

Estudio de Mutaciones Causadoras de Cardiomiopatía Hipertrofica en un Grupo de Pacientes en Espírito Santo, Brasil

Júlia Daher Carneiro Marsiglia¹, Maria do Carmo Pimentel Batitucci¹, Flávia de Paula¹, Clara Barbirato¹, Edmundo Arteaga², Aloir Queiroz de Araújo¹

Universidade Federal do Espírito Santo¹, Vitória, ES; Universidade de São Paulo², São Paulo, SP - Brasil

Resumen

Fundamento: La cardiomiopatía hipertrofica (CH) es la enfermedad cardíaca hereditaria más frecuente, causada por mutaciones en los genes codificadores para proteínas del sarcómero. Aunque se hayan identificado más de 430 mutaciones en varios continentes y países, no hay relato de que esto se haya estudiado en Brasil.

Objetivo: Conducir un estudio genético para identificar mutaciones genéticas que causan la CH en un grupo de pacientes en el estado de Espírito Santo, Brasil.

Métodos: Usando la técnica SSCP, se estudiaron 12 exones de los tres principales genes involucrados con la CH: exones 15, 20, 21, 22 y 23 del gen de la cadena pesada de la β -miosina (*MYH7*), exones 7, 16, 18, 22 y 24 del gen de la proteína C unida a la miosina (*MYBPC3*) y exones 8 y 9 del gen de la troponina T (*TNNT2*).

Resultados: Se encontraron 16 alteraciones, incluyendo dos mutaciones, una de ellas posiblemente patogénica en el gen *MYBPC3* gen (p. Glu441Lys) y otra patogénica ya descrita en el gen *TNNT2* (p. Arg92Trp); 8 variaciones de secuencia raras y 6 variaciones de secuencia con frecuencia alélica mayor que el 1% (polimorfismos).

Conclusiones: Con estos datos, es posible concluir que el genotipaje de los pacientes es factible en nuestro medio. Es posible que la variante p.Glu441Lys en el exón 16 del gen *MYBPC3* sea patogénica, resultando en un fenotipo más leve que el encontrado en asociación con otras mutaciones. La variante p.Arg92Trp en el exón 9 del gen *TNNT2* no resulta en un fenotipo tan homogéneo como el descrito anteriormente y puede llevar a hipertrofia grave. (Arq Bras Cardiol 2010; 94(1) : 10-17)

Palabras clave: Cardiomiopatía hipertrofica, miosina, proteína C, genes, Espírito Santo, Brasil.

Introducción

La cardiomiopatía hipertrofica (CH) es una enfermedad cardíaca primaria, caracterizada por hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI), sin dilatación, generalmente asimétrica y principalmente septal, en ausencia de cualquier otra enfermedad cardíaca o sistémica que puede llevar a la hipertrofia miocárdica^{1,2}. Además de la hipertrofia de las fibras miocárdicas, se produce un desarreglo histológico de esas fibras y grados variados de fibrosis intersticial y perivascular, contribuyendo para el desarrollo de insuficiencia cardíaca, isquémica miocárdica, arritmia ventricular y muerte súbita³.

La CH es la enfermedad cardíaca genética más común, pero sólo a comienzos de los años 90 se identificaron las mutaciones genéticas causadoras de la enfermedad^{4,5}. Hasta ahora, se identificaron 13 genes codificadores para proteínas del sarcómero cardíaco, lo que lleva a la definición de CH como siendo

una enfermedad del sarcómero. No obstante, las mutaciones encontradas en los genes de la cadena beta de miosina pesada (*MYH7*), de la proteína C cardíaca unida a miosina (*MYBPC3*) y de la troponina T cardíaca (*TNNT2*) son responsables por el 60 al 80% de los casos de CH^{2,6}. El único estudio genético disponible para la CH en Brasil fue conducido por Tirone et al.⁷. Fue un estudio pionero y la prevalencia de la CH en Brasil permanece desconocida; en consecuencia, se sabe todavía menos al respecto de la prevalencia de las mutaciones causadoras de la enfermedad. En el estado de Espírito Santo, donde la población estimada por el Instituto Brasileño de Geografía y Estadística (IBGE) en 2008 es de aproximadamente 3.500.000 habitantes⁸, y admitiendo que la prevalencia de la CH sea similar a la encontrada en otros continentes (1:500), es probable que haya cerca de 7.000 pacientes con CH en el estado, lo que justifica los esfuerzos para identificarlos de forma adecuada, así como los portadores familiares.

Métodos

Pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio se seleccionaron a partir de la revisión de los archivos del Sector de Ecocardiografía del

Correspondencia: Júlia Daher Carneiro Marsiglia •

Rua da Consolação, 3075 / 1218 - Cerqueira César - 01416-001

São Paulo, SP - Brasil

E-mail: marsigliajdc@yahoo.com.br

Artículo recibido el 11/05/09; revisado recibido el 24/06/09;

aceptado el 24/06/09.

Hospital Universitario Cassiano Antonio Moraes - Universidad Federal de Espírito Santo (HUCAM - UFES). Se contactaron pacientes con un diagnóstico ecocardiográfico de CH y se les invitó a visitar el hospital, donde recibieron informaciones sobre los objetivos de la investigación, en la cual podrían ser inmediatamente incluidos, si así lo deseaban.

Evaluación clínica

Cada individuo fue sometido a un examen clínico y cardíaco, incluyendo historia, examen físico y ecocardiograma, conducido por cardiólogos con experiencia en CH.

Ecocardiograma con Doppler

Los ecocardiogramas fueron conducidos por cardiólogos experimentados, usando un equipamiento modelo Acuson Sequoia 512 (Mountain View, CA, USA), con transductor de multifrecuencia (2,0 a 3,5 MHz), segunda armónica y Doppler tisular. Los pacientes fueron examinados en la posición izquierda lateral y los registros fueron grabados en espiración no forzada. Las medidas ecocardiográficas en modo unidimensional se obtuvieron durante el examen, así como las medidas de la velocidad y flujo miocárdicos (Doppler pulsado, Doppler tisular y Doppler continuo). El principal criterio para el diagnóstico de la CH fue el criterio ecocardiográfico, a través de la demostración inequívoca de espesor miocárdico ≥ 15 mm en cualquier segmento del VI en ausencia de otra enfermedad cardíaca o sistémica que cause hipertrofia ventricular.

Extracción de ADN

El ADN total se extrajo de 2 – 5 ml de sangre periférico, de acuerdo con la metodología descrita por Miller et al.⁹. El ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 y se diluyó hasta la concentración de uso (10ng/ μ L) en agua ultrapurificada.

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Los exones 15, 20, 21, 22 y 23 del gen *MYH7* (cadena beta de miosina pesada), 7, 16, 18, 22 y 24 del gen *MYBPC3* (proteína C cardíaca unida a miosina) y 8 y 9 del gen *TNNT2* (troponina T cardíaca) se amplificaron mediante PCR en un termociclador Applied Biosystems, modelo Veriti®, usando *primers* descritos en el banco de datos *CardioGenomics*⁶.

Screening de mutaciones

Después de la amplificación por PCR, el *screening* de mutaciones se realizó por la técnica de polimorfismo de conformación de filamento único o polimorfismo de conformación de cinta simple (SSCP, del inglés "Single Strand Conformation Polymorphism"). Aproximadamente 10 μ L de cada producto de la PCR se mezcló con 2 μ L de tampón de carga para SSCP. Las muestras fueron desnaturizadas a 94 °C por 10 minutos, mantenidas en hielo y aplicadas a los geles. Los geles se sometieron a electroforesis a 6W por 12-16 horas. Después de la corrida, los geles se colorearon con nitrato de plata, de acuerdo con la metodología descrita por Bassam et al.¹⁰.

Análisis de Secuenciamiento y alteraciones

Los fragmentos con migración anormal en el gel se secuenciaron en la plataforma de secuenciamiento de ADN de Embrapa – Laboratorio Cenargen – en Brasilia, DF, Brasil. El análisis de las alteraciones se realizó en base a la secuencia de referencia (*MYH7*: NG_007884, *MYBPC3*: NG_007667, *TNNT2*: NG_007556) del banco de datos de secuencias génicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible online¹¹, y se compararon con las alteraciones ya descritas en el banco de datos *Cardio Genomics*, disponible online⁶.

Grupo control

Se recolectaron muestras de sangre de un grupo control, compuesto por 64 voluntarios adultos, no emparentados, con salud aparentemente normal, sin historia familiar de cardiomiopatías, normotensos, con examen físico normal y electrocardiograma normal, que fueron sometidos al mismo proceso de las muestras de pacientes con CH fenotípicamente demostrada.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado sin restricciones por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Federal de Espírito Santo (Protocolo de Investigación No. 058/07). Todos los pacientes y voluntarios del grupo control recibieron informaciones sobre los procedimientos, riesgos y beneficios del estudio, y aquellos que consintieron en participar firmaron el Término de Consentimiento Libre e Informado, también aprobado por el Comité de Ética.

Resultados

El grupo de estudio estaba compuesto por 20 pacientes, 10 del sexo masculino, con edad promedio de 45,7 años. El grupo control estaba compuesto por 41 mujeres y 23 hombres, con edades variando entre 19 y 65 años (promedio 44,3 \pm 11,7 años). Las medidas ecocardiográficas obtenidas de los pacientes se presentan en la Tabla 1. Todos los pacientes presentan hipertrofia septal asimétrica > 15 mm, aumento del atrio izquierdo como resultado de la disfunción diastólica del VI (normal hasta 40 mm), diámetros ventriculares internos normales (variación 55 mm), excepto en 2 pacientes con dilatación leve y disminución de la fracción de eyección en sólo 1 paciente ($\geq 55\%$ normal). En reposo, sólo el 25% de los pacientes presentaban gradientes > 30 mmHg en la vía de salida del VI (CH obstructiva).

Los resultados del análisis por SSCP y el secuenciamiento mostraron 14 alteraciones, incluyendo dos mutaciones, 6 variaciones raras de secuencia y 6 polimorfismos. Los exones estudiados están involucrados en 139 de las 441 mutaciones descritas para todos los genes, un poco por encima del 31%.

En el gen *MYH7*, identificamos dos polimorfismos en el intrón 19, ambos sustituciones A>G. El primero se identificó en la posición c.13615-64 y presentó una frecuencia del 25% en los pacientes y el 19,5% en los controles. El segundo polimorfismo se identificó en la posición c.13615-64 y presentó una frecuencia del 100% en los controles y pacientes

estudiados. En el intrón 22, se identificó una variación rara de secuencia, una sustitución T > C en la posición c.14663+32. En el exón 22, también se encontró una variación rara de secuencia, una sustitución A > C en la posición c.14537, que altera el codón de TCC para TCA, ambos serina. En el exón 23, se encontraron dos polimorfismos caracterizados por una sustitución T > C: el primero se identificó en la posición c.15355 y modifica el codón GCT para GCC, ambos alanina, y presentaban una frecuencia del 5% en los pacientes y 1,56% en los controles. El segundo, en la posición c.15431, altera el codón de CTG para TTG, ambos leucina, y fue identificado con una frecuencia del 2,5% en pacientes y del 0,78% en los controles.

En el gen *MYBPC3*, se identificó en un paciente la mutación G > A del tipo sustitución (Figura 1). La mutación está localizada en la posición c.11642 en el exón 16 y altera el codón de GAG > AAG, de esa forma alterando el aminoácido, de ácido glutámico para lisina. Además de ello, se encontraron en el intrón 22 una variación rara de secuencia y un polimorfismo. La alteración se identificó en la posición c.13999+118 y es una sustitución G > A. El polimorfismo se caracterizó por una sustitución C > G y se identificó en la posición c.15130+19, con una frecuencia del 5% en pacientes y del 3,125% en controles. Una mutación tipo sustitución de C > T se encontró en el exón 9 de un paciente en la posición c.8772 del gen *TNNT2* (Figura 2). Esta sustitución altera el codón de CCG para

TGG, cambiando así el aminoácido de arginina para triptofano. Además de la mutación, se identificaron dos variaciones raras de secuencia en el intrón 8 y se identificó un polimorfismo en el exón 9. La primera alteración era una sustitución G > C en la posición c.8459+130 y la segunda era una sustitución C > T en la posición c.8762-20. El polimorfismo identificado era una sustitución C > T en la posición c.8816, que altera el codón de ATC > ATT, ambos isoleucina. El polimorfismo presentaba una frecuencia del 69,44% en pacientes y del 71,88% en los controles. El resumen de los resultados puede verse en la Tabla 2.

Discusión

Mutaciones Gen *MYBPC3*, exón 16

La sustitución G → A encontrada en el exón 16 del gen *MYBPC3* del paciente P4 altera el codón de GAG, que codifica ácido glutámico, para AAG, que determina lisina. Esta mutación fue inicialmente descrita por Seidman et al.¹² en heterocigosis compuesta con la mutación p.E258K en el exón 7 del gen *MYBPC3*. Olivotto et al.¹³ también describieron esta mutación en heterocigosis compuesta con la mutación p.E258K. Aunque sea poco probable que los pacientes de los estudios mencionados anteriormente sean el mismo individuo, no podemos afirmar que no estén emparentados

Tabla 1 - Medidas Ecocardiográficas de los pacientes

RG	AI(mm)	DDVI (mm)	SIV (mm)	PP (mm)	FEVI (%)	Grad (mmHg)
P1	48,5	43	20,2	11,5	81,4	40
P2	48,6	49,8	20,7	8,9	72,9	12
P3	54	46	16	9	71	0
P4	44	44,7	23,2	12,9	77,4	57
P5	41,8	47,6	21,5	8	71,8	0
P6	48,9	42,4	16,6	12,4	75,6	38
P7	48,2	37,4	24,3	9,3	72,6	10
P8	55,7	48,2	20,7	15,4	60,1	12
P9	41,2	52,6	19	10,3	71,5	0
P10	58,9	58,1	17	10,9	49,6	0
P11	39,1	47,3	16,6	13,8	55	0
P12	41	39,8	25	10,1	66,7	0
P13	52,5	42,3	30,7	13,7	69,7	0
P14	40	43,1	22,7	12,6	69,5	12
P15	65,7	57,2	28,1	15,1	72,6	112
P16	33,2	47	16	7,4	79	0
P17	37,5	42,3	16	9,5	70	0
P18	50	45,7	21,9	11,1	71	0
P19	69	55,1	19	11	69	0
P20	44	52	16	11	63	85

AI - diámetro diastólico del atrio izquierdo; DDVI: diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; SIV: espesor del septo interventricular; PP: espesor diastólico de la pared posterior; FEVI: fracción de eyección del VI; Grad: gradiente sistólico de pico en la vía de salida del ventrículo izquierdo.

(comunicación personal). Así, la mutación p.E441K todavía no fue descrita sola, entonces no está claro si ésta es capaz de causar la enfermedad cuando se expresa aisladamente.

Olivotto et al.¹³ relatan en su estudio que los portadores de la mutación doble presentaban un fenotipo más grave que aquellos con mutación simple. El paciente del grupo de Seidman tenía 29 años, presentaba fenotipo grave, aunque ellos no tuvieran más informaciones detalladas sobre el caso^{1*}. El paciente P4 del presente estudio tiene hipertrofia moderada, sin historia familiar de muerte súbita, sin relatos de síncope y no presenta taquicardia ventricular no sostenida en el ECG dinámico. El paciente se quejaba de angina de esfuerzo y la angiografía coronaria mostró arterias coronarias sin procesos obstructivos.

Niimura et al.¹⁴ observaron en su estudio que la supervivencia de pacientes con mutaciones en el gen *MYBPC3* era mayor que aquella observada con mutaciones en el gen *TNNT2* o alteraciones malignas en el gen *MYH7*. De forma general, los datos indican que las mutaciones en el gen *MYBPC3* están relacionadas con formas más leves de CH en muchos pacientes con la enfermedad. En otro estudio independiente con 22 familias, Richard et al.¹⁵ relataron que el 90% de las familias que presentaban mutaciones en el gen *MYBPC3* presentaban pronóstico benigno o intermediario. Además de ello, en su estudio, éstos encontraron algunos pacientes con heterocigosis doble u homocigosis para mutaciones y en tales casos, el fenotipo era descrito como siendo más grave. Así, en esas familias, la edad del desarrollo de la enfermedad, el grado de hipertrofia y el pronóstico estaban relacionados al número de mutaciones. Así, es improbable que los pacientes de los grupos de Seidman et al.¹² y Olivotto et al.¹³ tengan un fenotipo más grave solamente debido a la mutación p.E258K.

Con base en los datos clínicos, sugerimos que la combinación

* Comunicación personal.

de las dos mutaciones, la p.E258K y la p.E441K, es responsable por el fenotipo y ambas, aisladamente, son capaces de causar la enfermedad pero en su forma más leve, como es típico en las mutaciones del gen *MYBPC3*.

Además de las evidencias clínicas, algunos datos de estudios moleculares apoyan la hipótesis de que la mutación p.E441K es patogénica. Varias sustituciones de ácido glutámico por lisina fueron descritas como estando involucradas en la CH y en la cardiomiopatía dilatada (CD) en el banco de datos del CardioGenomics, disponible online⁶. Solamente en el gen *MYBPC3*, hay 3 sustituciones Glu → Lis involucradas con la enfermedad. En el gen *MYH7*, hay 7 de esas sustituciones involucradas con CH y una involucrada con la forma dilatada. Hay dos sustituciones en cada uno de los genes *TNNT2* y α -tropomiosina, y hay una sustitución en cada uno de los genes de la α -actina, de la cadena leve esencial de la miosina y de la cadena leve reguladora de la miosina.

Además de ello, al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína *MYBPC3* disponible en el banco de datos NCBI¹¹ en varios animales, es evidente que la región donde ocurrió la sustitución está bastante conservada en el hombre (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), perro (*Canis lupus familiaris*), buey (*Bos taurus*) y chimpancé (*Pan troglodytes*), lo que sugiere que ésta es una región importante de la proteína.

Sólo es posible asegurar que esta mutación, en la forma aislada, puede causar la enfermedad si la mutación en otros exones de ese gen y otros genes del sarcómero fueran descartadas a través de estudios familiares. Juntos, los datos clínicos y moleculares sugieren que la mutación p.E441K es patogénica.

Gen *TNNT2*, exón 9

La sustitución C → T encontrada en el exón 9 del paciente

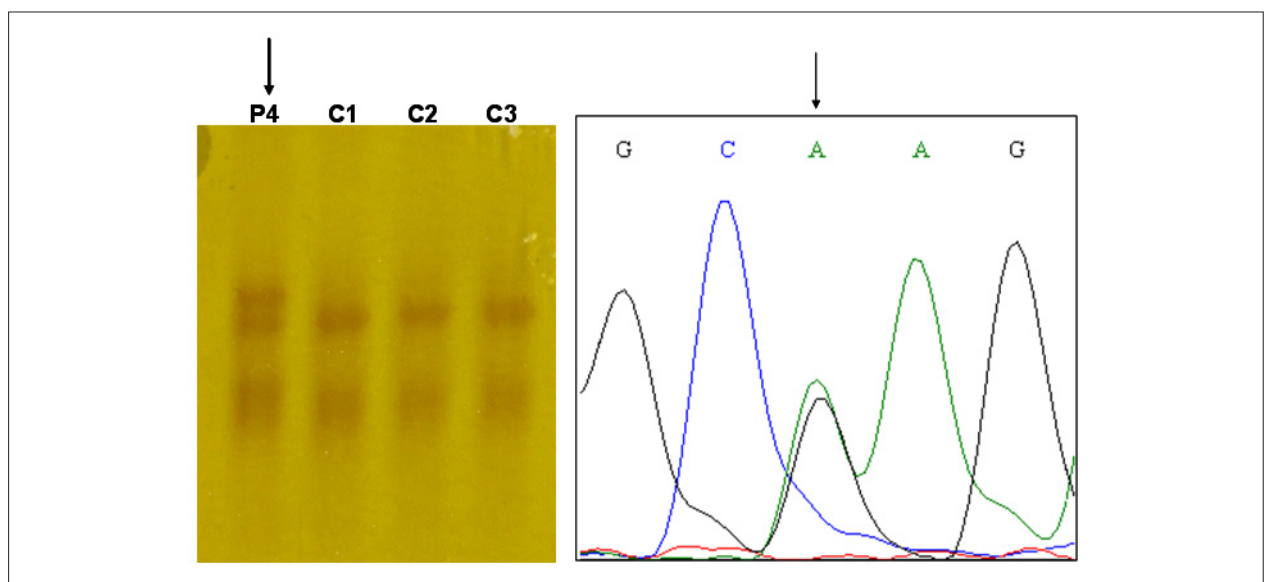


Figura 1 - Alteración en el fragmento conteniendo el exón 16 del gen *MYBPC3* a) Screening de mutaciones por SSCP en gel de poliacrilamida al 5%. C1, C2 y C3 con patrón normal y P4 mostrando un patrón diferente b) secuenciamiento del fragmento conteniendo el exón 16 del gen *MYBPC3* de P4, mostrando una sustitución G → A en heterocigosis.

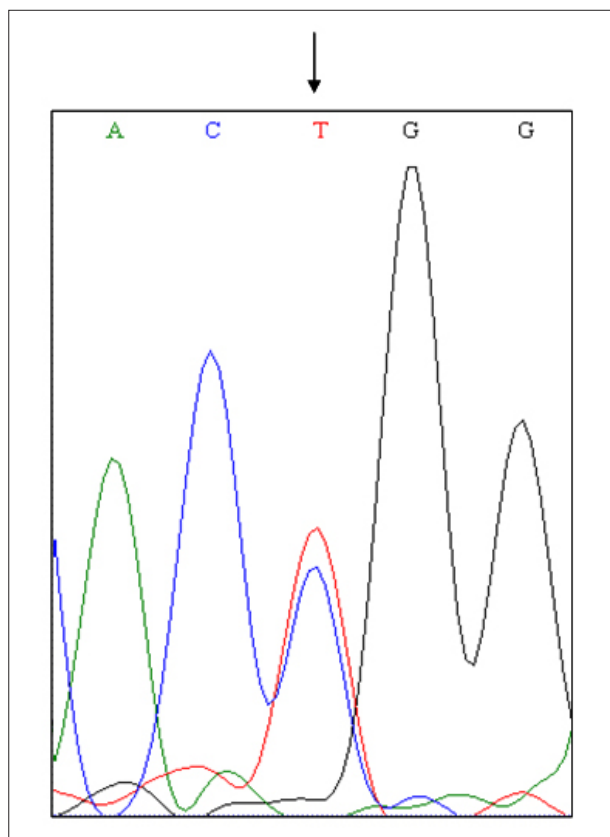


Figura 2 - Secuenciación de fragmento conteniendo el exón 8 y parte del exón 9 del gen P5 TNNT2, mostrando una sustitución C → T en heterocigosis.

P5 genera una alteración de codón de CCG para TGG, alterando el aminoácido de arginina para triptofano. Esta mutación, a p.Arg92Trp o a p.R92W, fue descrita primero por Moolman et al.¹⁶, con alta frecuencia entre los pacientes estudiados, sugiriendo un efecto fundador. Los datos clínicos de sus pacientes mostraron pequeña hipertrofia, frecuentemente indetectable, el espesor medio máximo de la pared de los pacientes estaba dentro de la variación normal, y ello se reflejaba en la baja penetración de la enfermedad. No obstante, el pronóstico asociado con la enfermedad era extremadamente malo, particularmente para jóvenes adolescentes del sexo masculino y adultos jóvenes. Además de ello, datos de este estudio sugiere que las mutaciones en el gen *TNNT2* llevan a la insuficiencia cardíaca congestiva, a una frecuencia más baja que las mutaciones en el gen *MYH7*.

En un estudio posterior, Moolman-Smook et al.¹⁷ investigaron 40 pacientes no emparentados y nuevamente la mutación p.Arg92Trp presentó alta frecuencia y los datos clínicos eran similares a los del estudio anterior. De acuerdo con los autores, la reducción en la expectativa de vida asociada con esta mutación y el haplotipo bien preservado en muchas familias sugiere un evento mutacional reciente.

En 2001, Varnava et al.¹⁸ también publicaron un estudio realizado en Londres, en el cual los pacientes con mutaciones en el gen *TNNT2* presentaban mayor desarreglo miocárdico, menor fibrosis y peso del corazón reducido en comparación

con pacientes que tenían mutaciones en otros genes. El estudio, por lo tanto, sugiere que el riesgo de muerte súbita en pacientes con mutaciones en este gen debe estar relacionado al aumento del desarreglo miocárdico, independiente del grado de hipertrofia. No obstante, de acuerdo con Ackerman et al.¹⁹, hay excepciones para todas las asociaciones genotipo-fenotipo y éste es el mayor impedimento para utilizar el genotipaje aisladamente como herramienta clínica y pronóstica para pacientes individuales. En su estudio, un paciente con la mutación p.Arg92Trp presentaba hipertrofia externa y su madre, afectada de forma similar, no presentaba hipertrofia, y no había relatos de muerte súbita en la familia. Los autores mencionan que hay además muchos factores que pueden confundir el fenotipo, tales como la expresión y la variabilidad fenotípicas dentro de familias, el pequeño tamaño de las familias estudiadas, genes modificadores, el papel de los polimorfismos y otros factores no genéticos. Estos factores combinados pueden debilitar la premisa de que el riesgo de muerte súbita está asociado con una mutación en particular. Éstos creen no todavía no hay conocimiento suficiente para determinar qué mutaciones causadoras de CH, combinación de mutaciones y factores ambientales pueden influenciar el desenlace clínico. En 2003, Van Driest et al.²⁰ presentaron un estudio con mutaciones en el gen *TNNT2*, en el cual los pacientes no presentaban hipertrofia significativa menor que pacientes con mutaciones en otros genes y ninguno de ellos tenía historia familiar de muerte súbita.

En nuestro pacientes P5, la mutación p.Arg92Trp llevó a un fenotipo que puede ser considerado grave, pues el paciente es bastante sintomático, presentando hipertrofia moderada a grave y relatos de recurrencia de síncope. Además de ello, tuvimos acceso al ecocardiograma de su hijo de 18 años, que presenta hipertrofia masiva (33 mm), corroborando los relatos de Ackerman et al.¹⁹.

Variantes alélicas con frecuencias < 1%

Cada una de las alteraciones clasificadas como variantes alélicas con frecuencia menor que el 1% fueron identificadas en apenas 1 individuo (paciente o control), entre los 84 individuos analizados. Encontramos 5 alteraciones, 4 intrónicas y una exónica del tipo silencioso, que no altera el aminoácido sintetizado.

Alteraciones en los intrones pueden o no afectar la proteína. A fin de identificar correctamente y vincular las secuencias de ARN que codifican las proteínas, los exones se deben diferenciar de los intrones. Hay varios motivos preservados en secuencias de nucleótidos cerca de los límites exón-intrón que actúan como señales esenciales de *splicing*. Estas señales están involucradas con la escisión de intrones de ARN pre-mensajeros y la unión de exones. Elementos adicionales conocidos como promotores y silenciadores son necesarios para permitir un *splicing* normal de las secuencias exónicas. Estos elementos regulatorios pueden estar próximos (hasta 50-100 pb) o distantes (millares de PB) de los locales de *splicing*²¹.

Entre los cambios encontrados, dos estaban en regiones próximas al límite del exón (+32 a -20) y dos estaban en regiones más distantes (+118 e +130). Sólo con las técnicas utilizadas en este estudio, no hay evidencia que

Tabla 2 - Alteraciones encontradas en los pacientes con CH y en los controles

Gen	Exón	Alteración	Posición	Tipo de Alteración	Frecuencia alélica	
					Pacientes	Controles
MYH7	20	c.13615-64A>G	Intrón 19	Polimorfismo	25%	19,5%
	20	c.13615-64A>G	Intrón 19	Polimorfismo	100%	100%
	22	c.14663+32T>C	Intrón 22	Rara variación de secuencia	-	-
	22	c.14537A>C TCC>TCA Ser>Ser	Exón 22	Rara variación de secuencia	-	-
	23	c.15355 T>C GCT>GCC Ala>Ala	Exón 23	Polimorfismo	5%	1,56%
	23	c.15431T>C TTG>CTG Leu>Leu	Exón 23	Polimorfismo	2,5%	0,78%
MYBPC3	16	c.11642G>A GAG>AAG Glu>Lys	Exón 23	Mutación	-	-
	22	c.13999+118G>A	Intrón 22	Rara variación de secuencia	-	-
	24	c.15130+19C>G	Intrón 22	Polimorfismo	5%	3,125%
TNNT2	8	c.8459+130 G>C	Intrón 8	Rara variación de secuencia	-	-
	8/9	c.8762-20C>T	Intrón 8	Rara variación de secuencia	-	-
	9	c.8816C>T ATC >ATT Ile>Ile	Exón 9	Polimorfismo	69,44%	71,88%
	9	c.8772C>T CGG>TGG Arg>Trp	Exón 9	Mutación	-	-

estas alteraciones afecten la proteína. Variantes genómicas que afecta el *splicing* (SpaGVs) pueden ocurrir en elementos regulatorios exónicos o intrónicos y son difíciles de ser definidas sólo por la secuencia de nucleótidos. Con todo, estas alteraciones pueden llevar a anomalías de *splicing* catastróficas. En particular, SpaGVs pueden inducir la exclusión de exones, activación de locales alternativos de *splicing*, o pueden alterar el equilibrio de formas alternativas de *splicing* (isoformas) producidas y así, resultar en fenotipos de la enfermedad. La importancia de las variantes genómicas (VG) funcionales que están localizadas lejos de los locales de *splicing* es todavía más difícil de ser identificada que la de las adyacentes. Aunque no estén cerca de ninguna secuencia regulatoria obvia, tales variantes pueden, por ejemplo, causar la activación de un nuevo sitio de *splicing*, que define los límites del exón²¹.

Las otras variaciones raras de secuencia encontradas eran de tipo silencioso. Tales alteraciones generalmente no se consideran por que no afectan la proteína sintetizada, pero estudios han mostrado que éstas pueden ser importantes.

Mutaciones silenciosas son normalmente clasificadas como polimorfismos alélicos y son consideradas neutras. Estas definiciones pueden estar correctas en algunos casos, pero

cuando no se basan en la caracterización del nivel del mRNA, éstas pueden conducir a errores, porque mutaciones que afectan la secuencia son importantes para la modulación del *splicing* y pueden llevar a efectos profundos en la traducción del producto. Muchos estudios han correlacionado mutaciones de punto específicas en regiones codificadoras con la exclusión del exón que contiene la mutación. El hecho de que las mutaciones silenciosas teóricamente causan la exclusión de un exón es particularmente significativo, porque esas mutaciones tienen que actuar a nivel del ARN. Estas mutaciones probablemente alteran los elementos regulatorios que son importantes para el *splicing* correcto. Aun así, es probable que esas mutaciones sean sub-relatadas, porque éstas pueden ser percibidas incorrectamente como polimorfismos neutros que no merecen mayor caracterización²².

No es posible afirmar que las variaciones encontradas aquí son patogénicas, ya que serían necesarios estudios de ARN para ello. No obstante, aun con técnicas sensibles como las de secuenciamiento directo y el estudio completo de todos los 13 exones de los genes involucrados en la CH, la detección de mutaciones en pacientes es exitosa sólo en el 70% de los casos^{2,15}. Así, es posible que algunas mutaciones de *splicing* en intrón o exón estén subestimadas y es por ello

que creemos ser importante estudiar estas alteraciones y publicar los resultados.

Variantes con frecuencia alélica > 1% (polimorfismos)

En este estudio encontramos 6 polimorfismos, 3 en la región intrónica y 3 dentro del exón. Recientemente, se ha sugerido que las causas genéticas de la susceptibilidad a las enfermedades complejas pueden estar más allá de mutaciones *missense* y *nonsense*, las cuales son comúnmente estudiadas en disturbios genéticos simples. Dentro de este espectro, se sospecha que polimorfismos que alteran la expresión génica tengan un papel importante²³.

Un estudio evaluó un polimorfismo frecuente (más del 50%), caracterizado por una deleción de 5pb en el intrón 3 del gen *TNNT2* en hipertrofia cardíaca y descubrió que la frecuencia del alelo era significativamente más alta en personas con hipertrofia ventricular izquierda que en la población normal²⁴. El estudio también sugiere que el genotipo en homocigosis para la deleción puede estar asociado con mayor espesor de pared y aumento de la masa ventricular del VI en la población con hipertrofia. Con todo, sólo la presencia del alelo no parece suficiente para causar la acentuada hipertrofia cardíaca. Los resultados sugieren, por lo tanto, que el genotipo predispone a los individuos a hipertrofia cardíaca.

Varios estudios han mostrados que los polimorfismos en regiones distantes del local de *splicing* pueden estar relacionados a enfermedades, afectando elementos regulatorios. Hoogendoorn et al.²³ estudiaron *in vitro* el efecto de los polimorfismos en promotores de *splicing* y descubrieron que una proporción sorprendentemente alta de polimorfismos, aproximadamente 1/3 en su estudio, podían alterar la expresión del gen en el 50% de los casos o más. La frecuencia alélica de los polimorfismos identificados en este estudio entre pacientes y controles no fue estadísticamente significativa. Ello sugiere que los polimorfismos no afectan el fenotipo. Además de ello, los datos clínicos de los pacientes que tenía o no tenían polimorfismos eran similares.

Nuestro conocimiento de los elementos regulatorios del genoma humano todavía es limitado y los polimorfismos funcionales de esos elementos no pueden ser distinguidos de forma clara de aquellos que no presentan efecto, solamente considerando su secuencia²⁴. De esta forma, consideramos relevante el estudio y la publicación de los polimorfismos, aun cuando éstos estén en regiones distantes de los locales de *splicing*.

Sensibilidad del método

En este estudio, se identificaron mutaciones en 2 de 20 pacientes, el 10% de la muestra, por lo tanto. Sería de esperar una proporción más alta, ya que los exones estudiados son responsables por aproximadamente el 31% de las mutaciones ya descritas. Varias posibilidades pueden sugerirse para explicar la sensibilidad debajo de lo esperado y entre ellas, tres merecen atención.

Primeramente, el método en sí no tiene una sensibilidad del 100% y ésta disminuye mucho con el aumento del tamaño del fragmento²⁵. Estudios sugieren que para fragmentos menores

que 200 pares de bases, más del 90% de las variaciones de secuencias serán detectados. Cuando el fragmento aumenta para 300-350 nucleóticos, más del 80% de las mutaciones serán detectadas. En nuestro estudio, sólo dos fragmentos tenían menos de 350 pb. La técnica de SSCP fue capaz de detectar varias sustituciones, incluyendo los fragmentos mayores, pero la sensibilidad del test puede mejorarse utilizando fragmentos menores o variando otras condiciones tales como la concentración de bisacrilamida, glicerol etc.

Segundo, debe considerarse el tamaño de la muestra. En el caso de un proyecto piloto, con el uso de un método trabajoso de screening genético, involucrando varias etapas de laboratorio, el tamaño de la muestra fue inicialmente considerado suficiente, dada la logística disponible, pero éste genera un impacto cuando se evalúa la sensibilidad del método.

Una tercera posibilidad es el perfil de la población local. La mayoría de los estudios de genotipaje en pacientes con CH son del hemisferio Norte y las frecuencias de las mutaciones que causan la enfermedad en países de Sudamérica, como Brasil, son todavía desconocidas y poco se sabe sobre su frecuencia en países en desarrollo. Dado el mestizaje de la población brasileña, se espera alguna similitud con otras poblaciones mundiales, pero esto es especulación y es posible que la prevalencia de genes afectadas sea diferente de lo descrito para otras poblaciones. En 1999, un estudio en Sudáfrica mostró que las mutaciones descritas como predominantes en el mundo eran aparentemente raras en el país¹⁷. Un estudio de pacientes españoles mostró que, en comparación con otras poblaciones, las mutaciones en los genes *MYH7* y *TNNT2* eran raras entre los pacientes estudiados²⁶ y se encontró una tasa muy baja de mutaciones en un estudio con pacientes en Finlandia²⁷. Estos datos sugieren que cada región puede tener un perfil de mutación único y ello puede tener efectos importantes en la implementación del *screening* poblacional.

Conclusiones

Considerando los objetivos del estudio, concluimos que el genotipaje de los pacientes con CH es factible en nuestro país. Con relación a las mutaciones, concluimos que es posible que la mutación p.E441K (p.Glu441Lys) en el exón 16 del gen *MYBPC3* sea patogénica en su forma aislada, promoviendo un fenotipo menos grave que cuando se asocia con otra mutación, y que la mutación p.R92W (Arg92Trp) en el exón 9 del gen *TNNT2* tiene un fenotipo que no es tan homogéneo como fuera descrito anteriormente y que puede conducir a hipertrofia grave.

Hasta donde sabes, ésta es la primera vez que una mutación causadora de CH se describe en Brasil. Dependiendo del análisis adicional, uno de los pacientes en esta muestra poblacional puede estar cargando una nueva mutación, cuando se la compara con los bancos de datos disponibles.

Agradecimientos

A la Fundación de Apoyo a la Investigación de Espírito Santo (FAPES, por su sigla en portugués) y a la Secretaría de Estado de Salud de Espírito Santo.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio fue parcialmente financiado por la Secretaría de Salud de Espírito Santo y la Fundación de Apoyo

a la Investigación de Espírito Santo (FAPES).

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de la disertación de Maestría de Júlia Daher Carneiro Marsiglia de la Universidad Federal de Espírito Santo.

Referencias

1. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet*. 1997; 350: 127-33.
2. Pascale R, Villard E, Charron P, Isnard R. The genetic bases of cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48 (9): A79-A89.
3. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002; 287: 1308-20.
4. Jarcho JA, McKenna W, Pare JA, Solomon SD, Holcombe RF, Dickie S, et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med*. 1989; 321: 372-8.
5. Geisterfer-Lowrance A, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Siedman CE, et al. A molecular basis of familial hypertrophic cardiomyopathy: a β -cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990; 62: 999-1006.
6. Cardiogenomics. Sarcomere protein gene mutation database. [Acesso em 2007 abr. 7]. Disponível em: <<http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/cg3/index.html>>.
7. Tirone AP, Arteaga E, Pereira AC, Krieger JE, Buck PC, Ianni BM, et al. Research of markers for the genes of the heavy chain of cardiac α -myosin and myosin binding protein c in relatives of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84 (6): 467-72.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estimativas populacionais para os municípios brasileiros em 01/07/2008. [Acesso em 2008 dez 28]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008>
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16 (3): 1215.
10. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem*. 1991; 196: 80-3.
11. National Center For Biotechnology Information. [Acesso em 2007 Feb. 10]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.
12. Cardiogenomics. Sarcomere protein gene mutation database. [Acesso em 2008 Feb. 20]. Disponível em: <http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/cg3/muts/MYBPC3_Glu441Lys.html>.
13. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, Stefano N, Martijn BJ, Elisabetta Z, et al. Myofibrillar protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83 (6): 630-8.
14. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, et al. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998; 338 (18): 1248-57.
15. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003; 107 (17): 2227-32.
16. Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, et al. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29 (3): 549-55.
17. 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.
18. Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation*. 2001; 104 (12): 1380-4.
19. Ackerman MJ, Van Driest SL, Ommen SR, Will ML, Nishimura RA, Tajik AJ, et al. Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39 (12): 2042-8.
20. Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2003; 108 (4): 445-51.
21. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. 2007; 8: 749-61.
22. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 285-98.
23. Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, et al. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 2003; 12 (18): 2249-54.
24. Komamura K, Iwai N, Kokame K, Kim J, Yamagishi M, Morisaki T, et al. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet*. 2004; 49: 129-33.
25. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*. 1993; 16: 325-32.
26. García-Castro M, Reguero JR, Batalla A, Diaz-Molina B, Gonzalez P, Alvarez V, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: low frequency of mutations in the β -myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin t (TNNT2) genes among spanish patients. *Clin Chem*. 2003; 49 (8): 1279-85.
27. Jaaskelainen P, Soranta M, Miettinen R, Saarinen L, Pihlajamäki J, Silvennoinen K, et al. The cardiac β -myosin heavy chain gene is not the predominant gene for hypertrophic cardiomyopathy in the Finnish population - mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32 (6): 1709-16.