqueles com mutação identificada (Tabela 4). Indicadores clínicos não diferiram significativamente entre os carreadores de mutações dos dois genes, exceção feita à menor idade de apresentação e história familiar de morte súbita, que se associaram à doença causada por *MYBPC3* (Tabela 5).

## Discussão

O presente estudo representa a primeira análise genético-molecular da CMH realizada em população do extremo sul do Brasil, a qual compreendeu a avaliação de membros de famílias não-relacionadas. Foi estudada uma amostra de pacientes-índices consecutivos e seus respectivos familiares, considerados como representativos de uma coorte ambulatorial não-referenciada de CMH. Mutações causadoras foram detectadas em 58% dos indivíduos e em 70% das famílias. As mutações do gene *MYH7*, identificadas em 47% dos indivíduos, foram

**Tabela 4 – Comparação de características clínicas entre indivíduos genótipo-positivos e genótipo-negativos**

Características	Genótipo-positivo (n = 25)	Genótipo-negativo (n = 18)	p
Idade (anos)	41 ± 19	35 ± 17	0,3
<b>Gênero</b>			
Masculino	13 (52%)	4 (22%)	0,08
Feminino	12 (48%)	14 (78%)	
<b>História familiar</b>			
CMH	25 (100%)	4 (22%)	0,0001
Morte súbita cardíaca	12 (48%)	2 (11%)	0,019

Dados apresentados por média ± desvio padrão. CMH: cardiomiopatia hipertrófica.

**Tabela 5 – Comparação de características clínicas entre carreadores de mutações nos genes MYH7 e MYBPC3**

	MYH7 (n = 20)	MYBPC3 (n = 7)	p
Idade (anos)	48 ± 19	32 ± 16	0,102
Idade de apresentação (anos)	47 ± 13	25 ± 13	0,0001
<b>Gênero</b>			
Masculino	13 (65%)	5 (71%)	0,127
Feminino	7 (35%)	2 (29%)	
<b>História familiar</b>			
CMH	20 (100%)	7 (100%)	-
Morte súbita	7 (35%)	5 (71%)	0,016
<b>Classe funcional NYHA</b>			
I/II	15 (75%)	6 (86%)	0,246
III/IV	5 (25%)	1 (14%)	
Diâmetro do átrio esquerdo (mm)	40 ± 6	33 ± 7	0,082
Diâmetro diastólico do VE (mm)	45 ± 5	40 ± 4	0,06
Diâmetro sistólico do VE (mm)	26 ± 4	24 ± 2	0,195
Espessura parietal máxima do VE (mm)	15 ± 6	19 ± 10	0,274
Fração de ejeção (%)	67 ± 19	70 ± 3	0,497
Obstrução na via-de-saída do VE	6 (30%)	1 (14%)	0,133

Dados apresentados por média ± desvio padrão; CMH: cardiomiopatia hipertrófica; VE: ventrículo esquerdo; NYHA: New York Heart Association.

predominantes em relação àquelas do gene *MYBPC3*, presentes em apenas 16% dos casos. A maioria dessas mutações demonstrou serem privativas de uma única família. Duas mutações do gene *MYH7* foram consideradas como novas. A presença de teste genético positivo no probando possibilitou a identificação molecular da doença em até 82% dos respectivos familiares, dos quais 39% eram fenótipo-positivos. Todos os carreadores de mutação sem evidências de HVE ao ecocardiograma apresentaram anomalias eletrocardiográficas, expressas majoritariamente por ondas Q patológicas, as quais podem ser indicativas da doença em fase pré-clínica.<sup>47</sup>

A CMH é considerada uma doença universal, que acomete diferentes populações expostas a uma ampla variedade de fatores ambientais e geográficos. Embora a expressão fenotípica da CMH não evidencie aspectos distintos em populações do hemisfério norte e sul, ainda não está claramente definido se ambas compartilham o mesmo substrato genético. A análise molecular de indivíduos com a doença, originários de múltiplas regiões geográficas e de etnia diversa, certamente contribuirá para o entendimento das complexas características desta entidade. O perfil genético da CMH foi definido com base no estudo de populações não-relacionadas da Europa e América do Norte.<sup>7-9,12-24</sup> Mais recentemente, a análise genético-molecular

foi estendida a coortes da Ásia,<sup>25,26,28,30</sup> África Setentrional<sup>27</sup> e Austrália.<sup>32</sup> Todavia, dados gerados a partir da avaliação de populações do hemisfério sul, são comparativamente escassos.<sup>31-34</sup> Em nosso país, as características moleculares da CMH foram determinadas em indivíduos oriundos das regiões sudeste, norte e nordeste.<sup>34</sup> A assimilação de testes genéticos mais resolutivos à prática clínica deverá certamente favorecer a sua aplicação em maior escala em coortes de todos os continentes.

Na presente análise, mutações causadoras foram identificadas com maior frequência do que em estudos prévios, que incluíram formas familiares e esporádicas de CMH.<sup>8,9,18,19, 22-27</sup> A maior positividade de nossos resultados pode ser atribuída ao fato de termos avaliado uma amostra bem caracterizada da doença, ainda que a identificação de mutações apresente variação de acordo com a população estudada.<sup>10</sup> Todas as mutações dos genes *MYH7* e *MYBPC3* detectadas eram *missense*. A ausência de acometimento no gene *TNNT2* pode ser atribuída à sua menor prevalência na população em geral e a idade mais avançada dos indivíduos integrantes dessa amostra, considerando que esse gene apresenta relação com início precoce e morte súbita prematura.<sup>4,6,13</sup> As mutações de *MYH7* foram predominantes em relação àquelas que envolveram *MYBPC3*, ao contrário do referido em estudos prévios baseados em populações independentes do hemisfério norte.<sup>7,8,11,22,23,27,48</sup> Essa característica foi descrita em pacientes com CMH originários de outras regiões do Brasil e pode representar uma particularidade da doença em nosso país.<sup>34</sup>

As mutações de *MYH7* foram encontradas em 47% dos indivíduos submetidos à genotipagem e em 60% das famílias. O rastreamento de todas as regiões codificantes deste gene identificou a presença de quatro mutações *missense* em diferentes domínios da proteína. A mutação p.Ile263Thr foi previamente relatada na França,<sup>7,22</sup> em Portugal,<sup>23</sup> e mais recentemente em outras regiões do Brasil.<sup>34</sup> A mutação p.Ala797Thr, previamente descrita na África do Sul<sup>31</sup> com provável efeito fundador, também foi referida em coortes da América do Norte,<sup>8</sup> África Setentrional<sup>27</sup> e Europa.<sup>9,23,24</sup> Assim como no Brasil.<sup>34</sup> A mutação p.Met877Ile, nova, foi mapeada em uma família com alto grau de penetrância, acometendo três dos quatro membros genotipados em duas gerações. A mutação associou-se à HVE de leve à grave e à obstrução médio-ventricular e de via-de-saída, assim como também a formas não-obstrutivas. A mutação p.Glu1468Lys, também considerada nova, foi identificada em três famílias não-relacionadas. Variação fenotípica inter e intrafamiliar foi observada em formas obstrutivas e não-obstrutivas com HVE de grau leve a moderado. Essa mutação relacionou-se, igualmente, à obstrução médio-ventricular associada à morte súbita tardia em um familiar.

Mutações *missense* do gene *MYBPC3* foram encontradas em 16% dos indivíduos e em 20% das famílias avaliadas. A mutação p.Arg495Gln, descrita na América do Norte<sup>20</sup> e na população portuguesa,<sup>23</sup> foi referida como frequente em uma coorte brasileira de CMH.<sup>34</sup> A mutação foi identificada em uma família com história de morte súbita prematura associada à HVE de moderada à maciça. A mutação p.Val896Met foi previamente detectada em coortes europeias,<sup>7,23</sup> assim como

na África do Sul.<sup>31</sup> Dois carreadores dessa mutação de uma família, o probando com HVE moderada e obstrução de via-de-saída grave, assim como um familiar jovem fenótipo-negativo, também exibiam a mutação p.Glu1468Lys no gene *MYH7*. O familiar fenótipo-negativo demonstrava ondas Q patológicas no eletrocardiograma em repouso. Heterozigose dupla ou composta costuma ser identificada em famílias com mutações de *MYBPC3*, correspondendo de 3 a 5% dos pacientes com CMH.<sup>7,20</sup> Múltiplas mutações estão usualmente relacionadas à fenótipos graves e doença de início precoce,<sup>4,6,7</sup> entretanto, graus variáveis de HVE já foram relatados em alguns desses indivíduos.<sup>34</sup>

Todas as mutações dos genes *MYH7* e *MYBPC3* demonstraram marcada variação fenotípica intra e interfamiliar relacionada ao grau de HVE. Variação fenotípica em pacientes carreadores de uma mesma mutação é considerada característica da CMH.<sup>10</sup> Os padrões de HVE e a idade de início da doença podem diferir mesmo entre indivíduos relacionados, considerando que o fenótipo é determinado não só pela mutação, mas também pela interação de polimorfismos, genes modificantes, fatores epigenéticos e ambientais.<sup>6,10</sup> A metanálise das associações genótipo-fenótipo na CMH demonstra que, devido ao fato de muitas mutações serem privativas de uma só família, os estudos já realizados ainda não possuem poder estatístico suficiente para obtenção de conclusões definitivas.<sup>48</sup> Entretanto, algumas variáveis clínicas podem estar relacionadas ao genótipo, tais como idade de apresentação, espessura parietal máxima do VE e história familiar da doença ou de morte súbita. Na amostra avaliada, houve predomínio de história familiar de morte súbita e idade de apresentação mais precoce nos carreadores de mutação do gene *MYBPC3*, características que diferem daquelas relatadas na literatura, mas que podem representar uma particularidade da população em estudo.

Em 30% das famílias, não foram identificadas mutações causadoras. Em todos esses casos, foi evidenciada ausência de história clínica prévia de CMH. A presença de um teste genético negativo pode resultar da existência de mutações em genes não conhecidos ou não sequenciados. A HVE, por não constituir fenótipo específico, é identificada em outras formas de cardiopatia como nas doenças metabólicas consideradas fenocópias da CMH. A detecção de mutações em genes sarcoméricos relacionados à doença associa-se à história familiar, início precoce da doença, prognóstico desfavorável e maior grau de HVE em relação aos casos com teste genético negativo.<sup>9,25,27</sup> Dados recentes indicam que essa associação manifesta-se independentemente do gene acometido, mas estudos adicionais são necessários para comprovar esses achados.<sup>2</sup> No presente estudo, história familiar de CMH ou morte súbita foi mais frequente em indivíduos genótipo-positivos em relação àqueles genótipo-negativos.

Neste estudo, mutações causadoras de CMH foram identificadas em expressivo número de indivíduos. Entretanto, o perfil genético da população aqui analisada não diferiu essencialmente daquele descrito em coortes de etnia diversa, originárias de outras regiões geográficas, exceto pelo fato de que o acometimento de *MYH7* foi mais frequente em relação à *MYBPC3*.

### Limitações do estudo

O estudo compreendeu o rastreamento dos três genes mais prevalentes na CMH, mas não se estendeu aos demais, considerados como de reduzida frequência. Não obstante, a análise restringiu-se a uma amostra de famílias não-relacionadas registradas em um único centro terciário situado no sul do Brasil.

### Conclusões

Nesta primeira análise genético-molecular de uma coorte de pacientes com CMH do extremo sul do Brasil, mutações foram identificadas em 58% dos indivíduos consecutivos de famílias não relacionadas. As mutações afetaram de forma predominante o gene *MYH7*, característica que diverge do relatado em países do hemisfério norte. O estudo corrobora que as mutações em *MYH7* e *MYBPC3* devem constituir o enfoque inicial da análise genético-molecular na CMH, mutações no gene *TNNT2* seguem um padrão de baixa prevalência na população brasileira. Todas as mutações detectadas eram do tipo *missense*, enquanto que duas do gene *MYH7* não haviam sido previamente descritas. As mutações caracterizaram-se por acometer distintos domínios das proteínas codificadas e determinar expressão fenotípica variável. Foi identificada relação entre teste genético positivo e história familiar de CMH ou morte súbita.

### Referências

1. Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, Dearani JA, Fifer MA, Link MS, et al; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; American Society of Echocardiography; American Society of Nuclear Cardiology; Heart Failure Society of America; Heart Rhythm Society; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Thoracic Surgeons. 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. *Circulation*. 2011;124(24):e783-831.
2. Elliot PM, Anastakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the task force for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014;35(39):2733-79.
3. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, Maron BJ. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(12):1249-54.
4. Jacoby D, McKenna WJ. Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2012;33(3):296-304.
5. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(8):705-15.
6. Ho CY, Charrin P, Richard P, Girolami F, Van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovasc Res*. 2015;105(4):397-408.
7. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al; EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a

Predomínio de mutações do gene *MYH7* pode representar uma característica da população local.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Mattos BP, Scolari FL, Torres MAR, Freitas VC, Giugliani R, Matte U; Obtenção de dados: Mattos BP, Scolari FL, Torres MAR, Simon L, Freitas VC, Giugliani R, Matte U; Análise e interpretação dos dados: Mattos BP, Scolari FL, Simon L, Matte U; Análise estatística e Redação do manuscrito: Mattos BP, Scolari FL; Obtenção de financiamento: Mattos BP; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Mattos BP, Matte U.

### Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

1. molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003;107(17):2227-32. Erratum in: *Circulation*. 2004;109(25):3258.
8. Van Driest SL, Jaeger MA, Ommen SR, Will ML, Gersh BJ, Tajik AJ, et al. Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(3):602-10.
9. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, Nistri S, Bos JM, Zachara E, et al. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(6):630-8.
10. Landstrom AP, Ackerman MJ. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010;122(23):2441-9.
11. Maron BJ, Ommen SR, Semsarian C, Spirito P, Olivetto I, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy: present and future, with translation into contemporary cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(1):83-99. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(11):1188.
12. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990;62(5):999-1006.
13. Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, et al. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell*. 1994;77(5):701-12.
14. Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, et al. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*. 1995;11(4):434-7.

15. Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, et al. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet.* 1996;13(1):63-9.
16. Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, et al. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 1997;16(4):379-82.
17. Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, et al. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1999;103(10):R39-43.
18. Morner S, Richard P, Kazzam E, Hellman U, Hainque B, Schwartz K, et al. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(7):841-9.
19. Erdmann J, Daehmlow S, Wischke S, Senyuva M, Werner U, Raible J, et al. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet.* 2003;64(4):339-49.
20. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(9):1903-10.
21. Oliva-Sandoval MJ, Ruiz-Espejo F, Monserrat L, Hermida-Prieto M, Sabater M, García-Molina E, et al. Insights into genotype-phenotype correlation in hypertrophic cardiomyopathy. Findings from 18 Spanish families with a single mutation in *MYBPC3*. *Heart.* 2010;96(24):1980-4.
22. Millat G, Bouvagnet P, Chevalier P, Dauphin C, Jouk PS, Da Costa A, et al. Prevalence and spectrum of mutations in a cohort of 192 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Med Genet.* 2010;53(5):261-7.
23. Brito D, Miltenberger-Miltenyi G, Vale Pereira S, Silva D, Diogo AN, Madeira H. Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: genetic profile in a Portuguese population. *Rev Port Cardiol.* 2012;31(9):577-87.
24. Berge KE, Leren TP. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy in Norway. *Clin Genet.* 2014;86(4):355-60.
25. Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, et al. Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J.* 2012;76(2):453-61.
26. Liu W, Liu W, Hu D, Zhu T, Ma Z, Yang J, et al. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2013;112(4):585-9.
27. Kassem HS, Azer RS, Saber-Ayad M, Moharem-Elgamal S, Magdy G, Elguindy A, et al. Early results of sarcomeric gene screening from the Egyptian National BA-HCM Program. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(1):65-80.
28. Maron BJ, Kalra A. Hypertrophic cardiomyopathy in the developing world: focus on India. *Eur Heart J.* 2014;35(36):2492-5.
29. Adalsteinsdottir B, Teekakirikul P, Maron BJ, Burke MA, Gudbjartsson DF, Holm H, et al. Nationwide study on hypertrophic cardiomyopathy in Iceland: evidence of a *MYBPC3* founder mutation. *Circulation.* 2014;130(14):1158-67.
30. Chiou KR, Chu CT, Charng MJ. Detection of mutations in symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy in Taiwan. *J Cardiol.* 2015;65(3):250-6.
31. Moolman-Smook JC, De Lange WJ, Bruwer EC, Brink PA, Corfield VA. The origins of hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in two South African subpopulations: a unique profile of both independent and founder events. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1308-20.
32. Ingles J, Semsarian C. The Australian genetic heart disease registry. *Int J Cardiol.* 2013;168(4):e127-8.
33. Marsiglia JD, Batitucci Mdo C, Paula Fd, Barbirato C, Arteaga E, Araújo AQ, et al. [Study of mutations causing hypertrophic cardiomyopathy in a group of patients from Espírito Santo, Brazil]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;91(1):10-7.
34. Marsiglia JD, Credidio FL, de Oliveira TG, Reis RF, Antunes Mde O, de Araujo AQ, et al. Screening of *MYH7*, *MYBPC3*, and *TNNT2* genes in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2013;166(4):775-82.
35. Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, Seidman JC, et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(1):111-6.
36. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet.* 2014;10(9):e1004572.
37. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
38. Cardiogenomics: Homepage. [Internet]. [Acesso em 2014 dez 20]. Disponível em <http://www.http://cardiogenomica.altervista.org/>
39. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-9.
40. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.
41. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.
42. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 2012;7(10):e46688.
43. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-2.
44. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, et al. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics.* 2009;25(21):2744-50.
45. Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, Brunak S. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(17):3439-52.
46. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67.
47. Mattos BP, Torres MA, Freitas VC. Diagnostic evaluation of hypertrophic cardiomyopathy in its clinical and preclinical phases. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(1):51-62.
48. Lopes LR, Rahman MS, Elliott PM. A systematic review and meta-analysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. *Heart.* 2013;99(24):1800-11.