



**Universidade de Coimbra  
Faculdade de Medicina**

**Alexandra Isabel Correia Mascarenhas**

***Análise Genética da Cardiomiopatia Hipertrófica  
na Morte Súbita Cardíaca***

***A Importância da Autópsia Molecular***

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Medicina Legal e Ciências Forenses,  
pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra*

**Orientadora:**

*Professora Doutora Isabel Marques Carreira*

**Co-Orientador:**

*Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves*

**Coimbra, 2011**



*"Para ser grande, sê inteiro:  
Nada Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Dõe quanto és  
No mínima que fazes"*

*Ricardo Reis*



## Agradecimentos

O trabalho apresentado só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas a quem devo os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, *Professora Doutora Isabel Marques Carreira*, pela orientação e apoio incondicionais. Agradeço a disponibilidade, a sabedoria e os ensinamentos constantes em todo o processo de orientação científica desta dissertação.

Ao meu co-orientador, *Professor Doutor Francisco Corte Real*, por ter estimulado a concretização deste projecto e pela disponibilidade e simpatia demonstradas durante a elaboração deste trabalho. Foi um privilégio poder contar com a sua orientação.

A todas as pessoas da *Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal* que dispensaram algum do seu tempo e me abriram as portas, de forma a recolher as amostras e informações necessárias para a elaboração deste projecto.

À *Ana Santos*, pela preciosa ajuda na execução da metodologia da sequenciação automática. Muito obrigada pela simpatia e disponibilidade.

Ao *Professor Doutor Carolino Monteiro* do *Laboratório de Genética Humana da FFUL*, à *Doutora Alexandra Fernandes (CQE; IST, UTL; ULHT; UNL)* e muito especialmente à *Doutora Susana Santos (CQE; IST; UTL; FECN da ULHT)*, pela colaboração na componente prática relativa à tecnologia do Sistema Sequenom MassARRAY e pela disponibilidade e simpatia demonstradas para o esclarecimento de todas as minhas dúvidas.

A toda a equipa do *Laboratório de Citogenética e Genómica*, local onde exerço a minha actividade profissional e onde foi desenvolvida parte do trabalho prático, um agradecimento especial pela amizade e companheirismo. Um obrigado especial ao *Luís Miguel Pires* e ao *José Ferrão* pela colaboração e ajuda.

Aos meus *amigos* pelo apoio e compreensão prestados durante as fases mais difíceis da elaboração deste projecto e que de uma forma ou de outra foram ajudando na discussão de ideias ao longo destes anos.

Ao *Carlos* por todos os bons momentos, pela preciosa ajuda e pelo incentivo incondicional, especialmente na fase final deste projecto.

Aos meus *pais, irmã e sobrinha*, por representarem os meus pilares, por acreditarem nas minhas capacidades e por todo o carinho e apoio demonstrados. Sem eles não teria sido possível. A eles dedico este trabalho.

# Índice

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
1.1 CARDIOMIOPATIAS	2
1.1.1 <i>Definição e Classificação</i>	2
1.2 CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA	5
1.2.1 <i>Patologia da CMH</i>	7
1.2.1.1 <i>Exame Macroscópico</i>	7
1.2.1.2 <i>Histopatologia</i>	8
1.2.2 <i>Etiologia</i>	9
1.2.3 <i>Clínica</i>	12
1.2.4 <i>Diagnóstico</i>	13
1.2.5 <i>Opções terapêuticas</i>	13
1.2.7 <i>Estratificação de risco</i>	14
1.2.7 <i>Base Genética da CMH</i>	15
1.2.8 <i>Relação genótipo-fenótipo</i>	19
1.2.9 <i>Fenocópias</i>	25
1.3 TESTES GENÉTICOS NA CMH	27
1.3.1 <i>Sequenciação Automática</i>	27
1.3.2 <i>Sequenom MassARRAY</i>	28
1.4 MORTE SÚBITA	30
1.5 MORTE SÚBITA CARDÍACA	31
1.5.1 <i>Definição</i>	31
1.5.2 <i>Incidência da MSC</i>	34
1.5.3 <i>Etiologia da MSC</i>	34
1.5.4 <i>Causas Genéticas da MSC</i>	37
1.5.5 <i>Cardiomiopatia Hipertrófica na Morte Súbita</i>	38
1.5.6 <i>MSC em atletas de alta competição</i>	40
1.5.7 <i>Investigação postmortem da MSC</i>	41
1.5.7.1 <i>Circunstâncias da morte e história familiar</i>	42
1.5.7.2 <i>Autópsia</i>	42
1.5.7.3 <i>Armazenamento de DNA</i>	43
1.5.7.4 <i>Testes Genéticos da MSC</i>	44
1.5.7.5 <i>Autópsia Molecular</i>	46
1.6 <i>DNA ISOLADO DE AMOSTRAS FIXADAS EM FORMALINA</i>	51
1.7 <i>OBJECTIVOS</i>	54
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>55</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>56</b>
2.1 <i>AMOSTRA ESTUDADA</i>	56
2.2 <i>METODOLOGIA</i>	57
2.2.1 <i>Amostras FFEP</i>	57
2.2.1 <i>Desparafinização</i>	57
2.2.2 <i>Amostras fixadas em formalina</i>	58
2.2.3 <i>Extracção do DNA</i>	58
2.3 <i>PESQUISA DE MUTAÇÕES</i>	61

2.3.1 Sequenciação Automática	62
2.3.1.1 Amplificação por PCR	62
2.3.1.2 Electroforese em gel de agarose	62
2.3.1.3 Purificação dos produtos de PCR	63
2.3.1.4 Reacção de Sequenciação	63
2.3.1.5 Purificação das reacções de sequenciação	64
2.3.1.6 Análise das reacções de sequenciação	64
2.3.2 Sequenom MassARRAY	64
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>69</b>
<b>3. ANÁLISE DOS RESULTADOS</b>	<b>70</b>
3.1 AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES VARIÁVEIS NOS MÉTODOS DE PRÉ-EXTRACÇÃO DO DNA	70
3.1.1 Avaliação dos métodos de desparafinização e tempo de digestão	70
3.1.2 Avaliação do método de extracção	72
3.2 MUTAÇÕES DETECTADAS NO SISTEMA SEQUENOM MASSARRAY	75
3.3 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS POR SEQUENCIAÇÃO AUTOMÁTICA	77
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>81</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>91</b>
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>



# Índice de Figuras

<b>FIGURA 1</b> – SUMÁRIO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO PROPOSTO PELA <i>AMERICAN HEART ASSOCIATION</i> _____	4
<b>FIGURA 2</b> – SUMÁRIO DO MODELO DE CLASSIFICAÇÃO PROPOSTO PELA <i>EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY</i> _____	4
<b>FIGURA 3</b> - PATOLOGIA MACROSCÓPICA DEMONSTRANDO HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA COMPARADA COM A MORFOLOGIA CARDÍACA NORMAL _____	7
<b>FIGURA 4</b> – REMODELAÇÃO NA CMH _____	8
<b>FIGURA 5</b> - SECÇÕES HISTOLÓGICAS DEMONSTRANDO A DESORGANIZAÇÃO DOS MIÓCITOS E O AUMENTO DE FIBROSE (A). EM CONTRASTE COM O MIOCÁRDIO NORMAL (B) _____	9
<b>FIGURA 6</b> – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SARCÓMERO _____	11
<b>FIGURA 7</b> – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO SARCÓMERO, EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DA BANDA I E DA BANDA A _____	12
<b>FIGURA 8</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SARCÓMERO EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DOS GENES MAIS ENVOLVIDOS NA ETIOLOGIA DA CMH _____	18
<b>FIGURA 9</b> – SUMÁRIO DA NOMENCLATURA QUE DISTINGUE A CMH DE OUTRAS DOENÇAS GENÉTICAS ASSOCIADAS A HVE _____	26
<b>FIGURA 10</b> – CAUSAS DE MORTE SÚBITA _____	30
<b>FIGURA 11</b> – ETIOLOGIAS DA MORTE SÚBITA CARDÍACA _____	35
<b>FIGURA 12</b> – CAUSAS GENÉTICAS DE MORTE SÚBITA CARDÍACA _____	38
<b>FIGURA 13</b> – CAUSAS MAIS FREQUENTES DE MS EM JOVENS ATLETAS DE ALTA COMPETIÇÃO NOS ESTADOS UNIDOS _____	41
<b>FIGURA 14</b> – REACÇÃO DO IPLEX MASSARRAY _____	66
<b>FIGURA 15</b> – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE POR IPLEX MASSARRAY _____	77
<b>FIGURA 16</b> – ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR PARA OS EXÕES 15 E 16 DO GENE <i>TNNT2</i> E PARA O EXÃO 25 DO GENE <i>MYBPC3</i> _____	78
<b>FIGURA 17</b> – ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR PARA O EXÃO 3 DO GENE <i>CSRP3</i> DOS PACIENTES 8 E 9 (AMOSTRAS FFEP) COMPARATIVAMENTE COM DNA EXTRAÍDO DE SANGUE PERIFÉRICO DE UM DOENTE COM CMH _____	78
<b>FIGURA 18</b> – ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% PARA A COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR DOS EXÕES 11 E 30 DO GENE <i>MYBPC3</i> DE DNA EXTRAÍDO DE SANGUE ARMAZENADO NA TOXICOLOGIA FORENSE DO PACIENTE 10 (A), E DO EXÃO 8 DO GENE <i>TNNI3</i> E DOS EXÕES 10 E 16 DO GENE <i>TNNT2</i> DOS PACIENTES 14, 15 E 16 DE DNA EXTRAÍDO DE SANGUE COLHIDO NA ALTURA DA AUTÓPSIA (B) _____	80

## Índice de Tabelas

<b>TABELA 1</b> – ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO PARA MORTE SÚBITA CARDÍACA NA CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA _____	14
<b>TABELA 2</b> – GENES SARCOMÉRICOS ASSOCIADAS A CMH _____	16
<b>TABELA 3</b> – GENES NÃO-SARCOMÉRICOS ENVOLVIDOS NA CMH _____	17
<b>TABELA 4</b> – FENOCÓPIAS DE CMH: GENES ENVOLVIDOS E FENÓTIPOS ASSOCIADOS _____	26
<b>TABELA 5</b> – GENES ENVOLVIDOS NA CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA _____	47
<b>TABELA 6</b> – GENES ENVOLVIDOS NA CARDIOMIOPATIA ARRITMOGÉNICA VENTRICULAR ESQUERDA _____	48
<b>TABELA 7</b> – GENES E PATOLOGIAS ENVOLVIDOS NAS SÍNDROMES ARRÍTMICAS NA MSC _____	49
<b>TABELA 8</b> – PACIENTES ESTUDADOS VÍTIMAS DE MORTE SÚBITA E INFORMAÇÕES CLÍNICAS – AMOSTRAS FFEP E TECIDOS FIXADOS EM FORMALINA _____	56
<b>TABELA 9</b> – PACIENTES ESTUDADOS VÍTIMAS DE MORTE SÚBITA E INFORMAÇÕES CLÍNICAS – AMOSTRAS DE SANGUE COLHIDO NA AUTÓPSIA _____	57
<b>TABELA 10</b> – GENES ANALISADOS NO SISTEMA <i>SEQUENOM MASSARRAY</i> _____	65
<b>TABELA 11</b> – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA EXTRACÇÃO DE DNA DE DOIS PACIENTES TESTANDO AS TRÊS VARIÁVEIS _____	70
<b>TABELA 12</b> – RESULTADOS DA EXTRACÇÃO DE DNA COM OS MÉTODOS 1 E 2 DE DESPARAFINIZAÇÃO COM XILOL _____	71
<b>TABELA 13</b> – COMPARAÇÃO DAS EXTRACÇÕES UTILIZANDO OS DOIS KITS COMERCIAIS – <i>ROCHE</i> E <i>QIAGEN</i> _____	72
<b>TABELA 14</b> – COMPARAÇÃO DA EXTRACÇÃO COM FENOL-CLOROFÓRMIO E O KIT COMERCIAL <i>ROCHE</i> _____	73
<b>TABELA 15</b> – QUANTIFICAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES 1 A 12 _____	74
<b>TABELA 16</b> – DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE SANGUE COLHIDO NA AUTÓPSIA _____	75
<b>TABELA 17</b> – ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO SISTEMA <i>SEQUENOM MASSARRAY</i> NO GRUPO DE PACIENTES 1 A 11 _____	76
<b>TABELA 18</b> – QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DE SANGUE CONGELADO, PROVENIENTE DO INML _____	79

## Abreviaturas

- ACTC** - Gene codificador da  $\alpha$  – Actina
- ATP** - Adenosina Trifosfato (do inglês *Adenosine triphosphate*)
- CALR3** - Gene codificador da Calreticulina
- CAV3** - Gene codificador da Caveolina 3
- CAVD** – Cardiomiopatia arritmogénica ventricular direita
- CDI** – Cardioversor desfibrilhador implantável
- CNV** – do inglês, *Copy Number Variation*
- CMD** – Cardiomiopatia Dilatada
- CMH** - Cardiomiopatia Hipertrófica
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *desoxyribonucleic acid*)
- HVE** - Hipertrofia ventricular esquerda
- INML** – Instituto Nacional de Medicina Legal
- JPH2** – Gene codificador da Junctophilina-2
- LGMC** – Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias
- MALDI-TOF** – do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*
- MHC** - Cadeia pesada da miosina (do inglês, *Myosin Heavy Chain*)
- MLC1** - Cadeia leve da miosina (do inglês, *Myosin Light Chain*) essencial
- MLC2** - Cadeia leve da miosina (do inglês, *Myosin Light Chain*) reguladora
- MLP** - Proteína muscular LIM (do inglês, *Muscle LIM Protein*)
- MS** – Morte Súbita
- MSC** – Morte Súbita Cardíaca
- MYBPC** - Proteína C de ligação à miosina (do inglês, *Myosin Binding Protein C*)
- MYBPC3** - Gene codificador da Proteína C de ligação à miosina
- MYH6** - Gene codificador da Cadeia pesada da  $\alpha$ -miosina
- MYH7** - Gene codificador da Cadeia pesada da  $\beta$ - miosina
- MYL2** - Gene codificador da Cadeia leve miosina reguladora
- MYL3** - Gene codificador da Cadeia leve miosina essencial
- MYLK2** - Gene codificador da Cinase 2 da Cadeia leve de miosina
- MYOZ2** - Gene codificador da Miozenina 2
- OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PCR** – do inglês, *Polimerase Chain Reaction*  
**PLN** - Gene codificador da *Phospholamban*  
**TCAP** - Gene codificador da Teletonina  
**TNNC1** - Gene codificador da Troponina C cardíaca  
**TNNI3** - Gene codificador da Troponina I cardíaca  
**TNNT2** - Gene codificador da Troponina T cardíaca  
**TPM1** – Gene codificador da  $\alpha$  –Tropomiosina  
**TVPC** – Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica  
**TTN** - Gene codificador da Titina  
**SB** – Síndrome de Brugada  
**SQTL** – Síndrome QT longo  
**SQTC** – Síndrome QT curto  
**VE** – Ventrículo Esquerdo

## Resumo

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é a doença cardíaca hereditária mais comum, com uma prevalência de 1:500 na população em geral. Caracteriza-se por hipertrofia ventricular esquerda de causa inexplicada e apresenta grande variabilidade na expressão clínica, morfológica e genética. A CMH é uma das causas mais comuns de morte súbita cardíaca, especialmente entre jovens e atletas. Apresenta um padrão de transmissão autossómico dominante, com mais de 1000 mutações identificadas, especialmente em genes que codificam proteínas do sarcómero.

A morte súbita cardíaca (MSC) define-se como a morte que ocorre geralmente dentro da primeira hora desde o início dos sintomas, devido a uma causa cardíaca subjacente. Nas últimas décadas tornou-se claro que doenças hereditárias cardíacas estão muitas vezes na base da MSC do jovem, sendo as cardiomiopatias e as arritmias cardíacas as patologias mais relevantes associadas a este evento trágico. Em muitos casos a causa de morte pode ser estabelecida, no entanto, numa percentagem significativa de casos de MSC, a causa de morte, mesmo após um exame *postmortem* rigoroso, permanece por esclarecer.

Futuramente, a autópsia molecular poderá estar formalmente indicada para vítimas de morte súbita com autópsia negativa ou com doenças hereditárias cardíacas detectáveis, diminuindo a percentagem de casos com causa de morte indeterminada e permitindo o aconselhamento genético a familiares em risco.

O presente trabalho tem como objectivo a avaliação da possibilidade de realizar um estudo retrospectivo das autópsias negativas ou com evidências de cardiomiopatia hipertrófica em vítimas previamente assintomáticas, realizadas no Instituto Nacional de Medicina Legal e avaliar a possibilidade de implementação da autópsia molecular, em futuros casos de morte súbita nestas situações.

Através da aplicação de uma tecnologia recente, que permite o rastreio mutações conhecidas associadas à CMH, baseada na espectrometria de massa MALDI-TOF semi-automática, utilizando o sistema *Sequenom MassARRAY*, foram detectadas mutações em algumas vítimas. No entanto, não foi possível a sua confirmação por sequenciação automática.

Uma vez que a qualidade do DNA é muitas vezes um factor limitante em estudos retrospectivos de MSC, em que a única fonte de material biológico disponível são amostras de tecido fixado em formalina e embebido em parafina, torna-se necessário o desenvolvimento de um protocolo com as delegações forenses, com o objectivo de obter amostras de sangue ou tecido fresco, para futura análise molecular nestas situações.

O teste genético proposto permite proporcionar um rastreio rápido de mutações nos genes mais frequentemente envolvidos na MSC de jovens, com uma boa relação custo/benefício.

## Abstract

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is a heterogeneous condition, defined by the presence of left ventricular hypertrophy in absence of congenital heart disease or abnormal loading conditions sufficient to cause the observed hypertrophy. HCM is one of the most common causes of sudden death, especially among youngsters and athletes, affecting 1:500 individuals. It's an autosomal dominant disease, with heterogeneous penetrance, diagnostic and expression. More than 1000 mutations are associated with HCM, especially in genes encoding sarcomere proteins.

Sudden cardiac death (SCD) can be defined as an unexpected death due to cardiac causes, occurring in a short time period in an individual apparently healthy or with unknown cardiac disease. SCD is one of the most common causes of death and remains a serious public health issue in developed countries. The most relevant pathologies related with SCD include the group of cardiomyopathies and cardiac arrhythmias. In many cases the cause of death can be established; however the number of SCD, in which no specific cause can be confirmed even through a rigorous post-mortem examination, is still highly significant.

In the last decade important advances have been made in understanding the genetic basis of these deaths. Most cardiac pathologies related to SCD have a genetic basis and the identification of alterations in the genes can provide a diagnostic, thus decreasing the percentage of cases with an indeterminate cause of death, showing the importance of a molecular autopsy.

The aim of this work was to analyse the possibility of a retrospective study in negative autopsies or in victims with evidences of HCM, performed in Portugal and to evaluate the efficiency of implementing genetic testing with new technologies in such situations in the future.

A recent technology was applied, allowing a rapid and cost-effective diagnostic screening strategy of mutations associated with HCM, based on semiautomated MALDI-TOF mass spectrometry using the Sequenom MassARRAY System and the iPLEX Gold genotyping chemistry.

Mutations in some patients were detected. However the confirmation by direct sequencing was not successful.

As DNA quality and amount is often a limiting factor for genetic analysis, especially in sudden death related diseases, where the genetic screening has to be performed *postmortem*, it is necessary to develop a protocol with forensic delegations in order to collect samples of blood and fresh tissue for future molecular analysis in these situations.

In terms of speed, labour and cost efficiency, the proposed strategy represents a significant time saving over conventional methods.

# Capítulo 1

---

# 1. Introdução

## 1.1 Cardiomiopatias

### 1.1.1 Definição e Classificação

Cardiomiopatias são um grupo importante e heterogéneo de doenças do músculo cardíaco associadas a disfunção cardíaca, com múltiplas etiologias e expressão fenotípica heterogénea. A insuficiência cardíaca devida a cardiomiopatias representa o maior problema de saúde pública na sociedade actual. Um aumento dramático na mortalidade e na morbilidade devido a insuficiência cardíaca tem vindo a ser observado, sendo descrito como epidemia de saúde emergente no século XXI (Fatkin and Graham, 2002).

O termo “cardiomiopatias” foi pela primeira vez utilizado em 1957 e desde então o conhecimento sobre este grupo de doenças cardíacas complexas tem aumentado substancialmente (Alves *et al.*, 2010).

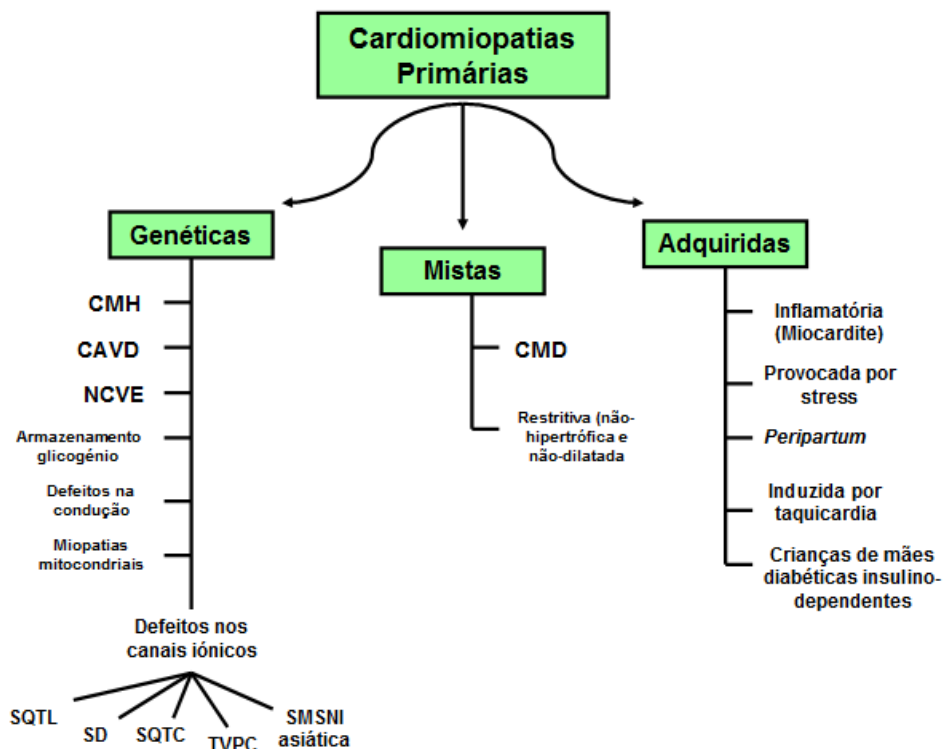
Nos últimos vinte anos, com o desenvolvimento e disponibilidade de técnicas de biologia molecular, grandes avanços têm sido feitos na compreensão das cardiomiopatias (Thiene *et al.*, 2005). Em Medicina, como na Biologia, também se utilizam sistemas de classificação para a nomenclatura das doenças, com base na partilha de características morfológicas, fisiológicas, genéticas ou bioquímicas particulares (Alves *et al.*, 2010). Consequentemente, a consciencialização e o conhecimento destas patologias em ambas as comunidades, pública e médica, têm histórica e periodicamente vindo a ser marcados por alguma confusão em torno da definição e da nomenclatura. Desta forma, as classificações formais e sistemáticas têm sido tradicionalmente encaradas como exercícios úteis para promover uma maior compreensão das doenças do músculo cardíaco. De facto, com o decorrer dos anos, um grande número de classificações de tais cardiomiopatias tem sido avançado, por investigadores a título individual e painéis de consenso sancionados por organizações relacionadas com a medicina tais, como a OMS. Estes esquemas de classificação têm evoluído de acordo com o nível da compreensão científica (Maron, 2008).



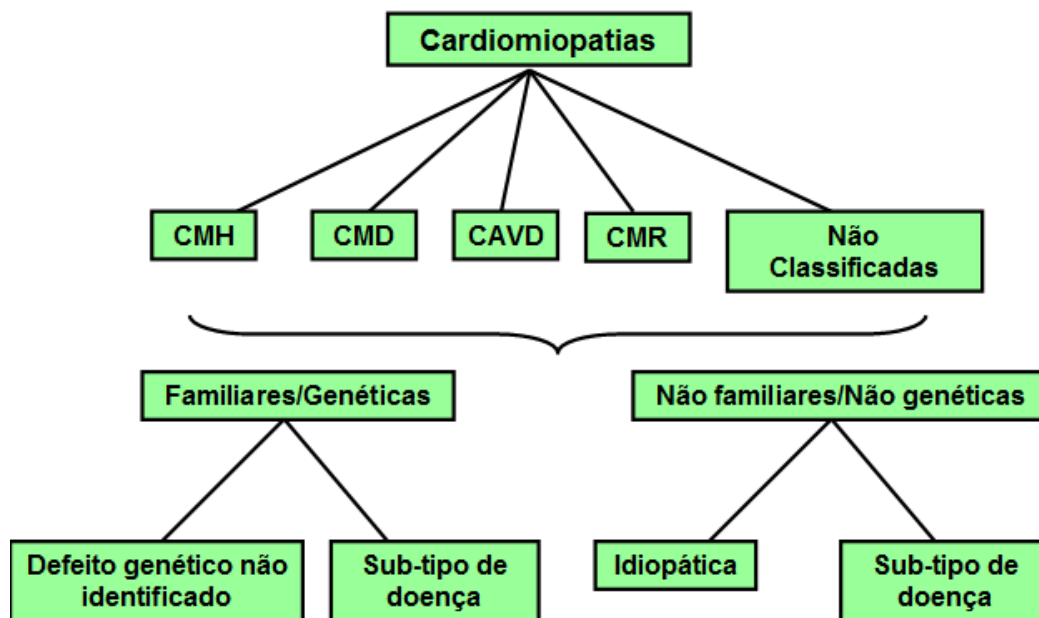
Na classificação original da OMS em 1980 (WHO/ISFC, 1980), as cardiomiopatias eram definidas apenas como "Doenças do músculo cardíaco de causa desconhecida", reflectindo uma falta de informação sobre os seus mecanismos básicos. A classificação final da OMS publicada em 1995 (Richardson *et al.*, 1996) propôs a seguinte definição: "doenças do miocárdio associadas a disfunção cardíaca" e incluíam: a cardiomiopatia dilatada, a cardiomiopatia/displasia arritmogénica do ventrículo direito, a cardiomiopatia restritiva primária e a cardiomiopatia hipertrófica. Recentemente, comissões de peritos da *American Heart Association* e a *European Society of Cardiology* propuseram versões actualizadas para a definição e classificação das cardiomiopatias (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006).

A *American Heart Association* adoptou a definição proposta em 2006: "cardiomiopatias são um grupo heterogéneo de doenças do miocárdio em que se verifica disfunção mecânica e/ou eléctrica que geralmente (mas não invariavelmente) se manifestam por hipertrofia ou dilatação ventricular inapropriadas e que são devidas a uma variedade de causas, frequentemente causas genéticas" (Maron *et al.*, 2006). Relativamente à classificação das cardiomiopatias, a mesma associação propõe que estas sejam divididas em dois grandes grupos – cardiomiopatias primárias e cardiomiopatias secundárias - baseando-se no principal órgão envolvido. As cardiomiopatias primárias (genéticas, não-genéticas e adquiridas) são confinadas unicamente ou predominantemente ao músculo cardíaco (Figura 1). As cardiomiopatias secundárias demonstram envolvimento patológico do miocárdio como parte de uma grande variedade de doenças sistémicas generalizadas (Maron *et al.*, 2006).

A *European Society of Cardiology* define cardiomiopatias como: "doenças do miocárdio nas quais o músculo cardíaco é estruturalmente e funcionalmente anormal, na ausência de doença coronária arterial, hipertensão, doença valvular e doença congénita cardíaca, suficientes para causar a anomalia miocárdica observada". A classificação proposta divide as cardiomiopatias em grupos específicos, relativamente ao fenótipo morfológico e funcional. Cada fenótipo é posteriormente subdividido nas formas familiar e não familiar (Figura 2) (Elliott *et al.*, 2008).



**Figura 1** – Sumário do modelo de classificação proposto pela *American Heart Association*. CMH – Cardiomiopatia hipertrofica, CAVD – Cardiomiopatia arritmogénica ventricular direita, NCVE – Não compactação ventricular esquerda, SQT – Síndrome QT longo, SB – Síndrome de Brugada, SQTc – Síndrome QT curto, TVPC – Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, SMSNI – Síndrome de morte súbita nocturna inexplicada, CMD – Cardiomiopatia dilatada (adaptado de Maron *et al.*, 2006).



**Figura 2** – Sumário do modelo de classificação proposto pela *European Society of Cardiology*. CMH – Cardiomiopatia hipertrofica, MCD – Cardiomiopatia dilatada, CAVD – Cardiomiopatia arritmogénica ventricular direita, CMR – Cardiomiopatia restritiva (adaptado de Elliott *et al.*, 2008).

## 1.2 Cardiomiopatia Hipertrófica

Desde a sua descoberta há aproximadamente 50 anos atrás, a Cardiomiopatia Hipertrófica (CMH) continua a fascinar clínicos e investigadores, devido às suas manifestações clínicas e patológicas pouco comuns.

A primeira descrição moderna da CMH foi feita em 1958 pelo patologista britânico Teare (Teare, 1958). Desde então, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico avançados permitiu um melhor conhecimento da doença.

A CMH é uma doença primária do miocárdio, caracterizada por hipertrofia do ventrículo direito que ocorre na ausência de outras doenças cardíacas ou sistémicas que possam provocar esta hipertrofia (Fatkin and Graham, 2002; Richardson *et al.*, 1996; Stroumpoulis *et al.*, 2010). Apresenta um padrão de transmissão autossómico dominante, sendo uma das doenças cardíacas hereditárias mais comuns, com uma prevalência em jovens adultos de 1-500 indivíduos. Apresenta uma grande variabilidade clínica intra e inter-familiar, variando entre formas benignas e formas malignas com um elevado risco de insuficiência cardíaca e morte súbita (Fokstuen *et al.*, 2011; Ho and Seidman, 2006; Maron *et al.*, 1995; Roncarati *et al.*, 2011).

Clinicamente é muito heterogénea: muitos pacientes permanecem assintomáticos durante toda a vida, outros desenvolvem sintomas de fibrilhação auricular e/ou insuficiência cardíaca, e alguns morrem subitamente, normalmente ainda jovens e sem sintomas prévios (Roncarati *et al.*, 2011).

A análise clínica estabeleceu a CMH familiar como a doença do jovem adulto. Permanece por esclarecer se a CMH em diferentes idades representa uma só doença ou entidades diferentes com fenótipos sobreponíveis. A sua variabilidade clínica intrigante da doença é parcialmente explicada pela sua heterogeneidade genética (Niimura *et al.*, 2002).

Um grupo americano (Maron *et al.*, 2006) sugeriu que a CMH fosse geneticamente e não morfológicamente definida. O grupo de trabalho em Doenças Miocárdicas e Pericordiais da Sociedade Europeia de Cardiologia recomenda a classificação morfológica (Elliott *et al.*, 2008).

Em Outubro de 2009 (Maron, 2010a) foram estabelecidos, por uma comissão internacional os seguintes princípios:

- A CMH é provavelmente não reconhecida clinicamente na maioria das pessoas afectadas, estando apenas diagnosticada a “ponta do iceberg”.
- É a doença cardiovascular genética mais comum, com uma prevalência de 1:500 na população em geral.
- CMH é a causa mais comum de morte súbita no jovem, incluindo os atletas.
- CMH é uma causa importante de doença cardíaca, incluindo a insuficiência cardíaca e a fibrilhação auricular.
- Paradoxalmente, a CMH tem, muitas vezes, pouca ou nenhuma tradução clínica, sendo frequentemente compatível com uma vida e longevidade normais.
- As expressões clínicas, morfológicas e genéticas são altamente heterogéneas.
- Tem uma expressão fenotípica, com hipertrofia ventricular esquerda assimétrica, que assume diversos padrões, frequentemente incluindo hipertrofia segmental ligeira (com massa ventricular esquerda normal).
- Outras características fenotípicas incluem arquitectura celular desorganizada, matriz intersticial expandida, fibrose, remodelação microvascular, cúspides da válvula mitral aumentadas/alongadas e anomalias congénitas do aparelho mitral.

Em resposta a doenças cardiovasculares, a morfologia do coração é remodelada maioritariamente em dois padrões: hipertrofia (Figura 3) ou dilatação. Os processos de remodelação são habitualmente mecanismos compensatórios que ajudam a preservar a função de bombeamento em estados de doença. A hipertrofia é clinicamente reconhecida pela imagem cardíaca, que documenta o aumento na espessura da parede ventricular (Seidman and Seidman, 2001).

A hipertrofia miocárdica associada a remodelação cardíaca ocorre através do aumento no tamanho das células cardíacas (cardiomiócitos) e não do seu número (hiperplasia) (Seidman and Seidman, 2001). A hipertrofia é muitas

vezes associada ao aumento de fibrose intersticial, onde mais fibroblastos cardíacos e matriz extracelular associada, estão presentes do que no coração saudável. A fibrose intersticial aumenta a rigidez cardíaca e prejudica o relaxamento ventricular, alterações que modificam a anatomia do coração. O relaxamento ventricular anormal impede o esvaziamento auricular do sangue, que pode passivamente aumentar estas câmaras e causar dilatação auricular, uma característica prevalente do coração hipertrófico. O processo de remodelação cardíaca compensatório é inicialmente benéfico para a função cardíaca, mas pode tornar-se numa adaptação prejudicial, podendo acelerar a deterioração funcional e provocar insuficiência cardíaca (Seidman and Seidman, 2001).

### 1.2.1 Patologia da CMH

#### 1.2.1.1 Exame Macroscópico

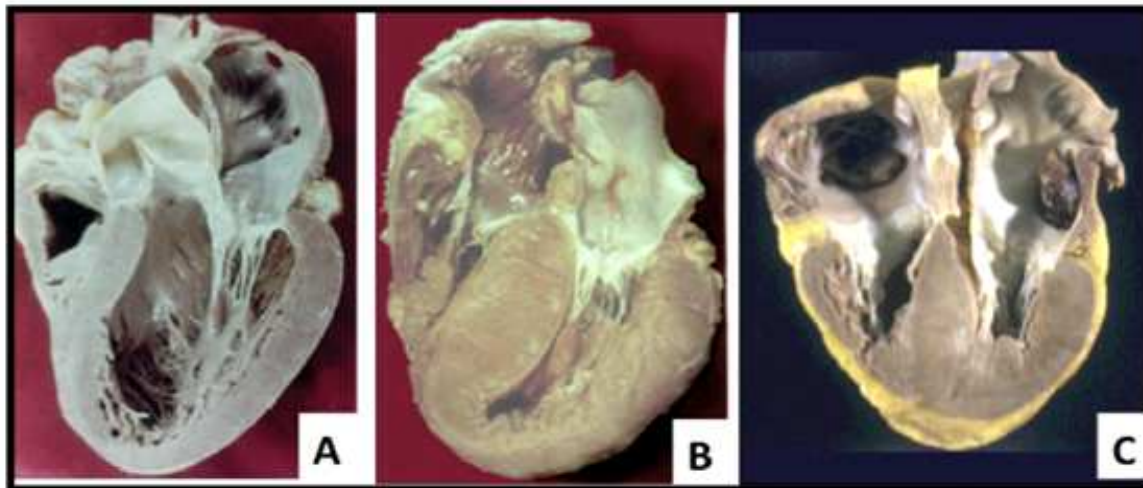
A definição clínica geral de CMH, independente da idade, estabelece que a CMH é um estado de doença caracterizada por hipertrofia ventricular esquerda inexplicada, na ausência de outra doença cardíaca ou sistémica, que possa produzir a magnitude da hipertrofia evidente no paciente (Maron, 2002; Maron *et al.*, 2003; Maron *et al.*, 2009b).

A doença é então, caracterizada por espessamento excessivo do miocárdio ventricular esquerdo, sem causa identificável (Ho, 2010b; Prinz *et al.*, 2011) (Figura 3).



**Figura 3** - Patologia macroscópica demonstrando hipertrofia ventricular esquerda (esquerda) comparada com a morfologia cardíaca normal (direita) (adaptado de Ho,2010b).

A extensão e localização do espessamento da parede são bastante variáveis. O septo interventricular está muitas vezes envolvido, o que leva a uma nomenclatura alternativa – hipertrofia septal assimétrica (Prinz *et al.*, 2011). Diferentes morfologias ventriculares são encontradas em pacientes com CMH, podendo a hipertrofia ventricular ser focal ou difusa, assimétrica ou concêntrica, obstrutiva ou não obstrutiva (Wang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010) (Figura 4).



**Figura 4** – Remodelação na CMH. A massa do miocárdio normal (A) está aumentada na CMH devido a hipertrofia ventricular, que pode ser assimétrica (B), concêntrica (C) ou focal (sem imagem) (adaptado de Wang *et al.*, 2010).

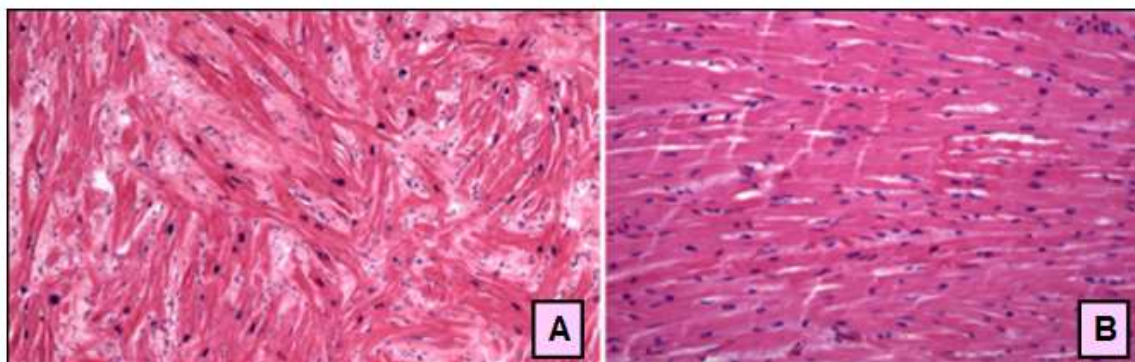
O diagnóstico clínico da CMH envolve a identificação de hipertrofia cardíaca de causa não identificada, por estudos electrocardiográficos e ecocardiográficos. O aparecimento e a progressão da doença não são homogêneos e têm grande variabilidade de manifestações clínicas e prognóstico (Rodriguez *et al.*, 2009). Devido à penetrância incompleta, o diagnóstico é muitas vezes acidental ou acontece após o diagnóstico de morte súbita num membro da família.

### **1.2.1.2 Histopatologia**

O ventrículo é composto, em cerca de 75%, por células musculares estriadas, os miócitos. Cada miócito tem um comprimento que pode variar entre 60 a 140  $\mu\text{m}$  e um diâmetro de 17 a 25  $\mu\text{m}$  (Fauci *et al.*, 2009). O alinhamento organizado dos miócitos, que caracteriza o miocárdio normal, (Figura 5B), adquire um aspecto distorcido pelo crescimento hipertrófico desta células, conferindo-lhes um padrão desorganizado. Esta característica, denominada como *disarray* dos miócitos, pode ser focal e adjacente à aparência normal miocárdica ou pode

estar espalhada pelo ventrículo. Com a morte prematura dos miócitos hipertróficos, os fibroblastos cardíacos e a matriz extracelular associada aumentam (fibrose) e contribuem para a distorção na arquitectura celular miocárdica (Seidman and Seidman, 2001).

Assim, histopatologicamente, a CMH caracteriza-se por desorganização típica das fibras cardiomiócitas, com miócitos espessados e ramificados e fibrose (Figura 5A) (Ho, 2009; Prinz *et al.*, 2011). Suspeita-se que a perda de contractilidade, associada a esta desorganização celular e fibrose intersticial, promova o processo de hipertrofia miocárdica (Prinz *et al.*, 2011).



**Figura 5** - Secções histológicas demonstrando a desorganização dos miócitos e o aumento de fibrose (A). Em contraste com o miocárdio normal (B), onde se observa um arranjo ordenado dos miócitos (adaptado de Ho, 2010b).

A função de bombeamento geralmente permanece normal durante anos com a CMH. No entanto, a fibrose e a hipertrofia causam disfunção diastólica, que está normalmente presente no diagnóstico (Dickstein *et al.*, 2008).

### **1.2.2 Etiologia**

Desde a descoberta da primeira mutação causadora de CMH no gene da cadeia pesada da  $\beta$ -miosina (MYH7), em 1990 (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990), numerosos estudos têm vindo a ser desenvolvidos com o objectivo de elucidar a etiologia molecular desta doença (Chung *et al.*, 2003; Marian, 2008; Maron *et al.*, 2004).

A CMH familiar reflecte cerca de 50% dos casos, assumindo-se os restantes casos como sendo mutações espontâneas (Bos *et al.*, 2009).

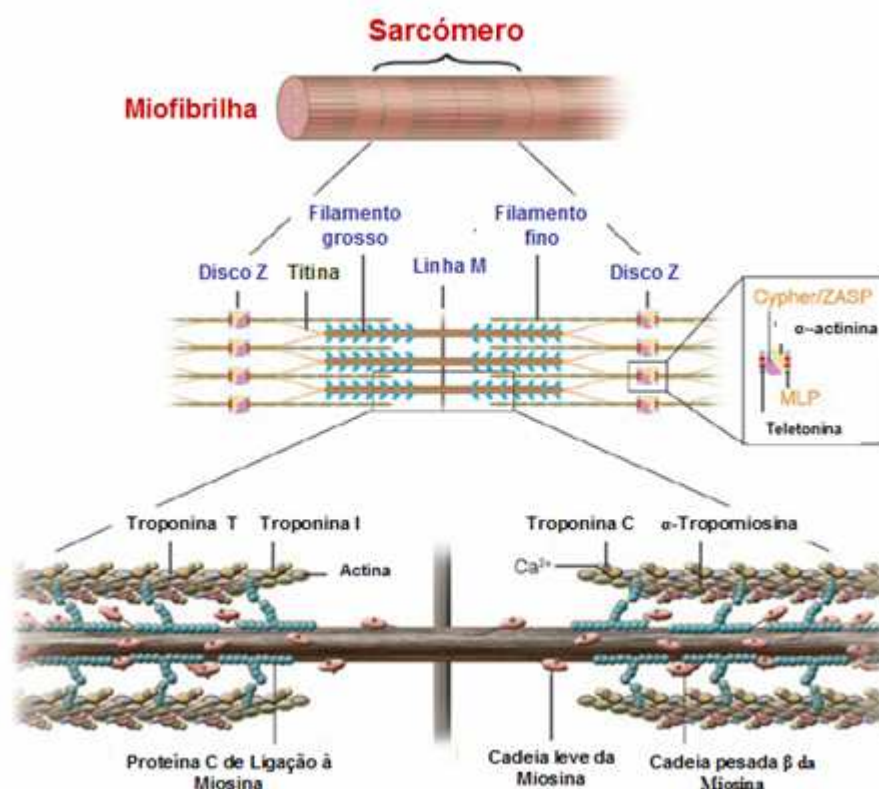
Devido ao facto de a maioria das mutações em pacientes com CMH serem identificadas em proteínas estruturais do músculo cardíaco, a doença tem sido denominada como “doença do sarcómero” (Bashyam *et al.*, 2003).

### **Sarcómero**

Miofibrilhas, que consistem da repetição de unidades conhecidas como sarcómeros – unidades básicas estruturais e funcionais do músculo cardíaco - constituem os elementos contrácteis do músculo. Cada sarcómero é estruturalmente definido como uma região entre duas linhas Z e é formado por um complexo multi-proteico, constituído por sete proteínas *major* e várias proteínas *minor* organizadas em filamentos finos e grossos, que estão paralelamente alinhados (Figura 6) (Boateng and Goldspink, 2008; Morita *et al.*, 2005). Os filamentos grossos são compostos por cadeias pesadas e leves de miosina. A proteína C de ligação à miosina (MyBP-C) é uma proteína associada ao filamento grosso, que forma 7-9 linhas transversais, em intervalos regulares na banda A (Figura 7) (Morimoto, 2008). Os filamentos finos consistem predominantemente em actina e em menos quantidade de proteínas reguladoras, nomeadamente a tropomiosina e a troponina (Bashyam *et al.*, 2003; Boateng and Goldspink, 2008).

Com microscopia electrónica, podem ser observadas pontes estendendo-se entre filamentos grossos e finos dentro da banda A. Estas pontes compreendem cabeças de miosina ligadas a filamentos de actina (Figura 7) (Fauci *et al.*, 2009). O disco-Z do sarcómero é uma região crítica, visto que representa a interface entre o aparelho contráctil e o citoesqueleto (Frank *et al.*, 2006). A alfa-actinina-2 (ACTN2) é a componente principal do disco-Z e tem uma importância biológica fundamental na organização e interacção entre o citoesqueleto do sarcómero e da membrana muscular (Figura 6 e 7) (Rodriguez *et al.*, 2009; Sjoblom *et al.*, 2008).



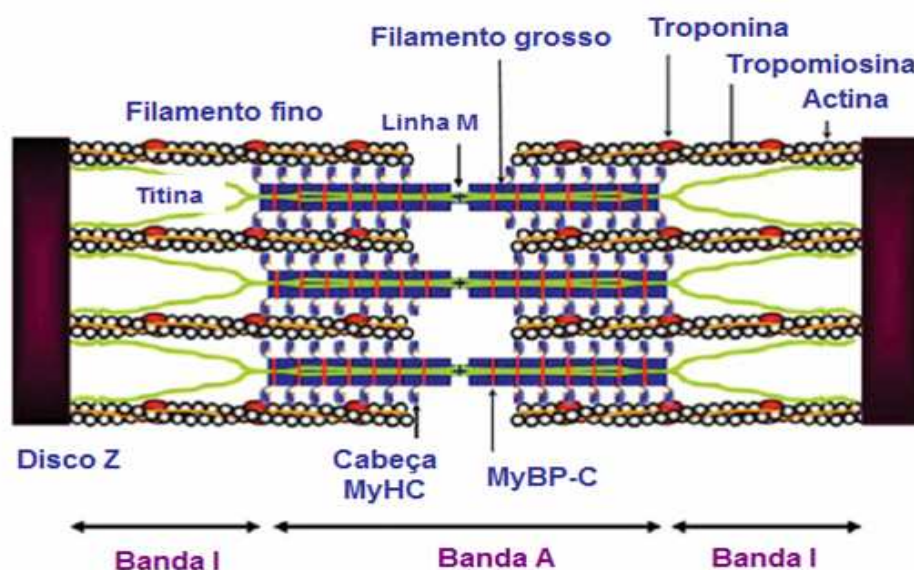


**Figura 6** – Representação esquemática do sarcômero (adaptado de Morita *et al.*, 2005)

No músculo em relaxamento, a ligação da tropomiosina ao local activo da actina previne a formação de pontes entre a actina e a miosina, prevenindo desta forma a contracção muscular. O processo de contracção é iniciado pela libertação de iões de cálcio do retículo sarcoplasmático das células do músculo cardíaco. Os iões de cálcio ligam-se à troponina, causando a movimentação da molécula de tropomiosina para fora do local da ponte de ligação da actina. Sequentemente, moléculas de ATP ligadas à miosina são hidrolisadas pela adenosina trifosfatase (ATPase) para a produção de uma molécula energizada de miosina e a ponte de ligação da molécula de miosina energizada liga-se à actina para activar a libertação da energia armazenada na cabeça da miosina. A libertação de energia corresponde ao movimento das pontes de ligação ligadas em movimento remante, trazendo as moléculas de actina até ao centro do sarcômero. Uma molécula de ATP liga-se à molécula de miosina e liberta a ponte de ligação em anexo. A miosina está agora pronta para se ligar a outro local da actina, enquanto o cálcio estiver presente (Bashyam *et al.*, 2003).

A contração ocorre quando os filamentos finos e grossos deslizam um sobre o outro e é rapidamente sucedida pelo relaxamento do sarcómero. Estes ciclos contínuos são regulados por fluxos de cálcio e reservas de energia disponíveis (ATP) (Rodriguez *et al.*, 2009).

Os filamentos grossos são mantidos na sua posição por uma estrutura designada de linha M (Boateng and Goldspink, 2008; Yu *et al.*, 1998). A organização dos filamentos grossos e finos, sob a forma interdigitada, resulta na formação das bandas A (filamentos finos e grossos sobrepostos) e bandas I (apenas filamentos finos). A manutenção desta estrutura é garantida, num plano transversal, pelo disco Z e pela linha M. Num plano longitudinal, tal facto é garantido por uma proteína estrutural – a titina – que, ao ancorar a sua região N-terminal ao disco Z e a C-terminal à banda M, conecta estes dois componentes (Figura 7) (Boateng and Goldspink, 2008).



**Figura 7** – Representação esquemática da estrutura do sarcómero, evidenciando a localização da banda I e da banda A (adaptado de Morimoto, 2008).

### 1.2.3 Clínica

A CMH é muito heterogénea em relação às manifestações clínicas. O espectro de sintomas varia de pacientes assintomáticos a pacientes com quadro clínico severo. Dispneia e angina sob stress, tonturas, palpitações e ocasionalmente síncope são comuns (Prinz *et al.*, 2011).

A fibrilhação auricular é a arritmia mantida mais comum em pacientes com CMH, afectando 20% dos pacientes, mais frequente em pacientes com idade superior a 50 anos (Maron, 2010a).

O sintoma mais dramático é a morte súbita cardíaca (MSC), que é comum em pacientes jovens e previamente assintomáticos. A morte ocorre predominantemente durante ou depois do exercício físico vigoroso e é explicada por arritmias malignas. A CMH é mesmo a causa de MSC mais comum em atletas (Prinz *et al.*, 2011).

#### **1.2.4 Diagnóstico**

A CMH é tipicamente diagnosticada pela hipertrofia ventricular esquerda (HVE) inexplicada na ecocardiografia bi-dimensional. O diagnóstico clínico baseia-se na presença de hipertrofia do ventrículo esquerdo na ausência de outra causa cardíaca ou sistémica, que possa provocar a hipertrofia, tal como estenose da válvula aórtica ou hipertensão (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006).

A idade de início da HVE varia desde cedo na infância até tarde no estado adulto, e depende em parte, da base genética subjacente (Niimura *et al.*, 2002; Rosenzweig *et al.*, 1991). O espectro de CMH é amplo. O diagnóstico de alguns pacientes ocorre incidentalmente durante a investigação de murmúrios assintomáticos ou com rastreio familiar. Alguns doentes apresentam dispneia, dor no peito ou intolerância ao exercício (Ho and Seidman, 2006).

#### **1.2.5 Opções terapêuticas**

O tratamento farmacológico é a terapia de primeira linha, tradicionalmente com  $\beta$ -bloqueantes ou bloqueadores não-hidropirínicos dos canais de cálcio (Ho and Seidman, 2006), fármacos anti-arrítmicos e diuréticos (Cirino and Ho, 1993). No entanto, estratégias farmacológicas não fornecem protecção absoluta contra a morte súbita (Maron, 2010a). Cardioversores desfibrilhadores implantáveis (CDI) são eficientes na prevenção da taquicardia/fibrilhação ventricular em pacientes de alto risco (11% e 4% anualmente, para prevenção primária e secundária respectivamente). Os CDIs alteram a evolução clínica da CMH e fornecem a possibilidade de uma longevidade normal ou perto do normal para muitos pacientes (Maron, 2010a).

### 1.2.7 Estratificação de risco

Tem vindo a ser feito um grande esforço no problema da estratificação de risco da morte súbita cardíaca durante as últimas décadas. Esta questão pretende determinar pacientes com alto risco de MSC (Semsarian, 2007). A disponibilidade de terapias que têm demonstrado reduzir a MSC em vários grupos em risco, incluindo a medicação com  $\beta$ -bloqueantes, inibidores da enzima conversora da angiotensina, estatinas e sistemas como a implementação de cardioversor desfibrilhador implantável (CDI), transformaram a estratificação de risco para MSC num exercício relevante (Goldberger *et al.*, 2011). A tabela 1 resume os factores considerados importantes (*minor e major*) na avaliação de que indivíduos com CMH apresentam um elevado risco de morte súbita (Maron, 2010a; Semsarian, 2007).

**Tabela 1** – Estratificação de risco para morte súbita cardíaca na cardiomiopatia hipertrófica (adaptado de Semsarian, 2007).

<b>Factores de risco major</b>	<p>Espessamento da parede ventricular esquerda <math>\geq</math> 30mm</p> <p>História familiar de morte súbita prematura (<math>\leq</math> 35 anos)</p> <p>Paragem cardíaca/Taquicardia ventricular prévia</p>
<b>Factores de risco minor</b>	<p>Episódios prévios de taquicardia ventricular não-mantida documentada</p> <p>Síncope recorrente</p> <p>Pressão sanguínea anormal em resposta ao exercício</p> <p>Evidência de isquémia do miocárdio</p> <p>Obstrução do fluxo ventricular esquerdo <math>\geq</math> 50 mmHG em repouso ou provocada</p>

Estes factores de risco são maioritariamente aplicáveis a pacientes com idade inferior a 40 anos (Maron, 2010a).

A MSC é a complicação mais temida da CMH, podendo ser a primeira e última manifestação da doença, especialmente em indivíduos jovens. A identificação

de indivíduos com um risco elevado de MSC poderá ser fundamental na abordagem de pacientes com CMH, dado que pode ser possível prevenir este evento súbito através da aplicação de um cardioversor desfibrilhador implantável (CDI) (Maron *et al.*, 2000).

No entanto, é também evidente que alguns pacientes com CMH que não apresentam factores de risco podem sofrer morte súbita (Elliott *et al.*, 2000; Maron *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2011). Assim, será necessário promover a identificação de factores de risco adicionais que poderão ajudar na selecção de pacientes candidatos à aplicação de CDI (Maron, 2010b; Maron *et al.*, 2008). Neste contexto, a estratégia de utilizar mutações simples em genes que codificam proteínas do sarcómero cardíaco como marcadores de prognóstico demonstrou ser pouco fiável (Ackerman *et al.*, 2002; Ho, 2010a; Landstrom and Ackerman, 2010; Van Driest *et al.*, 2002). No entanto, recentemente, surgiu uma hipótese que sugere que pacientes com CMH, portadores de mais de uma mutação patogénica independente, podem apresentar um risco superior de severidade de expressão da doença e uma evolução mais desfavorável (Girolami *et al.*, 2010; Ingles *et al.*, 2005; Kelly and Semsarian, 2009). Não está, todavia, actualmente definido se duas (ou mais) mutações sarcoméricas patogénicas sozinhas podem ser consideradas marcadores únicos de risco aumentado de MSC (Maron *et al.*, 2011).

A taxa de mortalidade anual de CMH evidente em populações não seleccionadas é actualmente cerca de 1-2% (Christiaans *et al.*, 2010).

### 1.2.7 Base Genética da CMH

A variabilidade clínica e fenotípica da doença podem ser parcialmente explicadas pela heterogeneidade genética (Bashyam *et al.*, 2003).

A CMH tem um padrão de transmissão autossómico dominante com penetrância variável. Várias centenas de mutações em mais de 32 genes foram identificadas até à data. A cadeia pesada da  $\beta$  – miosina, a proteína C de ligação à miosina e a troponina T cardíaca são as proteínas mais frequentemente afectadas, contabilizando cerca de 60 a 70% de todos os casos de CMH (Prinz *et al.*, 2011).

Onze genes sarcoméricos têm sido identificados como responsáveis pela CMH, apresentando grande variabilidade na frequência (Charron *et al.*, 1998;

Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990; Gruver *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1997; Maron, 2010a; Maron *et al.*, 2001; Mogensen *et al.*, 1999; Mogensen *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2000; Poetter *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1995; Watkins *et al.*, 1995a), sendo os mais frequentemente envolvidos o gene da cadeia pesada da  $\beta$ -miosina (MYH7) (o primeiro a ser identificado) e o gene da proteína C de ligação à miosina (MYBPC3), apresentando 80% dos pacientes, com testes genéticos positivos, mutações nestes dois genes (Maron, 2010a) (Tabela 2; Figura 8).

**Tabela 2** – Genes sarcoméricos associadas a CMH

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Locus</b>	<b>Mutações Reportadas/Associadas a CMH*</b>
<b>MYBPC3</b>	Proteína C que liga a miosina	11p11.2	294/169-179
<b>MYH7</b>	Cadeia pesada de miosina – isoforma $\beta$	14q11.2-q12	338/221-225
<b>TNNT2</b>	Troponina Cardíaca T	1q32	60/30-31
<b>TNNI3</b>	Troponina Cardíaca I	19p13.4	50/27
<b>TPM1</b>	Tropomiosina $\alpha$	15q22.1	24/11
<b>MYL2</b>	Cadeia leve regulatória da miosina	12q23-q24.3	13/10
<b>MYL3</b>	Cadeia leve essencial da miosina	3p21.2-p21.3	11/5-6
<b>ACTC1</b>	Actina cardíaca	15q11-q14	18/9
<b>TTN</b>	Titina	2q31	25/2
<b>TNNC1</b>	Troponina cardíaca C	3p21.1	13/5
<b>MYH6</b>	Cadeia pesada de miosina – isoforma $\alpha$	14q11.2-q12	23/2-3

\* Fonte: HGMD – Agosto 2011

Foram apresentadas duas hipóteses para a explicação da forma como uma simples mutação na proteína do sarcómero pode levar a CMH. A primeira propõe que uma proteína simples mutada no interior do sarcómero pode comprometer a função da unidade sarcomérica normal do músculo. A outra hipótese sugere que mutações nas proteínas sarcoméricas levam a haploinsuficiência. Em haploinsuficiência, uma mutação altera uma cópia do gene, permanecendo quantidades insuficientes da proteína normal que permitam o correcto funcionamento, resultando num fraco desempenho do restante sarcómero (Rodriguez *et al.*, 2009).

Uma publicação recente de Carolyn Ho refere que a HVE é uma manifestação tardia da doença e que as mutações sarcoméricas provocam anomalias na bioquímica e função miocárdica muito antes do desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda. (Ho, 2011).

Além das mutações envolvendo os miofilamentos do sarcômero, mutações no disco Z, que é composto por um quadro de proteínas envolvidas na citoarquitetura do cardiomiócito e na sinalização mecânico-sensorial, têm surgido como causadores de doença, no entanto, com níveis mais baixos de incidência (Arimura *et al.*, 2009; Bos *et al.*, 2007; Bos *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2010; Geier *et al.*, 2008; Hayashi *et al.*, 2004; Maron *et al.*, 2009b; Osio *et al.*, 2007; Seidman and Seidman, 2011; Vasile *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010) (Tabela 3; Figura 8).

Igualmente, proteínas envolvidas noutras funções do cardiomiócito e genes envolvidos na sinalização do cálcio e no metabolismo mitocondrial, na respiração celular e com funções auxiliares ao sarcômero têm também sido descritos como sendo implicados no desenvolvimento de CMH (Alcalai *et al.*, 2008; Bos *et al.*, 2007; Landstrom and Ackerman, 2010; Landstrom *et al.*, 2007; Seidman and Seidman, 2011; Vasile *et al.*, 2006) (Tabela 3).

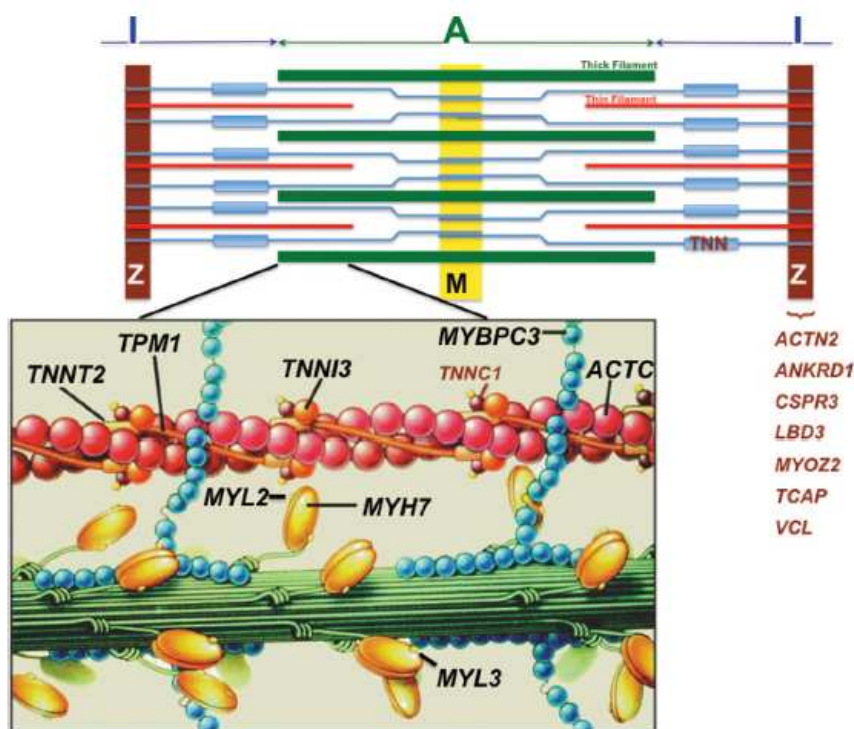
**Tabela 3** – Genes não-sarcoméricos envolvidos na CMH

Função	Gene	Proteína	Locus	Mutações Descritas/ Associadas a CMH*
Disco Z	CSRP3	Proteína LIM do músculo cardíaco	11p15.1	14/7
	TCAP	Teletonina ou <i>Tinin-cap</i>	17q12	14/5
	ANKRD1	Domínio 1 de repetição da anquirina	10q22.1	12/3
	MYOZ2	Miozenina 2	10q22.1	2/2
	ACTN2	$\alpha$ -actinina 2	1q42-q43	8/1
	VCL	Vinculina	10q22.2	3/1
Proteínas auxiliares sarcômero	MYO6	Miosina VI	6q13	8/1
	CAV3	Caveolina	3p25	40/1
	ACTA1	Actina $\alpha$ 1, músculo-esquelético	1q42.13	181/1
	OBSCN	Obscurina	1q42.13	3/1
	DES	Desmina	2q35	61/1

	JPH2	Junctofilina 2	20q13.12	4/4
	PLN	Fosfolamban	6q22.1	11/1
<b>Sinalização do cálcio</b>	CALR3	Calreticulina 3	19p13.11	2/2
	CASQ2	Calsequestrina 2	1p13-p11	15/1
	MYLK2	Cinase 2 da cadeia leve da miosina	20q13.31	2/2
	COX15	Proteína 15 da estrutura do citocromo C oxidase	10q24	4/2
<b>Outros</b>	SLC25A4	Membro 4 da família 25 de transportadores de solutos	4q35	6/1
	RAF1	Homólogo 1 do oncogene viral da leucemia dos murganhos	3p25	20/1
	FXN	Frataxina	9q13-q21	48/1

\* Fonte: HGMD – Agosto 2011

Comparativamente com as mutações encontradas nos genes sarcoméricos, as mutações noutros genes contribuem para uma pequena percentagem de pacientes com CMH, ficando uma percentagem significativa da doença geneticamente inexplicada (Landstrom *et al.*, 2007).



**Figura 8** - Representação esquemática do sarcômero evidenciando a localização dos genes mais envolvidos na etiologia da CMH. (adaptado de Seidman and Seidman, 2011).



A diversidade intergenética é composta igualmente por heterogeneidade intragenética considerável, com mais de 1000 mutações identificadas (<http://www.hgmd.org/>; <http://cardiogenomics.med.harvard.edu>) (Maron, 2010a) em mais de 30 genes que codificam isoformas de produtos genéticos sarcoméricos ou relacionados com o sarcômero, encontradas em cerca de 50% dos pacientes com testes genéticos (Maron, 2010a; Rodriguez *et al.*, 2009; Seidman and Seidman, 2011). No entanto, a frequência das mutações causais da CMH varia de estudo para estudo, variando de 30 a 61% em pacientes com a doença clinicamente definida. Esta variabilidade prende-se com as diferenças nas populações estudadas, as idades e natureza dos pacientes analisados, entre outras (Rodriguez *et al.*, 2009).

Mesmo com o conhecimento crescente das mutações genéticas causais, existem ainda muitas lacunas no diagnóstico da CMH, devido ao grande grau de heterogeneidade intra e inter genética e a uma grande prevalência de “mutações privadas” (Rodriguez *et al.*, 2009). Cerca de 2/3 de mutações relacionadas com a CMH, são novas, ocorrendo apenas numa família (Maron, 2010a).

A presença de múltiplas mutações genéticas está geralmente associada a uma maior severidade clínica. Infelizmente, a relação genótipo-fenótipo é muito complexa e está ainda a mudar (Roncarati *et al.*, 2011).

### **1.2.8 Relação genótipo-fenótipo**

Os estudos genéticos iniciais na CMH pretendiam encontrar associações entre defeitos genéticos particulares e fenótipos clínicos específicos (Keren *et al.*, 2008).

No estudo de Xu e colaboradores em 2010, os autores classificam as mutações em dois grupos: Benignas/Leves e Moderadas/Malignas. As primeiras são definidas como aquelas ligadas a pacientes com ou sem história familiar, penetrância baixa a moderada, sintomatologia ligeira e sem MSC ou outros eventos cardíacos severos (transplantes cardíacos, miectomia, insuficiência cardíaca). Estas mutações estão predominantemente associadas à classificação NYHA I (New York Heart Association). Mutações

Moderadas/Malignas são definidas como mutações ligadas a pacientes com ou sem história familiar, mas com início precoce, sintomas moderados a severos, penetrância elevada com ou sem MSC. A maioria dos pacientes afectados apresenta fibrilhação auricular e tem rápida progressão para insuficiência cardíaca. Estas mutações estão associadas à classificação NYHA III e IV (Xu *et al.*, 2010).

Mutações nos genes que codificam a cadeia pesada da  $\beta$ -miosina (MYH7), a proteína C de ligação à miosina (MYBPC3), a troponina T cardíaca (TNNT2) e troponina I cardíaca (TNNI3) são as mais frequentes e, em conjunto, contribuem para mais de 80% dos casos de CMH (Ho, 2010b).

A mutação genética causal influencia a idade na qual sinais e sintomas de CMH estão presentes (Alcalai *et al.*, 2008; Keren *et al.*, 2008). Manifestações clínicas de CMH causadas por mutações na cadeia pesada da  $\beta$ -miosina ou na troponina T começam tipicamente perto da adolescência (Watkins *et al.*, 2008; Watkins *et al.*, 1995b). Por outro lado, mutações na proteína C de ligação à miosina desencadeiam a CMH após um período assintomático prolongado, que se pode estender até à meia-idade (Niimura *et al.*, 1998; Niimura *et al.*, 2002).

Os diferentes padrões morfológicos de hipertrofia na CMH não se relacionam com o genótipo subjacente, com excepção de uma mutação única na actina, que produz uniformemente hipertrofia apical (Arad *et al.*, 2005). Os factores que contribuem para o padrão de remodelação morfológico permanecem desconhecidos (Wang *et al.*, 2010).

Pacientes com uma mutação sarcomérica definida têm manifestações cardíacas mais severas, relativamente a pacientes nos quais não foi detectada qualquer mutação (Olivotto *et al.*, 2008).

## **Miosina**

A miosina é uma molécula hexamérica, altamente assimétrica, com duas cadeias pesadas (isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  de MHC) e dois conjuntos de cadeias leves (essencial – MLC1 – e a reguladora – MLC2) (Fatkin and Graham, 2002).

### **Cadeia pesada da $\beta$ -Miosina**

O gene MYH7, localizado no braço longo do cromossoma 14 (14q11.2-q13), codifica a cadeia pesada  $\beta$  da miosina. É composto por 40 exões que codificam a proteína de 1935 aminoácidos. Actualmente, estão descritas mais de 330 mutações neste gene, com cerca de 225 associadas a CMH (<http://www.hgmd.org>), contribuindo para 30 a 35% dos casos (Marian and Roberts, 2001; Richard *et al.*, 2006; Seidman and Seidman, 2001). A maioria das mutações encontradas são *missense*, no entanto deleções e alterações nas regiões de *splicing* foram também identificadas (Fatkin and Graham, 2002). Mutações em MYH7 estão geralmente associadas a hipertrofia severa a moderada, alta penetrância da doença e prognóstico variável. As mutações Arg403Gln e Arg453Cys causam doença severa com elevada penetrância (~100%), hipertrofia severa, alta incidência de MSC e outras complicações relacionadas com a doença. Pelo contrário, a mutação Val606Met no mesmo gene é associada a hipertrofia moderada mas com um bom prognóstico (Keren *et al.*, 2008). Recentemente, foi sugerido que o prognóstico dos pacientes com mutações em MYH7 está directamente relacionado com o domínio funcional da proteína  $\beta$ -miosina que é afectado. No entanto, no que respeita ao gene MYH7, a variabilidade é normal; mutações no mesmo domínio podem originar fenótipos marcadamente diferentes (ex: mutações Arg403Gln e Phe513Cys, no mesmo domínio de MYH7, originam fenótipos muito severos e mais benignos, respectivamente) (Niimura *et al.*, 1998; Watkins *et al.*, 1992).

Nem todas as famílias com mutações em MYH7 apresentam penetrância elevada e hipertrofia moderada a severa. Uma característica da doença relacionada com MYH7 é que existem maiores diferenças alélicas na expressão da CMH, mas a heterogeneidade da manifestação da doença dentro das famílias é menos marcada (Keren *et al.*, 2008).

### **Proteína C de Ligação à Miosina**

O gene MYBPC3, localizado no braço curto do cromossoma 11 (11p11.2), composto por 35 exões, codifica a proteína C de ligação à miosina (MyBP-C) (Bashyam *et al.*, 2003). A sua função permanece desconhecida, mas pensa-se que fornece a integridade estrutural ao sarcómero (ligando a miosina e a titina), desempenham um papel na sua estabilidade e pode modular a actividade da

miosina ATPase e contractilidade cardíaca em resposta a estimulação adregérgica (Freiburg and Gautel, 1996; Ho, 2010b). Mutações *missense* são frequentes, no entanto, mutações *nonsense*, alterações nas regiões de *splicing* e pequenas deleções/inserções são comuns (Richard *et al.*, 2006; Van Driest *et al.*, 2004). Foram descritas até à data mais de 290 mutações, estando cerca de 170 associadas a CMH (<http://www.hgmd.org>), contribuindo para cerca de 30-40% dos casos (Marian and Roberts, 2001; Richard *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2006).

Estudos iniciais da doença relacionada com MYBPC3 revelaram que o início do fenótipo doente ocorre predominantemente na meia-idade e que a mutação está associada a um bom prognóstico (Charron *et al.*, 1998; Niimura *et al.*, 2002). Estas evidências foram confirmadas pela descoberta de pacientes idosos com CMH que apresentavam frequentemente mutações em MYBPC3 (Niimura *et al.*, 2002). No entanto, estudos mais recentes descreveram crianças com mutações em MYBPC3 que apresentavam fenótipos mais severos, indicando que a idade de início, a severidade de expressão, o risco de complicações da doença era similar a indivíduos com mutações em MYH7 (Van Driest *et al.*, 2004).

### **Troponina T**

A troponina T cardíaca é o único componente do complexo de troponinas que liga à  $\alpha$ -tropomiosina, desempenhando um papel central na regulação da contracção. *Splicing* alternativo no gene TNNT2, localizado no braço longo do cromossoma 1 (1q32), resulta em múltiplas isoformas de troponina T, incluindo a troponina T cardíaca (Ho, 2010b). Até á data foram reportadas 60 mutações *missense*, alterações na região de *splicing* e deleções, estando cerca de 30 associadas a CMH (<http://www.hgmd.org>), contribuindo para cerca de 5% da CMH (Richard *et al.*, 2006).

Mutações em TNNT2 são menos comuns mas potencialmente mais graves do que as mutações noutros genes sarcoméricos. A análise sistemática de electrocardiogramas e resultados em pacientes com mutações em MYH7 e em TNNT2, revelou um espessamento máximo da parede ventricular mais ligeiro mas uma maior incidência de morte súbita prematura em pacientes com mutações em TNNT2 do que em pacientes com mutações em MYH7 (Moolman

*et al.*, 1997; Varnava *et al.*, 2001; Watkins *et al.*, 1995a). Adicionalmente, uma proporção elevada de pacientes com mutações em TNNT2, que morreram subitamente, apresentava hipertrofia ausente ou mais ligeira relativamente a pacientes com mutações em MYH7. Em pacientes vítimas de morte súbita, a comparação das características morfológicas e anatómicas de pacientes com CMH com mutações em TNNT2 com pacientes com CMH sem mutações em TNNT2, revelou que os primeiros eram mais jovens, apresentavam menor hipertrofia e menos fibrose, mas maior desorganização miocárdica do que aqueles sem mutações em TNNT2 (Varnava *et al.*, 2001). Esta mutação particular pode representar o substrato patológico para arritmias malignas. A morte súbita associada a mutações em TNNT2 pode ocorrer em pacientes com evidência clínica ligeira ou ausente de hipertrofia ventricular esquerda (Moolman *et al.*, 1997; Varnava *et al.*, 1999).

### **Troponina I**

A troponina I cardíaca, codificada pelo gene TNNI3, localizado no braço longo do cromossoma 19 (19q13.4), constitui o componente inibitório do complexo de troponinas (Bashyam *et al.*, 2003). Estão descritas 50 mutações neste gene, das quais 27 se relacionam com o fenótipo de CMH (<http://www.hgmd.org>).

Mutações em TNNI3 estão associadas a uma expressão da doença muito heterogénea. Os sintomas podem incluir fisiologia restritiva severa, hipertrofia bi-ventricular severa e hipertrofia apical marcada. Existem famílias com complicações *major* assim como outras com formas mais ligeiras de doença (Mogensen *et al.*, 2004). Importa realçar que, em comparação com mutações em TNNT2, não existem relatos de morte súbita em indivíduos com fenótipos ligeiros associados a mutações em TNNI3 (Mogensen *et al.*, 2004).

### **Outros Genes Causadores de CMH**

Fenótipos severos têm sido reportados em famílias com mutações noutros genes relacionados com a CMH, que não MYH7, MYBPC3, TNNT2 e TNNI3. Padrões pouco comuns de hipertrofia têm sido observados em pacientes com mutações em ACTC ( $\alpha$ -actina cardíaca 1) e em MYL2 e MYL3 (cadeias leves 2 e 3 reguladora e essencial) (Olson *et al.*, 2000).

Genes que codificam moléculas que interagem com as proteínas sarcoméricas também têm sido associados a CMH. Muitas destas proteínas estão no centro do disco Z, que conecta o sarcômero um ao outro (Konno *et al.*, 2010). Variantes foram identificadas em genes que codificam a titina (TTN) (Sato *et al.*, 1999), a proteína muscular LIM (CSRP) (Geier *et al.*, 2008; Geier *et al.*, 2003), a teletonina (TCAP) (Hayashi *et al.*, 2004) e miozenina 2 (MYOZ2) (Osio *et al.*, 2007). O mecanismo através do qual estas alterações desencadeiam a patofisiologia da CMH permanece indefinido (Konno *et al.*, 2010).

### **Mutações Compostas**

O aparecimento de indivíduos nos quais a expressão da doença é severa e desproporcional relativamente aos outros membros da família pode indicar presença de mutações compostas ou múltiplas (Keren *et al.*, 2008). Mutações compostas têm sido observadas em famílias isoladas com mutações em MYBPC3 (Van Driest *et al.*, 2004). Aproximadamente 3-5% dos pacientes com CMH com mutações em genes sarcoméricos são heterozigóticos para duas mutações causadoras de doença, tanto no mesmo como em genes diferentes (compostas ou duplas heterozigóticas) (Richard *et al.*, 2003; Van Driest *et al.*, 2004). Como seria de esperar, estes pacientes, exibem um fenótipo mais severo (maior penetrância, maior grau de hipertrofia e incidência aumentada de morte súbita) do que casos de CMH com apenas uma mutação causal (Ho *et al.*, 2000; Ingles *et al.*, 2005). Estas evidências sugerem que em alguns casos, um efeito de dosagem de gene poderá ser responsável pelas manifestações heterogêneas da doença entre membros da mesma família.

Indivíduos homozigóticos para uma mutação ou heterozigóticos para duas ou mais mutações apresentam geralmente fenótipos mais severos (Xu *et al.*, 2010).

Correlações genótipo-fenótipo em CMH associada a mutações nos genes sarcoméricos são complicadas pela heterogeneidade fenotípica e expressão clínica variável em pacientes portadores da mesma mutação patogénica, indicando influências epigenéticas ou ambientais no desenvolvimento de diferentes quadros clínicos (Michels *et al.*, 2009).

O teste genético, que pode ter pouco significado na previsão do prognóstico do paciente fornece, no entanto, um diagnóstico definitivo de CMH e identifica familiares em risco (Maron, 2010a).

### **1.2.9 Fenocópias**

O diagnóstico corrente de CMH baseia-se na identificação de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) inexplicada. No entanto, HVE sozinha não consegue diferenciar a doença causada por mutações sarcoméricas de outros tipos de hipertrofia cardíaca que podem ter etiologias diferentes (Ho, 2011).

Um problema surge no diagnóstico diferencial da CMH com outras doenças familiares e congénitas. Algumas destas doenças abrigam fenocópias cardíacas nas quais o padrão e magnitude da hipertrofia ventricular esquerda mimetizam clinicamente a CMH causada por mutações em proteínas sarcoméricas (Maron *et al.*, 2009b).

Existem muitas patologias que apresentam manifestações fenotípicas similares que não envolvem mutações em proteínas sarcoméricas ou associadas ao sarcómero (Tabela 4). São denominadas fenocópias e incluem doenças metabólicas que apresentam hipertrofia ventricular inexplicada. Em algumas destas patologias como a Ataxia Friedreich, a doença de Noonan e a Síndrome LEOPARD, existem outros sintomas adicionais que podem ser utilizados pela clínica para estabelecer a diferenciação. No entanto, outras fenocópias, como a Síndrome de Wolff-Parkinson-White podem ter outros sintomas pouco evidentes, tornando-os indistinguíveis. O diagnóstico genético pode ser essencial para estabelecer esta diferenciação, uma vez que a terapia para estas patologias é significativamente diferente (Keren *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2009b).

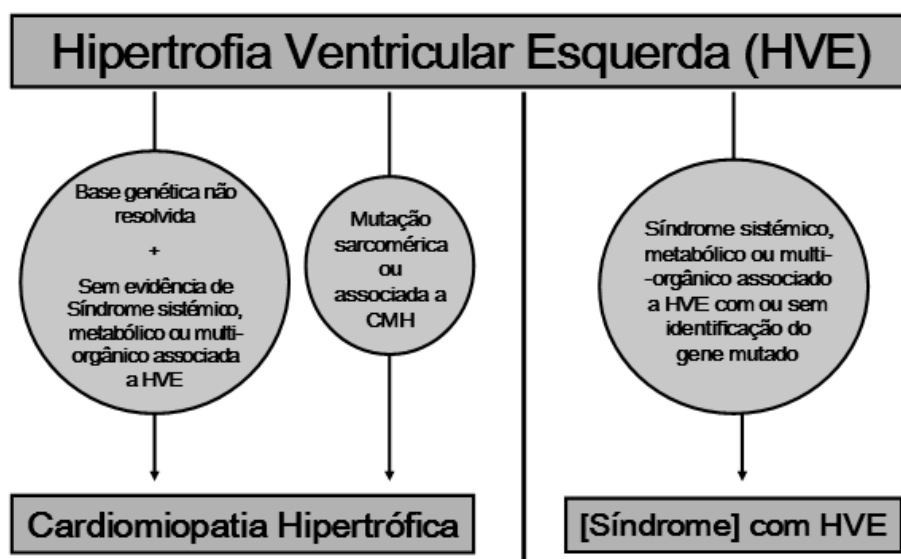
Outras condições raras que também entram neste espectro de cardiomiopatias relacionadas com o sarcómero são as miopatias mitocondriais causadas por mutações que codificam DNA mitocondrial ou proteínas mitocondriais associadas a defeitos na cadeia enzimática de transporte de electrões de ATP, alterando a morfologia mitocondrial (Maron *et al.*, 2009b). Adicionalmente, doenças tais como a doença de Danon, devida a anomalias na membrana do lisossoma, a Síndrome de Barth e a doença de armazenamento do glicogénio,

causada por deficiência da AMP-cinase foram mais recentemente descritas (Maron *et al.*, 2009b).

**Tabela 4** – Fenocópias de CMH: genes envolvidos e fenótipos associados (adaptado de Keren *et al.*, 2008).

Gene	Proteína	Locus	Fenótipo Associado
<b>PTPN11</b>	Tirosina fosfatase SHP-2	12q24	Síndrome de LEOPARD; Síndrome de Noonan
<b>GLA</b>	$\alpha$ -galactosidase A	Xq22	Doença de Fabry
<b>LAMP2</b>	Proteína membrana 2 associada ao lisossoma	Xq24	Doença de Danon
<b>PRKAG2</b>	Subunidade $\gamma$ da AMP cinase	7q36	Wolf-Parkinson-White
<b>FXN</b>	Fraxitina	9q13	Ataxia de Friedreich

Assim, Maron e colaboradores (Maron *et al.*, 2009b) defendem uma nomenclatura alternativa, mais próxima da realidade clínica contemporânea, reconhecendo o importante impacto que os substratos genéticos têm nos nomes usados para descrever doenças do músculo cardíaco com hipertrofia ventricular. Para minimizar a confusão, recomendam que a cardiomiopatia hipertrófica permaneça como diagnóstico clínico limitado a pacientes em que a expressão da doença com HVE, baseada em exames clínicos minuciosos, pareça estar confinada ao coração e em que a mutação causal da doença seja sarcomérica, em genes associados ao sarcômero ou não resolvida (Figura 9).



**Figura 9** – Sumário da nomenclatura que distingue a CMH de outras doenças genéticas associadas a HVE (adaptado de Maron *et al.*, 2009b).



### 1.3 Testes Genéticos na CMH

A *American Heart Association* e a *European Society of Cardiology* recomendam o teste genético em pacientes com CMH e familiares (Charron *et al.*, 1998; Maron *et al.*, 2003; Zipes *et al.*, 2006). Quando avaliadas análises moleculares genéticas a grupos de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, a prevalência de mutações detectadas é suficientemente elevada e consistente para justificar a avaliação genética, por rotina, nestes pacientes, podendo fornecer o diagnóstico definitivo de CMH (Maron *et al.*, 2003).

A detecção de mutações patogénicas está a ter um impacto crescente no diagnóstico dos doentes e seus familiares. O teste genético está actualmente disponível em vários países e tem uma taxa de sucesso de 30-60% (Ferrero-Miliani *et al.*, 2010). No entanto, a análise molecular, por métodos convencionais, como a sequenciação automática, é de difícil execução, para que seja estabelecida de forma rotineira (Fokstuen *et al.*, 2011).

A realização dos testes genéticos tem sido desta forma, limitada na prática clínica devido às dificuldades inerentes à doença, tais como a elevada heterogeneidade genética e a reduzida incidência de cada mutação (Maron *et al.*, 2003). Como foi atrás referido, encontram-se actualmente descritas mais de 1000 mutações associadas a 32 genes relacionados com a CMH (Tabela 2 e Tabela 3), o que dificulta a sequenciação automática, o método geralmente utilizado, tornando-a laboriosa e dispendiosa.

#### 1.3.1 Sequenciação Automática

A sequenciação automática (SA) dos genes mais frequentemente envolvidos é a técnica mais usual no diagnóstico genético de CMH.

O teste genético no caso *índex* começa pela análise por sequenciação automática dos genes sarcoméricos com mais mutações descritas, seguida, dependendo das facilidades do laboratório, pela análise de outros genes com incidência mais baixa de mutações reportadas (Fokstuen *et al.*, 2011). Numa fase inicial e com base na informação clínica, são inicialmente sequenciados os exões, para os quais estão descritas as mutações mais comuns, dos genes MYH7 e MYBPC3, com uma abrangência de 50 a 60% da etiologia de CMH (Richard *et al.*, 2006). Em caso de negatividade, é indicada a análise dos genes

TNNT2, TNNI3, MYL2, MYL3, TPM1 e ACTC que possibilitam a identificação adicional 10 a 20% das mutações (Ho and Seidman, 2006; Maron *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2003). A análise dos restantes genes não é recomendada de forma sistemática, excepto se existirem evidências que justifiquem a sua análise. A utilização desta metodologia, com algumas variações entre laboratórios, pode limitar alguns diagnósticos, uma vez que mutações em genes não testados não são descobertas e pacientes com mutações duplas ou compostas poderão ser subdiagnosticados. Se o teste genético do paciente for positivo, dever-se-á estender o estudo molecular aos familiares de primeiro grau; se for negativo, são desnecessárias análises subsequentes. Desta forma, quando uma mutação é definida para o caso *índex*, a avaliação familiar é direccionada, estudando-se apenas a mutação diagnosticada e, conseqüentemente menos laboriosa e dispendiosa. Assim, em famílias com diagnóstico clínico de CMH o estudo molecular do paciente, o aconselhamento genético e a avaliação dos familiares em primeiro grau é importante.

O desenvolvimento de tecnologias genómicas recentes, promovido pelo elevado número de genes associados a CMH e pela heterogeneidade alélica, impulsionou a implementação de testes de rastreio de larga escala, que têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos. Neste contexto, o sistema *Sequenom MassARRAY* pode ser uma alternativa à sequenciação automática para a análise de mutações conhecidas associadas a CMH (Brion *et al.*, 2010b; Santos *et al.*, 2011).

### **1.3.2 *Sequenom MassARRAY***

A técnica de genotipagem por *MassArray* utiliza o sistema de detecção baseado na espectrometria de massa MALDI-TOF. A química de *iPLEX GOLD* consiste num PCR multiplex, seguido de purificação SAP (do inglês - *Shrimp alkaline phosphatase*) e de uma reacção de SBE (extensão de uma base – do inglês: *single base extension*). Os produtos desta reacção são dessalinizados utilizando uma resina de troca aniónica e colocados em chips revestidos por uma matriz – *spectrochips* - que permitem a análise MALDI-TOF. As massas dos produtos de extensão dos *primers* são determinadas e traduzidas nos alelos correspondentes, com a incorporação de cada nucleótido gerando uma

diferença na massa do produto de extensão. Cada reacção multiplex é realizada num poço único em placas de 384 poços, permitindo a determinação até 36 variantes em 384 amostras separadas, por experiência (Brion *et al.*, 2010b; Gabriel *et al.*, 2009; Oeth *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011).

A principal vantagem do sistema *Sequenom MassARRAY* relacionada com a detecção de mutações é a simplicidade e flexibilidade da técnica, que pode determinar alterações de bases simples (SNPs), alterações não bi-alélicas, inserções e deleções (até 40 bp) e MNVS (variações multinucleotídicas) com a mesma reacção de extensão do *primer*. Outra vantagem é que a técnica requer *primers* oligonucleotídicos não modificados, de baixo custo, enquanto o desenho do software oferece a opção de reorganizar os ensaios testados ou incluir novas variações nos ensaios estabelecidos (Brion *et al.*, 2010b).

Exemplos da aplicabilidade desta tecnologia ao estudo da cardiomiopatia hipertrófica e morte súbita cardíaca têm sido reportados (Allegue *et al.*, 2011; Allegue *et al.*, 2010; Brion *et al.*, 2010a; Santos *et al.*, 2011), nos quais mutações conhecidas associadas CMH e à síndrome de QT longo foram analisadas.

## 1.4 Morte Súbita

Morte súbita (MS) pode definir-se como a morte de um indivíduo aparentemente saudável, com agonia breve e que ocorre inesperadamente (Zipes and Wellens, 1998). Muitas das mortes que se enquadram nesta definição são provocadas por arritmias cardíacas, no entanto, outras causas potenciais como a embolia pulmonar, ruptura da aorta, intoxicação por álcool e drogas, entre outras, podem desencadear morte súbita (Adabag *et al.*, 2010).

A MS no jovem pode ser dividida em causa de morte natural (devida a doença) ou não natural (acidente, suicídio, etc). As mortes naturais podem ser subdivididas em mortes não cardíacas, cardíacas ou inexplicadas. Estas duas últimas categorias incluem as mortes cardíacas devidas, potencialmente, a doenças cardíacas hereditárias (Figura 10).

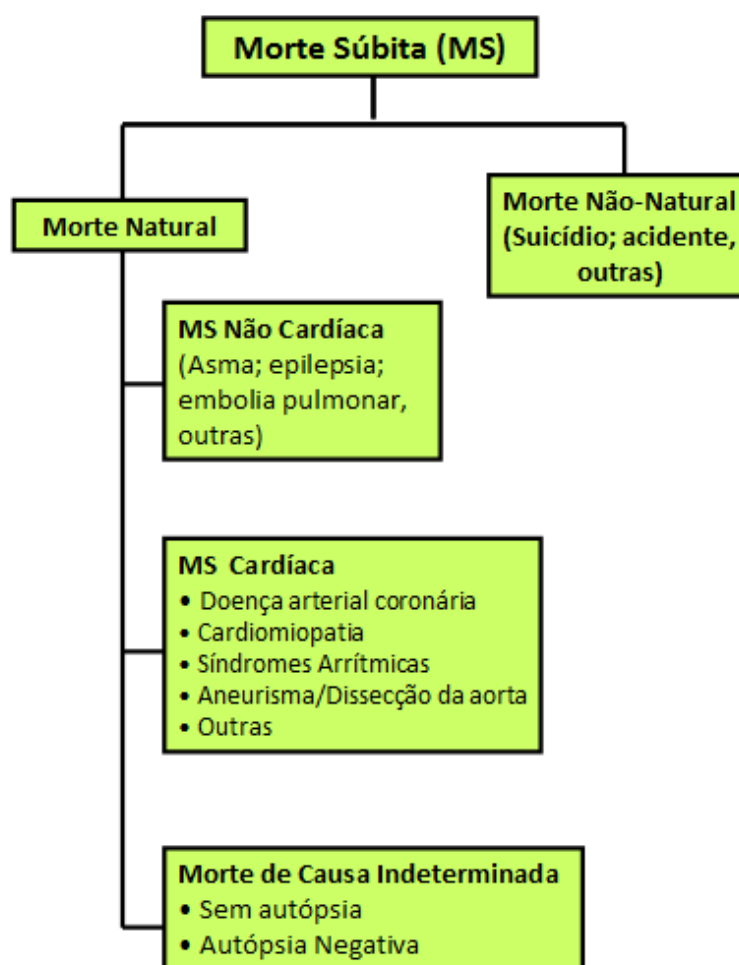


Figura 10 – Causas de Morte Súbita

Um grupo de trabalho da Sociedade Europeia de Cardiologia estabeleceu que a incidência de morte súbita será de 36 a 128 mortes por 100 000 pessoas por ano (Priori *et al.*, 2001), sendo mais de 60% destas mortes consequência de doença coronária cardíaca. Entre a população geral de adolescentes e jovens adultos com idade inferior a 30 anos, o risco de MS é de 1/100 000 e um espectro maior de doenças pode ter o seu contributo. A dificuldade maior na interpretação epidemiológica dos dados na MS está na falta de padronização no código de certificação da morte e na variabilidade da definição de morte súbita (Oliva *et al.*, 2010).

A morte súbita, devido à sua característica inesperada, requer um estudo exaustivo, com o objectivo de estabelecer um diagnóstico diferencial entre morte de causa natural e violenta. Desta forma, a maioria das mortes súbitas são objecto de autópsia médico-legal uma vez que as incertezas diagnósticas ou circunstâncias suspeitas constituem, frequentemente, a base legal para uma autópsia ordenada pelo Ministério Público.

A MS é um final trágico de uma grande variedade de doenças, no entanto, a sua origem está principalmente nas doenças cardiovasculares (Chugh *et al.*, 2004; Maron, 2002; Priori *et al.*, 2001). É uma das causas mais comuns de morte em países desenvolvidos, sendo um dos grandes problemas actuais de saúde pública (Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008).

Um número significativo de autópsias de casos de morte súbita é realizado anualmente em Portugal.

## **1.5 Morte súbita cardíaca**

### **1.5.1 Definição**

A morte súbita cardíaca (MSC) é uma consequência trágica e devastadora de um grande número de doenças cardiovasculares. Como evento inesperado, tem grandes implicações tanto para a família como para a comunidade. Define-se como a morte que ocorre geralmente dentro da primeira hora desde o início dos sintomas, devido a uma causa cardíaca subjacente (Zipes and Wellens,

1998). A morte súbita cardíaca pode ocorrer em qualquer idade, tendo um impacto substancialmente superior quando ocorre em jovens.

A terminologia que é utilizada para descrever a MSC é muitas vezes confusa devido à variedade de definições que vêm descritas na literatura. Uma distinção pode ser feita em MSC no jovem e a Síndrome de Morte Súbita Infantil (SMSI). O termo “Morte Súbita no Jovem” inclui um longo espectro de diferentes definições, mas geralmente compreende vítimas com idades entre 1 e 45 anos. O SMSI é a morte inesperada de uma criança com idade inferior a um ano, com o início do episódio fatal a ocorrer durante o sono, que permanece inexplicado após uma investigação minuciosa (Krous *et al.*, 2004). A distinção entre estas duas categorias ( $\leq 1$  ano e  $\geq 1$  ano) baseia-se nas diferenças na incidência e nas causas.

MSC foi recentemente definida como “morte devida a qualquer doença cardíaca que ocorra fora do hospital, no departamento de emergência ou num indivíduo que seja declarado morto na chegada ao hospital” (Goldberger *et al.*, 2008). O termo “Morte Súbita Inexplicada” (MSI) utiliza-se quando não se consegue estabelecer o diagnóstico baseado em investigação *ante* e *postmortem* (autópsia negativa) (Carturan *et al.*, 2008). No entanto, MSI pode igualmente referir-se a casos nos quais o diagnóstico não pode ser estabelecido porque não foi realizada autópsia. Na ausência de anomalias estruturais na autópsia, o termo “Síndrome de Morte Súbita Arritmica” tem sido proposto (Behr *et al.*, 2003; Behr *et al.*, 2008).

Na literatura, as definições de 1 hora, 6 horas e 24 horas são utilizadas na definição de MSC (Corrado *et al.*, 2001; Morentin *et al.*, 2003). A utilização de definições baseadas na duração dos sintomas anteriores tem limitações. Em primeiro lugar, sintomas prodrómicos (ex: fadiga ou febre) estão geralmente presentes por um período superior a 24 horas. Secundariamente, na prática diária poderá ser difícil a determinação exacta da duração dos sintomas antes da morte, especialmente porque esta informação necessita de ser recolhida retrospectivamente e não há testemunhas em cerca de 40% dos casos de MSC. Em terceiro lugar, as vítimas podem morrer uns dias após uma ressuscitação bem sucedida devido a danos irreversíveis (ex: morte cerebral) (Basso *et al.*, 2008). Estas vítimas não são muitas vezes incluídas em estudos

de morte súbita, no entanto, as causas de morte e as implicações clínicas para os familiares são as mesmas.

Enquanto a MSC em populações mais velhas é mais frequentemente devida a uma doença arterial coronária subjacente, a maioria das causas de morte cardíaca em indivíduos com idade inferior a 40 anos tem origem em causas estruturais e arritmogénicas (Doolan *et al.*, 2004; Morentin *et al.*, 2003; Semsarian and Hamilton, 2011). As causas estruturais de MSC incluem as cardiomiopatias, miocardite, doenças congénitas cardíacas e doença arterial coronária. Nas causas estruturais de MSC no jovem, o exame *postmortem* tem grande probabilidade de identificar a causa da morte. Pelo contrário, em causas arritmogénicas os achados autópsicos manifestam alterações inespecíficas e corações macroscopicamente e estruturalmente normais, sendo a autópsia considerada negativa e a causa de morte inexplicada (Semsarian and Hamilton, 2011).

O diagnóstico definitivo da causa da morte súbita é quase sempre imprescindível para as famílias, que necessitam de encontrar uma justificação para a morte inesperada. No entanto, na prática da Patologia Forense 1-5% das autópsias são negativas após a avaliação minuciosa do cadáver e de realização de testes laboratoriais, denominando-se morte súbita inexplicada (MSI) (Chugh *et al.*, 2000; Cohle and Sampson, 2001), e têm uma incidência de cerca de 30% em populações jovens vítimas de MSC (Doolan *et al.*, 2004). Apesar de se assumir que muitas das autópsias negativas de morte súbita se devem a doença eléctrica do coração ou a cardiomiopatia com alterações histológicas minor, outras causas devem ser excluídas (ex: ataque epiléptico, hipoglicémia, intoxicação).

A percentagem de MSC é variável de acordo com a idade do grupo estudado e os critérios de diagnóstico. Estudos populacionais mostraram que pelo menos 3% e provavelmente cerca de 30 % de MSC envolvendo crianças e jovens adultos não têm anomalias morfológicas identificáveis na autópsia (Corrado *et al.*, 2001; Morentin *et al.*, 2003; Puranik *et al.*, 2005; Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008).

Em Portugal, uma percentagem significativa de casos de morte súbita ocorridos permanece totalmente inexplicada.

### **1.5.2 Incidência da MSC**

A MSC é a causa principal de morte em todas as comunidades dos Estados Unidos e da União Europeia, mas a sua incidência precisa continua desconhecida (Oliva *et al.*, 2010).

Existem dois picos bem estabelecidos na prevalência da MSC consoante a idade: durante a infância – designada por SMSI, e o segundo no grupo geriátrico entre os 75 e os 85 anos. Estudos anteriores referem uma proporção de 25:75 entre mulheres e homens, no entanto, esta relação tende a modificar-se (Chugh *et al.*, 2008).

As taxas de incidência a nível mundial reportadas são de 37- 53 por 100 000 pessoas/ano (Chugh *et al.*, 2004). No jovem ( $\leq 40$  anos) a incidência de MSC estima-se estar entre 0.8 e 4.1 por 100 000 pessoas/ano (Morentin *et al.*, 2003; Vaartjes *et al.*, 2009; Wisten *et al.*, 2002) e em atletas varia de 0.6 a 3.6 por 100 000 pessoas/ano (Corrado *et al.*, 2006; Maron *et al.*, 2009a). A incidência varia consideravelmente entre estudos. A recolha de dados neste tópico é muito complicada porque a maioria dos casos de morte súbita ocorre fora do hospital e muitas vezes a informação necessita de ser recolhida de forma retrospectiva (Gorgels *et al.*, 2003). Estudos baseados nos dados dos certificados de morte podem sobre ou subestimar o número de casos de MSC, devido a erros de classificação (Fox *et al.*, 2005).

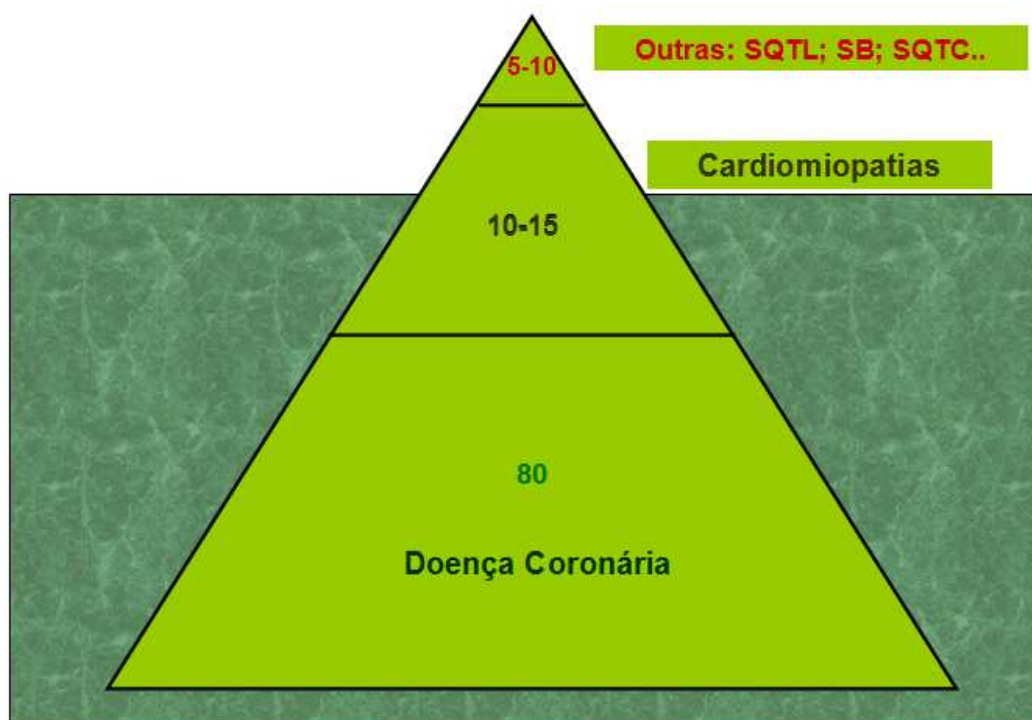
Assim, a incidência de MSC varia consoante o método de observação e a definição de MSC aplicada (Ferrero-Miliani *et al.*, 2010).

### **1.5.3 Etiologia da MSC**

A causa mais comum de morte súbita cardíaca é a doença arterial coronária, sendo 80% dos casos devidos a esta causa. Entre 10 a 15% pode ocorrer em pacientes com cardiomiopatias. Os restantes 5-10% são compostos por condições congénitas cardíacas estruturalmente anormais (anomalias coronárias, doenças cianóticas/não cianóticas) ou ocorre em pacientes com corações estruturalmente normais mas electricamente anómalos [(Síndrome do QT-Longo (SQTL), Síndrome de Brugada (SB), Síndrome do QT-Curto (SQTC),



Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC)] (Figura 11) (Chugh *et al.*, 2008).

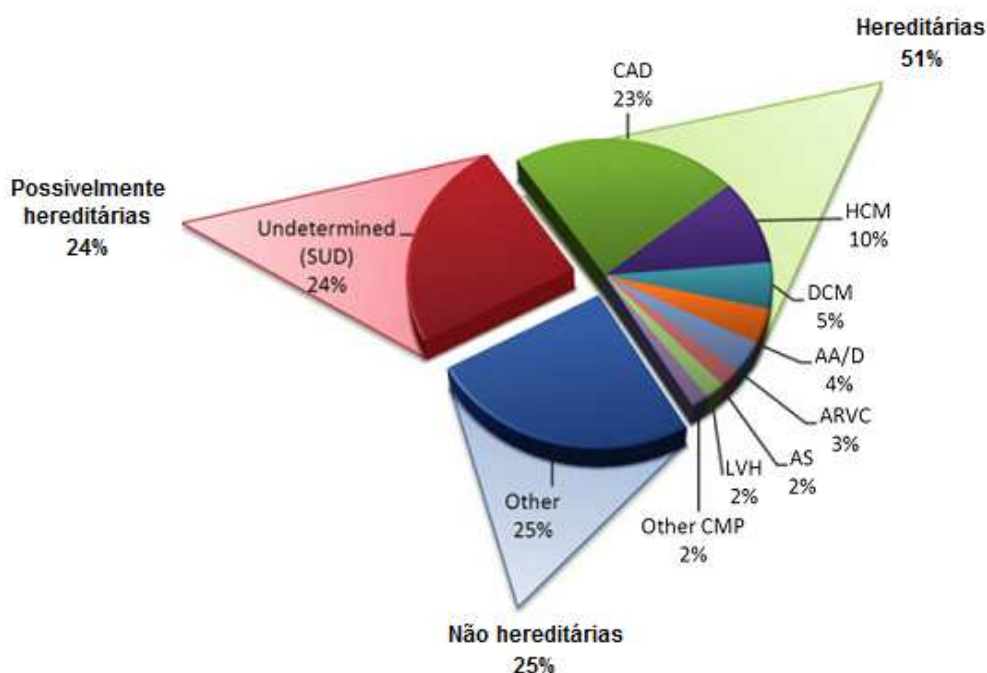


**Figura 11** – Etiologias da morte súbita cardíaca (adaptado de Chugh *et al.*, 2008).

As causas da MSC diferem consoante a idade do paciente. Em vítimas com idade inferior a 35 anos, muitas etiologias têm demonstrado contribuir para este problema, a maioria de natureza não-ischémica. Em idades inferiores a um ano, a primeira causa de morte é a SMSI, definida como aquela onde a causa de morte permanece inexplicada mesmo após o exame postmortem. Após o primeiro ano, em crianças e adolescentes, a cardiomiopatia hipertrófica, a cardiomiopatia arritmogénica do ventrículo direito, a miocardite e anomalias coronárias congénitas são causas frequentes de arritmias letais (Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008). MSC cardíaca em atletas é frequentemente devida a doença cardíaca estrutural não diagnosticada (Michaud *et al.*, 2009).

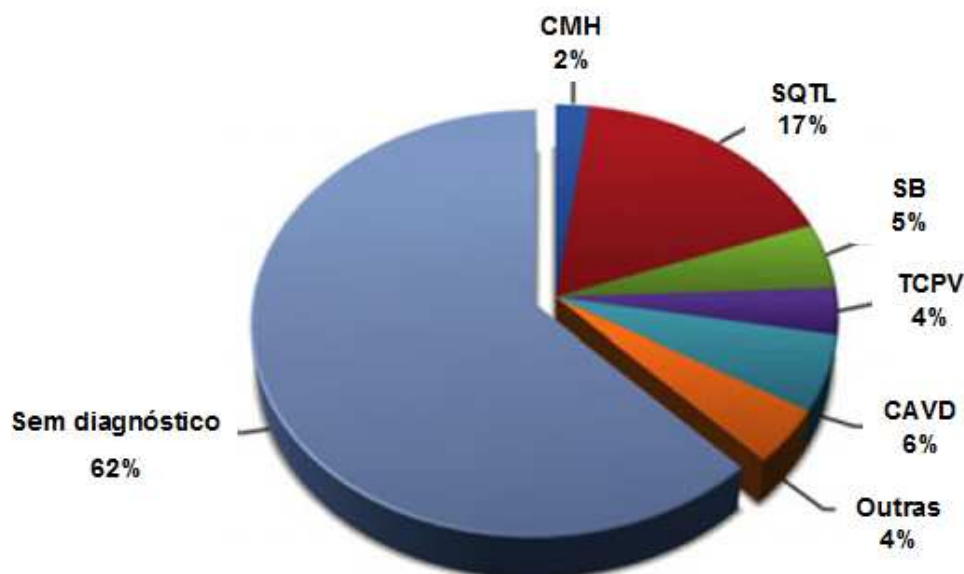
Num artigo de revisão, recentemente publicado por Ferrero-Miliani e colaboradores (Ferrero-Miliani *et al.*, 2010), foram revistos estudos que categorizavam as causas de morte como MSC, com idade máxima de 35 anos. As causas de morte estabelecidas na autópsia e o diagnóstico estabelecido pelo exame dos familiares foram analisados. Assim, estudos de série em

autópsias de vítimas de MSC jovens demonstram que cerca de 50% dos casos são provocados por uma doença hereditária identificável (Gráfico 1).



**Gráfico 1** – Causas de MSC no jovem estabelecidas na autópsia. Mais de 75% dos casos de MSC no jovem são provocadas por doenças cardíacas hereditárias. Em metade dos casos, uma doença cardíaca hereditária é identificada na autópsia, enquanto as restantes permanecem sem diagnóstico (MSI). Pensa-se que este grupo representa as arritmias cardíacas. Para a elaboração gráfica, estudos que categorizavam as causas de morte como MSC, com idades máxima de 35 anos foram revistos e as categorias no gráfico foram atribuídas de acordo com os autores. **Doença cardíaca hereditária diagnosticada na autópsia:** doença coronária arterial (CAD), cardiomiopatia arritmogénica do ventrículo direito (ARVC), cardiomiopatia hipertrófica (HCM), hipertrofia ventricular esquerda (LVH), cardiomiopatia dilatada (DCM), síndromes arrítmicas (AS) e anomalias no sistema de condução detectadas na autópsia e outras cardiomiopatias (CMP). **Indeterminada:** morte súbita, coração normal, síndrome de morte súbita arrítmica, síndrome de morte súbita infantil, suspeita de arritmia. **Outras:** doença valvular, miocardite, anomalias coronárias, doença cardíaca congénita, doença cardíaca hipertensiva, isquémia, endocardite infecciosa, aneurisma, dissecação e ruptura da aorta (AA/D), enfarte do miocárdio, outras (adaptado de Ferrero-Miliani *et al.*, 2010).

Nestes casos a descoberta da causa de morte foi possível através de exames nos familiares (Behr *et al.*, 2003; Behr *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2005). Com base na actividade cardíaca assim como nos testes genéticos, uma doença cardíaca hereditária foi identificada em 15-50% das famílias (média 38%). Em cerca de 25% dos casos uma causa cardíaca de morte é estabelecida (Gráfico 2) (Ferrero-Miliani *et al.*, 2010).

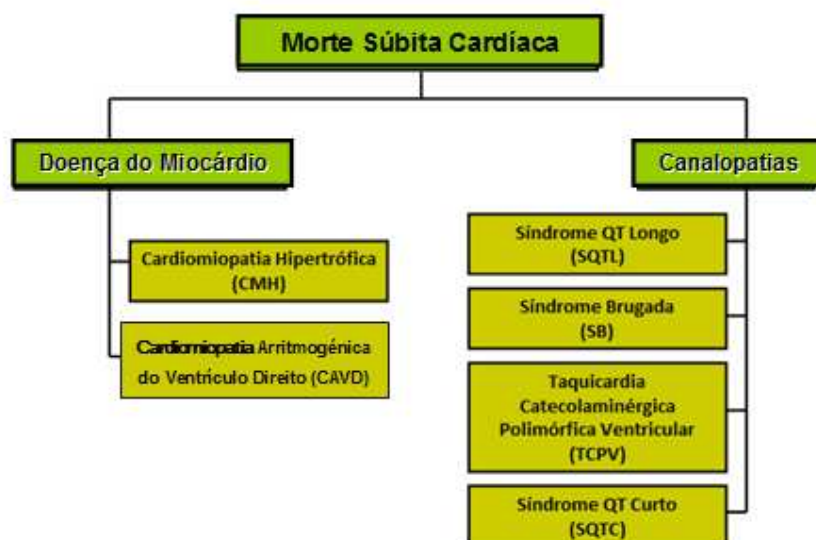


**Gráfico 2** – Diagnóstico estabelecido pelo exame nos familiares de vítimas de MSC. Pelo exame dos familiares de casos de MSC com autópsia negativa ou sem autópsia, uma doença cardíaca hereditária associada a MSC, foi diagnosticada em 38% dos casos. CMH – cardiomiopatia hipertrófica; CAVD - cardiomiopatia arritmogénica ventricular direita; TCPV - taquicardia polimórfica ventricular catecolaminérgica; SB – síndrome de Brugada; SQTl – síndrome QT longo (adaptado de Ferrero-Miliani *et al*, 2010).

De forma geral, MSC no jovem (1-40 anos) é mais comum em homens do que em mulheres (Vaartjes *et al.*, 2009).

#### 1.5.4 Causas Genéticas da MSC

Avanços significativos têm sido feitos na compreensão tanto da base clínica como da base genética da morte súbita cardíaca. As patologias mais relevantes associadas a esta morte inesperada incluem o grupo da cardiomiopatia hipertrófica (CMH) e displasia/cardiomiopatia arritmogénica do ventrículo direito (DAVD ou CAVD) e as arritmias, nomeadamente os defeitos dos canais iónicos (“canalopatias”), tais como, a síndrome do QT longo (SQTl); a síndrome de Brugada (SB), síndrome do QT curto (SQTC), taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC). Frequentemente, estas anomalias cardíacas hereditárias originam arritmias ventriculares letais e têm um padrão de transmissão autossómico dominante (Figura 12) (Allegue *et al.*, 2011; Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008).



**Figura 12** – Causas Genéticas de Morte súbita cardíaca (adaptado de Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008)

Familiares de jovens vítimas de MSC têm um risco aumentado de serem portadores de uma predisposição hereditária para desenvolverem uma doença cardíaca (Allegue *et al.*, 2011; Behr *et al.*, 2003; Behr *et al.*, 2008; Hofman *et al.*, 2007). A identificação de doenças hereditárias, seguida de tratamento precoce, pode reduzir o risco de MSC em portadores assintomáticos de doenças cardíacas hereditárias (Hobbs *et al.*, 2006; Maron *et al.*, 2007). No entanto, como a morte súbita no jovem é frequentemente a primeira e única manifestação de doença cardíaca hereditária, a identificação precoce é difícil em indivíduos jovens aparentemente saudáveis (Drory *et al.*, 1991). A investigação *postmortem* de vítimas de MSC pode ser uma ferramenta de diagnóstico importante para detectar doenças cardíacas hereditárias em familiares (Basso *et al.*, 2008).

### 1.5.5 Cardiomiopatia Hipertrófica na Morte Súbita Cardíaca

*“No dia 26 de Junho de 2003, sob intenso calor, o futebolista camaronês Marc-Vivien Foe caiu em pleno relvado do Estádio de França. Os médicos fizeram tudo para o reanimar, mas sem sucesso. Foe morreu. Na altura, especulou-se sobre a possibilidade de o jogador poder ter sido vítima de "doping". O mistério só seria esclarecido duas semanas mais tarde: o jogador sofria de uma cardiomiopatia hipertrófica.”*

O risco de morte súbita em pacientes com CMH é conhecido há pelo menos 50 anos. De facto, a doença é a causa mais comum de morte súbita cardíaca entre os jovens, incluindo os atletas (Maron, 2002; Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008).

A MSC tem sido relacionada com o diagnóstico de CMH, que é actualmente considerada como a causa mais comum destes eventos em jovens, incluindo atletas de alta competição (Maron, 2010b) (Figura 13).

No entanto, apenas nos últimos anos, a aplicação de cardioversores defibriladores implantáveis, tem sido utilizada como potencial salva-vidas em pacientes de alto risco (Maron *et al.*, 2007).

O risco de MSC na CMH é variável e pode estar relacionado com a mutação subjacente. Apesar de ser bem estabelecido que nenhum fenótipo clínico ou prognóstico é específico de uma dada mutação, quatro mutações em MYH7 – Arg403Gln (exão 13), Arg453Cys (exão 14) e Gly716Arg e Arg719Trp (exão 19), têm sido particularmente associadas a uma alta incidência de MSC e são consideradas mutações “malignas” em comparação com outras mutações causais de CMH (Ackerman *et al.*, 2002). Mutações na troponina T cardíaca, particularmente Arg92Trp (exão 9), com fenótipos ligeiros de hipertrofia (Ackerman *et al.*, 2002), são também associadas a um elevado risco de MSC (Noseworthy and Newton-Cheh, 2008).

As principais causas de MSC em indivíduos com CMH são as arritmias na forma de fibrilhação ventricular ou taquicardia ventricular sustentada (Hughes, 2004). A forma de morte para pacientes com CMH demonstra variação temporal com a idade. Embora o risco MSC decresça com a idade, infelizmente nunca desaparece completamente (Hughes, 2004).

Um estudo reportado por Doolan *et al.*, 2004, refere igualmente que a CMH pode estar na base de um grande número de mortes em jovens, decorrentes de alguns acidentes de viação ou afogamento (Doolan *et al.*, 2004).

A CMH é a causa mais frequente de morte súbita cardíaca entre os jovens, podendo ser a manifestação inaugural da doença. A dependência da idade e a ausência de sintomas evidentes e inequívocos levam a uma elevada

probabilidade da condição ser apenas detectada após MSC (Santos *et al.*, 2011).

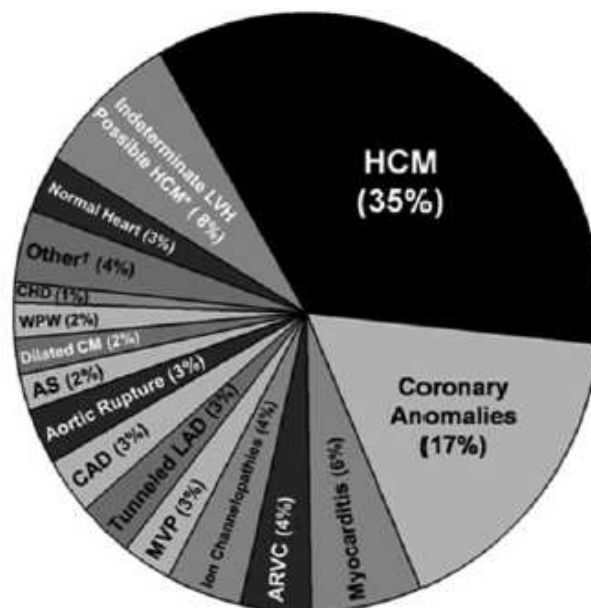
### **1.5.6 MSC em atletas de alta competição**

A morte súbita cardíaca de jovens atletas é um evento de grande visibilidade com grande impacto tanto na comunidade médica como na sociedade em geral. A visibilidade conferida a este evento trágico é ainda sublinhada pela divulgação de mortes súbitas de vários atletas profissionais conhecidos (Maron, 2005).

A lenda do herói grego Feidípides relata que, no ano de 490 AC, após correr 42,195 km, que separam a cidade de Maratona de Atenas, para participar a vitória dos gregos sobre os persas na Batalha de Maratona, deu a notícia e caiu morto. Esta pode ter sido a primeira morte súbita de atletas registada e que até hoje a humanidade se lembra. Em 1896, nos primeiros Jogos Olímpicos da era moderna, Feidípides foi homenageado com a criação da maratona, cuja distância era de 40 km, mas que desde 1908 está estipulada em 42,195 km.

As doenças cardíacas que predispõem os atletas de alta competição a taquiarritmias ventriculares letais têm sido documentadas em vários estudos reportados (Corrado *et al.*, 2005; Maron *et al.*, 2009a). Nos Estados Unidos a causa mais comum de morte em atletas é a CMH (Figura 13) (Maron, 2010b; Maron *et al.*, 2009a).

Consequentemente, o diagnóstico diferencial entre CMH e hipertrofia ventricular esquerda fisiológica não patológica, associada a treino sistemático - geralmente definida como “coração de atleta” - tem-se tornado num dilema clínico comum. Esta distinção clínica tem importantes implicações uma vez que a identificação de doenças cardiovasculares associadas a morte súbita pode ser a base para estabelecer a incapacidade para a competição, minimizando o risco (Maron *et al.*, 2009a).



**Figura 13** – Causas mais frequentes de MS em jovens atletas de alta competição nos Estados Unidos. ARVC: cardiomiopatia arritmogénica do ventrículo direito; AS, estenose da válvula aórtica; CHD: doença cardíaca congénita; LAD: descendente anterior esquerda; MVP: Prolapso da válvula mitral e WPW: síndrome Wolff-Parkinson-White (adaptado de Maron, 2010b).

A resolução mais definitiva neste diagnóstico diferencial pode basear-se no teste genético. De facto, testes genéticos rápidos estão agora disponíveis. No entanto, um resultado positivo pode esclarecer a ambiguidade clínica entre o coração de atleta e a CMH, mas existe um potencial de resultados falsos negativos, nos quais o diagnóstico de CMH não pode ser excluído (Maron *et al.*, 2009a).

### 1.5.7 Investigação *postmortem* da MSC

Dada a importância em estabelecer uma causa definitiva de morte, uma investigação *postmortem* minuciosa é essencial nos casos de MSC. Este estudo inclui a investigação das circunstâncias da morte, análise da história familiar e clínica da vítima, autópsia e recolha de amostras apropriadas para estudos complementares (incluindo a análise de DNA) e elaboração de uma conclusão final precisa e rigorosa (Basso *et al.*, 2008; de la Grandmaison, 2006; Semsarian and Hamilton, 2011).

O sistema de avaliação *postmortem*, incluindo o papel do médico legista, varia entre países, e mesmo entre estados do mesmo país (Semsarian and Hamilton, 2011).

### **1.5.7.1 Circunstâncias da morte e história familiar**

Um esforço deve ser feito na obtenção de informação relevante dos profissionais de saúde e de outras testemunhas que possam ter estado presentes no desenvolvimento da situação, do tipo e duração dos sintomas precedentes e a localização do evento fatal (Basso *et al.*, 2008; de la Grandmaison, 2006).

As circunstâncias da morte podem fornecer pistas importantes para estabelecer a causa de morte, uma vez que o desencadeamento da paragem cardíaca pode ser específico da doença subjacente. Arritmias podem ser accionadas pelo exercício em pacientes com CMH, CAVD, SQTL tipo I ou TVPC, enquanto, em pacientes com SB ou SQTL tipo III as arritmias fatais ocorrem mais frequentemente durante o sono. Além disso, informações sobre a história clínica da vítima devem também ser recolhidas, assim como, a medicação que estava a fazer, hábitos tabágicos ou abuso de drogas. A história familiar, relativamente a morte súbita ou doenças cardíacas ou neuromusculares hereditárias, pode ser igualmente importante (Basso *et al.*, 2008; de la Grandmaison, 2006).

### **1.5.7.2 Autópsia**

O exame externo (juntamente com a informação sobre as circunstâncias da morte) deve excluir a possibilidade de *commotio cordis* – evento arritmico, caracterizado por fibrilhação ventricular e morte súbita após um impacto pré-cordial. Durante o exame do hábito interno, deve ser dada especial atenção ao exame cardíaco. Devem ser realizados cortes transversais largos dos ventrículos para avaliar enfarte do miocárdio, cicatrizes, hipertrofia ou trombos murais. A pesagem do coração, após a remoção de sangue e coágulos *postmortem*, deve ser realizada (Semsarian and Hamilton, 2011). Amostras dos órgãos maiores e de tecidos devem ser colhidos e conservados em formalina, assim como cortes do coração, incluindo o ventrículo esquerdo. O septo intraventricular deve igualmente ter cortes transversais, para exclusão da miocardite, com um mínimo de 10 blocos examinados histologicamente. Devem ser realizados testes toxicológicos em amostras de sangue cardíaco e femural, conteúdo do estômago, urina e fígado (Semsarian and Hamilton, 2011).



Em todos os casos de MSC no jovem, devem ser colhidas amostras de 5-10 ml de sangue para subsequente extração de DNA e análise molecular. Adicionalmente, devem igualmente ser colhidos e armazenados cortes congelados de fígado ou rim, que são muito celulares e portanto ricos em DNA. Neste sentido, deve existir um protocolo com o laboratório do instituto ou com um laboratório externo, com o qual exista uma colaboração. (Semsarian and Hamilton, 2011). Tecidos embebidos em parafina não são adequados para estudos de DNA, uma vez que a qualidade do DNA é bastante diminuída (Carturan *et al.*, 2008; Semsarian and Hamilton, 2011), como será discutido mais à frente.

A comparação entre estudos autópsicos em casos de morte súbita é uma tarefa difícil, uma vez que não existe um protocolo padronizado (Vaartjes *et al.*, 2009). As recomendações para a investigação forense de MSC são numerosas, tanto relativamente à autópsia com às análises complementares (Brinkmann, 1999; Michaud *et al.*, 2011). Quando a autópsia é limitada à análise macroscópica do coração, sem exames histológicos de tecido cardíaco ou testes toxicológicos, anomalias cardíacas ou causas extra-cardíacas de morte súbita podem permanecer indetectáveis. A análise toxicológica para drogas, álcool e medicamentos deve ser considerada nos casos de autópsia negativa.

Nos casos de autópsia negativa de MS, o teste genético *postmortem* é recomendado (Basso *et al.*, 2008; Tester and Ackerman, 2011).

### **1.5.7.3 Armazenamento de DNA**

O armazenamento do DNA das vítimas permite a realização de testes genéticos. Geralmente, apenas tecido embebido em parafina é guardado quando uma vítima de MS é autopsiada, não sendo a melhor fonte de DNA para estudos genéticos extensivos. Orientações sustentam a noção de que será desejável colher sangue em EDTA e/ou tecido de músculo, fígado ou baço, que pode ser obtido durante a autópsia. Quando não for realizada autópsia, uma biópsia de pele pode ser recolhida e enviada para o laboratório (Ackerman *et al.*, 2001; Carturan *et al.*, 2008).

#### **1.5.7.4 Testes Genéticos da MSC**

Um dos desafios mais frustrantes enfrentados pelo patologista forense é a incapacidade de determinar a causa de morte de um jovem aparentemente saudável. Na prática clínica, aproximadamente 50% das mortes são naturais, 5-10% são inexplicadas após uma autópsia macroscópica e 1-5% permanecem negativas após os testes microscópicos e outros estudos laboratoriais (Cohle and Sampson, 2001).

A MSC devido a arritmias ventriculares é a maior causa de mortalidade em populações ocidentais. Apesar de factores ambientais poderem claramente contribuir para os determinantes de MSC, durante a última década foram feitos avanços significativos na compreensão tanto da base clínica como da base genética da MSC. Em casos de MSI, nos quais a causa de morte não é definida após uma autópsia completa, o teste genético na amostra de sangue da vítima pode identificar a causa subjacente (Tester and Ackerman, 2007).

De acordo com um grande número de publicações, o teste genético em vítimas de MSC é útil tanto para fins clínicos como para fins forenses, devendo ser incluído numa investigação forense *postmortem* (Ackerman *et al.*, 2001; Behr *et al.*, 2003; Corrado *et al.*, 2001; Elger *et al.*, 2010; Keren *et al.*, 2008; Priori *et al.*, 2001; Tester and Ackerman, 2009). Em muitos países a autópsia forense é requerida por autoridades judiciais competentes em muitos casos de mortes súbitas inesperadas, especialmente se a vítima for jovem.

Nas anomalias estruturais, o caso da CMH, os sinais podem ser evidentes. No entanto, em alguns casos, mesmo após uma autópsia rigorosa, a causa de morte pode não ser determinada (Elger *et al.*, 2010).

Entre 6 a 40% das autópsias negativas de MSC são devidas a síndromes arrítmicas súbitos letais e o teste genético pode ser usado para confirmar a presença de uma mutação causal para a doença (Cohle and Sampson, 2001; Corrado *et al.*, 2001; Elger *et al.*, 2010; Puranik *et al.*, 2005; Tester and Ackerman, 2011).

No entanto, poucos autores discutem o problema ético e legal enfrentado pelos geneticistas e outros profissionais no teste *postmortem* em casos de MSC. Este teste é um desafio e inclui a análise de mutações de genes em síndromes arrítmicas (SCN5A, KCNQ1 e KCNH2) e o rastreio por *chip* de mutações

descritas na CMH (Fokstuen *et al.*, 2011; Keren *et al.*, 2008) . Adicionalmente, síndromes específicas, tais como a cardiomiopatia arritmogénica do ventrículo direito, podem também ser testadas (Ahmad, 2003; Elger *et al.*, 2010).

Nem todas as mutações causais foram ainda descobertas e muitas síndromes genéticas demonstram heterogeneidade genética. Em indivíduos com síndrome de QT longo, a taxa de detecção do teste genético estima-se estar entre os 70 e os 80% (Hedley *et al.*, 2009). Nos casos de autópsia negativa de casos de MSC o teste genético pode ser complicado, caro e laborioso, devido ao enorme número de genes que poderão estar relacionados com o evento, especialmente quando não se suspeita de nenhum diagnóstico clínico específico baseado nas circunstâncias da morte e autópsia (Tabelas 5, 6 e 7).

No entanto, os resultados dos testes genéticos realizados nas vítimas podem ser importantes para os familiares, identificando portadores assintomáticos e podendo prevenir futuras MSC (Elger *et al.*, 2010).

A combinação do conhecimento dos genes em diferentes causas de MSC e a disponibilidade de várias tecnologias genómicas permitiu um avanço considerável no número de casos que podem ser diagnosticados, com o benefício não só de determinar a causa de morte mas também de permitir o aconselhamento genético a familiares em risco (Brion *et al.*, 2010b).

Num estudo recente refere-se que a doença cardíaca induzida por mutações genéticas inicia os seus danos no miocárdio (morfologia e/ou electrofisiologia) à nascença. Numa doença genética cardíaca, o risco de MSC pode mesmo começar desde o nascimento ou mesmo *in útero* (Dimitrow *et al.*, 2010). Um exemplo é o caso do risco arritmogénico na síndrome do QT longo. Tem sido proposto que nesta patologia seja realizada uma análise de sobrevivência, com acompanhamento posterior, desde a altura do nascimento. Na CMH, a desorganização dos miócitos, como substrato arritmogénico, acontece antes do nascimento, enquanto a fibrose como co-factor arritmogénico, se desenvolve maioritariamente durante a vida (Dimitrow *et al.*, 2010).

### **1.5.7.5 Autópsia Molecular**

O teste genético *postmortem* – autópsia molecular - pode identificar doenças cardíacas hereditárias que podem não ter sido detectadas pelo patologista nos métodos de diagnóstico na autópsia (Chugh *et al.*, 2004; Tester and Ackerman, 2007). Estas doenças incluem síndromes arrítmicas primárias, mas também doenças acompanhadas por manifestações estruturais como a CMH (Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2005). A maioria destas MSC nos jovens manifesta-se no grupo das cardiomiopatias hereditárias, como a cardiomiopatia hipertrófica e cardiomiopatia/displasia arritmogénica do ventrículo direito e, como consequência de mutações nos canais iónicos, responsáveis por anomalias hereditárias, como a síndrome de QT longo, a síndrome de Brugada, a síndrome de QT curto e a taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (Brion *et al.*, 2010b).

A maioria destas doenças é geneticamente heterogénea, dificultando o diagnóstico e o aconselhamento genético. A CMH é uma doença de heterogeneidade genética marcada com mais de 1000 mutações em cerca de 30 genes que codificam proteínas sarcoméricas ou associadas ao sarcómero, proteínas envolvidas no fluxo do cálcio e proteínas metabólicas reguladoras (Tabela 5) (Brion *et al.*, 2010b; Tester and Ackerman, 2009).

No caso da CMH, em cada proteína têm sido identificados “hot spots” associados a prognósticos malignos: Arg403Gln, Arg719Trp, Gly716Arg e Arg719Trp em MYH7 (Ackerman *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2003) e mutações em TNNT2, particularmente Arg92Trp, têm também sido associadas a elevado risco de MSC (Ackerman *et al.*, 2002).

**Tabela 5** – Genes envolvidos na cardiomiopatia hipertrófica (adaptado de Tester and Ackerman, 2009)

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Locus</b>	<b>Prevalência Pacientes*</b>
<b>Genes sarcoméricos CMH</b>			
<b>MYBPC3</b>	Proteína C que liga a miosina	11p11.2	25-30%
<b>MYH7</b>	Cadeia pesada de miosina – isoforma $\beta$	14q11.2-q12	25-30%
<b>TNNT2</b>	Troponina Cardíaca T	1q32	3-5%
<b>TNNI3</b>	Troponina Cardíaca I	19p13.4	1-5%
<b>TPM1</b>	Tropomiosina $\alpha$	15q22.1	1-5%
<b>MYL2</b>	Cadeia leve regulatória da miosina	12q23-q24.3	Rara
<b>MYL3</b>	Cadeia leve essencial da miosina	3p21.2-p21.3	Rara
<b>ACTC1</b>	Actina cardíaca	15q11-q14	Rara
<b>TTN</b>	Titina	2q31	Muito rara
<b>TNNC1</b>	Troponina cardíaca C	3p21.1	Rara
<b>MYH6</b>	Cadeia pesada de miosina – isoforma $\alpha$	14q11.2-q12	Rara
<b>Outros Genes CMH</b>			
<b>CSRP3</b>	Proteína LIM do músculo cardíaco	11p15.1	
<b>TCAP</b>	Teletonina ou <i>Tinin-cap</i>	17q12	
<b>ANKRD1</b>	Domínio 1 de repetição da anquirina	10q22.1	
<b>MYOZ2</b>	Miozenina 2	10q22.1	
<b>VCL</b>	Vinculina	10q22.2	
<b>ACTN2</b>	$\alpha$ -actinina 2	1q42-q43	
<b>LBD3</b>	Domínio 3 de ligação a LIM	10q22.2-q23.3	
<b>MYO6</b>	Miosina VI	6q13	
<b>CAV3</b>	Caveolina	3p25	
<b>ACTA1</b>	Actina $\alpha$ 1, músculo-esquelético	1q42.13	Rara
<b>OBSCN</b>	Obscurina	1q42.13	
<b>JPH2</b>	Junctofilina 2	20q13.12	
<b>PLN</b>	Fosfolamban	6q22.1	
<b>CALR3</b>	Calreticulina 3	19p13.11	
<b>CASQ2</b>	Calsequestrina 2	1p13-p11	
<b>MYLK2</b>	Cinase 2 da cadeia leve da miosina	20q13.31	
<b>COX15</b>	Proteína 15 da estrutura do citocromo C oxidase	10q24	
<b>SLC25A4</b>	Membro 4 da família 25 de transportadores de solutos	4q35	
<b>DES</b>	Desmina	2q35	

\* Fontes: Brion *et al.*, 2010b; Tester and Ackerman, 2009; HGMD – Agosto 2011

Na cardiomiopatia arritmogénica do ventrículo direito foram identificados oito genes susceptíveis, que foram recentemente incluídos no diagnóstico, numa publicação recente que vem alterar as indicações para o teste genético (Tabela 6) (Marcus *et al.*, 2010).

**Tabela 6** – Genes envolvidos na cardiomiopatia arritmogénica ventricular esquerda (adaptado de Tester and Ackerman, 2009)

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Locus</b>	<b>Prevalência Pacientes*</b>
<b>Cardiomiopatia Arritmogénica Ventricular Direita</b>			
<b>DSC2</b>	Desmocolina 2	18q21	Rara
<b>DSG2</b>	Desmoglein 2	1812.1-q12.2	10-15%
<b>DSP</b>	Desmoplaquina	6q24	10-15%
<b>JUP</b>	Placoglobina	17q21	Rara
<b>PKP2</b>	Placofilina 2	12p11	25%
<b>RYR2</b>	Receptor cardíaco da rianodina	1q42.1-q43	Rara
<b>TGFB3</b>	Factor de crescimento transformador $\beta$ -3	14q23-q24	Rara
<b>TMEM43</b>	Proteína Transmembranar 43	3p25	Rara

\* Fontes: Brion *et al.*, 2010b; Tester and Ackerman, 2009; HGMD – Agosto 2011

Na correcta execução do potencial de acção cardíaco, têm sido envolvidas mutações em 13 genes associados às síndromes de QT longo e QT curto e, de acordo com uma publicação recente, a identificação de uma mutação causal da doença é possível em 70-80% destes casos (Hedley *et al.*, 2009). Para muitas outras doenças a taxa pode ser menor (Priori and Napolitano, 2006). Relativamente à síndrome de Brugada e à taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, estão associados menos genes (Tabela 7).

A maioria dos estudos reportados até à data baseia-se na sequenciação automática de genes conhecidos por métodos convencionais. No entanto, o trabalho e dedicação de vários profissionais permitiram encontrar um grande número de mutações causais em cada um dos genes envolvidos nas cardiomiopatias e síndromes arrítmicas, que podem ser directamente estudados com tecnologias de rastreio de mutações (Brion *et al.*, 2010b).

**Tabela 7** – Genes e patologias envolvidos nas síndromes arrítmicas na MSC (adaptado de Tester and Ackerman, 2009)

<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Locus</b>	<b>Prevalência Pacientes*</b>
<b>Síndrome QT Longo</b>			
KCNQ1	Subunidade $\alpha$ IKs	11p15.5	30-35%
KCNH2	Subunidade $\alpha$ IKr	7q35-36	25-30%
SCN5A	Subunidade $\alpha$ IKa	3p21	5-10%
ANKB	Anquirina B	4q25-q27	
AKAP9	Yotiao	7q21-q22	
CACNA1C	Canal de cálcio tipo-L	12p13.3	
CAV3	Caveolina-3	3p25	
KCNE1	MinK	21q22.1	Rara
KCNE2	MiRP1	21q22.1	
KCNJ2	Kir2.1	17q23	
SCN4B	Canal de sódio $\beta$ 4	11q23.3	
SNTA1	$\alpha$ -Sintrofina 1	20q11.2	
<b>Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica</b>			
CASQ2	Calsequestrina 2	1p13.3	Rara
RYR2	Receptor cardíaco da rianodina	1q42.1-q43	50-60%
<b>Síndrome de Brugada</b>			
CACNA1C	Canal cálcio tipo-L	2p13.3	
CACNB2	Canal cálcio tipo-L subunidade $\beta$ 2	10p12	
KCNE3	MiRP2	11q13.4	?
SCN1b	Canal sódio $\beta$ 1	19q13.1	
SCN5A	NaV1.5	3p21-p24	20-30%
GPD1L	Desidrogenase glicerol-3-fostato	3p22.3	Rara
<b>Síndrome QT Curto</b>			
KCNH2	Kv11.1	7q35-36	
KCNJ2	Kir2.1	17q23	?
KCNQ1	Kv7.1	11q15.5	

\* Fontes: Brion *et al.*, 2010b; Tester and Ackerman, 2009; HGMD – Agosto 2011

Devido ao facto de a maioria das doenças cardíacas hereditárias mostrarem um padrão de transmissão autossómico dominante, os familiares em primeiro grau das vítimas de MSC com doença genética, têm 50% de risco de serem portadores da mesma doença. Estudos recentes mostraram que, através da

avaliação dos familiares directos de vítimas de MSI, uma causa de morte pode ser estabelecida em 22-53% das famílias (Behr *et al.*, 2003; Behr *et al.*, 2008; Hofman *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2005). A taxa de sucesso do teste genético em familiares é alta quando a mutação causal é conhecida (Basso *et al.*, 2001). No entanto, deve ter-se em conta que o familiar portador da mesma mutação, não vai necessariamente desenvolver sinais ou sintomas da condição clínica associada à mutação. A penetrância do fenótipo pode variar entre indivíduos da mesma família e factores secundários como mutações duplas/compostas ou factores ambientais podem influenciar a expressão fenotípica (HRUK, 2008; Piori *et al.*, 2001).

Uma vez que o rastreio genético dos genes mais frequentemente envolvidos na MSC pode ajudar a determinar a causa de morte e avaliar o risco potencial dos familiares, uma colaboração próxima entre o patologista forense e o geneticista é muito importante, especialmente para a orientação do estudo genético. A informação fornecida pelo clínico pode ser fundamental na selecção dos genes a analisar e na interpretação dos resultados (Allegue *et al.*, 2011).

Os avanços significativos que, nas últimas décadas, têm vindo a ser desenvolvidos na área de novas tecnologias genómicas, permitem o rastreio em larga escala das mutações conhecidas associadas à morte súbita. Neste contexto técnicas como o sistema *Sequenom MassARRAY* – genotipagem por espectrometria de massa (GEM), desnaturação de alta resolução (HRM - do inglês *High Resolution Melting*) ou *Next Generation Sequencing* (NGS), podem permitir o diagnóstico de algumas mortes súbitas inexplicadas, a um custo razoável (Allegue *et al.*, 2010; Brion *et al.*, 2010b; Fokstuen *et al.*, 2011; Millat *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011). Por outro lado, o resultado do teste genético poderá fornecer informações importantes para a prevenção do evento trágico noutros membros da família.

O sistema *Sequenom MassARRAY*, baseado na tecnologia de MALDI-TOF semiautomatizada, permite a obtenção de rastreios rápidos e eficientes de mutações descritas para os três principais genes associados na bibliografia a SQT1 e SB (Allegue *et al.*, 2010) e para os genes associados a CMH (Allegue *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011).



Uma das maiores dificuldades encontradas no estudo genético da MSC, ocorre quando se tenta fazer uma pesquisa da possível causa genética subjacente num número de casos estatisticamente representativo. Geralmente é necessário recorrer a estudos retrospectivos. A maioria das amostras disponíveis para estes estudos encontra-se fixada em formalina ou em blocos de parafina, com as consequentes dificuldades e artefactos para este tipo de estudo (Brion *et al.*, 2010b). Desta forma, a qualidade e quantidade de DNA é muitas vezes um factor limitativo para estas análises genéticas, em casos de morte súbita, onde o teste molecular tem de ser realizado *postmortem*. Relativamente a estudos retrospectivos, o DNA genómico isolado de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFEP) tem potencialmente importantes implicações na determinação da causa e forma de morte no caso das autópsias negativas ou brancas (Carturan *et al.*, 2008). No entanto, DNA extraído destas amostras tem grandes limitações em estudos genéticos extensivos.

## 1.6 DNA Isolado de Amostras Fixadas em Formalina

Amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFEP) representam a maior fonte de material biológico arquivado disponível para estudos genómicos (Aviel-Ronen *et al.*, 2006). Em muitos casos, como nas doenças raras, as FFEP representam a última fonte de DNA disponível para a análise genética (Santos *et al.*, 2009).

A quantidade de DNA intacto que pode ser extraído com sucesso de parafinas depende de muitas variáveis que fogem do controlo do investigador, tais como, o fixador utilizado, o tempo de fixação, a idade do bloco, entre outras. A obtenção de DNA de boa qualidade extraído de amostras FFEP nem sempre é uma tarefa fácil, tanto pela quantidade de material, muitas vezes escasso, como porque muitas vezes contem substâncias que inibem a reacção de PCR, como a formalina (Cao *et al.*, 2003), ou que inibem as proteínas K, como o xilol (Coura *et al.*, 2005). No entanto, o sucesso do PCR demonstra estar mais relacionado com o protocolo de extracção de DNA e com a fixação do que com o tipo e quantidade de material (Carturan *et al.*, 2008). Diferentes autores estabelecem que um método de extracção de DNA adequado é essencial e

precisa de ser escolhido de acordo com a investigação que se pretende desenvolver (Gilbert *et al.*, 2007a; Poljak *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1996).

É sabido que a quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos extraídos são altamente dependentes de um grande número de parâmetros, envolvendo os procedimentos implicados na manipulação das amostras FFEP (antes e depois da extracção de DNA). A manipulação da amostra (tipo e quantidade de tecido e a sua preservação antes da fixação), metodologia utilizada na fixação (fixador escolhido, pH do fixador, temperatura e tempo de fixação), como também as condições após a fixação (temperatura e período de armazenamento), são considerados os parâmetros mais importantes a ter em conta antes da extracção (Miething *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1996). Os procedimentos pré-extracção incluem o método de desparafinização (lavagens com xilol e etanol), e o tempo de digestão das amostras.

Apesar da formalina ser um excelente fixador para a manutenção da integridade dos tecidos, o tempo desde a morte, o tempo para a fixação, o processo de embebição em parafina e o subsequente armazenamento, levam à degradação do DNA e a grandes modificações que podem afectar a sua qualidade (Dedhia *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2007a; Gilbert *et al.*, 2007b; Okello *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2002). O formaldeído cria ligações cruzadas entre os ácidos nucleicos e as proteínas (Solomon and Varshavsky, 1985), resultando em formas de DNA e RNA com comprimento dos pares de bases médio de aproximadamente 200 pb ou menos (Lee *et al.*, 2005; Okello *et al.*, 2010), podendo ser um factor limitante da sua utilização. A fragmentação dos ácidos nucleicos também pode ocorrer devido à idade do tecido fixado ou ao pH do fixador (Gilbert *et al.*, 2007a). Nos métodos de extracção de DNA é importante ter em consideração alguns factores, como a composição do tampão de extracção (com ou sem proteínas K), e o tempo e temperatura do passo da digestão (Gilbert *et al.*, 2007a).

Mutações artificiais resultantes de amplificação por PCR usando DNA proveniente de tecido embebido em parafina foram anteriormente descritas com as seguintes explicações sugeridas:

- 1- Desaminização *postmortem* dos resíduos de citosina, resultando na conversão da citosina em uracilo no DNA (Hofreiter *et al.*, 2001).

2- Danificação do DNA, resultando em quebras que promovem o “*jumping*” durante o PCR e o uso de reduzido número de cópias de DNA modelo na reacção de PCR (Carturan *et al.*, 2008).

Uma das maiores dificuldades encontradas até à data no estudo genético da MSC é que a maioria dos estudos terá de ser retrospectivo, tendo de se recorrer a amostras fixadas em formalina e/ou embebidas em parafina, com as consequentes dificuldades e artefactos para este tipo de estudos. Para análises que requerem a digestão do DNA seguida de amplificação por PCR a utilização de amostras FFEP é um *handicap*, uma vez que contém DNA degradado, resultando em fragmentos ainda mais pequenos após digestão (Brion *et al.*, 2010b).

Muitos estudos reportados têm referido melhorias no processo de isolamento de ácidos nucleicos de grande qualidade de amostras FFEP. Estes melhoramentos têm sido aproveitados pelas maiores companhias de tecnologia e incluídos em kits comerciais (Chaw *et al.*, 1980; Coombs *et al.*, 1999; Coura *et al.*, 2005; Okello *et al.*, 2010). No entanto, kits comerciais para a extracção de ácidos nucleicos de tecidos FFEP poderão não ser ideais, porque originam melhores resultados em tecidos fixados por poucas horas. De facto, períodos mais longos de fixação podem resultar em dois efeitos: um grau mais elevado de ligações cruzadas entre biomoléculas e um maior grau de fragmentação do DNA (Casale *et al.*, 2010).

## 1.7 Objectivos

O presente trabalho teve como objectivo a avaliação da possibilidade de realizar um estudo retrospectivo em autópsias negativas ou com evidências de cardiomiopatia hipertrófica em vítimas previamente assintomáticas, realizadas no Instituto Nacional de Medicina Legal. Avaliou-se, igualmente, a possibilidade de implementação da autópsia molecular, com a aplicação da tecnologia *iPLEX GOLD* do sistema *Sequenom MassARRAY*, em futuros casos de morte súbita de causa indeterminada ou em vítimas com cardiomiopatia hipertrófica não diagnosticada.

## Capítulo 2

---

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Amostra Estudada

Numa primeira fase do projecto, com o objectivo de avaliar a possibilidade de realizar um estudo retrospectivo das autópsias negativas em Portugal, foram recolhidas da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, amostras, sob a forma de blocos de tecido fixado em formalina embebido em parafina (FFEP) ou tecido fixado em formalina, de 12 vítimas de morte súbita cardíaca, em regime de completo anonimato (Tabela 8).

**Tabela 8** – Pacientes estudados vítimas de morte súbita e informações clínicas – amostras FFEP e tecidos fixados em formalina.

<b>Caso (Ano)</b>	<b>Material Enviado</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Causa de Morte</b>	<b>Outras inf. Imp.*</b>
<b>Paciente 1 (2004)</b>	Blocos Parafina	55 A	M	Cardiomiopatia dilatada	
<b>Paciente 2 (2004)</b>	Blocos Parafina	23 A	M	Cardiomiopatia restritiva idiopática	
<b>Paciente 3 (2005)</b>	Blocos Parafina	56 A	M	Cardiomiopatia hipertensiva	
<b>Paciente 4 (2006)</b>	Blocos Parafina	?	M	Indeterminada	
<b>Paciente 5 (2006)</b>	Blocos Parafina	42 A	M	Indeterminada	
<b>Paciente 6 (2006)</b>	Blocos Parafina	28 A	M	Indeterminada	Toxicodependente
<b>Paciente 7 (2007)</b>	Blocos Parafina	45 A	M	Indeterminada	Alcoolemia = 3,89 g/L
<b>Paciente 8 (2008)</b>	Blocos Parafina	41	M	Indeterminada	
<b>Paciente 9 (2009)</b>	Blocos Parafina	25 A	F	Indeterminada	
<b>Paciente 10 (2010)</b>	Coração em formalina	25 A	M	Indeterminada	THC-COOH = 23 ng/mL
<b>Paciente 11 (2010)</b>	Coração em formalina	63 A	M	Indeterminada	
<b>Paciente 12 (2010)</b>	Coração em formalina	21 A	M	Indeterminada	

Posteriormente, e dada a dificuldade apresentada na qualidade de DNA extraído de tecidos fixados em formalina, foram sendo recolhidas amostras de

sangue em EDTA, colhido na altura da autópsia de 4 vítimas de morte súbita de causa indeterminada (Tabela 9).

**Tabela 9** - Pacientes estudados vítimas de morte súbita e informações clínicas – amostras de sangue colhido na autópsia.

<b>Caso (Ano)</b>	<b>Material Enviado</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Causa de Morte</b>	<b>Outras inf. Imp.</b>
<b>Paciente 13 (2010)</b>	Sangue EDTA	41 A	M	Indeterminada	
<b>Paciente 14 (2010)</b>	Sangue EDTA	32 A	M	Cardiomiopatia	
<b>Paciente 15 (2011)</b>	Sangue EDTA	44 A	M	Indeterminada	Hist. Fam. MS/ HIV+
<b>Paciente 16 (2011)</b>	Sangue EDTA	48 A	M	Indeterminada	Hist. Fam. MS

Dos 16 pacientes vítimas de morte súbita, apenas um era do sexo feminino. As idades situam-se entre os 21 e 63 anos, com uma média de 39, 3 anos. Das informações disponíveis, em dois pacientes (paciente 15 e 16) existia história familiar de morte súbita. No paciente 14 a análise histológica revelou a presença de fibrose e desorganização dos cardiomiócitos.

## **2.2 Metodologia**

### **2.2.1 Amostras FFEP**

A partir de cada bloco de parafina dos pacientes 1-9 foram obtidos cortes histológicos de espessura variável, utilizando um micrótomo convencional. Para cada bloco foi usada uma lâmina nova, a fim de prevenir a contaminação entre as amostras. Para cada paciente foram utilizadas, consoante o tamanho da amostra embebida em parafina, 4-6 secções e colocadas em tubos de microcentrifugação devidamente identificados e armazenados à temperatura ambiente até o momento da extracção.

### **2.2.1 Desparafinização**

Foram utilizados 2 métodos de desparafinização, com o objectivo de avaliar qual o método mais eficiente.

## **Método 1**

### **Deparafinização com Xilol**

1. Com a ajuda de um bisturi, retirou-se o máximo de parafina das secções histológicas e colocaram-se em tubos de microcentrifugação (*eppendorfs*).
2. Adicionou-se 1 ml de xilol e homogeneizou-se no vórtex.
3. Incubou-se 10 min à temperatura ambiente.
4. Centrifugou-se 5 min a 12500 rpm.
5. Eliminou-se o sobrenadante, sem perturbar o sedimento.
6. Repetiram-se os passos 2 a 5 até remover o máximo de parafina.

## **Método 2**

### **Deparafinização Térmica**

1. Retirou-se o máximo de parafina das secções, com a ajuda de um bisturi e colocaram-se em tubos de microcentrifugação (*eppendorfs*).
2. Pipetou-se 100µL de Tween-20, homogeneizando-se a amostra com a ajuda de pipeta.
3. Incubou-se no termobloco – 10 min a 98-100°C.
4. Centrifugou-se 5 min a 12500 rpm, enquanto quente e deixou-se arrefecer no frio.
5. Retirou-se o disco de parafina à superfície.
6. Repetiram-se os passos 2 a 5 até remover o máximo de parafina

### **2.2.2 Amostras fixadas em formalina**

Para as amostras de coração fixadas em formalina dos pacientes 10-12 de forma a facilitar a digestão enzimática, procedeu-se inicialmente a uma digestão mecânica. Os pedaços resultantes foram lavados duas vezes com PBS (phosphate-buffered saline, 1X, pH 7,4) e colocados em tubos de microcentrifugação até à altura da extracção.

### **2.2.3 Extracção do DNA**

Foram utilizados 3 protocolos de extracção de DNA, com o objectivo de avaliar qual o método mais eficiente.



## **Protocolo 1**

### **Extracção com High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)**

O protocolo para extracção de DNA a partir de amostras FFEP e de amostras fixadas em formalina, com o sistema comercial High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha), foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com adaptação do tempo de digestão com proteinase K.

## **Protocolo 2**

### **Extracção com QIAamp DNA Minikit® (Qiagen)**

O protocolo para extracção de DNA, a partir de material parafinado, com o sistema comercial QIAamp DNA minikitR, foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com ligeiras alterações do tempo de digestão com proteinase K.

## **Protocolo 3**

### **Extracção com Fenol-Clorofórmio**

O protocolo para extracção de DNA a partir das amostras FFEP e amostras fixadas em formalina, com fenol-clorofórmio foi realizado de acordo com as seguintes etapas:

### **Digestão enzimática das proteínas e RNA**

1. Adicionar 1000  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão (10Mm Tris-HCL, pH=8.0; 0.1M EDTA, pH=8.0; 0.5% SDS) à amostra e incubar com 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , durante a noite a 56°C.

### **Extracção do DNA**

2. Adicionar 1 volume de fenol/clorofórmio (1:1) e agitar suavemente, invertendo, durante 10 min.
3. Centrifugar a 3 500g durante 10 min.
4. Se ainda existir muita proteína precipitada (interface branca), volta-se a repetir a extracção com fenol/clorofórmio, até que a interface fique límpida.
5. Adicionar 1 volume de clorofórmio, para retirar os vestígios de fenol existentes na solução e centrifugar a 3500g durante 10 min.

### **Precipitação do DNA**

6. Remover o sobrenadante para um tubo de microcentrifugação (*eppendorf*) e adicionar 1/10 volume de acetato de sódio (3M, pH=5.2) e misturar.
7. Adicionar 2/3 volume de etanol frio a 99% e agitar suavemente.
8. Deixar durante a noite a -80°C
9. Centrifugar a 3 500g durante 30 min a 4°C
10. Eliminar o sobrenadante e adicionar 500 µL de etanol a 70%
11. Centrifugar a 3 500g durante 30 min a 4°C e deixar secar à temperatura ambiente.
12. Dissolver o DNA em 100 µL de tampão de eluição (10mM Tris-HCL e 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH=8.0).

### **2.2.3 Amostras de Sangue em EDTA**

Para as amostras de sangue em EDTA, colhido na altura da autópsia, foi realizado o protocolo para extracção de DNA a partir de sangue, utilizando o sistema comercial Kit JetQuick MidiPrep da Genomed, segundo as instruções do fabricante, com ligeiras adaptações.

### **2.2.4 Quantificação e amplificação do DNA**

A quantidade e a pureza do DNA genómico foram determinadas por densidade óptica por espectrofotometria no NanoDrop® para as amostras após a extracção de DNA.

Os ácidos nucleicos absorvem radiação ultravioleta entre os 220nm e os 320 nm, em que o pico de absorção máximo se encontra aos 260nm. A absorção de radiação ultravioleta pelos ácidos nucleicos é essencialmente devida às duplas ligações conjugadas dos anéis heterocíclicos das bases azotadas. O NanoDrop® é um espectrofotómetro de espectro completo (220-750nm) que quantifica amostras de ácidos nucleicos de 1µl. Os resultados são apresentados em ng/µl.

Os níveis de absorvância realizados no espectrofotómetro incluem a absorvância de todas as moléculas na amostra que absorvem a comprimentos

de onda de interesse. Uma vez que nucleótidos, RNA, ssDNA e dsDNA absorvem todos a 260 nm, irão contribuir para a absorvância total da amostra.

### **Relação 260/280**

A relação de absorvância a 260nm e 280nm é utilizada para verificar a pureza do DNA e do RNA. Uma relação de ~1.8 é geralmente aceite como “pura” para DNA; uma relação de ~2.0 é referida com “pura” para RNA. Se a relação for substancialmente inferior, para ambos os casos, pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente perto dos 280nm.

### **Relação 260/230**

A relação 260/230 é utilizada como grau de pureza secundário de ácidos nucleicos. Valores esperados situam-se geralmente entre 2.0-2.2. Se os valores desta relação forem apreciavelmente inferiores aos esperados, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem a 230nm. EDTA, carboidratos e fenol têm valores de absorvância perto dos 230nm.

Após a quantificação, as amostras foram conservadas a -20°C.

## **2.3 Pesquisa de mutações**

Até ao início de 2010, no Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias (LGMC), do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra, a pesquisa de mutações em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica consistia na sequenciação e posterior análise da sequência de exões para os quais está descrita uma incidência mais elevada de mutações dos genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3 e MYL2.

A classificação clínico-laboratorial determinava a ordem dos genes estudados:

- Grupo I – Indivíduos com quadros de apresentação grave em idade adulta ou infantil – o estudo começa pelo gene MYH7.
- Grupo II – Indivíduos com apresentação em idades mais avançadas – o estudo inicia-se pelo gene MYBPC3
- Grupo III – Indivíduos com história familiar de morte súbita associada a CMH – o estudo inicia-se pelo gene TNNT2.

O aparecimento de uma alteração descrita como patogénica determinava o fim da análise molecular.

Nos familiares de casos já estudados e com teste genético positivo, apenas se estudam os exões que apresentam alterações no caso índice.

### **2.3.1 Sequenciação Automática**

A sequenciação automática foi realizada seguindo as seguintes etapas:

#### **2.3.1.1 Amplificação por PCR**

Para cada amplificação por PCR são utilizados *primers* específicos, utilizando a seguinte mistura:

<b>Mistura de PCR</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Volume/ul</b>
H <sub>2</sub> O	13.9
Tampão 5X	5
dNTPs (5mM)	1
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5
Primer F (10pmol/ul)	1.25
Primer R/ (10pmol/ul)	1.25
Taq ( 5U/ul)	0.1
<b>Total</b>	<b>24ul</b>

#### **2.3.1.2 Electroforese em gel de agarose**

A verificação dos produtos amplificados por PCR em gel de agarose 2% é efectuada adicionando 5 µL das amostras amplificadas e 2 µL de Loading Buffer e procedendo-se à electroforese com TBE 1X, a 70 V durante 30 minutos. Simultaneamente com a amostra aplica-se um controlo positivo, e um controlo negativo (mistura de PCR sem DNA).

Após a electroforese visualiza-se o gel no transiluminador e documenta-se o padrão fotográfico.

### **2.3.1.3 Purificação dos produtos de PCR**

A purificação de reacções de PCR é realizada através do kit High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Applied Science, de acordo com as instruções do fabricante.

Este procedimento é baseado nas propriedades selectivas de aderência do produto amplificado de DNA a fibras especiais de vidro constituintes das colunas usadas em presença de sais de tiocianato de guanidina, de modo a remover sais, dNTPs, *primers* e polimerases não incorporadas durante a reacção de PCR. Assim, o produto de PCR a ser purificado depois de misturado com uma solução de ligação é adicionado a uma coluna contendo fibras especiais de vidro às quais fica aderido através de uma centrifugação. Durante este processo, o DNA adere à fibra especial de vidro de uma forma reversível. Depois da remoção dos sais, dNTPs e polimerases existentes através de lavagens sucessivas, o DNA é eluído numa solução salina baixa (10mM Tris-HCl, pH8,5). O DNA obtido pode ser posteriormente usado em aplicações várias.

### **2.3.1.4 Reacção de Sequenciação**

A sequenciação de DNA realiza-se utilizando o GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit e o sequenciador automatizado Beckman Coulter.

A reacção de sequenciação com o GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit é baseada na incorporação de análogos de nucleótidos terminadores de cadeia (ddNTPs) pela polimerase de DNA, cada um deles marcado com um fluorocromo diferente. Durante a reacção de sequenciação, os ddNTPs marcados são incorporados sequencialmente na extremidade 3' de uma cadeia de DNA nascente, em que a elongação desta é terminada selectivamente em A, T, C ou G, porque os ddNTPs não têm extremidade 3'-OH. Cada reacção de sequenciação é feita num só tubo, para cada *primer* e produz uma série de moléculas de DNA de tamanho variável, cada uma terminando numa base diferente com fluorescência diferente. Os produtos da reacção de sequenciação são posteriormente purificados e analisados no sequenciador automatizado Beckman Coulter de acordo com o descrito no manual.

### **2.3.1.5 Purificação das reacções de sequenciação**

A purificação de reacções de sequenciação é realizada através do método com etanol.

Este procedimento é baseado na precipitação das reacções de sequenciação com a remoção dos sais residuais, dNTPs marcados com fluorocromos em excesso que não foram incorporados e que ainda possam existir. Esta remoção dos sais e dos dNTPs marcados é fundamental pois estes podem interferir com os resultados das sequências principalmente numa fase inicial da leitura.

### **2.3.1.6 Análise das reacções de sequenciação**

Após a purificação dos produtos de sequenciação, as amostras são corridas no sequenciador CEQ 8000, Beckman Coulter de 8 capilares.

Os resultados da sequenciação são apresentados sob a forma de electroferogramas. A análise faz-se por comparação com a sequência normal.

## **2.3.2 Sequenom MassARRAY**

Desde o início de 2010, a metodologia utilizada para a pesquisa de mutações segue um protocolo mais abrangente:

As amostras são enviadas para o Laboratório de Genética Humana da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, onde são corridas no MassARRAY, iPLEX Gold (*Sequenom*), 384 position SpectroCHIP arrays, PCR multiplex com a versão HCM\_W35\_SpectroCHIP\_MassArrayIplex\_Sequenom. São analisadas 541 mutações dispersas nos genes MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNT3, TPM1, TNNC1, MYL2, MYL3, MYO6, MYH6, TCAP, TTN, ACTC1, CSRP3, COX15, LAPM2, JPH2, ACTA1, FXN, CAV3, DES, MTCYB, MTTH, MTTI, MYLK2, MYOZ2, PRKAG2, PLN, OBSCN, RAF1, VCL (Tabela 10) utilizando o software de análise: MassARRAY® Typer 3.4 Software.

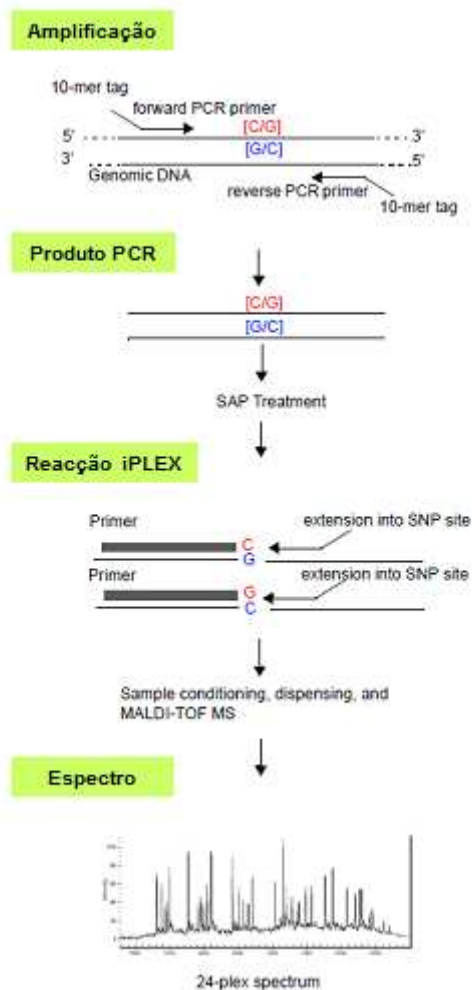
A selecção das mutações nos genes associados a CMH foi realizada utilizando a *Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.org/>) e a *Harvard Sarcomere Protein Gene Mutation Database* (<http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/>), sendo seleccionadas 541 mutações nos genes referidos na tabela 10.

Tabela 10 – Genes analisados no sistema *Sequenom MassARRAY*

Gene	Proteína	Prevalência Pacientes*
MYBPC3	Proteína C que liga a miosina	25-30%
MYH7	Cadeia pesada de miosina – isoforma $\beta$	25-30%
TNNT2	Troponina Cardíaca T	3-5%
TNNI3	Troponina Cardíaca I	1-5%
TPM1	Tropomiosina $\alpha$	1-5%
MYL2	Cadeia leve regulatória da miosina	Rara
MYL3	Cadeia leve essencial da miosina	
ACTC1	Actina cardíaca	
TTN	Titina	
TNNC1	Troponina cardíaca C	
MYH6	Cadeia pesada de miosina – isoforma $\alpha$	
CSRP3	Proteína LIM do músculo cardíaco	
TCAP	Teletonina ou <i>Tinin-cap</i>	
LAPM2	Proteína membrana 2 associada ao lisossoma	
MYOZ2	Miozenina 2	
VCL	Vinculina	
MTCYB	Citocromo b do complexo III	
MYO6	Miosina VI	
CAV3	Caveolina	
ACTA1	Actina $\alpha$ 1, músculo-esquelético	
OBSCN	Obscurina	
JPH2	Junctofilina 2	
PLN	<i>Fosfolamban</i>	
FXN	Frataxina	
MTTG	RNA mitocondrial transferência, glicina	
MTTI	RNA mitocondrial transferência, isoleucina	
MYLK2	Cinase 2 da cadeia leve da miosina	
PRKAG2	Subunidade $\gamma$ da AMP cinase	
COX15	Proteína 15 da estrutura do citocromo C oxidase	
RAF1	Homólogo 1 do oncogene viral da leucemia dos murganhos	
DES	Desmina	

\* Fontes: Brion *et al.*, 2010b; Tester and Ackerman, 2009

As amplificações por PCR são efectuadas seguindo as instruções do fabricante. Após o PCR, o tratamento com a enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) é realizado para desfosforilar os dNTPs não incorporados. Após este tratamento é efectuada a reacção iPLEX GOLD. Para otimizar a análise por espectrometria de massa, um kit de resina de limpeza deve ser adicionado, dessalinizando os produtos da reacção de iPLEX. Os produtos são posteriormente dispensados num spectroCHIP de 384 poços, utilizando o Nanodispensador MassARRAY. As diferenças nos *primers* de extensão são detectadas com a tecnologia MALDI-TOF-MS. O software de análise: MassARRAY® Typer 3.4 Software, que analisa os picos identificando SNPs específicos (Figura 14).



**Figura 14** – Reacção do iPLEX MassARRAY (adaptado de Gabriel *et al.*, 2009)



O método utilizado, baseado na extensão de apenas uma base de um *primer* amplificado na região de variação do DNA, permite a detecção de inserções, deleções e substituições de uma base simples. Este método, tem como controlo o processamento em simultâneo de DNA de um indivíduo saudável (controlo negativo) e DNA de um paciente com cardiomiopatia hipertrófica com mutações identificadas (controlo positivo) conforme descrito em Santos, e colaboradores (Santos *et al.*, 2011).

As alterações, de todas as amostras de casos índice são confirmadas no LGMC por PCR, seguida de sequenciação para que sejam validados os resultados.



## Capítulo 3

---

### 3. Análise dos Resultados

#### 3.1 Avaliação das diferentes variáveis nos métodos de pré-extracção do DNA

Como referido no capítulo anterior, foram testados diferentes protocolos para a extracção de DNA a partir das diferentes amostras.

##### 3.1.1 Avaliação dos métodos de desparafinização e tempo de digestão

Numa fase inicial, foram testadas 3 variáveis em dois pacientes, para os quais mais amostras FFEP estavam disponíveis:

1. Espessura da secção do bloco de parafina
2. Método de desparafinização
3. Tempo de digestão dos tecidos

Na tabela 11 estão descritos os resultados obtidos e as diferentes condições testadas, utilizando o kit de extracção High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche:

**Tabela 11** – Comparação dos resultados obtidos na extracção de DNA de dois pacientes testando as três variáveis. Esp: espessura do corte; T Dig: tempo de digestão; Desp: método de desparafinização; DT: durante a noite; h: horas T: desparafinização térmica; X: desparafinização com xilol.

Amostra	Esp/T Dig/Desp	[ ] µg/µl	260/280	260/230
Paciente 2	20µ 3h T	30,0	1,66	1,11
	10µ 3h T	65,6	1,77	1,34
	20µ 3h X	47,9	1,72	1,85
	10µ 3h X	33,9	1,80	1,54
	20µ DT X	65,6	1,81	1,78
	10µ DT X	52,4	1,75	1,62
Paciente 3	20µ 3h T	22,0	2,59	0,08
	10µ 3h T	20,4	2,42	0,07
	20µ 3h X	15,9	1,84	0,60
	10µ 3h X	7,3	1,51	0,44
	20µ DN X	26,1	1,67	0,89
	10µ DN X	5,9	1,55	0,42

A análise destes resultados não mostrou diferenças significativas relativamente à concentração de DNA obtida, aplicando os dois métodos de desparafinização. No entanto, a desparafinização com xilol obtém valores para a relação 260/280, que indica a pureza do DNA, mais adequados. No que se refere à espessura das secções dos blocos de parafina, cortes mais espessos (20 $\mu$ ) apresentaram valores superiores para a maioria das amostras. Relativamente ao tempo de digestão, concluiu-se que a digestão durante a noite parece ser mais eficaz, tanto para a quantidade como para a qualidade do DNA extraído.

Assim, para as extracções subsequentes, utilizaram-se secções de 20 $\mu$ , desparafinização com xilol e digestão durante a noite.

No entanto, na tentativa de melhorar o protocolo, após de pesquisas adicionais na literatura, algumas alterações foram efectuadas ao protocolo de desparafinização com xilol.

1. 1 ml de xilol 10 min a temperatura ambiente; centrifugação 5 min a 12500 rpm – duas vezes
2. 1 ml de xilol 30 min a 65°C; centrifugação 5 min a 12500 rpm – duas vezes.

Os resultados obtidos utilizando o kit de extracção High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche, e os dois métodos alterados de desparafinização com xilol estão apresentados na tabela 12:

**Tabela 12** – Resultados da extracção de DNA com os métodos 1 e 2 de desparafinização com xilol. (1) – Método 1; (2) – Método 2

Amostra	[ ] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280	260/230
<b>Paciente 9 (1)</b>	80,9	1,77	1,68
<b>Paciente 9 (2)</b>	68,0	1,76	1,47
<b>Paciente 5 (1)</b>	98,3	1,70	1,64
<b>Paciente 5 (2)</b>	36,5	1,82	1,53
<b>Paciente 8 (1)</b>	60,6	1,76	1,35
<b>Paciente 8 (2)</b>	36,1	1,80	1,10

Para as três amostras testadas, o tubo 1 apresentou melhores resultados, tanto para os valores da concentração de DNA, como para o grau de pureza,

passando a ser este o método de desparafinização utilizado nas extracções subsequentes.

### 3.1.2 Avaliação do método de extracção

Após a escolha do método de desparafinização e do tempo de digestão, testaram-se diferentes métodos de extracção:

1. Kit Roche - High Pure PCR Template Preparation Kit
2. Qiagen - QIAamp DNA Minikit
3. Fenol-clorofórmio

Numa primeira fase analisaram-se os resultados obtidos na extracção de DNA utilizando os dois kits comerciais (Tabela 13):

**Tabela 13** – Comparação das extracções utilizando os dois kits comerciais – *Roche* e *Qiagen*

<b>Amostra</b>	<b>[ ] <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Paciente 1 <i>Qiagen</i></b>	41,3	1,96	2,09
<b>Paciente 1 <i>Roche</i></b>	32,2	1,70	1,32
<b>Paciente 2 <i>Qiagen</i></b>	43,6	1,84	1,99
<b>Paciente 2 <i>Roche</i></b>	65,6	1,81	1,78
<b>Paciente 10 <i>Qiagen</i></b>	35,6	1,77	6,41
<b>Paciente 10 <i>Roche</i></b>	366,5	1,77	1,47

No que respeita à eficiência dos dois kits comerciais testados, o kit comercial da Roche apresentou valores de concentração significativamente mais elevados para o caso do paciente 10 (coração fixado em formalina). Relativamente ao paciente 1, o kit comercial da Qiagen revelou uma concentração mais elevada, mas com uma diferença pouco significativa. No que se refere à relação 260/280, os valores apresentados pelos dois kits não mostram diferenças significativas, estando, para os pacientes 2 e 10, muito próximos do valor 1.8, geralmente aceite para amostras “puras” de DNA. Relativamente à qualidade do DNA, o kit da Qiagen apresenta valores bons para esta relação mas, apresenta um resultado muito elevado para a relação 260/230 no paciente 10. Este valor é tão discrepante que se pensou que poderia corresponder a uma leitura errada do aparelho Nanodrop, no entanto,

as leituras da mesma amostra realizadas posteriormente apresentavam o mesmo valor.

A verificação dos resultados da extracção por electroforese em gel de agarose demonstrou resultados semelhantes para todas as amostras, verificando-se algum arrastamento (*smearing*) residual, evidenciando a alta fragmentação do DNA, obtido a partir de ambos os kits testados. Os resultados apresentados não parecem realçar vantagens significativas, relativamente à extracção de DNA, para nenhum dos kits comerciais, no entanto, em termos de reproductibilidade e custos foi escolhido o kit de extracção High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche.

Posteriormente avaliou-se a eficácia do kit comercial da Roche relativamente à extracção com fenol-clorofórmio (Tabela 14).

**Tabela 14** – Comparação da extracção com fenol-clorofórmio (FC) e o kit comercial Roche.

<b>Amostra</b>	<b>[ ] <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Paciente 2 (FC*)</b>	27,5	1,86	1,85
<b>Paciente 2 (Roche**)</b>	65,6	1,81	1,78
<b>Paciente 8 (FC*)</b>	289,2	1,91	1,76
<b>Paciente 8 (Roche**)</b>	60,6	1,76	1,35
<b>Paciente 9 (FC*)</b>	168,9	1,88	1,73
<b>Paciente 9 (Roche**)</b>	80,9	1,77	1,68
<b>Paciente 10 (FC*)</b>	217,3	1,86	2,12
<b>Paciente 10 (Roche**)</b>	366,5	1,77	1,47
<b>Paciente 11 (FC*)</b>	188,8	1,72	1,97
<b>Paciente 11 (Roche**)</b>	119,4	1,74	1,62

\* Eluição em 30  $\mu\text{L}$ ; \*\*Eluição em 100  $\mu\text{L}$

Os resultados obtidos utilizando o método de extracção com fenol-clorofórmio, comparativamente à extracção com o kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche, revelam que a quantidade de DNA extraída pelo primeiro método foi significativamente inferior (eluição em apenas 30  $\mu\text{L}$ ) à quantidade extraída usando o kit comercial. No que se refere aos graus de pureza do DNA não existem diferenças significativas entre os dois métodos, sendo os valores, para a maioria dos casos, bastante satisfatórios.

Assim, após testadas as metodologias, optou-se pela extração com o kit High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche. Nos casos das amostras FFEP, o método de desparafinização utilizado foi o estabelecido no protocolo 1, em cortes de 20 $\mu$  de cada bloco de cada paciente, com digestão durante a noite. Para as amostras fixadas em formalina, o processo iniciou-se pela digestão mecânica e utilizou-se o mesmo tempo de digestão e o mesmo kit comercial, nas amostras seguintes. Para as 9 amostras de FFEP (pacientes 1-9) e as 3 de tecido fixado em formalina (pacientes 10-12) os melhores resultados obtidos estão resumidos na tabela 15:

**Tabela 15** – Quantificação do DNA das amostras dos pacientes 1 a 12.

<b>Amostra</b>	<b>[ ] <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Paciente 1</b>	32,2	1,70	1,32
<b>Paciente 2</b>	65,6	1,81	1,78
<b>Paciente 3</b>	26,1	1,67	0,89
<b>Paciente 4</b>	72,7	1,79	1,64
<b>Paciente 5</b>	57,7	1,69	1,86
<b>Paciente 6</b>	34,1	1,64	1,78
<b>Paciente 7</b>	37,6	1,59	1,39
<b>Paciente 8</b>	60,6	1,76	1,35
<b>Paciente 9</b>	80,9	1,77	1,68
<b>Paciente 10</b>	366,5	1,77	1,47
<b>Paciente 11</b>	119,4	1,74	1,62
<b>Paciente 12</b>	71,5	1,86	1,98

A quantidade do DNA genómico obtido pelas técnicas avaliadas foi adequada. Relativamente à relação 260/280, utilizada para verificar o grau de pureza do DNA, para alguns casos os valores são relativamente baixos, embora satisfatórios para a maioria. Para a relação 260/230, que se refere a um grau de pureza secundário, os resultados obtidos apresentam valores inferiores aos referidos para amostras ideais, indicando a presença de contaminantes.

Estes resultados desencadearam um consenso com o Instituto Nacional de Medicina Legal – Delegação do Centro, e a partir do final de 2010, passaram a ser enviadas para o laboratório amostras de sangue colhidas na altura da autópsia para extração de DNA e posterior análise molecular. Foram



recebidas até Junho de 2011 quatro amostras nestas condições. Uma vez que se tratavam de amostras de sangue em EDTA, a extracção de DNA foi realizada com o Kit JetQuick MidiPrep da Genomed. Ao protocolo estabelecido pelo fabricante fizeram-se ligeiras alterações para melhorar a extracção, uma vez que o sangue proveniente da autópsia, provavelmente devido a efeitos *postmortem*, apresentava uma textura mais espessa, obstruindo a membrana da coluna de extracção. A eluição foi realizada em 800 $\mu$ L, em vez dos 1000 $\mu$ L indicados pelo fabricante, e o volume inicial de sangue também foi menor. A quantidade e a pureza do DNA genómico foram determinadas obtendo-se os seguintes resultados (Tabela 16):

**Tabela 16** – Determinação da quantidade e qualidade do DNA extraído de sangue colhido na autópsia

<b>Amostra</b>	<b>[ ] <math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Paciente 13</b>	49,2	1,81	1,44
<b>Paciente 14</b>	72,1	1,87	2,34
<b>Paciente 15</b>	21,3	1,74	1,25
<b>Paciente 16</b>	68,2	1,83	2,14

Embora os valores relativos à concentração do DNA não sejam muito elevados, os valores apresentados para a relação 260/280 estão muito perto do valor ideal (1,8), com apenas um caso (paciente 15) a apresentar um valor ligeiramente inferior.

Foram enviadas para o Laboratório de Genética Humana da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa amostras dos pacientes 1 a 11 e aplicadas no sistema *Sequenom MassARRAY*. Os pacientes 12 a 16 chegaram ao laboratório numa fase posterior, não sendo incluídos neste primeiro grupo. Actualmente estão em processamento no laboratório de Lisboa.

### **3.2 Mutações detectadas no Sistema *Sequenom MassARRAY***

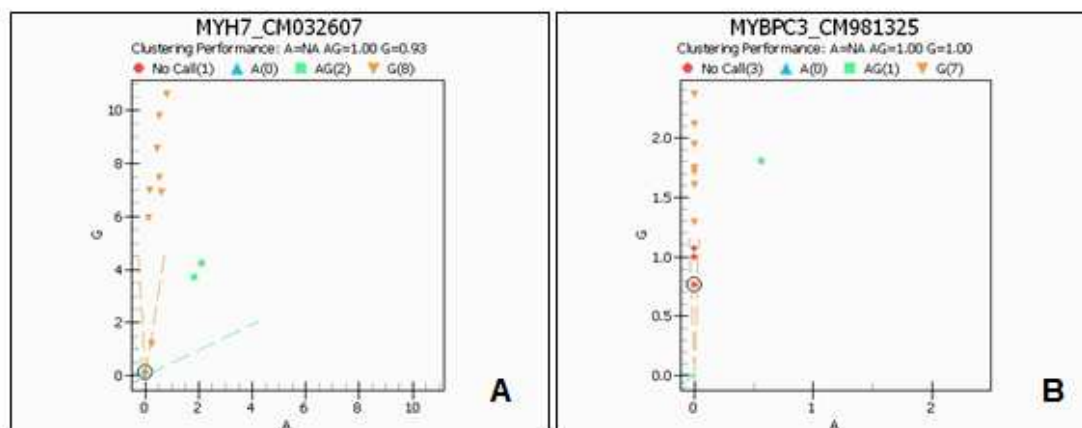
As amostras de DNA dos pacientes 1 a 11 foram aplicadas no sistema *Sequenom MassARRAY* e obtiveram-se resultados para a maioria das amostras. No entanto, devido qualidade do DNA das amostras, a análise dos resultados indica que muitas das alterações poderão ser falsos positivos, uma

vez que apresentam níveis de extensão muito baixos e gráficos difusos. As alterações mais prováveis estão descritas na tabela 17.

**Tabela 17** – Alterações encontradas no sistema *Sequenom MassARRAY* no grupo de pacientes 1-11 (\* analisadas posteriormente por sequenciação automática).

Paciente	Gene	Codão	Alteração	Alteração nt
<b>Paciente 1</b>	ACTC1	307	Met-Leu	ACT>CTG
	TPM1	180	Glu-Val	GAG>GTG
<b>Paciente 2</b>	TPM1	180	Glu-Val	GAG>GTG
	TCAP	137	Thr-Ile	ACA>ATA
<b>Paciente 4</b>	MYBPC3*	(intrão 33)		G>A
	MYH7	824	Val-Ile	gGTC>ATC
	MYH7	778	Asp-Gly	GAC>GGC
	TNNT2	271	Asn-Ile	AAC>ATC
<b>Paciente 5</b>	TNNT2*	251	Glu-Asp	GAGg>GAT
	TNNT2*	285	Arg-Cys	cCGC>TGC
<b>Paciente 6</b>	MYH7	404	Val-Leu	gGTG>TTG
	OBSCN	4344	Arg-Gln	CGG>CAG
	MYBPC3	755	Asn-Lys	AACc>AAA
<b>Paciente 8</b>	CSRP3*	58	Cys-Gly	cTGC>GGC
	MYH7	824	Val-Ile	gGTC>ATC
	MYKL2	95	Ala-Glu	GCA>GAA
	MYBPC3	811	Lys-Arg	AAG>AGG
	TNNT2	285	Arg-Cys	cCGC>TGC
<b>Paciente 9</b>	CSRP3*	58	Cys-Gly	cTGC>GGC
	MYKL2	95	Ala-Glu	GCA>GAA
	TNNT2*	271	Asn-Ile	AAC>ATC
<b>Paciente 10</b>	MYOZ2	48	Ser-Pro	aTCC>CCC
<b>Paciente 11</b>	MYBPC3*	502	Arg-Gln	CGG>CAG
	MYBPC3*	811	Lys-Arg	AAG>AGG
	MYBPC3*	(intrão 33)		G>A

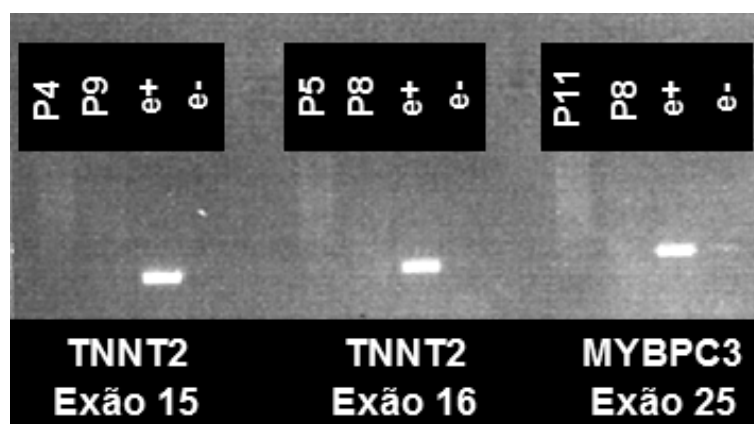
A análise dos resultados obtidos no sistema *Sequenom MassARRAY* demonstrou uma correlação clara com a qualidade da amostra. Embora para alguns casos os níveis de extensão apresentados sejam adequados, para a maioria a extensão é muito baixa (Figura 15), o que evidencia a falta de qualidade do DNA das amostras. Desta forma, sendo a taxa de detecção muito baixa para a primeira *call* do software, foi necessário recorrer um nível de sensibilidade superior - o *cluster call* que poderá originar falsos positivos.



**Figura 15** – Representação gráfica da análise por iPlex MassARRAY. **A.** *Cluster plot* para uma mutação em MYH7, para os pacientes 4 e 8, com bons níveis de extensão. Os quadrados verdes representam os pacientes 4 e 8 e o *cluster* de triângulos a laranja representa amostras sem mutação. **B.** *Cluster plot* para uma mutação em MYBPC3 para o paciente 11, com muito baixa extensão. O quadrado verde representa o paciente 11 e o *cluster* de triângulos a laranja representa amostras sem mutação.

### 3.3 Confirmação dos resultados por Sequenciação Automática

Num laboratório de diagnóstico, a introdução de uma nova tecnologia tem, obrigatoriamente, de ser confirmada por outra metodologia até à sua validação. Assim, os resultados obtidos no sistema *Sequenom MassARRAY* teriam de ser confirmados por sequenciação. No entanto, embora a concentração de DNA das amostras apresentasse valores aceitáveis, não foi possível amplificar o DNA por PCR para a reacção de sequenciação automática, da maioria dos pacientes. A razão mais provável para esta dificuldade está na fragmentação do DNA resultante do processo de fixação do material da autópsia. A figura 16 evidencia um exemplo dos resultados obtidos na electroforese dos produtos de amplificação com *primers* específicos para cada exão. Nestes casos, não foi visualizado resultado de amplificação para os exões 15 e 16 do gene TNNT2 e para o exão 25 de MYBPC3, dos pacientes 4, 5, 8, 9 e 11.



**Figura 16** – Electroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR para os exões 15 e 16 do gene TNNT2 e para o exão 25 do gene MYBPC3, dos pacientes 4, 5, 8 e 9 (amostras FFEP) e do paciente 11 (coração em formalina). P - paciente; e<sup>+</sup> - controlo positivo; e<sup>-</sup> - controlo negativo (amostra sem DNA).

Em comparação com o controlo positivo (e<sup>+</sup>), nenhuma banda foi observada nos pacientes, para os produtos de amplificação dos diferentes exões. Estes resultados negativos podem ser resultantes da fragmentação do DNA, uma vez que relativamente ao controlo negativo (e<sup>-</sup>) se pode observar algum “arrastamento” (*smearing*) no gel de agarose.

Para os pacientes 8 e 9 os produtos de amplificação para o exão 3 do gene CSRP3 evidenciaram uma banda, embora mais fraca relativamente à banda apresentada pelo produto de PCR relativo ao DNA de sangue periférico de um doente com CMH (Figura 17).



**Figura 17** – Electroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR para o exão 3 do gene CSRP3 dos pacientes 8 e 9 (amostras FFEP) comparativamente com DNA extraído de sangue periférico, de um doente com CMH (Sg); e<sup>-</sup> - controlo negativo.

Numa tentativa de confirmar as mutações encontradas, foi investigada junto da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal se existiam

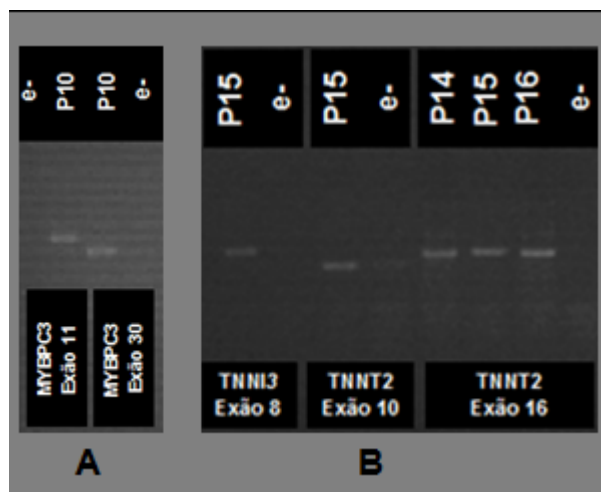
amostras de tecidos congelados, sem fixação em formalina, dos pacientes que apresentavam mutações que necessitavam de confirmação por sequenciação automática. Para os casos mais antigos as amostras já tinham sido destruídas; no entanto, para cinco dos pacientes (pacientes 4, 5, 9, 10 e 11) existia sangue congelado disponível no INML (cardíaco e/ou periférico). Procedeu-se à extracção do DNA destas amostras, utilizando o método usado para a extracção de DNA dos sangues colhidos na altura da autópsia. Os resultados da quantificação no Nanodrop estão apresentados na tabela 18.

**Tabela 18** – Quantificação do DNA extraído de sangue congelado, proveniente do INML (SCC – sangue da cavidade cardíaca; SP – sangue periférico).

<b>Amostra</b>	<b>[ ] <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Paciente 4 (SCC)</b>	76,1	2,00	2,14
<b>Paciente 5 (SCC)</b>	35,7	1,62	1,40
<b>Paciente 9 (SCC)</b>	17,9	1,57	1,10
<b>Paciente 9 (SP)</b>	21,6	2,15	1,72
<b>Paciente 10 (SCC)</b>	26,8	1,40	1,23
<b>Paciente 10 (SP)</b>	24,0	1,43	1,35
<b>Paciente 11 (SCC)</b>	74,3	1,85	2,22
<b>Paciente 11 (SP)</b>	7,7	2,64	1,61

Os resultados obtidos, relativamente à quantidade de DNA extraído das amostras de sangue congeladas, revelaram concentrações mais baixas relativamente aos sangues colhidos na autópsia. No que respeita à qualidade de DNA, os valores obtidos são pouco satisfatórios, indicando a influência de factores como a idade da amostra, modo de conservação ou efeitos desenvolvidos *postmortem*.

No entanto, os produtos de amplificação destes sangues congelados na Toxicologia Forense apresentam resultados de amplificação positivos (Figura 18A), e quando comparados com os produtos de PCR de sangues recolhidos na altura da autópsia, não são identificáveis diferenças significativas (Figura 18B).



**Figura 18** – Electroforese em gel de agarose 2% para a comparação da eficiência de amplificação dos produtos de PCR dos exões 11 e 30 do gene MYBPC3 de DNA extraído de sangue armazenado na toxicologia forense do paciente 10 (A), e do exão 8 do gene TNNI3 e dos exões 10 e 16 do gene TNNT2 dos pacientes 14,15 e 16 de DNA extraído de sangue colhido na altura da autópsia (B); e<sup>-</sup> - controlo negativo.

Desta forma, foram analisados por sequenciação automática algumas das possíveis alterações detectadas no sistema *Sequenom MassARRAY*, para os pacientes 4, 5, 9, 10 e 11 (Tabela 14). As restantes mutações aguardam confirmação, uma vez que não existem *primers* para todos os exões no LGMC. Nenhuma das alterações analisadas foi confirmada até à data, muito provavelmente por serem devidas a artefactos induzidos pela fixação do material biológico ou por se tratarem de falsos positivos induzidos pela necessidade de aumentar a especificidade e sensibilidade da técnica devido à qualidade reduzida do DNA.

Para avaliar a eficiência da sequenciação automática dos casos de sangue colhido na autópsia foram analisados, por sequenciação, alguns exões dos genes MYH7, MYBPC3, TNNT2 e TNNI3 para estes pacientes. Concluiu-se que a amplificação dos produtos de extracção é possível (Figura 18B), assim como a análise da sequência, embora sejam necessárias algumas adaptações. Estes casos irão ser analisados na próxima aplicação no sistema *Sequenom MassARRAY* e se forem detectadas alterações, serão analisadas por sequenciação para confirmação dos resultados.

## Capítulo 4

---

## 4. Discussão

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é a doença cardíaca hereditária mais comum, com uma prevalência de 1:500 na população em geral. Caracteriza-se por hipertrofia ventricular esquerda de causa inexplicada. Apresenta grande variabilidade na expressão clínica, morfológica e genética. Clinicamente a CMH é muito heterogénea; muitos pacientes permanecem assintomáticos durante toda a vida, outros desenvolvem sintomas de fibrilhação auricular e/ou insuficiência cardíaca e alguns são vítimas de morte súbita, normalmente ainda jovens e sem sintomas prévios, sendo a CMH a causa mais comum de morte súbita em atletas (Alcalai *et al.*, 2008; Maron, 2002; Maron, 2010a; Roncarati *et al.*, 2011).

Muitos pacientes com CMH, com risco de morte súbita cardíaca (MSC) devido a taquicardia/fibrilhação ventricular, podem ser reconhecidos pela presença de um ou mais factores de risco. A identificação destes pacientes de alto-risco é crucial, uma vez que os cardioversores desfibriladores implantáveis (CDI) provaram ser eficientes na prevenção de MSC nesta doença (Maron, 2010b; Maron *et al.*, 2011). No entanto, o reconhecimento que alguns pacientes sem factores de risco convencionais podem, ocasionalmente, sofrer eventos arrítmicos imprevistos, sugere que o actual modelo de estratificação de risco está incompleto. Existe, conseqüentemente, um interesse aumentado no desenvolvimento de factores de risco adicionais (Maron, 2010b; Maron *et al.*, 2008). A genotipagem da CMH tem sido considerada como uma estratégia potencial através da qual pacientes com um substrato eléctrico miocárdico instável e risco aumentado de MSC podem ser identificados pela presença de uma mutação sarcomérica “maligna” num só gene (Ho, 2010a). No entanto, durante as duas últimas décadas, a análise mutacional provou ser imprecisa na previsão do diagnóstico e evolução para pacientes individuais com esta doença complexa devido, maioritariamente, à vasta heterogeneidade genética – com centenas de mutações reconhecidas em pelo menos 11 genes sarcoméricos e noutros genes relacionados com proteínas do sarcómero (Maron *et al.*, 2011). Recentemente, no entanto, a presença de duas (ou mais) mutações nestes genes, em pacientes com CMH, tem sido frequentemente descrita na literatura, levando à dedução que este estado genético complexo promove uma maior



severidade da doença e influencia a história natural de alguns pacientes. (Frazier *et al.*, 2008; Girolami *et al.*, 2010; Ingles *et al.*, 2005; Kelly and Semsarian, 2009; Landstrom and Ackerman, 2010; Maron *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2003; Van Driest *et al.*, 2004). Estes dados, evidenciam a importância do papel dos testes genéticos na avaliação clínica de pacientes com CMH, incluindo nas estratégias de avaliação dos factores de risco (Maron *et al.*, 2011).

Neste contexto, a análise molecular em vítimas de MSC que evidenciem sinais de CMH, sem diagnóstico prévio estabelecido, com o objectivo de identificar a mutação subjacente, é de extrema importância. A identificação de uma mutação causal estabelece o diagnóstico definitivo da causa de morte e pode promover o acompanhamento e prevenção de novos casos nos familiares sobreviventes (Basso *et al.*, 2008).

A Morte Súbita Cardíaca (MSC) é um grande problema de saúde pública, contribuindo para aproximadamente 20% da mortalidade no mundo ocidental (Sung and Lauer, 2000).

A MSC de um jovem tem um enorme impacto nos familiares sobreviventes. Envolve vários sentimentos de ansiedade, incompreensão e revolta, devido ao facto de tal evento dramático não poder ser antecipado. Nas últimas décadas tornou-se claro que doenças hereditárias cardíacas estão muitas vezes na base da MSC do jovem (Basso *et al.*, 2001; Thiene *et al.*, 2009). No entanto, em alguns casos, particularmente em jovens, o coração pode apresentar-se anatómica e histologicamente normal (Basso *et al.*, 2001; di Gioia *et al.*, 2006; Doolan *et al.*, 2004; Tester and Ackerman, 2007). Tem sido descrito que em cerca de metade das vítimas jovens de MSC de 1 a 35 anos, nenhuma causa óbvia de morte é encontrada após a autópsia médico-legal, e a morte súbita nestes jovens ocorre frequentemente como o sintoma inaugural, sem aviso prévio. A percentagem de MSC é variável de acordo com a idade do grupo estudado e os critérios de diagnóstico. Estudos populacionais mostraram que pelo menos 3% e provavelmente cerca de 30 % de MS envolvendo crianças e jovens adultos não têm anomalias morfológicas identificáveis na autópsia, sendo a causa de morte catalogada como morte súbita inexplicada (MSI)

(Corrado *et al.*, 2001; Morentin *et al.*, 2003; Puranik *et al.*, 2005; Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008).

Embora em muitos dos casos a causa da morte possa ser estabelecida, sendo as anomalias cardíacas evidentes na autópsia (Chugh *et al.*, 2000; Liberthson, 1996), um número significativo, especialmente entre os jovens, permanece inexplicado após uma investigação médico-legal, incluindo a autópsia e os testes laboratoriais (Rodriguez-Calvo *et al.*, 2008).

A maioria destas MSC nos jovens tem uma base genética, manifestando-se no grupo das cardiomiopatias hereditárias, como a cardiomiopatia hipertrófica e cardiomiopatia/displasia arritmogénica do ventrículo direito e como consequência de mutações nos canais iónicos, responsáveis por anomalias hereditárias, como a síndrome de QT longo, a síndrome de Brugada, a síndrome de QT curto e a taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (Brion *et al.*, 2010b). A maioria destas doenças é geneticamente heterogénea, dificultando o diagnóstico e o aconselhamento genético.

Num estudo anteriormente publicado por Tan e colaboradores (2005) é descrita a importância do exame cardíaco e genético para o diagnóstico nos familiares da vítima, especialmente em famílias com mais de dois casos reportados de MSC em indivíduos jovens ( $\leq 40$  anos) (Tan *et al.*, 2005).

A combinação do conhecimento dos genes em diferentes causas de MSC e a disponibilidade de várias tecnologias genómicas permitiu um avanço considerável no número de casos que podem ser diagnosticados, com o benefício não só de determinar a causa de morte, mas também de permitir o aconselhamento genético a familiares em risco (Brion *et al.*, 2010b).

A autópsia molecular em vítimas de MSC assintomáticos e com sinais de CMH na autópsia poderá contribuir para a determinação da causa de morte e para que sejam estabelecidos factores de risco em familiares assintomáticos, portadores da mesma mutação. O teste genético é igualmente aconselhável em casos de MS com corações estruturalmente normais na autópsia, mas com história familiar de morte súbita cardíaca e doença arritmogénica (Allegue *et al.*, 2011).

Como consequência do aumento do conhecimento da base genética da MSC, a utilidade da autópsia molecular tem sido defendida por diversos autores. Embora a análise molecular em casos de MSC consuma muito tempo e

recursos (humanos e monetários), o estabelecimento da base genética da MS é essencial para o acompanhamento clínico e aconselhamento genético das famílias afectas por este evento súbito (Basso *et al.*, 2008; Ingles and Semsarian, 2007).

O desenvolvimento actual parece indicar que estratégias de genotipagem disponíveis irão contribuir no futuro próximo para estudos mais abrangentes e a custos mais baixos (Brion *et al.*, 2010b).

Pretendia-se com o presente trabalho avaliar a possibilidade de realizar a avaliação genética retrospectiva de autópsias com evidências de CMH e autópsias negativas realizadas no INML bem como avaliar a eficácia da implementação do teste genético nas autópsias de morte súbita de causa indeterminada em casos futuros, a chamada autópsia molecular.

A pesquisa de mutações na maioria dos grupos de pacientes com CMH é rotineiramente efectuada por sequenciação automática ou pela utilização de métodos de rastreio tais como o DHPLC (do inglês - *Denaturing high performance liquid chromatography*) ou SSCP (do inglês - *Single-Strand Conformation Polymorphism*) (Garcia-Castro *et al.*, 2007; Olivotto *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2003; Van Driest *et al.*, 2003; Van Driest *et al.*, 2004). Estes métodos de detecção de mutações são dispendiosos e tecnicamente muito laboriosos. A análise por desnaturação de alta resolução (HRM do inglês - *High Resolution Melting*) tem sido bem sucedida na resolução de muitas destas limitações e consiste num método de detecção com uma taxa de quase 100% de sucesso (Millat *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011). O sistema *Sequenom MassARRAY*, baseado na tecnologia de MALDI-TOF semiautomática, permite a obtenção de rastreios rápidos e eficazes de mutações descritas para genes associados na bibliografia a CMH (Allegue *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011).

No presente trabalho a análise genética da CMH em casos de MSC em vítimas com fenótipo de CMH ou de causa indeterminada, foi realizada utilizando o sistema *Sequenom MassARRAY*.

Foram analisadas, numa fase inicial, diferentes condições para a extracção de DNA das amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFEP) e para as amostras fixadas em formalina, recebidas da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal. Os testes efectuados demonstraram que o DNA extraído de tecidos fixados em formalina não era limitante relativamente

à quantidade, mas, no que respeita à qualidade, as amostras revelaram que o DNA apresentava níveis de fragmentação muito elevados e baixos graus de pureza.

Amostras de DNA resultantes destes casos foram aplicadas no sistema *Sequenom MassARRAY*, onde foram testadas mais de 500 mutações conhecidas em 32 genes associados à CMH. Para a maioria dos casos analisados na primeira abordagem realizada pelo sistema foram encontradas alterações prováveis em alguns genes. No entanto, a confirmação posterior dos resultados por sequenciação automática demonstrou a baixa qualidade das amostras e a falha de extensão para a maioria das mutações testadas, evidenciando o elevado nível de fragmentação dos ácidos nucleicos. De facto, para a maioria das amostras o PCR realizado para a amplificação dos produtos de extensão, não revelou resultados. O "arrastamento" (do inglês – *smearing*) revelado pela electroforese em gel de agarose demonstrou níveis de fragmentação muito elevados. Para duas amostras foi possível realizar o PCR para amplificação dos produtos de extensão nas amostras FFEP, no entanto, a sequenciação automática não confirmou os resultados obtidos no sistema *Sequenom MassARRAY*.

Num estudo recente, elaborado por Carturan e colaboradores, foram comparados diferentes métodos de desparafinização, extracção e purificação para estabelecer o melhor protocolo para a obtenção de DNA de amostras FFEP, com qualidade suficiente para proceder ao teste genético *postmortem* em autópsias negativas. Os autores realizaram o teste genético da taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, uma causa genética comum das autópsias negativas. Analisaram igualmente a fiabilidade dos resultados obtidos em DNA extraído de amostras FFEP. Apesar de neste estudo, tal como no apresentado neste trabalho, se ter obtido DNA de qualidade satisfatória para a maioria dos casos estudados, apenas uma pequena percentagem mostrou resultados para a amplificação dos produtos de PCR, referindo os autores, que o sucesso do PCR está fortemente dependente do tamanho dos produtos de amplificação. À semelhança do sucedido no nosso estudo, também neste artigo as alterações encontradas não foram confirmadas por sequenciação posterior. Os autores referem os artefactos relacionados com o procedimento de fixação como responsáveis por esta discordância de resultados.

Embora as dificuldades apresentadas no presente estudo, relativamente às dificuldades na amplificação por PCR de amostras FFEP e fixadas em formalina, bem como na fiabilidade dos resultados obtidos, se encontre descrita na literatura, como no exemplo do artigo referido anteriormente, era importante sequenciar as regiões que demonstraram alterações no sistema *Sequenom MassARRAY*. Neste sentido, amostras de sangue congeladas e armazenadas na Toxicologia Forense, onde permanecem por períodos de tempo específicos, após os quais são destruídas, foram recolhidas. Embora não existisse material disponível para todos os pacientes analisados, ou porque já tinham sido eliminadas ou por ausência de amostra, em 5 pacientes estavam armazenados no Serviço de Toxicologia Forense, amostras de sangue periférico e/ou cardíaco congeladas.

O DNA extraído destas amostras, sendo quantitativamente e qualitativamente inferior ao DNA extraído de sangue periférico fresco, apresentou bons resultados na amplificação por PCR e na análise por sequenciação. Assim, para estes 5 pacientes foi realizada a sequenciação automática para confirmação das alterações encontradas e para as quais existiam *primers* disponíveis. Nenhuma das alterações foi confirmada até à data.

Apesar de não ter sido possível confirmar as alterações encontradas, tanto devido à necessidade de aumentar sensibilidade e especificidade da técnica, originando falsos positivos, como devido à qualidade das amostras de DNA extraído de amostras FFEP ou fixadas em formalina, que se apresentam muito fragmentadas e com possibilidade de artefactos induzidos pelos métodos de fixação, o presente estudo permitiu estabelecer que a análise em amostras de qualidade baixa, mas não fixadas em formalina, pode ser uma realidade para uma avaliação inicial em sistemas de detecção de larga escala para mutações conhecidas. A constatação de que amostras de DNA com elevados níveis de degradação obtêm resultados na plataforma *MassARRAY* é devida ao facto dos testes serem efectuados em *amplicons* com cerca de 100 pb. Assim, adicionalmente, este trabalho sugere a possibilidade da utilização de amostras de sangue, cardíaco ou periférico, normalmente arquivadas na toxicologia, de autópsias de morte súbita de causa indeterminada, que parecem representar uma boa fonte de DNA nestes casos.

Um artigo muito recente, realizado por Allegue e colaboradores (Allegue *et al.*, 2011), relativamente à prevalência de mutações de CMH e Síndrome de QT longo em casos de morte súbita em jovens, utilizando a tecnologia do sistema *Sequenom MassARRAY* e sequenciação automática, revelou que em 4 dos 49 casos analisados foram encontradas mutações patogénicas, provavelmente responsáveis pela morte súbita nestes pacientes. Apenas uma das quatro mutações reportadas estava relacionada com a CMH.

A ausência de mutações confirmadas no nosso estudo não deve, portanto, ser desmotivante. Pretendia-se avaliar a possibilidade de realizar, tanto o estudo retrospectivo como prospectivo de casos de autópsias de MS de causa indeterminada ou com fenótipos de hipertrofia. Uma vez que não foram incluídos na investigação todos os genes associados a MSC, e dadas as dificuldades apresentadas na extração de DNA de amostras FFEP a ausência de mutações encontradas seria previsível.

A padronização da autópsia em casos de MSC e MSI é uma ferramenta importante para a investigação das causas de morte e facilita a comparação e partilha de dados de várias fontes. A estreita relação entre o patologista e o geneticista pode igualmente fornecer pistas importantes para o estudo genético.

Um documento bastante recente publicado em Junho deste ano, por um painel extenso de colaboradores da *Heart Rhythm Society* e da *European Heart Rhythm Association* (Ackerman *et al.*, 2011), refere as normas para a realização de testes genéticos nas cardiomiopatias e canalopatias. O documento recomenda a realização do teste genético, por rotina, em casos de CMH para os genes mais comuns, bem como apresenta as recomendações para a realização do estudo molecular em casos de morte súbita em casos de morte súbita inexplicada (MSI). Neste contexto, as indicações referem que para todos os casos de MSI e síndrome de morte súbita infantil, uma amostra de 5ml de sangue em EDTA, mancha de sangue ou amostra de tecido congelada, devem ser colhidos na altura da autópsia, para posterior teste genético – autópsia molecular. Se após a realização de todos os exames complementares a causa de morte não for estabelecida, o teste genético deve ser realizado nos genes RYR2, KCNQ1, KCNH2 e SCN5A.

Apesar das recomendações actuais, um estudo realizado por Michaud e colaboradores (Michaud *et al.*, 2011) que analisa os resultados de um inquérito realizado a nível europeu, demonstrou a aplicabilidade limitada do teste genético em casos de MSC na rotina da investigação forense. Apenas 40% dos inquéritos respondidos referem a possibilidade de realizar teste genético. O estudo refere ainda que muitos dos problemas envolvidos na investigação de casos de MSC têm uma origem económica.

Neste contexto, um segundo objectivo do trabalho apresentado referia-se à avaliação da possibilidade de implementação da autópsia molecular em casos de MSC ocorridos em Portugal. Desta forma, foi efectuado um acordo com a Delegação do Centro do INML, com o objectivo de serem colhidas na autópsia amostras de sangue em EDTA da vítima. Foram recebidas desde o final de 2010, quatro amostras nestas condições. Procedeu-se à extracção do DNA e avaliou-se a eficácia do PCR para a amplificação dos produtos de extensão para a sequenciação automática. Os sangues provenientes da autópsia apresentam uma textura mais espessa, provavelmente devido a efeitos *postmortem*, mas os resultados são bastante satisfatórios tanto no que se refere ao PCR como à análise por sequenciação automática. Estas amostras aguardam a realização futura do teste genético.

Como foi anteriormente referido, a análise molecular de todos os genes associados à MSC envolve uma pesquisa extensiva, laboriosa e dispendiosa, uma vez que muitas patologias, com heterogeneidade genética elevada estão envolvidas neste evento súbito. Desta forma, as amostras ficam armazenadas a -20°C até que seja estabelecida a conclusão final da autópsia. A estreita relação entre o patologista forense e o geneticista pode fornecer pistas importantes para o estudo genético, nomeadamente no que diz respeito ao resultado dos estudos complementares da autópsia, que podem em alguns casos estabelecer a causa de morte, dispensando a análise molecular em casos de morte não cardíaca ou orientar o teste genético, como por exemplo, em casos em que hipertrofia é diagnosticada por dissecção do coração ou por histologia, realizadas posteriormente à autópsia.

Avanços recentes na área da patologia molecular e genética resultaram na possibilidade de testar muitas mutações genéticas. Na prática forense de

---

muitos países, incluindo Portugal, o estudo genético não é indicado. No entanto, em grupos seleccionados tais como, vítimas com história familiar de MSC, o estudo genético pode ser justificado (Sung et al., 2008).

A sequenciação automática dos genes mais frequentemente envolvidos, a técnica usual no diagnóstico genético de CMH em Portugal, é cara e laboriosa, com pouca sensibilidade para a detecção de CNVs ou inserção/deleção, e não avalia todos os genes relacionados com a CMH (Santos *et al.*, 2011). A existência de mais de 1000 mutações fenotipicamente associadas a CMH faz com que a SA seja falível, lenta e dispendiosa podendo o *Iplex MassArray* representar uma tecnologia alternativa.

Assim, propõe-se que o estudo genético em vítimas de MSC, com evidências de CMH sem diagnóstico prévio e em casos de morte súbita de causa indeterminada após a realização da autópsia e dos exames complementares, seja iniciado pelo rastreio das principais mutações associadas à CMH e síndromes arrítmicas, utilizando a tecnologia do sistema *Sequenom MassARRAY*.

O teste genético proposto permite proporcionar um rastreio rápido de mutações nos genes mais frequentemente envolvidos na MSC de jovens, com uma melhor relação custo/benefício.



## Capítulo 5

---

## 5. Conclusão e Perspectivas Futuras

A genética tem vindo a ter um impacto crescente em muitas especialidades médicas. Esta revolução genética iniciou-se com o conhecimento do genoma humano e avançou exponencialmente com o desenvolvimento de novas tecnologias genómicas, que permitiram a identificação da base genética de um grande número de doenças. Também a nível das ciências forenses, a genética tem desempenhado um papel importante, não só pela introdução dos perfis genéticos mas também no âmbito da toxicologia e patologia forenses. Um bom exemplo desta última aplicação está na investigação *postmortem* da morte súbita cardíaca (MSC) – a autópsia molecular.

Em termos de perspectivas futuras, a autópsia molecular poderá estar formalmente indicada para vítimas de morte súbita com autópsia negativa ou com doenças hereditárias cardíacas detectáveis.

A análise genética proposta permite proporcionar um rastreio rápido de mutações nos genes mais frequentemente envolvidos na MSC de jovens, com uma boa relação custo/benefício.

O teste genético pode fornecer uma resposta em 35% dos casos e conduzir à prevenção da MSC de alguns membros da família, devendo tornar-se prontamente disponível. Neste sentido, será muito importante estabelecer um protocolo com o INML, delineando estratégias a aplicar em casos de MSC, bem como avaliar a possibilidade de realizar um estudo retrospectivo. É igualmente de extrema importância o estabelecimento de protocolos relativamente à obtenção de fontes de DNA de boa qualidade, que sejam adicionadas ao modelo seguido na análise *postmortem* de casos de MSC. Outro ponto importante refere-se ao facto de avaliar casos de MSC que possuam amostras na toxicologia forense, que são destruídas após o período legal previsto, podendo no entanto, representar uma óptima fonte de material biológico para este tipo de estudos, um facto que não encontramos descrito na literatura.

Embora, com a elaboração deste trabalho final do projecto de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, se finalize uma etapa, o entusiasmo e as perspectivas futuras da aplicabilidade das metodologias testadas, sublinham o pensamento que não se trata do fim de um ciclo, mas da primeira, de muitas

etapas a desenvolver. Neste contexto, amostras de sangue colhido na altura da autópsia de vítimas de morte súbita cardíaca, continuam a ser processadas no nosso laboratório com a finalidade de prosseguir com o projecto.



## **Referências Bibliográficas**

---

## Referências Bibliográficas

- Ackerman, M. J.; Priori, S. G.; Willems, S.; Berul, C.; Brugada, R.; Calkins, H.; Camm, A. J.; Ellinor, P. T.; Gollob, M., *et al.* (2011). 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* **8**, 1308-39.
- Ackerman, M. J.; Tester, D. J. and Driscoll, D. J. (2001). Molecular autopsy of sudden unexplained death in the young. *Am J Forensic Med Pathol* **22**, 105-11.
- Ackerman, M. J.; VanDriest, S. L.; Ommen, S. R.; Will, M. L.; Nishimura, R. A.; Tajik, A. J. and Gersh, B. J. (2002). 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* **39**, 2042-8.
- Adabag, A. S.; Luepker, R. V.; Roger, V. L. and Gersh, B. J. (2010). Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. *Nat Rev Cardiol* **7**, 216-25.
- Ahmad, F. (2003). The molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia-cardiomyopathy. *Clin Invest Med* **26**, 167-78.
- Alcalai, R.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2008). Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* **19**, 104-10.
- Allegue, C.; Gil, R.; Blanco-Verea, A.; Santori, M.; Rodriguez-Calvo, M.; Concheiro, L.; Carracedo, A. and Brion, M. (2011). Prevalence of HCM and long QT syndrome mutations in young sudden cardiac death-related cases. *Int J Legal Med* **125**, 565-72.
- Allegue, C.; Gil, R.; Sanchez-Diz, P.; Torres, M.; Quintela, I.; Carracedo, A. and Brion, M. (2010). A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY system. *Electrophoresis* **31**, 1648-55.
- Alves, M. L.; Gaffin, R. D. and Wolska, B. M. (2010). Rescue of familial cardiomyopathies by modifications at the level of sarcomere and Ca<sup>2+</sup> fluxes. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 834-42.
- Arad, M.; Penas-Lado, M.; Monserrat, L.; Maron, B. J.; Sherrid, M.; Ho, C. Y.; Barr, S.; Karim, A.; Olson, T. M., *et al.* (2005). Gene mutations in apical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **112**, 2805-11.
- Arimura, T.; Bos, J. M.; Sato, A.; Kubo, T.; Okamoto, H.; Nishi, H.; Harada, H.; Koga, Y.; Moulik, M., *et al.* (2009). Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **54**, 334-42.
- Aviel-Ronen, S.; Qi Zhu, C.; Coe, B. P.; Liu, N.; Watson, S. K.; Lam, W. L. and Tsao, M. S. (2006). Large fragment Bst DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics* **7**, 312.
- Bashyam, M. D.; Savithri, G. R.; Kumar, M. S.; Narasimhan, C. and Nallari, P. (2003). Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC). *J Hum Genet* **48**, 55-64.
- Basso, C.; Burke, M.; Fornes, P.; Gallagher, P. J.; de Gouveia, R. H.; Sheppard, M.; Thiene, G. and van der Wal, A. (2008). Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Arch* **452**, 11-8.

- Basso, C.; Calabrese, F.; Corrado, D. and Thiene, G. (2001). Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. *Cardiovasc Res* **50**, 290-300.
- Behr, E.; Wood, D. A.; Wright, M.; Syrris, P.; Sheppard, M. N.; Casey, A.; Davies, M. J. and McKenna, W. (2003). Cardiologist assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet* **362**, 1457-9.
- Behr, E. R.; Dalageorgou, C.; Christiansen, M.; Syrris, P.; Hughes, S.; Tome Esteban, M. T.; Rowland, E.; Jeffery, S. and McKenna, W. J. (2008). Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J* **29**, 1670-80.
- Boateng, S. Y. and Goldspink, P. H. (2008). Assembly and maintenance of the sarcomere night and day. *Cardiovasc Res* **77**, 667-75.
- Bos, J. M.; Ommen, S. R. and Ackerman, M. J. (2007). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? *Curr Opin Cardiol* **22**, 193-9.
- Bos, J. M.; Poley, R. N.; Ny, M.; Tester, D. J.; Xu, X.; Vatta, M.; Towbin, J. A.; Gersh, B. J.; Ommen, S. R., *et al.* (2006). Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab* **88**, 78-85.
- Bos, J. M.; Towbin, J. A. and Ackerman, M. J. (2009). Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **54**, 201-11.
- Brinkmann, B. (1999). Harmonization of medico-legal autopsy rules. Committee of Ministers. Council of Europe. *Int J Legal Med* **113**, 1-14.
- Brion, M.; Allegue, C.; Gil, R.; Blanco-Verea, A.; Carracedo, A.; Pagannone, E.; Evangelista, A.; Di Castro, S.; Marchitti, S., *et al.* (2010a). Identification of a novel MYBPC3 gene variant in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Ann Clin Lab Sci* **40**, 285-9.
- Brion, M.; Quintela, I.; Sobrino, B.; Torres, M.; Allegue, C. and Carracedo, A. (2010b). New technologies in the genetic approach to sudden cardiac death in the young. *Forensic Sci Int* **203**, 15-24.
- Cao, W.; Hashibe, M.; Rao, J. Y.; Morgenstern, H. and Zhang, Z. F. (2003). Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev* **27**, 397-404.
- Carturan, E.; Tester, D. J.; Brost, B. C.; Basso, C.; Thiene, G. and Ackerman, M. J. (2008). Postmortem genetic testing for conventional autopsy-negative sudden unexplained death: an evaluation of different DNA extraction protocols and the feasibility of mutational analysis from archival paraffin-embedded heart tissue. *Am J Clin Pathol* **129**, 391-7.
- Charron, P.; Dubourg, O.; Desnos, M.; Isnard, R.; Hagege, A.; Bonne, G.; Carrier, L.; Tesson, F.; Bouhour, J. B., *et al.* (1998). Genotype-phenotype correlations in familial hypertrophic cardiomyopathy. A comparison between mutations in the cardiac protein-C and the beta-myosin heavy chain genes. *Eur Heart J* **19**, 139-45.
- Chaw, Y. F.; Crane, L. E.; Lange, P. and Shapiro, R. (1980). Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochemistry* **19**, 5525-31.
- Chiu, C.; Bagnall, R. D.; Ingles, J.; Yeates, L.; Kennerson, M.; Donald, J. A.; Jormakka, M.; Lind, J. M. and Semsarian, C. (2010). Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide analysis. *J Am Coll Cardiol* **55**, 1127-35.

- Christiaans, I.; Nannenbergh, E. A.; Dooijes, D.; Jongbloed, R. J.; Michels, M.; Postema, P. G.; Majoor-Krakauer, D.; van den Wijngaard, A.; Mannens, M. M., *et al.* (2010). Founder mutations in hypertrophic cardiomyopathy patients in the Netherlands. *Neth Heart J* **18**, 248-54.
- Chugh, S. S.; Kelly, K. L. and Titus, J. L. (2000). Sudden cardiac death with apparently normal heart. *Circulation* **102**, 649-54.
- Chugh, S. S.; Reinier, K.; Teodorescu, C.; Evanado, A.; Kehr, E.; Al Samara, M.; Mariani, R.; Gunson, K. and Jui, J. (2008). Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis* **51**, 213-28.
- Chugh, S. S.; Senashova, O.; Watts, A.; Tran, P. T.; Zhou, Z.; Gong, Q.; Titus, J. L. and Hayflick, S. J. (2004). Postmortem molecular screening in unexplained sudden death. *J Am Coll Cardiol* **43**, 1625-9.
- Chung, M. W.; Tsoutsman, T. and Semsarian, C. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: from gene defect to clinical disease. *Cell Res* **13**, 9-20.
- Cirino, A. L. and Ho, C. (1993). Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Overview.
- Cohle, S. D. and Sampson, B. A. (2001). The negative autopsy: sudden cardiac death or other? *Cardiovasc Pathol* **10**, 219-22.
- Coombs, N. J.; Gough, A. C. and Primrose, J. N. (1999). Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* **27**, e12.
- Corrado, D.; Basso, C.; Pavei, A.; Michieli, P.; Schiavon, M. and Thiene, G. (2006). Trends in sudden cardiovascular death in young competitive athletes after implementation of a preparticipation screening program. *JAMA* **296**, 1593-601.
- Corrado, D.; Basso, C. and Thiene, G. (2001). Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res* **50**, 399-408.
- Corrado, D.; Basso, C. and Thiene, G. (2005). Essay: Sudden death in young athletes. *Lancet* **366 Suppl 1**, S47-8.
- Coura, R.; Prolla, J. C.; Meurer, L. and Ashton-Prolla, P. (2005). An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* **58**, 894-5.
- de la Grandmaison, G. L. (2006). Is there progress in the autopsy diagnosis of sudden unexpected death in adults? *Forensic Sci Int* **156**, 138-44.
- Dedhia, P.; Tarale, S.; Dhongde, G.; Khadapkar, R. and Das, B. (2007). Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac J Cancer Prev* **8**, 55-9.
- di Gioia, C. R.; Autore, C.; Romeo, D. M.; Ciallella, C.; Aromatario, M. R.; Lopez, A.; Pagannone, E.; Giordano, C.; Gallo, P., *et al.* (2006). Sudden cardiac death in younger adults: autopsy diagnosis as a tool for preventive medicine. *Hum Pathol* **37**, 794-801.
- Dickstein, K.; Cohen-Solal, A.; Filippatos, G.; McMurray, J. J.; Ponikowski, P.; Poole-Wilson, P. A.; Stromberg, A.; van Veldhuisen, D. J.; Atar, D., *et al.* (2008). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* **10**, 933-89.



- Dimitrow, P. P.; Chojnowska, L.; Rudzinski, T.; Piotrowski, W.; Ziolkowska, L.; Wojtarowicz, A.; Wycisk, A.; Dabrowska-Kugacka, A.; Nowalany-Kozielska, E., *et al.* (2010). Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: old risk factors re-assessed in a new model of maximalized follow-up. *Eur Heart J* **31**, 3084-93.
- Doolan, A.; Langlois, N. and Semsarian, C. (2004). Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust* **180**, 110-2.
- Drory, Y.; Turetz, Y.; Hiss, Y.; Lev, B.; Fisman, E. Z.; Pines, A. and Kramer, M. R. (1991). Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol* **68**, 1388-92.
- Elger, B. S.; Michaud, K.; Fellmann, F. and Mangin, P. (2010). Sudden death: ethical and legal problems of post-mortem forensic genetic testing for hereditary cardiac diseases. *Clin Genet* **77**, 287-92.
- Elliott, P.; Andersson, B.; Arbustini, E.; Bilinska, Z.; Cecchi, F.; Charron, P.; Dubourg, O.; Kuhl, U.; Maisch, B., *et al.* (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* **29**, 270-6.
- Elliott, P. M.; Poloniecki, J.; Dickie, S.; Sharma, S.; Monserrat, L.; Varnava, A.; Mahon, N. G. and McKenna, W. J. (2000). Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol* **36**, 2212-8.
- Fatkin, D. and Graham, R. M. (2002). Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* **82**, 945-80.
- Ferrero-Miliani, L.; Holst, A. G.; Pehrson, S.; Morling, N. and Bundgaard, H. (2010). Strategy for clinical evaluation and screening of sudden cardiac death relatives. *Fundam Clin Pharmacol* **24**, 619-35.
- Fokstuen, S.; Munoz, A.; Melacini, P.; Iliceto, S.; Perrot, A.; Ozcelik, C.; Jeanrenaud, X.; Rieubland, C.; Farr, M., *et al.* (2011). Rapid detection of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy by custom DNA resequencing array in clinical practice. *J Med Genet* **48**, 572-6.
- Fox, C. S.; Evans, J. C.; Larson, M. G.; Lloyd-Jones, D. M.; O'Donnell, C. J.; Sorlie, P. D.; Manolio, T. A.; Kannel, W. B. and Levy, D. (2005). A comparison of death certificate out-of-hospital coronary heart disease death with physician-adjudicated sudden cardiac death. *Am J Cardiol* **95**, 856-9.
- Frank, D.; Kuhn, C.; Katus, H. A. and Frey, N. (2006). The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)* **84**, 446-68.
- Frazier, A.; Judge, D. P.; Schulman, S. P.; Johnson, N.; Holmes, K. W. and Murphy, A. M. (2008). Familial hypertrophic cardiomyopathy associated with cardiac beta-myosin heavy chain and troponin I mutations. *Pediatr Cardiol* **29**, 846-50.
- Freiburg, A. and Gautel, M. (1996). A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem* **235**, 317-23.
- Gabriel, S.; Ziaugra, L. and Tabbaa, D. (2009). SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 2**, Unit 2 12.
- Garcia-Castro, M.; Reguero, J. R.; Moris, C.; Alonso-Montes, C.; Berrazueta, J. R.; Sainz, R.; Alvarez, V. and Coto, E. (2007). Prevalence and spectrum of mutations in the sarcomeric troponin T and I genes in a cohort of Spanish cardiac hypertrophy patients. *Int J Cardiol* **121**, 115-6.

- Geier, C.; Gehmlich, K.; Ehler, E.; Hassfeld, S.; Perrot, A.; Hayess, K.; Cardim, N.; Wenzel, K.; Erdmann, B., *et al.* (2008). Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* **17**, 2753-65.
- Geier, C.; Perrot, A.; Ozcelik, C.; Binner, P.; Counsell, D.; Hoffmann, K.; Pilz, B.; Martiniak, Y.; Gehmlich, K., *et al.* (2003). Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **107**, 1390-5.
- Geisterfer-Lowrance, A. A.; Kass, S.; Tanigawa, G.; Vosberg, H. P.; McKenna, W.; Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (1990). A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* **62**, 999-1006.
- Gilbert, M. T.; Haselkorn, T.; Bunce, M.; Sanchez, J. J.; Lucas, S. B.; Jewell, L. D.; Van Marck, E. and Worobey, M. (2007a). The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One* **2**, e537.
- Gilbert, M. T.; Sanchez, J. J.; Haselkorn, T.; Jewell, L. D.; Lucas, S. B.; Van Marck, E.; Borsting, C.; Morling, N. and Worobey, M. (2007b). Multiplex PCR with minisequencing as an effective high-throughput SNP typing method for formalin-fixed tissue. *Electrophoresis* **28**, 2361-7.
- Girolami, F.; Ho, C. Y.; Semsarian, C.; Baldi, M.; Will, M. L.; Baldini, K.; Torricelli, F.; Yeates, L.; Cecchi, F., *et al.* (2010). Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol* **55**, 1444-53.
- Goldberger, J. J.; Buxton, A. E.; Cain, M.; Costantini, O.; Exner, D. V.; Knight, B. P.; Lloyd-Jones, D.; Kadish, A. H.; Lee, B., *et al.* (2011). Risk stratification for arrhythmic sudden cardiac death: identifying the roadblocks. *Circulation* **123**, 2423-30.
- Goldberger, J. J.; Cain, M. E.; Hohnloser, S. H.; Kadish, A. H.; Knight, B. P.; Lauer, M. S.; Maron, B. J.; Page, R. L.; Passman, R. S., *et al.* (2008). American Heart Association/American College of Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* **118**, 1497-1518.
- Gorgels, A. P.; Gijssbers, C.; de Vreede-Swagemakers, J.; Lousberg, A. and Wellens, H. J. (2003). Out-of-hospital cardiac arrest--the relevance of heart failure. The Maastricht Circulatory Arrest Registry. *Eur Heart J* **24**, 1204-9.
- Gruver, E. J.; Fatkin, D.; Dodds, G. A.; Kisslo, J.; Maron, B. J.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (1999). Familial hypertrophic cardiomyopathy and atrial fibrillation caused by Arg663His beta-cardiac myosin heavy chain mutation. *Am J Cardiol* **83**, 13H-18H.
- Hayashi, T.; Arimura, T.; Itoh-Satoh, M.; Ueda, K.; Hohda, S.; Inagaki, N.; Takahashi, M.; Hori, H.; Yasunami, M., *et al.* (2004). Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **44**, 2192-201.
- Hedley, P. L.; Jorgensen, P.; Schlamowitz, S.; Wangari, R.; Moolman-Smook, J.; Brink, P. A.; Kanters, J. K.; Corfield, V. A. and Christiansen, M. (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum Mutat* **30**, 1486-511.
- Ho, C. Y. (2009). Hypertrophic cardiomyopathy: preclinical and early phenotype. *J Cardiovasc Transl Res* **2**, 462-70.
- Ho, C. Y. (2010a). Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **122**, 2430-40; discussion 2440.

- Ho, C. Y. (2010b). Hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Fail Clin* **6**, 141-59.
- Ho, C. Y. (2011). New Paradigms in Hypertrophic Cardiomyopathy: Insights from Genetics. *Prog Pediatr Cardiol* **31**, 93-98.
- Ho, C. Y.; Lever, H. M.; DeSanctis, R.; Farver, C. F.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2000). Homozygous mutation in cardiac troponin T: implications for hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **102**, 1950-5.
- Ho, C. Y. and Seidman, C. E. (2006). A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **113**, e858-62.
- Hobbs, J. B.; Peterson, D. R.; Moss, A. J.; McNitt, S.; Zareba, W.; Goldenberg, I.; Qi, M.; Robinson, J. L.; Sauer, A. J., *et al.* (2006). Risk of aborted cardiac arrest or sudden cardiac death during adolescence in the long-QT syndrome. *JAMA* **296**, 1249-54.
- Hofman, N.; Tan, H. L.; Clur, S. A.; Alders, M.; van Langen, I. M. and Wilde, A. A. (2007). Contribution of inherited heart disease to sudden cardiac death in childhood. *Pediatrics* **120**, e967-73.
- Hofreiter, M.; Jaenicke, V.; Serre, D.; Haeseler Av, A. and Paabo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* **29**, 4793-9.
- HRUK (2008). Clinical indications for genetic testing in familial sudden cardiac death syndromes: an HRUK position statement. *Heart* **94**, 502-7.
- Hughes, S. E. (2004). The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. *Histopathology* **44**, 412-27.
- Ingles, J.; Doolan, A.; Chiu, C.; Seidman, J.; Seidman, C. and Semsarian, C. (2005). Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet* **42**, e59.
- Ingles, J. and Semsarian, C. (2007). Sudden cardiac death in the young: a clinical genetic approach. *Intern Med J* **37**, 32-7.
- Kelly, M. and Semsarian, C. (2009). Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: a marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 182-90.
- Keren, A.; Syrris, P. and McKenna, W. J. (2008). Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**, 158-68.
- Kimura, A.; Harada, H.; Park, J. E.; Nishi, H.; Satoh, M.; Takahashi, M.; Hiroi, S.; Sasaoka, T.; Ohbuchi, N., *et al.* (1997). Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **16**, 379-82.
- Konno, T.; Chang, S.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2010). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*.
- Krous, H. F.; Beckwith, J. B.; Byard, R. W.; Rognum, T. O.; Bajanowski, T.; Corey, T.; Cutz, E.; Hanzlick, R.; Keens, T. G., *et al.* (2004). Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* **114**, 234-8.
- Landstrom, A. P. and Ackerman, M. J. (2010). Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **122**, 2441-9; discussion 2450.
- Landstrom, A. P.; Weisleder, N.; Bataalden, K. B.; Bos, J. M.; Tester, D. J.; Ommen, S. R.; Wehrens, X. H.; Claycomb, W. C.; Ko, J. K., *et al.* (2007). Mutations in JPH2-encoded

- junctional-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* **42**, 1026-35.
- Lee, J.; Hever, A.; Willhite, D.; Zlotnik, A. and Hevezi, P. (2005). Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *FASEB J* **19**, 1356-8.
- Liberthson, R. R. (1996). Sudden death from cardiac causes in children and young adults. *N Engl J Med* **334**, 1039-44.
- Marcus, F. I.; McKenna, W. J.; Sherrill, D.; Basso, C.; Bauce, B.; Bluemke, D. A.; Calkins, H.; Corrado, D.; Cox, M. G., *et al.* (2010). Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation* **121**, 1533-41.
- Marian, A. J. (2008). Genetic determinants of cardiac hypertrophy. *Curr Opin Cardiol* **23**, 199-205.
- Marian, A. J. and Roberts, R. (2001). The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 655-70.
- Maron, B. J. (2002). Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* **287**, 1308-20.
- Maron, B. J. (2005). Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy from athlete's heart: a clinical problem of increasing magnitude and significance. *Heart* **91**, 1380-2.
- Maron, B. J. (2008). The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is the gold standard. *Circ Heart Fail* **1**, 72-5; discussion 76.
- Maron, B. J. (2010a). The 2009 international hypertrophic cardiomyopathy summit. *Am J Cardiol* **105**, 1164-8.
- Maron, B. J. (2010b). Contemporary insights and strategies for risk stratification and prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **121**, 445-56.
- Maron, B. J.; Doerer, J. J.; Haas, T. S.; Tierney, D. M. and Mueller, F. O. (2009a). Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006. *Circulation* **119**, 1085-92.
- Maron, B. J.; Gardin, J. M.; Flack, J. M.; Gidding, S. S.; Kurosaki, T. T. and Bild, D. E. (1995). 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* **92**, 785-9.
- Maron, B. J.; Maron, M. S.; Lesser, J. R.; Hauser, R. G.; Haas, T. S.; Harrigan, C. J.; Appelbaum, E.; Main, M. L. and Roberts, W. C. (2008). Sudden cardiac arrest in hypertrophic cardiomyopathy in the absence of conventional criteria for high risk status. *Am J Cardiol* **101**, 544-7.
- Maron, B. J.; Maron, M. S. and Semsarian, C. (2011). Double Or Compound Sarcomere Mutations In Hypertrophic Cardiomyopathy: A Potential Link To Sudden Death In The Absence Of Conventional Risk Factors. *Heart Rhythm*.
- Maron, B. J.; McKenna, W. J.; Danielson, G. K.; Kappenberger, L. J.; Kuhn, H. J.; Seidman, C. E.; Shah, P. M.; Spencer, W. H., 3rd; Spirito, P., *et al.* (2003). American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *Eur Heart J* **24**, 1965-91.

- Maron, B. J.; Niimura, H.; Casey, S. A.; Soper, M. K.; Wright, G. B.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2001). Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. *J Am Coll Cardiol* **38**, 315-21.
- Maron, B. J.; Seidman, C. E.; Ackerman, M. J.; Towbin, J. A.; Maron, M. S.; Ommen, S. R.; Nishimura, R. A. and Gersh, B. J. (2009b). How should hypertrophic cardiomyopathy be classified?: What's in a name? Dilemmas in nomenclature characterizing hypertrophic cardiomyopathy and left ventricular hypertrophy. *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 81-5; discussion 86.
- Maron, B. J.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2004). Proposal for contemporary screening strategies in families with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **44**, 2125-32.
- Maron, B. J.; Shen, W. K.; Link, M. S.; Epstein, A. E.; Almquist, A. K.; Daubert, J. P.; Bardy, G. H.; Favale, S.; Rea, R. F., *et al.* (2000). Efficacy of implantable cardioverter-defibrillators for the prevention of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **342**, 365-73.
- Maron, B. J.; Spirito, P.; Shen, W. K.; Haas, T. S.; Formisano, F.; Link, M. S.; Epstein, A. E.; Almquist, A. K.; Daubert, J. P., *et al.* (2007). Implantable cardioverter-defibrillators and prevention of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *JAMA* **298**, 405-12.
- Maron, B. J.; Towbin, J. A.; Thiene, G.; Antzelevitch, C.; Corrado, D.; Arnett, D.; Moss, A. J.; Seidman, C. E. and Young, J. B. (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* **113**, 1807-16.
- Michaud, K.; Fellmann, F.; Abriel, H.; Beckmann, J. S.; Mangin, P. and Elger, B. S. (2009). Molecular autopsy in sudden cardiac death and its implication for families: discussion of the practical, legal and ethical aspects of the multidisciplinary collaboration. *Swiss Med Wkly* **139**, 712-8.
- Michaud, K.; Mangin, P. and Elger, B. S. (2011). Genetic analysis of sudden cardiac death victims: a survey of current forensic autopsy practices. *Int J Legal Med* **125**, 359-66.
- Michels, M.; Soliman, O. I.; Pfeifferkorn, J.; Hoedemaekers, Y. M.; Kofflard, M. J.; Dooijes, D.; Majoor-Krakauer, D. and Ten Cate, F. J. (2009). Disease penetrance and risk stratification for sudden cardiac death in asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers. *Eur Heart J* **30**, 2593-8.
- Miething, F.; Hering, S.; Hanschke, B. and Dressler, J. (2006). Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *J Histochem Cytochem* **54**, 371-4.
- Millat, G.; Chanavat, V.; Crehalet, H. and Rousson, R. (2010). Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* **411**, 1983-91.
- Mogensen, J.; Klausen, I. C.; Pedersen, A. K.; Egeblad, H.; Bross, P.; Kruse, T. A.; Gregersen, N.; Hansen, P. S.; Baandrup, U., *et al.* (1999). Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **103**, R39-43.
- Mogensen, J.; Murphy, R. T.; Kubo, T.; Bahl, A.; Moon, J. C.; Klausen, I. C.; Elliott, P. M. and McKenna, W. J. (2004). Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **44**, 2315-25.

- Moolman, J. C.; Corfield, V. A.; Posen, B.; Ngumbela, K.; Seidman, C.; Brink, P. A. and Watkins, H. (1997). Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol* **29**, 549-55.
- Morentin, B.; Suarez-Mier, M. P. and Aguilera, B. (2003). Sudden unexplained death among persons 1-35 years old. *Forensic Sci Int* **135**, 213-7.
- Morimoto, S. (2008). Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* **77**, 659-66.
- Morita, H.; Seidman, J. and Seidman, C. E. (2005). Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest* **115**, 518-26.
- Niimura, H.; Bachinski, L. L.; Sangwatanaroj, S.; Watkins, H.; Chudley, A. E.; McKenna, W.; Kristinsson, A.; Roberts, R.; Sole, M., *et al.* (1998). Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **338**, 1248-57.
- Niimura, H.; Patton, K. K.; McKenna, W. J.; Soultis, J.; Maron, B. J.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2002). Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* **105**, 446-51.
- Noseworthy, P. A. and Newton-Cheh, C. (2008). Genetic determinants of sudden cardiac death. *Circulation* **118**, 1854-63.
- Oeth, P.; del Mistro, G.; Marnellos, G.; Shi, T. and van den Boom, D. (2009). Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol* **578**, 307-43.
- Okello, J. B.; Zurek, J.; Devault, A. M.; Kuch, M.; Okwi, A. L.; Sewankambo, N. K.; Bimenya, G. S.; Poinar, D. and Poinar, H. N. (2010). Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Anal Biochem* **400**, 110-7.
- Oliva, A.; Brugada, R.; D'Aloja, E.; Boschi, I.; Partemi, S.; Brugada, J. and Pascali, V. L. (2010). State of the art in forensic investigation of sudden cardiac death. *Am J Forensic Med Pathol* **32**, 1-16.
- Olivotto, I.; Girolami, F.; Ackerman, M. J.; Nistri, S.; Bos, J. M.; Zachara, E.; Ommen, S. R.; Theis, J. L.; Vaubel, R. A., *et al.* (2008). Myofibrillar protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* **83**, 630-8.
- Olson, T. M.; Doan, T. P.; Kishimoto, N. Y.; Whitby, F. G.; Ackerman, M. J. and Fananapazir, L. (2000). Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 1687-94.
- Osio, A.; Tan, L.; Chen, S. N.; Lombardi, R.; Nagueh, S. F.; Shete, S.; Roberts, R.; Willerson, J. T. and Marian, A. J. (2007). Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* **100**, 766-8.
- Poetter, K.; Jiang, H.; Hassanzadeh, S.; Master, S. R.; Chang, A.; Dalakas, M. C.; Rayment, I.; Sellers, J. R.; Fananapazir, L., *et al.* (1996). 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* **13**, 63-9.
- Poljak, M.; Seme, K. and Gale, N. (2000). Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. *Pflugers Arch* **439**, R42-4.

- Prinz, C.; Farr, M.; Hering, D.; Horstkotte, D. and Faber, L. (2011). The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Dtsch Arztebl Int* **108**, 209-15.
- Priori, S. G.; Aliot, E.; Blomstrom-Lundqvist, C.; Bossaert, L.; Breithardt, G.; Brugada, P.; Camm, A. J.; Cappato, R.; Cobbe, S. M., *et al.* (2001). Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **22**, 1374-450.
- Priori, S. G. and Napolitano, C. (2006). Role of genetic analyses in cardiology: part I: mendelian diseases: cardiac channelopathies. *Circulation* **113**, 1130-5.
- Puranik, R.; Chow, C. K.; Duflo, J. A.; Kilborn, M. J. and McGuire, M. A. (2005). Sudden death in the young. *Heart Rhythm* **2**, 1277-82.
- Richard, P.; Charron, P.; Carrier, L.; Ledeuil, C.; Cheav, T.; Pichereau, C.; Benaiche, A.; Isnard, R.; Dubourg, O., *et al.* (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* **107**, 2227-32.
- Richard, P.; Villard, E.; Charron, P. and Isnard, R. (2006). The Genetic Bases of Cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology* **48**, A79-A89.
- Richardson, P.; McKenna, W.; Bristow, M.; Maisch, B.; Mautner, B.; O'Connell, J.; Olsen, E.; Thiene, G.; Goodwin, J., *et al.* (1996). Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* **93**, 841-2.
- Rodriguez-Calvo, M. S.; Brion, M.; Allegue, C.; Concheiro, L. and Carracedo, A. (2008). Molecular genetics of sudden cardiac death. *Forensic Sci Int* **182**, 1-12.
- Rodriguez, J. E.; McCudden, C. R. and Willis, M. S. (2009). Familial hypertrophic cardiomyopathy: basic concepts and future molecular diagnostics. *Clin Biochem* **42**, 755-65.
- Roncarati, R.; Latronico, M. V.; Musumeci, B.; Aurino, S.; Torella, A.; Bang, M. L.; Jotti, G. S.; Puca, A. A.; Volpe, M., *et al.* (2011). Unexpectedly low mutation rates in beta-myosin heavy chain and cardiac myosin binding protein genes in italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cell Physiol*.
- Rosenzweig, A.; Watkins, H.; Hwang, D. S.; Miri, M.; McKenna, W.; Traill, T. A.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (1991). Preclinical diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *N Engl J Med* **325**, 1753-60.
- Santos, S.; Lanca, V.; Oliveira, H.; Branco, P.; Silveira, L.; Marques, V.; Brito, D.; Madeira, H.; Bicho, M., *et al.* (2011). Genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry DNA arrays and high resolution melting. *Rev Port Cardiol* **30**, 7-18.
- Santos, S.; Sa, D.; Bastos, E.; Guedes-Pinto, H.; Gut, I.; Gartner, F. and Chaves, R. (2009). An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Res Vet Sci* **86**, 421-6.
- Satoh, M.; Takahashi, M.; Sakamoto, T.; Hiroe, M.; Marumo, F. and Kimura, A. (1999). Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 411-7.
- Schwartz, K.; Carrier, L.; Guicheney, P. and Komajda, M. (1995). Molecular basis of familial cardiomyopathies. *Circulation* **91**, 532-40.
- Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (2011). Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circ Res* **108**, 743-50.

- Seidman, J. G. and Seidman, C. (2001). The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* **104**, 557-67.
- Semsarian, C. (2007). Guidelines for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Lung Circ* **16**, 16-8.
- Semsarian, C. and Hamilton, R. M. (2011). Key Role of the Molecular Autopsy in Sudden Unexpected Death. *Heart Rhythm*, doi: 10.1016/j.hrthm.2011.07.034
- Sjoblom, B.; Salmazo, A. and Djinovic-Carugo, K. (2008). Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2688-701.
- Solomon, M. J. and Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6470-4.
- Stroumpoulis, K. I.; Pantazopoulos, I. N. and Xanthos, T. T. (2010). Hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *World J Cardiol* **2**, 289-98.
- Sung, R. J. and Lauer, M. R. (2000). Sudden cardiac death syndrome: diagnosis and management. *J Formos Med Assoc* **99**, 809-22.
- Tan, H. L.; Hofman, N.; van Langen, I. M.; van der Wal, A. C. and Wilde, A. A. (2005). Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation* **112**, 207-13.
- Teare, D. (1958). Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J* **20**, 1-8.
- Tester, D. J. and Ackerman, M. J. (2007). Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol* **49**, 240-6.
- Tester, D. J. and Ackerman, M. J. (2009). Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children. *Annu Rev Med* **60**, 69-84.
- Tester, D. J. and Ackerman, M. J. (2011). Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation* **123**, 1021-37.
- Thiene, G.; Basso, C.; Calabrese, F.; Angelini, A. and Valente, M. (2005). Twenty years of progress and beckoning frontiers in cardiovascular pathology: cardiomyopathies. *Cardiovasc Pathol* **14**, 165-9.
- Thiene, G.; Carturan, E.; Corrado, D. and Basso, C. (2009). Prevention of sudden cardiac death in the young and in athletes: dream or reality? *Cardiovasc Pathol* **19**, 207-17.
- Vaartjes, I.; Hendrix, A.; Hertogh, E. M.; Grobbee, D. E.; Doevendans, P. A.; Mosterd, A. and Bots, M. L. (2009). Sudden death in persons younger than 40 years of age: incidence and causes. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **16**, 592-6.
- Van Driest, S. L.; Ackerman, M. J.; Ommen, S. R.; Shakur, R.; Will, M. L.; Nishimura, R. A.; Tajik, A. J. and Gersh, B. J. (2002). Prevalence and severity of "benign" mutations in the beta-myosin heavy chain, cardiac troponin T, and alpha-tropomyosin genes in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **106**, 3085-90.
- Van Driest, S. L.; Ellsworth, E. G.; Ommen, S. R.; Tajik, A. J.; Gersh, B. J. and Ackerman, M. J. (2003). Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **108**, 445-51.



- Van Driest, S. L.; Vasile, V. C.; Ommen, S. R.; Will, M. L.; Tajik, A. J.; Gersh, B. J. and Ackerman, M. J. (2004). Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **44**, 1903-10.
- Varnava, A.; Baboonian, C.; Davison, F.; de Cruz, L.; Elliott, P. M.; Davies, M. J. and McKenna, W. J. (1999). A new mutation of the cardiac troponin T gene causing familial hypertrophic cardiomyopathy without left ventricular hypertrophy. *Heart* **82**, 621-4.
- Varnava, A. M.; Elliott, P. M.; Baboonian, C.; Davison, F.; Davies, M. J. and McKenna, W. J. (2001). Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation* **104**, 1380-4.
- Vasile, V. C.; Ommen, S. R.; Edwards, W. D. and Ackerman, M. J. (2006). A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 998-1003.
- Wang, L.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2010). Narrative review: harnessing molecular genetics for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Ann Intern Med* **152**, 513-20, W181.
- Wang, L. T.; Smith, A.; Iacopetta, B.; Wood, D. J.; Papadimitriou, J. M. and Zheng, M. H. (1996). Nested PCR-SSCP assay for the detection of p53 mutations in paraffin wax embedded bone tumours: improvement of sensitivity and fidelity. *Clin Mol Pathol* **49**, M176-8.
- Watkins, H.; Ashrafian, H. and McKenna, W. J. (2008). The genetics of hypertrophic cardiomyopathy: Teare redux. *Heart* **94**, 1264-8.
- Watkins, H.; Conner, D.; Thierfelder, L.; Jarcho, J. A.; MacRae, C.; McKenna, W. J.; Maron, B. J.; Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (1995a). Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **11**, 434-7.
- Watkins, H.; McKenna, W. J.; Thierfelder, L.; Suk, H. J.; Anan, R.; O'Donoghue, A.; Spirito, P.; Matsumori, A.; Moravec, C. S., *et al.* (1995b). Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **332**, 1058-64.
- Watkins, H.; Rosenzweig, A.; Hwang, D. S.; Levi, T.; McKenna, W.; Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (1992). Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **326**, 1108-14.
- WHO/ISFC (1980). Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* **44**, 672-3.
- Wisten, A.; Forsberg, H.; Krantz, P. and Messner, T. (2002). Sudden cardiac death in 15-35-year olds in Sweden during 1992-99. *J Intern Med* **252**, 529-36.
- Wu, L.; Patten, N.; Yamashiro, C. T. and Chui, B. (2002). Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **10**, 269-74.
- Xu, Q.; Dewey, S.; Nguyen, S. and Gomes, A. V. (2010). Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 899-909.
- Yu, B.; French, J. A.; Carrier, L.; Jeremy, R. W.; McTaggart, D. R.; Nicholson, M. R.; Hambly, B.; Semsarian, C.; Richmond, D. R., *et al.* (1998). Molecular pathology of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac myosin binding protein C gene. *J Med Genet* **35**, 205-10.

Zipes, D. P.; Camm, A. J.; Borggrefe, M.; Buxton, A. E.; Chaitman, B.; Fromer, M.; Gregoratos, G.; Klein, G.; Moss, A. J., *et al.* (2006). ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death--executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death) Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Eur Heart J* **27**, 2099-140.

Zipes, D. P. and Wellens, H. J. (1998). Sudden cardiac death. *Circulation* **98**, 2334-51.