



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Biologia Molecular

Variantes genéticas associadas à Miocardiopatia Hipertrófica - Interpretação do seu significado clínico através de revisão bibliográfica e ferramentas computacionais

Ana Beatriz Nogueira Garcia

Junho'2018



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Biologia Molecular

Variantes genéticas associadas à Miocardiopatia Hipertrófica - Interpretação do seu significado clínico através de revisão bibliográfica e ferramentas computacionais

Ana Beatriz Nogueira Garcia

Orientado por:

Prof.^a Doutora Maria do Carmo Fonseca

Junho'2018

Resumo

A Miocardiopatia Hipertrófica é definida por um aumento da espessura do ventrículo esquerdo, não explicada por alterações da carga. Trata-se da doença cardiovascular hereditária mais comum, bem como a principal causa de morte súbita cardíaca nos jovens e atletas. Com o advento das tecnologias de sequenciação genética de nova geração tem sido possível identificar elevado número de variantes genéticas, possivelmente associadas à doença. O presente trabalho teve como objetivo rever em termos de significado clínico (efeito benigno ou patogénico) algumas destas variantes.

A partir da base de dados “ClinVar”, foram seleccionadas variantes de genes do sarcómero previamente classificadas como patogénicas (89) ou benignas (111). Relativamente a estas foi realizada uma revisão da literatura – a partir da qual lhes foi atribuída uma classificação segundo as linhas orientadoras propostas pelo “American College of Medical Genetics and Genomics” - e ainda efectuada uma análise por diferentes ferramentas computacionais de significado clínico.

Com base na revisão desenvolvida, apenas foi possível atribuir significado clínico a 30% das variantes incluídas no estudo. As restantes foram classificadas como sendo de significado incerto. As ferramentas computacionais apresentam sensibilidade e especificidade médias na ordem dos 60%, apresentando assim considerável taxa de falsos negativos e falsos positivos.

Os resultados obtidos demonstram que a interpretação clínica das variantes genéticas identificadas por sequenciação constitui um desafio, sendo necessária a realização de mais estudos, particularmente familiares e funcionais, que contribuam para a sua melhor caracterização. As ferramentas computacionais podem constituir uma mais-valia na selecção de variantes a estudar, sobretudo quando apresentam elevada sensibilidade e especificidade.

Palavras-Chave: Miocardiopatia Hipertrófica; Sequenciação de Nova Geração; Variantes genéticas de significado incerto; Ferramentas computacionais de predição

Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy is defined by the presence of increased left ventricular wall thickness that is not solely explained by abnormal loading conditions. It is the most common familial genetic disease of the heart, as well as the most common cause of sudden cardiac death in young people and athletes. The advent of next-generation sequencing (NGS) technologies has allowed the identification of a large number of genetic variants, possibly associated with the disease. The aim of this study was to review the clinical significance (benign or pathogenic effect) of some of these variants.

Sarcomere genetic variants previously associated with HCM and classified as pathogenic (89) or benign (111) were selected from the “ClinVar” database. A manual curation of the literature, followed by application of “American College of Medical Genetic and Genomics” guidelines, and computational predictive programs analyses was performed.

Based on the review developed, it was only possible to attribute clinical significance to 30% of the variants included in the study. The remainders were classified as of uncertain significance. Computational tools present average sensitivity and specificity in the order of 60%, thus presenting a considerable rate of false negatives and false positives.

The results obtained in this study show that determining the clinical validity of NGS results is challenging. Additional studies are needed, namely functional and familial co-segregation studies. Computational tools are an added value in the process, especially when they have high sensitivity and specificity.

Key Words: Hypertrophic Cardiomyopathy; Next-generation Sequencing; Genetic variants of uncertain significance; Computational prediction tools

“ O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML”

Abreviaturas

ACGS – “*Association for Clinical Genetic Science*”

ACMG – “*American College of Medical Genetics and Genomics*”

ACTC1 – Alfa-actina cardíaca

ACTN2 – Alfa-actinina 2

B – *Benign*

ExAC – “*Exome Agregation Consortium*”

ILK – Cinase ligada à integrina

JPH2 – Junctofilina

LMNA – Laminina A/C

M – *Moderate*

MCH – Miocardiopatia Hipertrófica

MYBPC3 – Proteína C que liga a miosina

MYH6 – Cadeia pesada da miosina 6

MYH7 – Isoforma beta da cadeia pesada da miosina

MYL2 – Cadeia leve reguladora da miosina

MYL3 – Cadeia leve essencial da miosina

MYLK2 – Cinase da cadeia leve da miosina 2

MYOZ2 – Miosenina 2

NEXN – Nexilina

NGS – Next Generation Sequencing

P - *Pathogenic*

P' - *Supporting*

PDLIM3 – Domínio PDZ e LIM 3

PRKAG2 – Subunidade-gama da AMP cinase 2

S - *Strong*

TCAP – Teletonina

TNNC1 – Troponina C cardíaca

TNNI3 – Troponina I cardíaca

TNNT2 – Troponina T cardíaca

TPM1 – Alfa-tropomiosina

TTN – Titina

Índice

Introdução.....	1
Material e Métodos.....	4
Seleção de variantes associadas à MCH.....	4
Revisão da Literatura.....	4
Aplicação dos critérios de classificação propostos pelo ACMG.....	4
Análise <i>in silico</i>	4
Resultados.....	6
Classificação de acordo com as linhas orientadoras do ACMG.....	6
Variantes Patogénicas.....	9
Variantes Benignas.....	15
Análise <i>in silico</i>	22
Discussão.....	24
Agradecimentos.....	28
Bibliografia.....	29
Anexos.....	51

Introdução

A MCH é a doença cardiovascular hereditária mais comum e afeta indivíduos de diferentes etnias, raças e culturas, em virtualmente todo o mundo. ^[1] A sua prevalência foi inicialmente estimada em 1 para 500 na população geral, tendo mais recentemente sido sugerida uma prevalência de 1 para 200. ^[2]

Caracteriza-se por um aumento da espessura do ventrículo esquerdo, na ausência de outra doença cardiovascular capaz de produzir similar magnitude de hipertrofia, como sendo Hipertensão Arterial ou Doença Valvular Primária (Figura 1). ^[3] Trata-se de uma doença extremamente complexa devido à heterogeneidade da apresentação clínica, diferentes fenótipos, um grande número de mutações causais e um largo espectro de complicações associadas. ^[4, 5]

A doença é causada por mutações nos genes codificadores dos componentes do

sarcómero e transmitida de forma autossômica dominante. ^[4, 6-10] Os genes do sarcómero mais frequentemente mutados são os seguintes: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3* e *ACTC1*. ^[11] Contudo, cerca de 50% dos indivíduos com diagnóstico clínico de MCH não tem mutação causal identificada. ^[12, 13]

A maioria dos doentes são assintomáticos, podendo, contudo, apresentar manifestações clínicas da MCH que incluem dispneia, dor torácica, palpitações e síncope, que estão relacionadas com o desenvolvimento de disfunção diastólica, obstrução do trato de saída do ventrículo esquerdo, isquémia, fibrilhação auricular e alterações da microcirculação coronária. ^[4, 14, 15] Está associada a um aumento do risco de morte súbita, insuficiência cardíaca e eventos trombo-embólicos, constituindo a principal causa de morte súbita cardíaca nos jovens e atletas. ^[16-18]



Figura 1. Ecocardiograma de Doente com MCH. Este ecocardiograma evidencia hipertrofia assimétrica do septo interventricular. Adaptado de HARRISON'S *Principles of Internal Medicine*, 19th Edition (2015)

Os achados físicos encontrados prendem-se com o movimento sistólico anterior dos folhetos da válvula mitral que conduz à obstrução do trato de saída do ventrículo esquerdo e compreendem pulso arterial com dois picos sistólicos, sopro de ejeção sistólico que aumenta de intensidade com manobras que reduzem o volume ventricular e sinais de insuficiência mitral quando esta está presente.^[4]

O eletrocardiograma pode ser normal, mas na maioria dos doentes evidencia hipertrofia ventricular esquerda, alterações do segmento ST, da onda T e/ou ondas Q patológicas.
[19][20]

O diagnóstico é estabelecido pela identificação de um aumento da espessura do miocárdio do ventrículo esquerdo – superior ou igual a 15 mm em adultos ou superior a dois desvios padrão da média prevista em crianças – através de exame imagiológico (ecocardiograma, ressonância magnética ou tomografia computadorizada).^[4]

Recomenda-se o aconselhamento genético a todos os indivíduos com a doença e, se possível, um rastreio familiar em cascata. A identificação de uma mutação causal facilita o diagnóstico pré-sintomático dos membros da família, bem como a vigilância clínica e o aconselhamento reprodutivo.^[21]

A NGS permite determinar num único ensaio a sequência de moléculas de ácido desoxirribonucleico com mais de 1 milhão de pares de bases. Esta tecnologia veio revolucionar a investigação na área da genética bem como a sua aplicação em contexto clínico, uma vez que permite a análise de múltiplos genes (e no limite a totalidade do genoma) com uma precisão semelhante aos métodos de sequenciação convencionais, acrescentando o benefício da economia de custos e tempo.^[22, 23]

A MCH, devido ao elevado número de genes e mutações associadas, foi uma das entidades clínicas cuja investigação mais beneficiou com a introdução das novas tecnologias de sequenciação.^[24, 25]

Contudo, analisar um grande número de genes conduz à identificação de muitas variantes genéticas raras de significado incerto, que constituem um desafio no momento da sua interpretação clínica.^[25–27]

O presente trabalho teve como objetivo rever a classificação em termos de significado clínico (efeito benigno ou patogénico) de variantes genéticas associadas à MCH,

combinando para esse efeito uma análise da literatura publicada com uma análise computacional utilizando ferramentas de previsão. Com os resultados obtidos pretende-se contribuir para o complexo processo que decorre entre a identificação laboratorial de uma variante genética e a compreensão das suas repercussões clínicas a nível do indivíduo que dela é portador.

Material e Métodos

Seleção de variantes associadas à MCH

As variantes a analisar foram selecionadas a partir da “ClinVar” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)^[28], uma base de dados de variantes genéticas para a qual contribuem diversos laboratórios, reportando variantes identificadas em indivíduos estudados e sua relação com patologia. A aplicação de filtros pré-definidos nesta base permitiu constituir dois grupos de variantes associadas à MCH: patogénicas e benignas, assim previamente classificadas por múltiplos autores ou por um painel de especialistas e sem conflitos na interpretação. No primeiro grupo foram incluídas variantes do tipo “*missense*” e “*splice site*” localizadas em 8 genes sarcoméricos frequentemente associados à MCH. No segundo grupo foram consideradas variantes do tipo “*missense*”, “*splice site*”, “*intronic*” e “*5'-UTR*” localizadas em 19 genes do sarcómero.

Revisão da Literatura

Todos os artigos publicados na base “PubMed” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com referência a cada uma das variantes selecionadas foram analisados, no sentido de recolher toda a informação pertinente para a sua classificação de acordo com as linhas orientadoras publicadas pelo ACMG em 2015.^[29] Nomeadamente, foram tidos em conta estudos funcionais *in vivo/in vitro*, estudos de co-segregação familiar, descrição de variantes *de novo*.

Aplicação dos critérios de classificação propostos pelo ACMG

Os critérios de classificação de variantes publicados pelo ACMG em 2015 e suplementados pela ACGS em 2017^[30] foram aplicados a todas as variantes selecionadas.

Análise *in silico*

As variantes selecionadas foram analisadas por diferentes tipos de ferramentas computacionais preditivas de significado clínico de variantes genéticas, tendo sido utilizados *thresholds* (Th) sugeridos na literatura.

A análise foi realizada por programas que se baseiam essencialmente na conservação entre espécies (“GERP++RS” – Th 4.4^[31], “SIFT” – Th 0.05^[31], “SiPhy” – Th 12.17^[31], “Mutation Assessor” – Th 1.935^[31], “GWAVA” – Th 0.4^[11]), na função da proteína (“PolyPhen-2” – Th 0.5^[31], “FATHMM_coding” – Th 0.5^[31], “FATHMM_noncoding” – Th 0.5^[32], “PROVEAN” – Th 2.5^[31]), nos mecanismos de *splicing* (“SPIDEX” – Th 5^[11]) ou que combinam os resultados individuais de múltiplas ferramentas, reunindo assim diferentes características preditivas (“CADD” – Th 15^[32], “DANN” – Th 0.9^[33], “Genomiser” – Th 0.6^[11]).

Resultados

Classificação de acordo com as linhas orientadoras do ACMG

Atendendo à evidência de patogenicidade / benignidade transmitida pelos diferentes critérios de classificação, estes são agrupados em quatro categorias: *very strong*, *strong*, *moderate* e *supporting*.

Os critérios baseados em variantes para além das seleccionadas (troca para o mesmo aminoácido que outra variante previamente estabelecida como patogénica, independentemente do nucleótido alterado – PS1- e/ou alteração de um aminoácido na mesma posição que outra variante determinada como patogénica – PM5) foram aplicados de acordo com a descrição e classificação apresentada na base de dados “ClinVar”.

A partir dos artigos científicos com referência a cada variante em causa, publicados na base “PubMed”, foi recolhida a informação que fundamenta a atribuição dos critérios relativos aos seguintes aspectos:

- Variantes descritas como *de novo*, quer casos em que os testes de identidade foram realizados (PS2) quer naqueles em que a maternidade e paternidade são assumidas (PM6).
- Estudos familiares que demonstram a co-segregação da variante e da doença entre os elementos da família. A atribuição dos níveis de evidência de patogenicidade – “*strong*”, “*moderate*”, “*supporting*”- foi realizada como sugerido por Jarvik e Browning (2016)^[34], tendo sido, portanto, calculada a probabilidade da variante estar presente num indivíduo fenotipicamente afetado por mero acaso, em detrimento da co-segregação. Esta probabilidade é $N = (1/2)^m$, em que m é o número de meioses da variante de interesse dentro da(s) família(s) estudada(s). Evidência “*strong*”, “*moderate*” ou “*supporting*” é atribuída quando $N \leq 1/32$, $\leq 1/16$ ou $\leq 1/8$ (uma única família estudada) ou $N \leq 1/16$, $\leq 1/8$ ou $\leq 1/4$ (mais que uma família estudada), respetivamente.
- Estudos funcionais *in vivo/in vitro* que indicam que a variante tem um efeito deletério no gene ou no seu produto (PS3).

Os critérios associados à prevalência das variantes na população geral foram atribuídos em concordância com a base ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>), que agrega dados de uma grande variedade de projectos de sequenciação. O facto de determinada variante não estar descrita nesta base constitui critério de patogenicidade (PM2). A frequência máxima expectável na população para um alelo causador de MCH foi calculada como indicado por Whiffin *et al* (2016)^[35]:

$$\text{Frequência alélica máxima expectável na população} = \text{prevalência} \times \text{contribuição alélica máxima} \times (1 / \text{penetrância})$$

A prevalência da MCH na população geral é estimada em cerca de 1 para 500. Estudos genéticos de larga escala relativos à doença indicam que a maior proporção de casos é atribuída à variante *missense MYBPC3* c. 1504 C>T (p. Arg502Trp), encontrada em 104/6179 casos (1.7 %, Intervalo de Confiança 95% 1.4-2.0%).^[36, 37] O limite superior desta proporção é então considerado a contribuição alélica máxima para a CMH. Assumindo uma penetrância de 50% como descrito previamente^[38], a frequência alélica máxima expectável para a CMH é:

$$1/500 \times 1/2 \text{ (divisão da prevalência por indivíduo pelo número de cromossomas por indivíduo)} \times 0.02 \times 1/0.5 = 4 \times 10^{-5}$$

Este valor é admitido como frequência máxima expectável para qualquer variante causadora de MCH e, quando inferior à frequência da variante apresentada na base ExAC, é considerado como critério de benignidade (BS1).

A avaliação do número de variantes *missense* benignas associadas a determinado gene teve em conta o “*score Z*” da base ExAC, tal como sugerido por Lek *et al* (2016),^[39, 40] que representa uma medida da tolerância dos genes à variação (scores negativos indicam maior número de variantes benignas e vice-versa). Admite-se que variantes *missense* em genes que apresentam um reduzido número de variantes funcionais, tenham maior probabilidade de ser deletérias. Scores superiores ou iguais a 3 constituem critério de patogenicidade (PP’2).

Quando determinado fenótipo patológico é altamente específico para os genes nos quais são identificadas variantes considera-se este um argumento a favor de patogenicidade

(PP'4). Uma vez que a doença em estudo é a MCH e foram selecionadas variantes dos genes que codificam proteínas do sarcômero, este critério foi atribuído a todas elas.

Os critérios cuja aplicação requer análise *in silico* não foram contemplados nesta fase.

Por fim, as variantes foram classificadas em *pathogenic*, *likely pathogenic*, *benign*, *likely benign* e *uncertain significance* de acordo com a combinação de critérios indicada pelo ACMG (Tabela 1).

Tabela 1. Regras para Combinação de Critérios de Classificação de Variantes

<i>Pathogenic</i>	1. 1 PVS e [(≥ 1 PS) ou (≥ 2 PM) ou (1 PM + 1 PP') ou (≥ 2 PP')] ou 2. ≥ 2 PS ou 3. 1 PS e [(≥ 3 PM) ou (2 PM + ≥ 2 PP') ou (1 PM + ≥ 4 PP')]
<i>Likely Pathogenic</i>	1. PVS e 1 PM ou 2. 1 PS e [(1-2 PM) ou (≥ 2 PP')] ou 3. ≥ 3 PM ou 4. 2 PM e ≥ 2 PP' ou 5. 1 PM e ≥ 4 PP'
<i>Benign</i>	1. BVS ou 2. ≥ 2 BS
<i>Likely Benign</i>	1. 1 BS e 1 BP' ou 2. ≥ 2 BP'
<i>Uncertain Significance</i>	1. A conjugação de critérios acima descrita não se verifica. ou 2. Os critérios de patogenicidade e benignidade são contraditórios.

PVS, *Pathogenic Very Strong*; PM, *Pathogenic Moderate*; PP' *Pathogenic Supporting*; PS, *Pathogenic Strong*; BVS, *Benign Very Strong*; BS, *Benign Strong*; BP', *Benign Supporting*

Variantes Patogénicas

Neste grupo foram incluídas 89 variantes dos genes *MYBPC3* (34), *MYH7* (22), *TNNT2* (10), *TNNI3* (13), *TPM1* (3), *MYL2* (3), *MYL3* (3) e *ACTC1* (1), das quais 62 *missense* e 27 *splice site* (Figura 2).

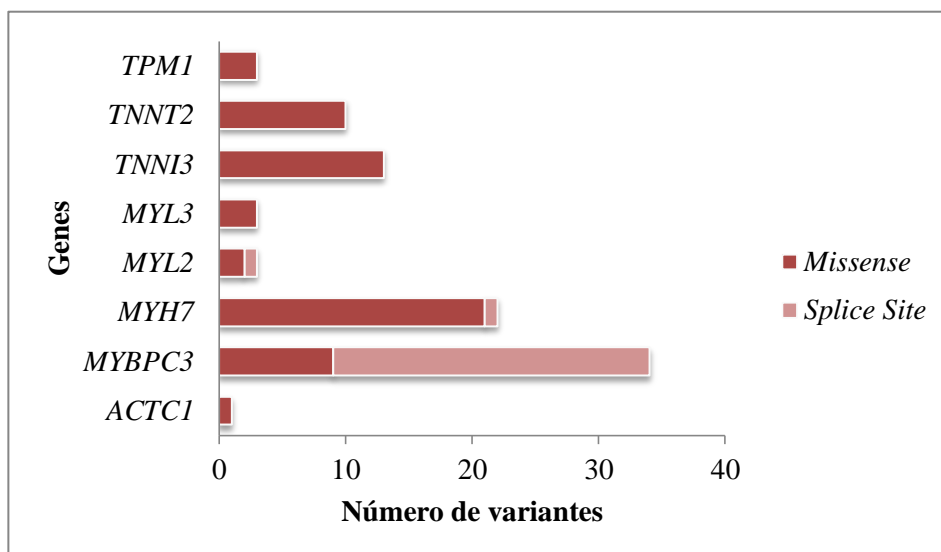


Figura 2. Variantes Patogénicas. Distribuição das variantes previamente classificadas como patogénicas incluídas na análise por gene e tipo. Cada linha do gráfico representa o número de variantes *missense* e *splice site* do respetivo gene.

Após aplicação dos critérios de classificação ACMG, tal como explicitado anteriormente, foi atribuída a classificação de *pathogenic* a 29 variantes (33%), 27 (31%) foram classificadas como *likely pathogenic* e 33 (37%) como *uncertain significance*, sendo que nesta última categoria estão inseridas maioritariamente variantes *splice site* (19) (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Classificação das Variantes Patogênicas Seleccionadas de Acordo com os Critérios ACMG

Nº	Gene	Identificação da Variante	Estudos Familiares	Estudos Funcionais	Frequência na População (ExAC)	Outros Critérios	Classificação Final	
1	<i>ACTC1</i>	c.301G>A (p.Glu101Lys)	ECS: <i>PStrong</i>	PS3	0.00001	Score Z = 5.2 PP ² PP ⁴	<i>Pathogenic</i>	
2		c.2374T>C(p.Trp792Arg)	SECS	PS3	PM2	PP ⁴	<i>Likely Pathogenic</i>	
3		c.2308G>A(p.Asp770Asn)	SECS	ND	0.00001	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>	
4		c.1624G>C(p.Glu542Gln)	ECS: <i>PStrong</i>	PS3	0.00003	PP ⁴	<i>Pathogenic</i>	
5		c.1505G>A(p.Arg502Gln)	ECS: <i>PStrong</i>	ND	PM2	PP ⁴	<i>Likely Pathogenic</i>	
6		c.1484G>A (p.Arg495Gln)	ECS: <i>PStrong</i>	PS3	0.00001	PM5 PP ⁴	<i>Pathogenic</i>	
7		c.1483C>G (p.Arg495Gly)	SECS	ND	PM2	PM5 PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>	
8		c.772G>A(p.Glu258Lys)	ECS: <i>PStrong</i>	PS3	0.00004	PP ⁴	<i>Pathogenic</i>	
9		c.655G>T(p.Val219Phe)	SECS	PS3	0.00001	PM5 PP ⁴	<i>Likely Pathogenic</i>	
10		c.655G>C (p.Val219Leu)	SECS	PS3	PM2	PM5 PP ⁴	<i>Likely Pathogenic</i>	
11		c.3815-1G>A	SECS	ND	PM2	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>	
12		c.3627+1G>A	ECS: <i>PStrong</i>	ND	PM2	PP ⁴	<i>Likely Pathogenic</i>	
13		c.3491-2A>T	SECS	ND	PM2	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>	
14		c.3331-2A>C	SECS	ND	PM2	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>	
15		c.3330+2T>G	SECS	PS3	PM2	PP ⁴	<i>Likely Pathogenic</i>	
16		c.3190+2T>G	SECS	ND	PM2	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>	
17		c.3190+1G>A	SECS	ND	PM2	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>	
18		<i>MYBPC3</i>	c.2309-2A>G	SECS	ND	PM2	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>
19			c.2308+1G>T	ECS: <i>PStrong</i>	ND	PM2	PP ⁴	<i>Likely Pathogenic</i>
20			c.2308+1G>A	ECS: <i>PStrong</i>	PS3	PM2	PP ⁴	<i>Pathogenic</i>
21			c.1928-2A>G	ECS: <i>PStrong</i>	PS3	PM2	PP ⁴	<i>Pathogenic</i>
22			c.1897+1G>A	SECS	ND	PM2	PP ⁴	<i>Uncertain Significance</i>

23		c.1624+2T>C	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
24		c.1458-1G>A	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
25		c.1351+2T>C	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
26		c.1351+1G>A	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
27		c.1227-2A>G	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
28		c.1090+1G>T	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
29		c.1090+1G>A	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
30		c.927-2A>G	ECS: PStrong	ND	PM2	PP'4	<i>Likely Pathogenic</i>
31		c.821+1G>C	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
32		c.821+1G>A	ECS: PStrong	ND	0.00004	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
33		c.772+1G>A	ECS: PStrong	ND	PM2	PP'4	<i>Likely Pathogenic</i>
34		c.655-1G>A	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
35		c.26-2A>G	SECS	ND	PM2	PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
36		c.5134C>T (p.Arg1712Trp)	ECS: PStrong	ND	PM2	PM5 Score Z= 6.54 PP'2	<i>Pathogenic</i>
37		c.4498C>T (p.Arg1500Trp)	SECS	PS3	PM2	PM5 Score Z= 6.54 PP'2	<i>Pathogenic</i>
38		c.4135G>A (p.Ala1379Thr)	ECS: PStrong	ND	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	<i>Likely Pathogenic</i>
39		c.3346G>A (p.Glu1116Lys)	SECS	ND	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	<i>Uncertain Significance</i>
40		c.2788G>A (p.Glu930Lys)	SECS	ND	PM2	PM5 Score Z= 6.54 PP'2	<i>Likely Pathogenic</i>
41	MYH7	c.2770G>A (p.Glu924Lys)	SECS	PS3	PM2	PS2 ^[41, 42] Score Z= 6.54 PP'2	<i>Pathogenic</i>
42		c.2710C>T (p.Arg904Cys)	ECS: PStrong	ND	0.00001	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	<i>Likely Pathogenic</i>
43		c.2389G>A (p.Ala797Thr)	ECS: PStrong	ND	0.00003	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	<i>Likely Pathogenic</i>
44		c.2302G>A (p.Gly768Arg)	SECS	ND	PM2	PS1 Score Z= 6.54 PP'2	<i>Likely Pathogenic</i>
45		c.2221G>A (p.Gly741Arg)	SECS	ND	PM2	PS1 PM5	<i>Pathogenic</i>
46		c.2191C>T (p.Pro731Ser)	SECS	ND	PM2	PM5 Score Z= 6.54 PP'2	<i>Likely Pathogenic</i>

47		c.1987C>T (p.Arg663Cys)	SECS	PS3	PM2	PM5 Score Z= 6.54 PP'2	Pathogenic
48		c.1954A>G (p.Arg652Gly)	ECS: PStrong	ND	0.00001	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	Uncertain Significance
49		c.1816G>A (p.Val606Met)	ECS: PStrong	PS3	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	Pathogenic
50		c.1012G>A (p.Val338Met)	SECS	ND	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	Uncertain Significance
51		c.842G>C (p.Arg281Thr)	SECS	ND	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	Uncertain Significance
52		c.767G>A (p.Gly256Glu)	ECS: PStrong	PS3	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	Pathogenic
53		c.746G>A (p.Arg249Gln)	ECS: PStrong	PS3	PM2	PM6 ^[43,44] Score Z= 6.54 PP'2	Pathogenic
54		c.740T>G (p.Phe247Cys)	SECS	ND	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	Uncertain Significance
55		c.596C>T (p.Ala199Val)	SECS	ND	PM2	Score Z= 6.54 PP'2 PP'4	Uncertain Significance
56		c.438G>T (p.Lys146Asn)	SECS	ND	PM2	PS2 ^[41] Score Z= 6.54 PP'2	Likely Pathogenic
57		c.732+1G>A	SECS	ND	PM2	PP'4	Uncertain Significance
58		c.173G>A (p.Arg58Gln)	SECS	PS3	0.00001	PP'4	Uncertain Significance
59	MYL2	c.64G>A (p.Glu22Lys)	ECS: PStrong	PS3	0.00001	PP'4	Pathogenic
60		c.403-1G>C	SECS	PS3	0.00003	PP'4	Likely Pathogenic
61		c.445A>G (p.Met149Val)	ECS: PStrong	PS3	PM2	PM5 PP'4	Pathogenic
62	MYL3	c.281G>A (p.Arg94His)	ECS: PStrong	ND	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
63		c.170C>G (p.Ala57Gly)	ECS: PStrong	PS3	0.00020	PP'4	Pathogenic
64		c.611G>A (p.Arg204His)	SECS	PS3	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
65		c.575G>A (p.Arg192His)	SECS	PS3	PM2	PM6 ^[45] PM5	Pathogenic
66		c.557G>A (p.Arg186Gln)	ECS: PStrong	ND	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
67	TNNI3	c.544G>A (p.Glu182Lys)	SECS	ND	PM2	PM6 ^[46] PP'4	Uncertain Significance
68		c.509G>A (p.Arg170Gln)	SECS	ND	PM2	PS2 ^[47] PM5	Likely Pathogenic
69		c.508C>T (p.Arg170Trp)	SECS	ND	PM2	PM5 PP'4	Uncertain Significance
70		c.485G>A (p.Arg162Gln)	ECS: PStrong	PS3	0.00003	PM5 PP'4	Pathogenic

71		c.470C>T (p.Ala157Val)	ECS: PStrong	ND	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
72		c.434G>A (p.Arg145Gln)	SECS	PS3	0.00003	PM5 PP'4	Likely Pathogenic
73		c.433C>T (p.Arg145Trp)	ECS: PStrong	PS3	0.00001	PM5 PP'4	Pathogenic
74		c.433C>G (p.Arg145Gly)	ECS: PStrong	PS3	PM2	PM5 PP'4	Pathogenic
75		c.422G>A (p.Arg141Gln)	ECS: PStrong	ND	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
76		c.407G>A (p.Arg136Gln)	SECS	ND	0.00001	PP'4	Uncertain Significance
77		c.536C>T (p.Ser179Phe)	ECS: PSupporting	PS3	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
78		c.517C>T (p.Arg173Trp)	ECS: PStrong	PS3	PM2	PM5 PP'4	Pathogenic
79		c.421C>T (p.Arg141Trp)	ECS: PStrong	PS3	PM2	PM5 PM6 ^[48]	Pathogenic
80		c.388C>T (p.Arg130Cys)	SECS	PS3	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
81	TNNT2	c.281G>A (p.Arg94His)	SECS	ND	PM2	PM5 PP'4	Uncertain significance
82		c.280C>T (p.Arg94Cys)	SECS	ND	PM2	PM5 PP'4	Uncertain Significance
83		c.275G>A (p.Arg92Gln)	SECS	PS3	PM2	PS2 ^[41] PM5	Pathogenic
84		c.304C>T (p.Arg102Trp)	ECS: PStrong	PS3	0.00001	PP'4	Pathogenic
85		c.244G>A (p.Gly82Arg)	ECS: PStrong	ND	PM2	PP'4	Likely Pathogenic
86		c.236T>A (p.Ile79Asn)	ECS: PStrong	PS3	PM2	PP'4	Pathogenic
87		c.284T>C (p.Val95Ala)	ECS: PStrong	PS3	PM2	Score Z= 3.42 PP'2 PP'4	Pathogenic
88	TPM1	c.523G>A(p.Asp175Asn)	ECS: PStrong	PS3	PM2	Score Z= 3.42 PP'2 PP'4	Pathogenic
89		c.688G>A(p.Asp230Asn)	ECS: PStrong	PS3	PM2	Score Z= 3.42 PP'2 PP'4	Pathogenic

ECS, Evidência de co-segregação; ND, Não documentado; SECS, Sem evidência de co-segregação P, Pathogenic; S, Strong; M, Moderate, P' Supporting;

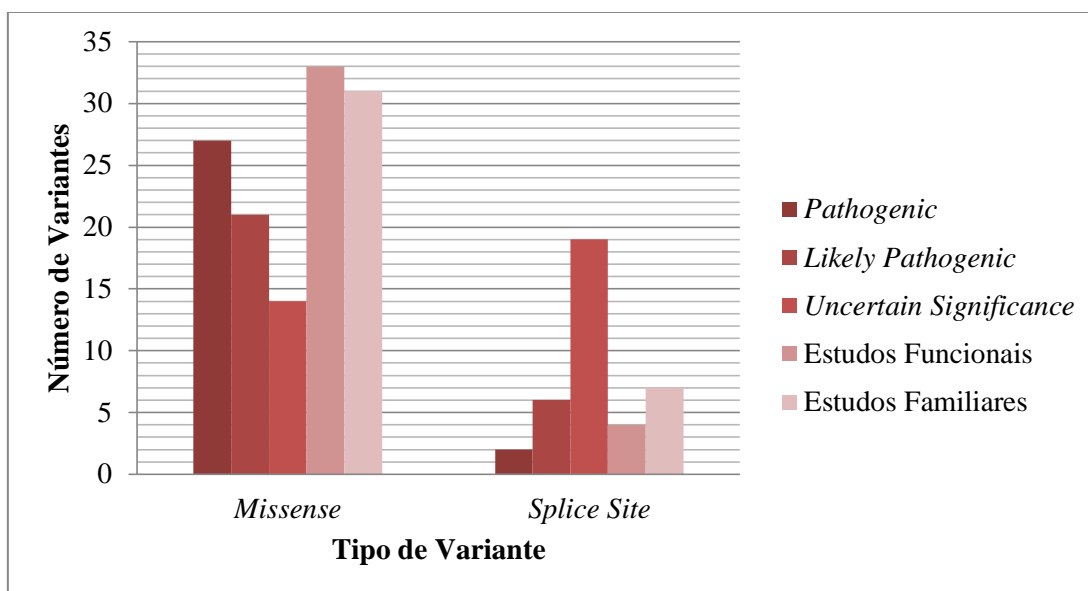


Figura 3. Classificação das Variantes Patogénicas. Distribuição das variantes patogénicas *missense* (esquerda) e *splice site* (direita) tendo em conta a sua classificação de acordo com as linhas orientadoras do ACMG – *pathogenic*, *likely pathogenic* e *uncertain significance* – e a existência de estudos funcionais ou familiares a suportar a sua patogénicidade.

A corroborar a sua patogénicidade, 37 variantes (42%) têm estudos funcionais que demonstram que a alteração conduz a um efeito prejudicial no gene ou no seu produto. Os estudos funcionais evidenciam essencialmente alteração dos mecanismos de *splicing*,^[49, 50] da síntese e da integridade da proteína,^[49, 51, 60, 52-59] bem como modificação da cinética do cálcio, da atividade da ATPase e da interação entre os miofilamentos.^[61, 62, 71-80, 63, 81-90, 64, 91-100, 65, 101-110, 66-70] Verificou-se ainda alteração da força máxima gerada, com comprometimento do relaxamento muscular.^[71, 104, 111-114] (Vide Tabela 1 em anexo)

Relativamente a 39 variantes (43%) foram realizados estudos familiares em que se verifica a co-segregação da doença com a variante em múltiplos membros da família (Vide Tabela 2 em anexo).^[43, 44, 117-126, 45, 127-136, 50, 137-146, 73, 147-156, 76, 157-162, 103, 110, 115, 116]

A maioria das variantes (78%) não está listada no ExAC, constituindo assim um critério de patogénicidade.

Variantes Benignas

Neste grupo foram integradas 111 variantes dos genes *ACTN2* (7), *ILK* (1), *JPH2* (3), *LMNA* (2), *MYBPC3* (9), *MYH6* (19), *MYH7* (7), *MYL2* (2), *MYL3* (1), *MYLK2* (7), *MYOZ2* (1), *NEXN* (1), *PDLIM3* (3), *PRKAG2* (3), *TCAP* (2), *TNNC1* (1), *TNNI3* (2), *TNNT2* (4), *TTN* (36), das quais 69 *missense*, 38 *splice site*, 3 *5'-UTR* e 1 *intronic*. (Figura 4)

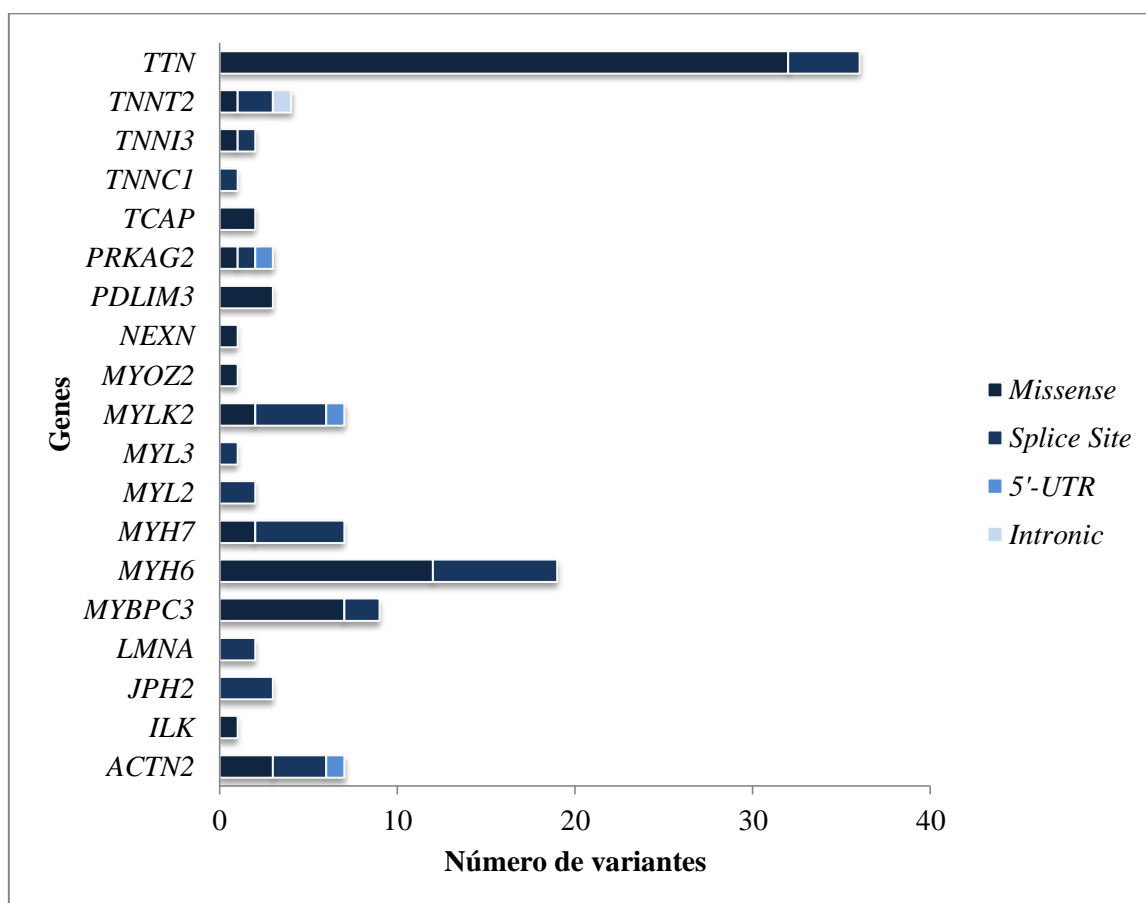


Figura 3. Variantes Benignas. Distribuição das variantes previamente classificadas como benignas incluídas na análise por gene e tipo. Cada linha do gráfico representa o número de variantes *missense*, *splice site*, *5'-UTR* e *intronic* do respetivo gene.

A frequência na população de quase todas estas variantes é superior à frequência alélica máxima expectável para a MCH (4.0×10^{-5}) [35], constituindo este facto um critério de benignidade (BS1) (Tabela 3). Apenas uma destas variantes não cumpre esta condição (assinalada com * na Tabela 3).

Contudo, na revisão da literatura efectuada, não estão descritos estudos funcionais ou familiares que suportem o seu comportamento benigno.

Somente para duas destas variantes estão publicados um estudo funcional e um estudo familiar que, em vez de um comportamento benigno, sustentam um efeito patogénico. Estudo funcional revelou que a proteína variante *TNNI3* Pro82Ser compromete a cooperação entre os miofilamentos e induz disfunção diastólica.^[164] Acerca da variante *MYH7* Ala26Val foi realizado um estudo familiar envolvendo 37 indivíduos pertencentes à mesma família, tendo-se identificado que 9 elementos apresentam a variante, dos quais 4 têm características clínicas de MCH e 28 não expressam a variante, nem fenótipo de MCH.^[163] Estes dados fundamentam a co-segregação da variante e do fenótipo, de nível *strong*.

Assim sendo, todas as variantes deste grupo foram classificadas como *uncertain significance*.

Tabela 3. Classificação das Variantes Benignas Selecionadas de acordo com os Critérios ACMG

Nº	Gene	Identificação da Variante	Estudos Familiares/ Funcionais	Frequência na População (ExAC)	Identificada em doente com MCH	Classificação Final
1	ACTN2	c.-22C>T	ND	0.02615	-	<i>Uncertain Significance</i>
2		c.536+10C>T	ND	0.00130	-	<i>Uncertain Significance</i>
3		c.877-8C>G	ND	0.7753	-	<i>Uncertain Significance</i>
4		c.1298C>T (p.Ser433Leu)	ND	0.00080	-	<i>Uncertain Significance</i>
5		c.1423G>A (p.Asp475Asn)	ND	0.00723	-	<i>Uncertain Significance</i>
6		c.1810A>G (p.Met604Val)	ND	0.00585	-	<i>Uncertain Significance</i>
7		c.2367+8A>G	ND	0.00016	-	<i>Uncertain Significance</i>
8	ILK	c.435A>C (p.Arg145Ser)	ND	0.00078	-	<i>Uncertain Significance</i>
9	JPH2	c.1289-7C>T	ND	0.01251	-	<i>Uncertain Significance</i>
10		c.380-6C>T	ND	0.00414	-	<i>Uncertain Significance</i>
11		c.380-9C>G	ND	0.00513	-	<i>Uncertain Significance</i>
12	LMNA	c.810+13G>T	ND	0.01681	-	<i>Uncertain Significance</i>
13		c.811-13T>A	ND	0.00235	-	<i>Uncertain Significance</i>
14	MYBPC3	c.3004C>T (p.Arg1002Trp)	ND	0.00067	-	<i>Uncertain Significance</i>
15		c.2737+12C>T	ND	0.10086	-	<i>Uncertain Significance</i>
16		c.2498C>T (p.Ala833Val)	ND	0.00222	-	<i>Uncertain Significance</i>
17		c.1790+7G>A	ND	0.000602	Sim ^[165]	<i>Uncertain Significance</i>
18		c.1564G>A (p.Ala522Thr)	ND	0.00039	Sim ^[166, 167]	<i>Uncertain Significance</i>
19		c.1144C>T (p.Arg382Trp)	ND	0.00422	Sim ^[168]	<i>Uncertain Significance</i>
20		c.977G>A (p.Arg326Gln)	ND	0.00551	Sim ^[168-171]	<i>Uncertain Significance</i>
21	c.706A>G (p.Ser236Gly)	ND	0.10790	Sim ^[168-170, 172]	<i>Uncertain Significance</i>	
22	c.472G>A (p.Val158Met)	ND	0.09043	Sim ^[169, 172]	<i>Uncertain Significance</i>	

23		c.4838T>C (p.Val1613Ala)	ND	0.01463	-	<i>Uncertain Significance</i>
24		c.4778A>T (p.Gln1593Leu)	ND	0.01470	-	<i>Uncertain Significance</i>
25		c.4360-7C>T	ND	0.01470	-	<i>Uncertain Significance</i>
26		c.4359+13C>T	ND	0.35634	-	<i>Uncertain Significance</i>
27		c.4359+8A>C	ND	0.00082	-	<i>Uncertain Significance</i>
28		c.3979-8C>T	ND	0.02308	-	<i>Uncertain Significance</i>
29		c.3979-9C>G	ND	0.01540	-	<i>Uncertain Significance</i>
30		c.3979-11C>G	ND	0.01218	-	<i>Uncertain Significance</i>
31		c.3883G>C (p.Glu1295Gln) r	ND	0.00325	-	<i>Uncertain Significance</i>
32	MYH6	c.3388G>A (p.Ala1130Thr)	ND	0.10033	-	<i>Uncertain Significance</i>
33		c.3302T>C (p.Val1101Ala)	ND	0.34610	-	<i>Uncertain Significance</i>
34		c.2890G>T (p.Ala964Ser)	ND	0.00048	-	<i>Uncertain Significance</i>
35		c.2806G>T (p.Ala936Ser)	ND	0.00239	-	<i>Uncertain Significance</i>
36		c.2579G>A (p.Arg860His)	ND	0.00166	-	<i>Uncertain Significance</i>
37		c.2071G>A (p.Val691Ile)	ND	0.00079	-	<i>Uncertain Significance</i>
38		c.1132G>A (p.Gly378Ser)	ND	0.00088	-	<i>Uncertain Significance</i>
39		c.800-11A>G	ND	0.7565	-	<i>Uncertain Significance</i>
40		c.622G>A (p.Asp208Asn)	ND	0.00550	Doente com cardiomiopatia não especificada. ^[173]	<i>Uncertain Significance</i>
41		c.166G>A (p.Gly56Arg)	ND	0.06980	Sim ^[174]	<i>Uncertain Significance</i>
42		c.3972+15C>T	ND	0.01183	-	<i>Uncertain Significance</i>
43		c.3853+7C>T	ND	0.00229	-	<i>Uncertain Significance</i>
44	MYH7	c.3770A>G (p.Asn1257Ser)	ND	0.00031	-	<i>Uncertain Significance</i>
45		c.2923-18G>A	ND	0.01523	-	<i>Uncertain Significance</i>
46		c.2679+7C>T	ND	0.00003 *	-	<i>Uncertain Significance</i>

47		c.2162+4G>A	ND	0.00081	-	<i>Uncertain Significance</i>
48		c.77C>T (p.Ala26Val)	ECS: Strong	0.00057	Sim ^[163, 175-177]	<i>Uncertain Significance</i>
49	MYL2	c.275-7G>A	ND	0.00014	-	<i>Uncertain Significance</i>
50		c.4-14C>T	ND	0.01287	-	<i>Uncertain Significance</i>
51	MYL3	c.559+6C>T	ND	0.00020	Sim ^[7]	<i>Uncertain Significance</i>
52		c.-67T>C	ND	0.05390	-	<i>Uncertain Significance</i>
53		c.266G>A(p.Gly89Asp)	ND	0.00402	-	<i>Uncertain Significance</i>
54		c.508G>A (p.Glu170Lys)	ND	0.00061	-	<i>Uncertain Significance</i>
55	MYLK2	c.1082+11G>A	ND	0.02061	-	<i>Uncertain Significance</i>
56		c.1295+4C>A	ND	0.00064	-	<i>Uncertain Significance</i>
57		c.1710+15A>G	ND	0.07943	-	<i>Uncertain Significance</i>
58		c.1711-6C>T	ND	0.00114	-	<i>Uncertain Significance</i>
59	MYOZ2	c.29A>C (p.Gln10Pro)	ND	0.00270	-	<i>Uncertain Significance</i>
60	NEXN	c.733G>A (p.Gly245Arg)	ND	0.18459	-	<i>Uncertain Significance</i>
61		c.734C>T (p.Thr245Ile)	ND	0.01721	-	<i>Uncertain Significance</i>
62	PDLIM3	c.379G>A (p.Val127Met)	ND	0.00911	-	<i>Uncertain Significance</i>
63		c.29C>T (p.Pro10Leu)	ND	0.00086	-	<i>Uncertain Significance</i>
64		c.114+12C>T	ND	0.05012	-	<i>Uncertain Significance</i>
65	PRKAG2	c.59G>T (p.Ser20Ile)	ND	0.00648	-	<i>Uncertain Significance</i>
66		c.-26C>T	ND	0.17431	-	<i>Uncertain Significance</i>
67	TCAP	c.191C>T (p.Ser64Leu)	ND	0.00111	-	<i>Uncertain Significance</i>
68		c.316C>T (p.Arg106Cys)	ND	0.01958	Sim ^[147]	<i>Uncertain Significance</i>
69	TNNC1	c.203-5C>T	ND	0.00046	-	<i>Uncertain Significance</i>
70	TNNI3	c.244C>T (p.Pro82Ser)	PS3	0.00169	Sim ^[178, 179]	<i>Uncertain Significance</i>

71		c.25-4C>T	ND	0.00027	-	<i>Uncertain Significance</i>
72	TNNT2	c.758A>G (p.Lys253Arg)	ND	0.05073	Sim ^[169, 180]	<i>Uncertain Significance</i>
73		c.294+7G>A	ND	0.00317	-	<i>Uncertain Significance</i>
74		c.133+12G>A	ND	0.00494	-	<i>Uncertain Significance</i>
75		c.68-1626A>G	ND	0.00233	-	<i>Uncertain Significance</i>
76		c.33340+10T>C	ND	0.00244	-	<i>Uncertain Significance</i>
77	TTN	c.28916G>A (p.Arg9639Lys)	ND	0.01241	-	<i>Uncertain Significance</i>
78		c.32254G>A (p.Val10752Ile)	ND	0.00349	-	<i>Uncertain Significance</i>
79		c.27832A>G (p.Ile9278Val)	ND	0.35364	-	<i>Uncertain Significance</i>
80		c.27220G>A (p.Glu9074Lys)	ND	0.01456	-	<i>Uncertain Significance</i>
81		c.28313G>A (p.Arg9438Gln)	ND	0.04512	-	<i>Uncertain Significance</i>
82		c.21894G>T (p.Gln7298His)	ND	0.03971	-	<i>Uncertain Significance</i>
83		c.25398T>A (p.Asp8466Glu)	ND	0.01122	-	<i>Uncertain Significance</i>
84		c.25274G>A (p.Ser8425Asn)	ND	0.17836	-	<i>Uncertain Significance</i>
85		c.25064C>A (p.Ala8355Glu)	ND	0.30877	-	<i>Uncertain Significance</i>
86		c.24431A>C (p.Glu8144Ala)	ND	0.17633	-	<i>Uncertain Significance</i>
87		c.19445C>T (p.Ser6482Leu)	ND	0.00668	-	<i>Uncertain Significance</i>
88		c.22384G>C (p.Asp7462His)	ND	0.17861	-	<i>Uncertain Significance</i>
89		c.17312C>T (p.Ala5771Val)	ND	0.01645	-	<i>Uncertain Significance</i>
90		c.19204A>G (p.Met6402Val)	ND	0.00488	-	<i>Uncertain Significance</i>
91	c.15272A>G (p.Asp5091Gly)	ND	0.00296	-	<i>Uncertain Significance</i>	
92	c.17741-9A>G	ND	0.00289	-	<i>Uncertain Significance</i>	
93	c.11446G>A (p.Val3816Ile)	ND	0.00440	-	<i>Uncertain Significance</i>	
94	c.10256G>A (p.Ser3419Asn)	ND	0.19110	-	<i>Uncertain Significance</i>	

95	<i>TTN</i>	.9781G>A (p.Val3261Met)	ND	0.19510	-	<i>Uncertain Significance</i>
96		c.9461A>G (p.Lys3154Arg)	ND	0.06589	-	<i>Uncertain Significance</i>
97		c.8492G>A (p.Ser2831Asn)	ND	0.07594	-	<i>Uncertain Significance</i>
98		c.7830G>C (p.Met2610Ile)	ND	0.07135	-	<i>Uncertain Significance</i>
99		c.7174G>A (p.Gly2392Ser)	ND	0.06532	-	<i>Uncertain Significance</i>
100		c.6727G>T (p.Asp2243Tyr)	ND	0.00272	-	<i>Uncertain Significance</i>
101		c.5231C>T (p.Pro1744Leu)	ND	0.00634	-	<i>Uncertain Significance</i>
102		c.3601A>G (p.Lys1201Glu)	ND	0.49980	-	<i>Uncertain Significance</i>
103		c.2432C>T (p.Thr811Ile)	ND	0.16907	-	<i>Uncertain Significance</i>
104		c.1537-4G>A	ND	0.00216	-	<i>Uncertain Significance</i>
105		c.1492G>A (p.Val498Ile)	ND	0.01484	-	<i>Uncertain Significance</i>
106		c.1398+8C>T	ND	0.00350	-	<i>Uncertain Significance</i>
107		c.1079G>C (p.Arg360Thr)	ND	0.00620	-	<i>Uncertain Significance</i>
108		c.1003G>A (p.Val335Met)	ND	0.00391	-	<i>Uncertain Significance</i>
109	c.982C>T (p.Arg328Cys)	ND	0.12379	-	<i>Uncertain Significance</i>	
110	c.542G>A (p.Ser181Asn)	ND	0.00553	-	<i>Uncertain Significance</i>	
111	c.178G>T (p.Asp60Tyr)	ND	0.01389	-	<i>Uncertain Significance</i>	

ECS, Evidência de co-segregação; ND, Não documentado

Análise *in silico*

A performance das diferentes ferramentas computacionais de predição de significado clínico de variantes genéticas foi avaliada comparando a sua interpretação, isto é se priorizam como potencialmente patogénica determinada variante ou não, com a classificação atribuída de acordo com a plataforma “ClinVar” (Figura 4).

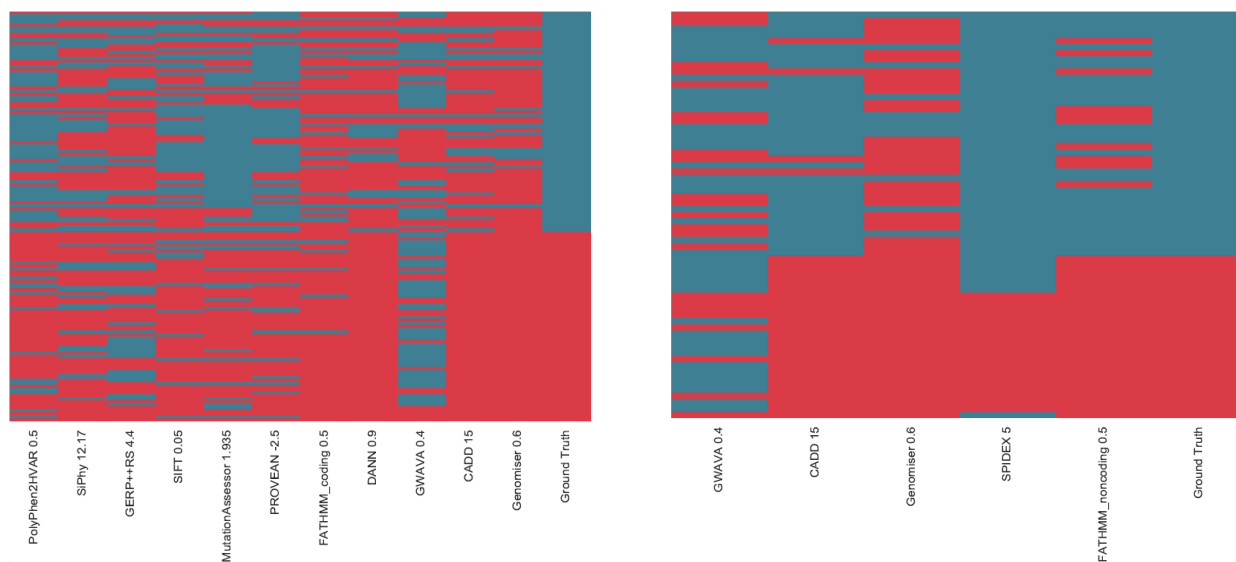


Figura 4. Performance das ferramentas computacionais de predição por variante. Cada linha corresponde a uma variante. Cada coluna corresponde a uma ferramenta computacional, estando representadas aquelas com melhor desempenho para as variantes exónicas (esquerda) e para as intrónicas (direita). As colunas vermelhas correspondem a variantes priorizadas e as azuis a variantes não priorizadas, pelos respetivos programas. O resultado de uma ferramenta ideal seria igual ao da coluna “*GroundTruth*”, que representa a classificação atribuída de acordo com a base “ClinVar” e na qual as variantes classificadas como patogénicas estão representadas a vermelho e as classificadas como benignas a azul.

Neste sentido, foi calculada a proporção de variantes que são erradamente classificadas como patogénicas (taxa de falsos positivos), a proporção de variantes que são erradamente classificadas como benignas (taxa de falsos negativos), a proporção de variantes patogénicas que são classificadas como tal (sensibilidade) e a proporção de variantes benignas que são classificadas como tal (especificidade) para cada um dos programas (Tabela 4).

Tabela 4. Performance das diferentes ferramentas computacionais de predição

Ferramentas Computacionais	Verdadeiros Positivos	Falsos Negativos	Falsos Positivos	Verdadeiros Negativos	Taxa de Falsos Positivos (%)	Taxa de Falsos Negativos (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
GERP++RS	58	31	47	64	42.3	34.8	65.2	57.7
SIFT	54	35	29	82	26.1	39.3	60.7	73.9
PolyPhen-2	49	40	22	89	19.8	44.9	55.1	80.2
Mutation Assessor	49	40	18	93	16.2	44.9	55.1	83.8
FATHMM_coding	58	31	53	58	47.7	34.8	65.2	52.3
FATHMM_noncoding	26	63	10	101	9.0	70.8	29.2	91.0
SPIDEX	20	69	0	111	0	77.6	22.4	100
CADD	89	0	54	57	48.6	0	100	51.4
PROVEAN	89	0	111	0	100	0	100	0
DANN	89	0	49	62	44.1	0	100	55.9
GWAVA	28	61	53	58	47.7	68.5	31.5	52.3
SiPhy	67	22	40	71	36.0	24.7	75.3	64.0
Genomiser	89	0	84	27	75.7	0	100	24.3

Discussão

As novas tecnologias de sequenciação genética têm revolucionado tanto a prática clínica como a investigação de muitas patologias, em particular da MCH, com potencial em contexto preventivo e diagnóstico. Contudo, o crescente acesso à sequenciação genética implica novos desafios inerentes à validação clínica das variantes genéticas identificadas. [22, 181]

A classificação manual, ou seja, aquela com base na literatura científica disponível e sem recurso a ferramentas computacionais, das variantes consideradas não se mostrou uniformemente concordante com aquela atribuída previamente por múltiplos autores ou painel de especialistas e sem conflitos de interpretação, de acordo com a base “ClinVar”.

Das 89 variantes previamente classificadas como patogénicas, 56 (63%) foram classificadas como *pathogenic* ou *likely pathogenic* e 33 (37%) receberam a classificação de *uncertain significance*. O grupo de variantes classificadas como *pathogenic* ou *likely pathogenic* é em grande parte constituído por variantes *missense* (48), ao passo que as variantes classificadas como *uncertain significance* são maioritariamente *splice site* (19). Tal diferença prende-se com o facto de existir um maior número de variantes *missense* para as quais foram realizados estudos funcionais *in vitro/in vivo* ou estudos de co-segregação familiar. Cerca de 70 % das variantes *missense* têm estudos funcionais ou familiares a suportar a sua patogenicidade, ao passo que apenas para 9 (33%) das variantes *splice site* revistas estão publicados tais estudos. Estas últimas têm vindo a ser classificadas como patogénicas com base fundamentalmente em programadas computacionais preditores de significado clínico de variantes genéticas, não contemplados nesta classificação manual.

Algumas variantes incluídas para as quais foram realizados estudos familiares que mostram co-segregação da variante com a doença (MCH) com forte nível de evidência ou estudos funcionais que revelam um efeito deletério ao nível do gene ou do seu produto são, ainda assim, classificadas como *uncertain significance*. Isto acontece pois os critérios de patogenicidade referentes a estes dois grupos de estudos não são considerados suficientemente fortes pelo sistema de classificação para, na ausência de outros critérios, permitirem a classificação da variante numa categoria de

patogenicidade. Apesar disto, em termos clínicos, é diferente interpretar variantes classificadas como de significado incerto para as quais existem estudos funcionais ou familiares ou para as quais não foi realizada nenhuma investigação semelhante.

Outro aspecto importante na atribuição de critérios de patogenicidade prende-se com a valorização dos diferentes estudos funcionais. Estes são uma poderosa ferramenta indicadora do efeito patogénico de uma variante, mas nem todos os estudos funcionais predizem com a mesma segurança um possível efeito deletério no gene ou na função da proteína que este codifica. A validade dos estudos funcionais deve considerar o quanto estes reflectem o ambiente biológico sendo que estudos realizados em tecidos obtidos a partir de biópsias de doentes ou modelos animais fornecem geralmente melhor evidência que estudos *in vitro*.^[29] Do mesmo modo, a reprodutibilidade e a robustez dos estudos tem também impacto na confiança relativamente ao critério de patogenicidade que estes sustentam. No entanto, esta distinção não é tida em conta no momento da classificação das variantes. Apesar das linhas orientadoras propostas pela “ACMG” reforçarem o facto de que esta informação deve ser cuidadosamente avaliada e que apenas devem ser tidos em conta estudos funcionais corretamente desenvolvidos, não há discriminação em termos de nível de evidência no que aos estudos funcionais diz respeito. Tal diferenciação seria importante, à semelhança do que foi proposto pelo ACGS para os estudos familiares, em que é atribuído um nível de evidência de co-segregação de acordo com o número de meioses identificado.

Todas as variantes previamente classificadas como benignas na base “ClinVar” foram categorizadas neste estudo como *uncertain significance*, uma vez que não existem estudos funcionais, familiares ou casos relevantes descritos que permitam atribuir uma classificação diferente desta. O único critério atribuído que suporta o comportamento benigno destas variantes diz respeito à sua frequência na população descrita na plataforma ExAC, que é superior à proporção máxima de casos de MCH atribuída a determinado alelo. Na verdade, para duas destas variantes até estão descritos estudos funcionais e familiares que orientam a sua interpretação clínica no sentido da patogenicidade, reforçando a incerteza do seu significado.

Assim sendo, a classificação das variantes deve ser transmitida aos clínicos juntamente com toda a informação disponível e as ressalvas inerentes, a fim de potenciar o rigor da sua interpretação.^[23]

Relativamente à performance das diferentes ferramentas computacionais aplicadas verifica-se que estas têm uma sensibilidade média de aproximadamente 66% e especificidade de aproximadamente 61%. Estas ferramentas são, portanto, capazes de identificar como patogénicas a maior parte das variantes que de facto o são, mas em muitos casos não as identificam a todas, deixando algumas por priorizar. Por outro lado, sobretudo as ferramentas que apresentaram uma maior sensibilidade, têm associadas elevadas taxas de falsos positivos, o que significa que priorizam erradamente variantes como sendo patogénicas, condicionando uma investigação diagnóstica mais morosa e, em última análise, podendo comprometer o sucesso diagnóstico. Quanto à especificidade dos programas computacionais, estes classificam a maior parte das variantes benignas como não sendo responsáveis pela doença. Contudo, têm uma taxa de falsos negativos média de 34% o que significa que certas variantes são erradamente classificadas como benignas.

Estes resultados demonstram que embora os programas computacionais tenham um enorme potencial no auxílio da interpretação das variantes genéticas identificadas, para que possamos confiar nos seus resultados exigem aperfeiçoamento. ^[31, 32]

A revisão da literatura disponível acerca de cada uma das variantes e posterior atribuição de critérios de classificação constitui um método rigoroso, mas moroso e que está dependente da prévia identificação da variante e realização de estudos relacionados com o seu significado clínico. É neste sentido que os programas computacionais de predição se apresentam como uma mais-valia para o processo, especialmente quando conseguem reunir elevada sensibilidade e especificidade.

A perspectiva futura é de que estes dois métodos se complementem, a fim de oferecer aos indivíduos portadores de determinada variante genética uma interpretação rigorosa e segura do seu significado.

Em contexto clínico, o recurso a NGS levanta outro desafio relacionado com questões éticas^[22], em particular o problema dos achados acidentais, isto, é a identificação de variantes que indicam elevada probabilidade de presença ou risco de patologia não relacionada com a indicação clínica que motivou a sequenciação. Um assunto de debate é até que ponto a informação obtida por NGS deve ser transmitida aos doentes.

Concluindo, com o advento das novas tecnologias de sequenciação surgem novos desafios para os quais os clínicos devem estar preparados para gerir. A fim de tomar as melhores decisões preventivas, diagnósticas e terapêuticas para os doentes, os clínicos devem conhecer as indicações para a sequenciação do exoma/genoma e confirmar os seus resultados através da revisão da literatura disponível, integrando toda a informação com a história e características de cada doente em particular.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Carmo Fonseca pela orientação, apoio e disponibilidade prestados, que tornaram possível a realização deste Trabalho Final de Mestrado.

Reconheço também todo o auxílio e esclarecimentos dados pela Marta Ribeiro (Estudante do Programa Doutoral intitulado “Identification of novel noncoding genetic variants with functional impact in hypertrophic cardiomyopathy”, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa), pela Joana Tavares (Especialista em Bioinformática, GenoMed) e pela Dra. Marta Amorim (Geneticista Clínica, GenoMed).

Bibliografia

1. Maron, B.J., Rowin, E.J. and Maron, M.S. (2018) Global Burden of Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC: Heart Failure*, **6**, 376–378.
2. Semsarian, C., Ingles, J., Maron, M.S. and Maron, B.J. (2015) New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, **65**, 1249–1254.
3. Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., et al. (2008) Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal*, **29**, 270–276.
4. Task, A., Elliott, P.M., Ue, C., Anastakis, A., Garcia, M.A.B., Garcia, M.B., et al. (2014) 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal*, **35**, 2733–2779.
5. Spirito, P. and Autore, C. (2006) Clinical review Management of hypertrophic cardiomyopathy. *BMJ*, **332**, 1251–1255.
6. Van Driest, S.L., Ommen, S.R., Tajik, A.J., Gersh, B.J. and Ackerman, M.J. (2005) Yield of Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Mayo Clinic Proceedings*, **80**, 739–744.
7. Morita, H., Rehm, H.L., Menesses, A., McDonough, B., Roberts, A.E., Kucherlapati, R., et al. (2008) Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *The New England Journal of Medicine*, **358**, 1899–908.
8. Brito, D., Miltenberger-Miltenyi, G., Pereira, S.V., Silva, D., Diogo, A.N. and Madeira, H. (2012) Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: Genetic profile in a Portuguese population. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **31**, 577–587.
9. Kassem, H.S., Azer, R.S., Ayad, M.S., Moharem-Elgamal, S., Magdy, G., Elguindy, A., et al. (2013) Early results of sarcomeric gene screening from the egyptian national BA-HCM program. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **6**, 65–80.

10. Lopes, L.R., Zekavati, A., Syrris, P., Hubank, M., Giambartolomei, C., Dalageorgou, C., et al. (2013) Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *Journal of Medical Genetics*, **50**, 228–239.
11. Mendes De Almeida, R., Tavares, J., Martins, S., Carvalho, T., Enguita, F.J., Brito, D., et al. (2017) Whole gene sequencing identifies deep-intronic variants with potential functional impact in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS ONE*, **12**, 1–19.
12. Lopes, L.R., Rahman, M.S. and Elliott, P.M. (2013) A systematic review and meta-analysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. *Heart*, **99**, 1800–1811.
13. Sen-Chowdhry, S., Jacoby, D., Moon, J.C. and McKenna, W.J. (2016) Update on hypertrophic cardiomyopathy and a guide to the guidelines. *Nature Reviews Cardiology*, **13**, 651–675.
14. Maron, M.S., Olivotto, I., Betocchi, S., Casey, S.A., Lesser, J.R., Losi, M.A., et al. (2003) Effect of Left Ventricular Outflow Tract Obstruction on Clinical Outcome in Hypertrophic Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, **348**, 295–303.
15. Elliott, P.M., Kaski, J.C., Prasad, K., Seo, H., Slade, A.K., Goldman, J.H., et al. (1996) Chest pain during daily life in patients with hypertrophic cardiomyopathy: an ambulatory electrocardiographic study. *Eur Heart J*, **17**, 1056–1064.
16. Mehra, R. (2007) Global public health problem of sudden cardiac death. *Journal of Electrocardiology*, **40**, 118–122.
17. Smith, T.W. and Cain, M.E. (2006) Sudden cardiac death: Epidemiologic and financial worldwide perspective. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, **17**, 199–203.
18. Maron, B., Shirani, J., Poliac, L., Mathenge, R., Roberts, W.C. and Mueller, F.O. (1996) Sudden Death in Young Competitive Athletes. *Jama*, **276**, 199–204.
19. McLeod, C.J., Ackerman, M.J., Nishimura, R.A., Tajik, A.J., Gersh, B.J. and

- Ommen, S.R. (2009) Outcome of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy and a Normal Electrocardiogram. *Journal of the American College of Cardiology*, **54**, 229–233.
20. Savino, K., Bagliani, G., Crusco, F. and Padeletti, M. (2018) Electrocardiogram and Imaging An Integrated Approach to Arrhythmogenic Cardiomyopathies. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, **10**, 413–429.
21. Charron, P., Arad, M., Arbustini, E., Basso, C., Bilinska, Z., Elliott, P., et al. (2010) Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, **31**, 2715–2728.
22. Demkow, U. and Ploski, R. (2016) Next Generation Sequencing—General Information About The Technology, Possibilities, and Limitations. In *Clinical applications for next-generation sequencing*. Elsevier Inc, p. 319.
23. Biesecker, L.G. and Green, R.C. (2014) Diagnostic Clinical Genome and Exome Sequencing. *New England Journal of Medicine*, **370**, 2418–2425.
24. Bortot, B., Athanasis, E., Brun, F., Rizzotti, D., Mestroni, L., Sinagra, G., et al. (2011) High-throughput genotyping robot-assisted method for mutation detection in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Diagnostic Molecular Pathology*, **20**, 175–179.
25. Fokstuen, S., Munoz, A., Melacini, P., Iliceto, S., Perrot, A., Ozcelik, C., et al. (2011) Rapid detection of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy by custom DNA resequencing array in clinical practice. *Journal of Medical Genetics*, **48**, 572–576.
26. Parikh, V.N. and Ashley, E.A. (2017) Next-Generation Sequencing in Cardiovascular Disease: Present Clinical Applications and the Horizon of Precision Medicine. *Circulation*, **135**, 406–409.
27. Meder, B., Haas, J., Keller, A., Heid, C., Just, S., Borries, A., et al. (2011) Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, **4**, 110–122.

28. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, M.D. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.*
29. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., et al. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, **17**, 405–423.
30. Ellard, S., Baple, E.L., Owens, M., Eccles, D.M., Abbs, S. and Zandra, C. (2017) ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2017. *Association for Clinical Genetic Science*, 2017.
31. Botulinum, R.I. and Study, R. (2016) dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Non-synonymous and Splice Site SNVs. *Human Mutation*, **37**, 235–241.
32. Dong, C., Wei, P., Jian, X., Gibbs, R., Boerwinkle, E., Wang, K., et al. (2015) Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Human Molecular Genetics*, **24**, 2125–2137.
33. Richardson, T.G., Campbell, C., Timpson, N.J. and Gaunt, T.R. (2016) Incorporating non-coding annotations into rare variant analysis. *PLoS ONE*, **11**, 1–15.
34. Jarvik, G.P. and Browning, B.L. (2016) Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *American Journal of Human Genetics*, **98**, 1077–1081.
35. Whiffin, N., Minikel, E., Walsh, R., Donnell-luria, A.O., Ing, A.Y., Barton, P.J.R.R., et al. (2017) Using high-resolution variant frequencies to empower clinical genome interpretation. *Genetics in Medicine*, **19**, 1151–1158.
36. Alfares, A.A., Kelly, M.A., McDermott, G., Funke, B.H., Lebo, M.S., Baxter, S.B.,

- et al. (2015) Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: Expanded panels offer limited additional sensitivity. *Genetics in Medicine*, **17**, 880–888.
37. Walsh, R., Thomson, K.L., Ware, J.S., Funke, B.H., Woodley, J., McGuire, K.J., et al. (2017) Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genetics in Medicine*, **19**, 192–203.
38. Saltzman, A.J., Mancini-dinardo, D., Li, C., Chung, W.K., Carolyn, Y., Hurst, S., et al. (2010) The Cardiac Myosin Binding Protein C Arg502Trp Mutation: A Common Cause of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res*, **106**, 1549–1552.
39. Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E. V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., et al. (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, **536**, 285–291.
40. Samocha, K.E., Robinson, E.B., Sanders, S.J., Stevens, C., Sabo, A., McGrath, L.M., et al. (2014) A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease. *Nature Genetics*, **46**, 944–950.
41. Roberts, A.E., Kucherlapati, R., Ph, D. and Towbin, J.A. (2009) Shared Genetic Causes of Cardiac Hypertrophy in Children and Adults. **358**, 1899–1908.
42. Watkins, H., Thierfelder, L., Hwang, D.S., McKenna, W., Seidman, J.G. and Seidman, C.E. (1992) Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to de novo myosin mutations. *Journal of Clinical Investigation*, **90**, 1666–1671.
43. Greber-Platzer, S., Marx, M., Fleischmann, C., Suppan, C., Dobner, M. and Wimmer, M. (2001) Beta-myosin heavy chain gene mutations and hypertrophic cardiomyopathy in Austrian children. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **33**, 141–8.
44. Arbustini, E., Fasani, R., Morbini, P., Diegoli, M., Grasso, M., Dal Bello, B., et al. (1998) Coexistence of mitochondrial DNA and beta myosin heavy chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy with late congestive heart failure. *Heart*, **80**, 548–558.

45. Mogensen, J., Kubo, T., Duque, M., Uribe, W., Shaw, A., Murphy, R., et al. (2003) Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *Journal of Clinical Investigation*, **111**, 209–216.
46. Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Morahan, B., Seydel, K.B., et al. (2012) Genetic Testing for Dilated Cardiomyopathy in Clinical Practice. *Journal of Cardiac Failure*, **18**, 296–303.
47. Mouton, J., Pellizzon, A., Goosen, A., Kinnear, C., Herbst, P., Brink, P., et al. (2015) Diagnostic disparity and identification of two TNNI3 gene mutations, one novel and one arising de novo, in South African patients with restrictive cardiomyopathy and focal ventricular hypertrophy. *Cardiovascular Journal Of Africa*, **26**, 63–69.
48. Villard, E., Duboscq-Bidot, L., Charron, P., Benaiche, A., Conraads, V., Sylvius, N., et al. (2005) Mutation screening in dilated cardiomyopathy: Prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *European Heart Journal*, **26**, 794–803.
49. Crehalet, H., Millat, G., Albuissou, J., Bonnet, V., Rouvet, I., Rousson, R., et al. (2012) Combined use of in silico and in vitro splicing assays for interpretation of genomic variants of unknown significance in cardiomyopathies and channelopathies. *Cardiogenetics*, **2**, 6.
50. Yu, B. , Bonne,G. ,Carrier,L., Bahrend,E., Richard,P., Niel,F., Hainque,B., Cruaud,C., Gary,F., Labeit,S., Bouhour,J., Dubourg, O., Desnos,M., Hagege,A., Trent,R., Komajda,M., Fiszman,M., Schwartz, K. (1997) Organization and sequence of Human cardiac myosin binding protein C gene and identification of mutations Predicted to Produce Truncated Proteins in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation Journal*, **80**, 3.
51. Theis, J.L., Bos, J.M., Theis, J.D., Miller, D. V., Dearani, J.A., Schaff, H. V., et al. (2009) Expression patterns of cardiac myofilament proteins. *Circulation: Heart Failure*, **2**, 325–333.
52. Yin, Q., Lin, S., Lamothe, B., Lu, M., Lo, Y., Hura, G., et al. (2010) Sarcomere Mutation-Specific Expression Patterns in Human Hypertrophic Cardiomyopathy. **16**, 658–666.

53. Govada, L., Carpenter, L., da Fonseca, P.C.A., Helliwell, J.R., Rizkallah, P., Flashman, E., et al. (2008) Crystal Structure of the C1 domain of Cardiac Myosin Binding Protein-C: Implications for Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Molecular Biology*, **378**, 387–397.
54. Sarikas, A., Carrier, L., Schenke, C., Doll, D., Flavigny, J., Lindenberg, K.S., et al. (2005) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovascular Research*, **66**, 33–44.
55. Predmore, J.M., Wang, P., Davis, F., Bartolone, S., Margaret, V., Dyke, D.B., et al. (2010) Ubiquitin Proteasome Dysfunction in Human Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathies. *Circulation*, **121**, 997–1004.
56. Kasner, E., Hunter, C.A., Ph, D., Kariko, K. and Ph, D. (2010) Mutations at the Same Amino Acid in Myosin that Cause Either Skeletal or Cardiac Myopathy Have Distinct Molecular Phenotypes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **48**, 1007–1013.
57. Gruen, M. and Gautel, M. (1999) Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C. *Journal of molecular biology*, **286**, 933–49.
58. Weterman, M.A.J., Barth, P.G., Van Spaendonck-Zwarts, K.Y., Aronica, E., Poll-The, B.T., Brouwer, O.F., et al. (2013) Recessive MYL2 mutations cause infantile type i muscle fibre disease and cardiomyopathy. *Brain*, **136**, 282–293.
59. Ertz-Berger, B.R., He, H., Dowell, C., Factor, S.M., Haim, T.E., Nunez, S., et al. (2005) Changes in the chemical and dynamic properties of cardiac troponin T cause discrete cardiomyopathies in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 18219–18224.
60. Coats, C.J. and Elliott, P.M. (2013) Genetic biomarkers in hypertrophic cardiomyopathy. *Biomarkers in Medicine*, **7**, 505–516.
61. Bookwalter, C.S. and Trybus, K.M. (2006) Functional consequences of a mutation in an expressed human α -cardiac actin at a site implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 16777–16784.

62. Cuda, G., Fananapazir, L., Epstein, N.D. and Sellers, J.R. (1997) The in vitro motility activity of beta-cardiac myosin depends on the nature of the beta-myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of muscle research and cell motility*, **18**, 275–83.
63. Sata, M. and Ikebe, M. (1996) Functional analysis of the mutations in the human cardiac beta-myosin that are responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. Implication for the clinical outcome. *The Journal of clinical investigation*, **98**, 2866–2873.
64. Roopnarine, O. and Leinwand, L. a. (1998) Functional Analysis of Myosin Mutations That Cause Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Biophysical Journal*, **75**, 3023–3030.
65. Jacques, A.M., Briceno, N., Messer, A.E., Gallon, C.E., Jalilzadeh, S., Garcia, E., et al. (2008) The molecular phenotype of human cardiac myosin associated with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, **79**, 481–491.
66. Fananapazir, L., Dalakast, M.C., Cyran, F., Cohn, G. and Epstein, N.D. (1993) Missense mutations in the f8-myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Medical Sciences*, **90**, 3993–3997.
67. Szczesna, D., Ghosh, D., Li, Q., Gomes, A. V., Guzman, G., Arana, C., et al. (2001) Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations in the Regulatory Light Chains of Myosin Affect their Structure, Ca²⁺ Binding, and Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7086–7092.
68. Szczesna-Cordary, D., Guzman, G., Ng, S.-S. and Zhao, J. (2004) Familial Hypertrophic Cardiomyopathy-linked Alterations in Ca²⁺ Binding of Human Cardiac Myosin Regulatory Light Chain Affect Cardiac Muscle Contraction. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 3535–42.
69. Sanbe, A., Nelson, D., Gulick, J., Setser, E., Osinska, H., Wang, X., et al. (2000) In vivo analysis of an essential myosin light chain mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *American Heart Association*, **87**, 296–302.
70. Roopnarine, O. (2003) Mechanical defects of muscle fibers with myosin light chain mutants that cause cardiomyopathy. *Biophysical journal*, **84**, 2440–2449.

71. Szczesna-Cordary, D., Guzman, G., Zhao, J., Hernandez, O., Wei, J. and Diaz-Perez, Z. (2005) The E22K mutation of myosin RLC that causes familial hypertrophic cardiomyopathy increases calcium sensitivity of force and ATPase in transgenic mice. *Journal of cell science*, **118**, 3675–83.
72. Szczesna-Cordary, D., Jones, M., Moore, J.R., Watt, J., Kerrick, W.G.L., Xu, Y., et al. (2007) Myosin regulatory light chain E22K mutation results in decreased cardiac intracellular calcium and force transients. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21**, 3974–3985.
73. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, S.S. (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.*, **14**, 353–6.
74. Kazmierczak, K., Paulino, E.C., Huang, W., Muthu, P., Liang, J., Yuan, C.-C., et al. (2013) Discrete effects of A57G-myosin essential light chain mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **305**, H575-89.
75. Lossie, J., Ushakov, D.S., Ferenczi, M.A., Werner, S., Keller, S., Haase, H., et al. (2012) Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting. *Cardiovascular Research*, **93**, 390–396.
76. Doolan, A., Tebo, M., Ingles, J., Nguyen, L., Tsoutsman, T., Lam, L., et al. (2005) Cardiac troponin I mutations in Australian families with hypertrophic cardiomyopathy: Clinical, genetic and functional consequences. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **38**, 387–393.
77. Liu, B., Tikunova, S.B., Kline, K.P., Siddiqui, J.K. and Davis, J.P. (2012) Disease-related cardiac troponins alter thin filament Ca^{2+} association and dissociation rates. *PLoS ONE*, **7**.
78. Kobayashi, T. and Solaro, R.J. (2006) Increased Ca^{2+} affinity of cardiac thin filaments reconstituted with cardiomyopathy-related mutant cardiac troponin I.

Journal of Biological Chemistry, **281**, 13471–13477.

79. Gomes, A. V., Liang, J.S. and Potter, J.D. (2005) Mutations in human cardiac Troponin I that are associated with restrictive cardiomyopathy affect basal ATPase activity and the calcium sensitivity of force development. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 30909–30915.
80. Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Harada, K., Minakami, R., Shiraishi, F., Ohta, M., et al. (2001) Functional consequences of the mutations in human cardiac troponin I gene found in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **33**, 2095–2107.
81. Wen, Y., Xu, Y., Wang, Y., Pinto, J.R., Potter, J.D. and Kerrick, W.G.L. (2009) Functional Effects of a Restrictive Cardiomyopathy linked Cardiac Troponin I mutation (R145W) in Transgenic Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **392**, 1158–1167.
82. Yumoto, F., Lu, Q.W., Morimoto, S., Tanaka, H., Kono, N., Nagata, K., et al. (2005) Drastic Ca²⁺ sensitization of myofilament associated with a small structural change in troponin I in inherited restrictive cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**, 1519–1526.
83. Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S. and Ohtsuki, I. (2000) Effect of Arg145Gly mutation in human cardiac troponin I on the ATPase activity of cardiac myofibrils. *Journal of Biochemistry*, **127**, 355–357.
84. Elliott, K., Watkins, H. and Redwood, C.S. (2000) Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 22069–22074.
85. Wen, Y., Pinto, J.R., Gomes, A. V., Xu, Y., Wang, Y., Wang, Y., et al. (2008) Functional consequences of the human cardiac troponin I hypertrophic cardiomyopathy mutation R145G in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 20484–20494.
86. Burton, D., Abdulrazzak, H., Knott, a and Elliott, K. (2002) Two mutations in troponin I that cause hypertrophic cardiomyopathy have contrasting effects on cardiac muscle contractility. *Biochemical Journal*, **362**, 443–451.

87. Deng, Y., Schmidtman, A., Redlich, A., Westerdorf, B., Jaquet, K. and Thieleczek, R. (2001) Effects of phosphorylation and mutation R145G on human cardiac troponin I function. *Biochemistry*, **40**, 14593–14602.
88. Robinson, P., Griffiths, P.J., Watkins, H. and Redwood, C.S. (2007) Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and α -tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. *Circulation Research*, **101**, 1266–1273.
89. Lang, R., Gomes, A. V., Zhao, J., Housmans, P.R., Miller, T. and Potter, J.D. (2002) Functional analysis of a troponin I (R145G) mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 11670–11678.
90. Harada, K. and Potter, J.D. (2004) Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations from Different Functional Regions of Troponin T Result in Different Effects on the pH and Ca²⁺ Sensitivity of Cardiac Muscle Contraction. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 14488–14495.
91. Sommese, R.F., Nag, S., Sutton, S., Miller, S.M., Spudich, J.A. and Ruppel, K.M. (2013) Effects of troponin T cardiomyopathy mutations on the calcium sensitivity of the regulated thin filament and the actomyosin cross-bridge kinetics of human beta-cardiac myosin. *PLoS ONE*, **8**.
92. Memo, M., Leung, M.C., Ward, D.G., Dos Remedios, C., Morimoto, S., Zhang, L., et al. (2013) Familial dilated cardiomyopathy mutations uncouple troponin i phosphorylation from changes in myofibrillar Ca²⁺ sensitivity. *Cardiovascular Research*, **99**, 65–73.
93. Mirza, M., Marston, S., Willott, R., Ashley, C., Mogensen, J., McKenna, W., et al. (2005) Dilated cardiomyopathy mutations in three thin filament regulatory proteins result in a common functional phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 28498–28506.
94. Lu, Q.W., Morimoto, S., Harada, K., Du, C.K., Takahashi-Yanaga, F., Miwa, Y., et al. (2003) Cardiac troponin T mutation R141W found in dilated cardiomyopathy stabilizes the troponin T-tropomyosin interaction and causes a Ca²⁺

- desensitization. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **35**, 1421–1427.
95. Venkatraman, G., Gomes, A. V., Kerrick, W.G.L. and Potter, J.D. (2005) Characterization of troponin T dilated cardiomyopathy mutations in the fetal troponin isoform. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 17584–17592.
96. Manning, E.P., Tardiff, J.C. and Schwartz, S.D. (2012) Molecular effects of familial hypertrophic cardiomyopathy-related mutations in the TNT1 domain of cTnT. *Journal of Molecular Biology*, **421**, 54–66.
97. Manning, E.P., Guinto, P.J. and Tardiff, J.C. (2012) Correlation of molecular and functional effects of mutations in cardiac troponin T linked to familial hypertrophic cardiomyopathy: An integrative in silico/in vitro approach. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 14515–14523.
98. Palm, T., Graboski, S., Hitchcock-DeGregori, S.E. and Greenfield, N.J. (2001) Disease-causing mutations in cardiac troponin T: identification of a critical tropomyosin-binding region. *Biophysical journal*, **81**, 2827–2837.
99. Yanaga, F., Morimoto, S. and Ohtsuki, I. (1999) Protein Chemistry And Structure : Ca²⁺ Sensitization and Potentiation of the Maximum Level of Myofibrillar ATPase Activity Caused by Mutations of Troponin T Found in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 1–8.
100. Cardiomyopathy, S., Mutations, C., Either, T., The, D., State, A., Or, A., et al. (2012) Several Cardiomyopathy Causing Mutations on. *Biochem Biophys Res Commun*, **406**, 74–78.
101. Bai, F., Weis, A., Takeda, A.K., Chase, P.B. and Kawai, M. (2011) Enhanced active cross-bridges during diastole: Molecular pathogenesis of tropomyosin's HCM mutations. *Biophysical Journal*, **100**, 1014–1023.
102. Wang, F., Brunet, N.M., Grubich, J.R., Bienkiewicz, E.A., Asbury, T.M., Compton, L.A., et al. (2011) Facilitated cross-bridge interactions with thin filaments by familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in α -tropomyosin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2011**.
103. Karibe, A., Tobacman, L.S., Strand, J., Butters, C., Back, N., Bachinski, L.L., et al.

- (2001) Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by a Novel alpha-Tropomyosin Mutation (V95A) Is Associated With Mild Cardiac Phenotype, Abnormal Calcium Binding to Troponin, Abnormal Myosin Cycling, and Poor Prognosis. *Circulation*, **103**, 65–71.
104. Muthuchamy, M., Pieples, K., Rethinasamy, P., Hoit, B., Grupp, I.L., Boivin, G.P., et al. (1999) Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in alpha-tropomyosin manifests cardiac dysfunction. *Circulation research*, **85**, 47–56.
105. Bottinelli, R., Coviello, D.A., Redwood, C.S., Pellegrino, M.A., Maron, B.J., Spirito, P., et al. (1998) A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ Res*, **82**, 106–115.
106. Borovikov, Y.S., Rysev, N.A., Karpicheva, O.E. and Redwood, C.S. (2011) Hypertrophic cardiomyopathy-causing Asp175asn and Glu180gly Tpm1 mutations shift tropomyosin strands further towards the open position during the ATPase cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **407**, 197–201.
107. Ly, S. and Lehrer, S.S. (2012) Long-range effects of familial hypertrophic cardiomyopathy mutations E180G and D175N on the properties of tropomyosin. *Biochemistry*, **51**, 6413–6420.
108. Rysev, N.A., Karpicheva, O.E., Redwood, C.S. and Borovikov, Y.S. (2012) The effect of the Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations on actin-myosin interaction during the ATPase cycle. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1824**, 366–373.
109. Warner, W.A., Sanchez, R., Dawoodian, A., Li, E. and Momand, J. (2012) The flexibility of two tropomyosin mutants, D175N and E180G, that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **424**, 493–496.
110. Mcelroy, M., Brien, P.O., Hoffman, R.M., Guo, S., Bouvet, M., Diego, D.S., et al. (2010) Familial Dilated Cardiomyopathy caused by an Alpha- Tropomyosin Mutation: The Distinctive Natural History of Sarcomeric DCM. *American College of Cardiology Foundation*, **55**, 320–329.

111. Witjas-Paalberends, E.R., Piroddi, N., Stam, K., Van Dijk, S.J., Oliviera, V.S., Ferrara, C., et al. (2013) Mutations in MYH7 reduce the force generating capacity of sarcomeres in human familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, **99**, 432–441.
112. Du, J., Zhang, C., Liu, J., Sidky, C. and Huang, X.P. (2006) A point mutation (R192H) in the C-terminus of human cardiac troponin I causes diastolic dysfunction in transgenic mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **456**, 143–150.
113. Knollmann, B.C., Blatt, S.A., Horton, K., De Freitas, F., Miller, T., Bell, M., et al. (2001) Inotropic Stimulation Induces Cardiac Dysfunction in Transgenic Mice Expressing a Troponin T (I79N) Mutation Linked to Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 10039–10048.
114. Miller, T., Szczesna, D., Housmans, P.R., Zhao, J., De Freitas, F., Gomes, A. V., et al. (2001) Abnormal Contractile Function in Transgenic Mice Expressing a Familial Hypertrophic Cardiomyopathy-linked Troponin T (I79N) Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 3743–3755.
115. Arad, M., Penas-Lado, M., Monserrat, L., Maron, B.J., Sherrid, M., Ho, C.Y., et al. (2005) Gene mutations in apical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, **112**, 2805–2811.
116. Monserrat, L., Hermida-Prieto, M., Fernandez, X., Rodríguez, I., Dumont, C., Cazón, L., et al. (2007) Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *European Heart Journal*, **28**, 1953–1961.
117. Klaassen, S., Probst, S., Oechslin, E., Gerull, B., Krings, G., Schuler, P., et al. (2008) Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. *Circulation*, **117**, 2893–2901.
118. Jarcho, J. a, Anas-, A., Toutouzas, P., Hospital, H. and El-, E. (1998) Mutations in the Gene for Cardiac Myosin-binding Protein C and Late-onset Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, **338**, 18.
119. António, M., Costa, C., Venâncio, M., Martins, P., Dionísio, T., Pires, A., Castela,

- E. (2011) Left ventricular noncompaction: analysis of a pediatric population. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **30**, 295–311.
120. Girolami, Francesca; Olivotto, Iacopo; Passerini, Ilaria; Zachara, Elisabetta; Nistri, Stefano; Re, Federica; Fantini, Silvia; Baldini, Katia; Torricelli, Francesca; Cecchi, F. (2006) A molecular screening strategy based on β -myosin heavy chain, cardiac myosin binding protein C and troponin T genes in Italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Medicine*, **7**, 601–607.
121. Jarcho, J. a, Anas-, A., Toutouzas, P., Hospital, H. and El-, E. (1998) Mutations In The Gene For Cardiac Myosin-Binding Protein C And Late-Onset Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 1998.
122. Ehlermann, P., Weichenhan, D., Zehelein, J., Steen, H., Pribe, R., Zeller, R., et al. (2008) Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene. *BMC medical genetics*, **9**, 95.
123. Erdmann, J., Raible, J., Maki-Abadi, J., Hummel, M., Hammann, J., Wollnik, B., et al. (2001) Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, **38**, 322–330.
124. Blair, E., Redwood, C., De Jesus Oliveira, M., Moolman-Smook, J.C., Brink, P., Corfield, V.A., et al. (2002) Mutations of the light meromyosin domain of the β -myosin heavy chain rod in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Research*, **90**, 263–269.
125. Hougs, L., Havndrup, O., Bundgaard, H., Køber, L., Vuust, J., Larsen, L.A., et al. (2005) One third of Danish hypertrophic cardiomyopathy patients with MYH7 mutations have mutations in MYH7 rod region. *European journal of human genetics : EJHG*, **13**, 161–5.
126. Van Der Zwaag, P., Van Tintelen, J., Gerbens, F., Jongbloed, J., Boven, L., Van der Smagt, J., et al. (2011) Haplotype sharing test maps genes for familial cardiomyopathies. *Clinical Genetics*, **79**, 459–467.
127. Perrot, A., Schmidt-Traub, H., Hoffmann, B., Prager, M., Bit-Avragim, N., Rudenko, R.I., et al. (2005) Prevalence of cardiac beta-myosin heavy chain gene

- mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)*, **83**, 468–477.
128. Moolman-Smook, J., De Lange, W., Corfield, V. and Brink, P. (2000) Expression of HCM causing mutations: lessons learnt from genotype-phenotype studies of the South African founder MYH7 A797T mutation. *J.Med.Genet.*, **37**, 951–956.
129. Overeem, S., Schelhaas, H.J., Blijham, P.J., Grootscholten, M.I., ter Laak, H.J., Timmermans, J., et al. (2007) Symptomatic distal myopathy with cardiomyopathy due to a MYH7 mutation. *Neuromuscular Disorders*, **17**, 490–493.
130. Havndrup, O., Bundgaard, H., Andersen, P.S., Larsen, L.A., Vuust, J., Kjeldsen, K., et al. (2003) Outcome of clinical versus genetic family screening in hypertrophic cardiomyopathy with focus on cardiac β -myosin gene mutations. *Cardiovascular Research*, **57**, 347–357.
131. Zheng, D., Yang, J., Tao, Q., Geng, M., Lin, J., Yang, X., et al. (2010) Mutations in the β -Myosin Heavy Chain Gene in Southern Chinese Families with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of International Medical Research*, **38**, 810–820.
132. Marian, a J., Mares, a, Kelly, D.P., Yu, Q.T., Abchee, a B., Hill, R., et al. (1995) Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. *European heart journal*, **16**, 368–76.
133. Havndrup, O., Bundgaard, H., Andersen, P.S., Larsen, L. a, Vuust, J., Kjeldsen, K., et al. (2001) The Val606Met mutation in the cardiac beta-myosin heavy chain gene in patients with familial hypertrophic cardiomyopathy is associated with a high risk of sudden death at young age. *The American journal of cardiology*, **87**, 1315–7.
134. Ho, C.Y., Sweitzer, N.K., McDonough, B., Maron, B.J., Casey, S.A., Seidman, J.G., et al. (2002) Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, **105**, 2992–2997.
135. Fananapazir, L. and Epstein, N.D. (1994) Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with

- distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations. *Circulation*, **89**, 22–32.
136. Rosenzweig, A. and Watkins, H. (1991) Preclinical diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *The New England Journal of Medicine*, **324**, 429–436.
137. Posen, B.M., Moolman, J.C., Corfield, V. a and Brink, P. a (1995) Clinical and prognostic evaluation of familial hypertrophic cardiomyopathy in two South African families with different cardiac beta myosin heavy chain gene mutations. *British heart journal*, **74**, 40–6.
138. Garcia-Pavia, P., Vzquez, M.E., Segovia, J., Salas, C., Avellana, P., Gmez-Bueno, M., et al. (2011) Genetic basis of end-stage hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, **13**, 1193–1201.
139. Kabaeva, Z.T., Perrot, A., Wolter, B., Dietz, R., Cardim, N., Correia, J.M., et al. (2002) Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics*, **10**, 741–748.
140. Nomura, A., Tada, H., Teramoto, R., Konno, T., Hodatsu, A., Won, H.H., et al. (2016) Whole exome sequencing combined with integrated variant annotation prediction identifies a causative myosin essential light chain variant in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Cardiology*, **67**, 133–139.
141. Lee, W.H., Hwang, T.H., Kimura, A., Park, S.W., Satoh, M., Nishi, H., et al. (2001) Different expressivity of a ventricular essential myosin light chain gene Ala57Gly mutation in familial hypertrophic cardiomyopathy. *American Heart Journal*, **141**, 184–189.
142. Choi, J.O., Yu, C.W., Nah, J.C., Park, J.R., Lee, B.S., Choi, Y.J., et al. (2010) Long-term outcome of 4 Korean families with hypertrophic cardiomyopathy caused by 4 different mutations. *Clinical Cardiology*, **33**, 430–438.
143. Gastrectomy, V.S. and Risk, A. (2016) Identification of Rare Variants in TNNI3 with Atrial Fibrillation in a Chinese GeneID Population. *Molecular Genetics and Genomisc*, **291**, 79–92.

144. Mogensen, J., Murphy, R.T., Kubo, T., Bahl, A., Moon, J.C., Klausen, I.C., et al. (2004) Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, **44**, 2315–2325.
145. Zhu Hu, J., Xiang Li, J., Hong, K., Xin Hu, J., Brugada, P., Shu Cheng, X., et al. (2012) Hypertrophic cardiomyopathy and planned in vitro fertilization: Genetic testing and clinical evaluation. *Herz*, **37**, 447–452.
146. Rani, D.S., Nallari, P., Priyamvada, S., Narasimhan, C., Singh, L. and Thangaraj, K. (2012) High prevalence of Arginine to Glutamine Substitution at 98, 141 and 162 positions in Troponin I (TNNI3) associated with hypertrophic cardiomyopathy among Indians. *BMC Medical Genetics*, **13**, 69.
147. Andersen, P.S., Havndrup, O., Hougs, L., Sørensen, K.M., Jensen, M., Larsen, L.A., et al. (2009) Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Human Mutation*, **30**, 363–370.
148. Strijack, B., Ariyarajah, V., Soni, R., Jassal, D.S., Greenberg, C.R., McGregor, R., et al. (2008) Late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in genotyped hypertrophic cardiomyopathy with normal phenotype. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, **10**, 58.
149. Curila, K., Benesova, L., Penicka, M., Minarik, M., Zemanek, D., Veselka, J., et al. (2009) Low prevalence and variable clinical presentation of troponin I and troponin T gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Genetic testing and molecular biomarkers*, **13**, 647–50.
150. Kimura, A., Harada, H., Park, J.-E., Nishi, H., Satoh, M., Takahashi, M., et al. (1997) Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics*, **16**, 379–382.
151. Ning Sun, Masayuki Yazawa, Jianwei Liu, Leng Han, Veronica Sanchez-Freire, Oscar J. Abilez, Enrique G. Navarrete, Shijun Hu, Li Wang, Andrew Lee, Aleksandra Pavlovic, Shin Lin, Rui Chen, Roger J. Hajjar, M. (2012) Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as Model for Familial Dilated

Cardiomyopathy. *Sci Transl Med*, **4**.

152. Campbell, N., Sinagra, G., Jones, K.L., Slavov, D., Gowan, K., Merlo, M., et al. (2013) Whole exome sequencing identifies a troponin T mutation hot spot in familial dilated cardiomyopathy. *PloS one*, **8**, e78104.
153. 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. *American Heart Association*, 2000.
154. Li, D., Czernuszewicz, G.Z., Gonzalez, O., Tapscott, T., Karibe, A., Durand, J.B., et al. (2001) Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **104**, 2188–2193.
155. Moolman, J.C., Corfield, V.A., Posen, B., Ngumbela, K., Seidman, C., Brink, P.A., et al. (1997) Sudden death due to troponin T mutations. *Journal of the American College of Cardiology*, **29**, 549–555.
156. Fujita, E., Nakanishi, T., Nishizawa, T., Hagiwara, N. and Matsuoka, R. (2013) Mutations in the cardiac troponin T gene show various prognoses in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart and Vessels*, **28**, 785–794.
157. Fujino, N., Shimizu, M., Ino, H., Okeie, K., Yamaguchi, M., Yasuda, T., et al. (2001) Cardiac troponin T Arg92Trp mutation and progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. *Clinical cardiology*, **24**, 397–402.
158. Manuscript, A., Nagueh, S.F., Chen, S., Patel, R., Tsybouleva, N., Lutucuta, S., et al. (2009) Cardiac troponin T mutation in familial cardiomyopathy with variable remodeling and restrictive physiology. *Heart And Lung*, **22**, 527–540.
159. Judge, D.P. and Presentation, C. (2009) Use of Genetics in the Clinical Evaluation of Cardiomyopathy. *JAMA*, **302**, 2471–2476.
160. Hedman, A., Hartikainen, J., Vanninen, E., Laitinen, T., Jääskeläinen, P., Laakso, M., et al. (2004) Inducibility of life-threatening ventricular arrhythmias is related to maximum left ventricular thickness and clinical markers of sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy attributable to the Asp175Asn mutation in the alpha-tropomy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **36**,

91–99.

161. Coviello, D.A., Maron, B.J., Spirito, P., Watkins, H., Vosberg, H.P., Thierfelder, L., et al. (1997) Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutation of a ‘hot spot’ in the alpha-tropomyosin gene. *Journal of the American College of Cardiology*, **29**, 635–640.
162. Jääskeläinen, P., Soranta, M., Miettinen, R., Saarinen, L., Pihlajamäki, J., Silvennoinen, K., et al. (1998) The cardiac Beta-myosin heavy chain gene is not the predominant gene for hypertrophic cardiomyopathy in the Finnish population. *Journal of the American College of Cardiology*, **32**, 1709–1716.
163. Liu, S., Hu, S., Sun, J., Wang, J. and Wang, X. (2005) Characteristics of the beta myosin heavy chain gene Ala26Val mutation in a Chinese family with hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Internal Medicine*, **16**, 328–333.
164. Ramirez-correa, G.A., Frazier, A.H., Zhu, G., Zhang, P., Rappold, T., Kooij, V., et al. (2015) Cardiac troponin I Pro82Ser variant induces diastolic dysfunction , blunts beta-adrenergic response , and impairs myofilament cooperativity. *American Physiological Society*, **118**, 212–223.
165. Bashyam, M.D., Purushotham, G. and Chaudhary, A.K. (2012) A low prevalence of MYH7 / MYBPC3 mutations among Familial Hypertrophic Cardiomyopathy patients in India. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **360**, 373–382.
166. Cardim, N., Perrot, A., Santos, S., Morgado, P., Pádua, M., Ferreira, S., et al. (2005) Miocardiopatia hipertrófica em população Portuguesa: Mutações da proteína C que liga a miosina. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **24**, 1463–1476.
167. Olivotto, I., Girolami, F., Ackerman, M.J., Nistri, S., Bos, J.M., Zachara, E., et al. (2008) Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, **83**, 630–638.
168. Van Driest, S.L., Vasile, V.C., Ommen, S.R., Will, M.L., Tajik, A.J., Gersh, B.J., et al. (2004) Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, **44**,

1903–1910.

169. Mörner, S., Richard, P., Kazzam, E., Hellman, U., Hainque, B., Schwartz, K., et al. (2003) Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **35**, 841–849.
170. Laakso, M. (2002) Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *Journal of Molecular Medicine*, **80**, 412–422.
171. Ingles, J. (2005) Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *Journal of Medical Genetics*, **42**, e59–e59.
172. Alders, M., Jongbloed, R., Deelen, W., Wijngaard, A. Van Den, Doevendans, P., Ten, F., et al. (2017) The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation , which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *European Heart Journal*, **24**, 1848–1853.
173. Granados-riveron, J.T., Ghosh, T.K., Pope, M., Lock, F.B., Thornborough, C., Eason, J., et al. (2017) Alpha-Cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. *Human Molecular Genetics*, **19**, 4007–4016.
174. Carniel, E., Taylor, M.R.G., Sinagra, G., Di Lenarda, A., Ku, L., Fain, P.R., et al. (2005) α -myosin heavy chain: A sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation*, **112**, 54–59.
175. Wang, J., Xu, S.-J., Zhou, H., Wang, L.-J., Hu, B., Fang, F., et al. (2009) A novel mutation of the beta myosin heavy chain gene responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical cardiology*, **32**, E16-21.
176. Song, L., Zou, Y., Wang, J., Wang, Z., Zhen, Y., Lou, K., et al. (2005) Mutations profile in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta*, **351**, 209–216.
177. Arai, S., Matsuoka, R., Hirayama, K., Sakurai, H., Tamura, M., Ozawa, T., et al. (1995) Missense Mutation of the p-Cardiac Myosin Heavy-Chain Gene in

Hypertrophic Cardiomyopathy. *American Journal of Medical Genetics*, **58**, 267–276.

178. Niimura, H., Patton, K.K., Mckenna, W.J., Soultis, J., Maron, B.J., Seidman, J.G., et al. (2002) Sarcomere Protein Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly. *American Heart Association*, **105**, 446–451.
179. Ramachandran, G., Kumar, M., Selvi Rani, D., Annanthapur, V., Calambur, N., Nallari, P., et al. (2013) An In Silico Analysis of Troponin I Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy of Indian Origin. *PLoS ONE*, **8**, 1–8.
180. H. J acqueline S uK , B.A., R yuichiro Anan , M.D., Annie O’Donoghue , R.N., Paolo Spirito , M.D., Akira Matsumori , M.D., Christine S. Moravec , P H .D., J.G. Seidman , P H .D., AND Christine E. Seidman, M.D. (1995) Mutations in the Genes for Cardiac Troponin T AND Alfa-Tropomyosin in Hipertrophic Cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 1995.
181. Rehm, H.L., Bale, S.J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J.S., Brown, K.K., Deignan, J.L., et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*, **15**, 733–747.
182. Chandra, M., Rundell, V.L., Tardiff, J.C., Leinwand, L.A., de Tombe, P.P. and Solaro, R.J. (2001) Ca(2+) activation of myofilaments from transgenic mouse hearts expressing R92Q mutant cardiac troponin T. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **280**, H705-13.
183. Robinson, P., Mirza, M., Knott, A., Abdulrazzak, H., Willott, R., Marston, S., et al. (2002) Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac troponin T mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by troponin T mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 40710–40716.

Anexos

Tabela 1. Descrição dos Estudos Funcionais Utilizados como Fundamento de Patogenicidade das Variantes Seleccionadas

Variante Nº	Características e Principais Conclusões
1	Estudo funcional <i>in vitro</i> demonstrou que a proteína variante reduz a afinidade da miosina para a actina e diminui a força gerada. ^[61]
2	Estudos realizados a partir de amostras de tecido cardíaco de doentes com MCH portadores da variante evidenciaram níveis aumentados de proteínas dos miofilamentos, em comparação com tecido cardíaco de doentes saudáveis, sugerindo assim um efeito deletério do péptido. ^[51]
4	Estudos <i>in vitro</i> revelaram que a variante altera o último nucleótido do exão, que constitui parte do local de <i>splicing</i> , resultando num transcrito aberrante. ^[49, 50]
6	Análise quantitativa dos níveis de transcritos e de proteínas do sarcómero em amostras de tecido miocárdico de doentes com MCH e portadores da variante revelou um aumento da expressão do gene <i>MYBPC3</i> relativamente aos controlos e que o péptido mutante é predominantemente expresso relativamente ao <i>wild-type</i> (62-69% do <i>MYBPC3</i> total). ^[52]
8	Estudo <i>in vitro</i> revelou que a variante induz alteração da carga de superfície do domínio C-1 da proteína, conduzindo a uma modificação da sua integridade estrutural e interações electrostáticas. ^[53] Foi ainda constatado uma redução da atividade do sistema ubiquitina-proteossoma em tecido cardíaco de doentes com MCH e portadores da variante, comparativamente com as amostras controlo. ^(49,50)
9	Estudo <i>in vitro</i> mostrou que a variante conduz a omissão do exão 6, alteração esta que é expectável conduzir a uma proteína anormal ou a total ausência da mesma. ^[49]
10	Estudo <i>in vitro</i> mostrou que a variante conduz a omissão do exão 6, alteração esta que é expectável conduzir a uma proteína anormal ou a total ausência da mesma. ^[49]
15	Análise de tecido cardíaco de doentes com MCH (incluindo portadores da variante em causa) revelou um aumento da quantidade total de mRNA <i>MYBPC3</i> relativamente a amostras controlo. Os autores presumem que tal alteração se deve a um mecanismo de compensação da instabilidade gerada pelo transcrito variante de modo a manter níveis normais de proteína <i>MYBPC3</i> íntegra. ^[52]
20	Análise do cDNA identificado em linfócitos de doentes com MCH portadores da variante mostrou que esta conduz a destruição do local de <i>splicing</i> ao nível do intrão 23, resultando numa proteína truncada. ^[50]
21	Estudo <i>in vitro</i> demonstrou que esta variante conduz a alteração do <i>splicing</i> e a introdução de um codão stop prematuro. ^[123]
37	Estudo <i>in vitro</i> revelou que a variante causa uma diminuição da estabilidade termodinâmica com impacto funcional na proteína resultante, em comparação com a <i>wild-type</i> . ^[56]
41	Estudo <i>in vitro</i> revelou que a proteína variante reduz drasticamente as interações com o domínio regulador do proteína codificada pelo gene <i>MYBPC3</i> . ^[57]
47	Análise de 43 amostras de tecido cardíaco de doentes com variantes nos genes do sarcómero (um dos doentes com a variante MYH7 – Arg663Cys) revelou uma diminuição significativa da força máxima gerada pelos cardiomiócitos, em comparação com amostras de miocárdio controlo. ^[111]
49	Estudo de motilidade <i>in vitro</i> revelou que a proteína variante move os filamentos de actina mais lentamente, em comparação com a proteína <i>wild-type</i> . ^[62] Análise de proteínas MYH7 <i>wild-type</i> e variantes, expressas em células de insectos, revelou que a proteína variante MYH7 – Val606Met afeta minimamente a translocação da actina, bem como a atividade de ATPase da miosina. ^[63, 64] Estudos realizados em amostras de miectomia de doentes portadores da variante mostraram que a proteína MYH7-Val606Met produz maior velocidade de deslizamento que a proteína <i>wild-type</i> . ^[65]
52	Estudo de motilidade <i>in vitro</i> revelou que a proteína variante move os filamentos de actina mais lentamente, em comparação com a proteína <i>wild-type</i> . ^[62] Análise histoquímica de biópsias do músculo solhar de doentes com MCH e gene <i>MYH7</i> variante (1 doente com variante <i>MYH7</i> -Gly256Glu) revelou a presença de doença do núcleo central (DNC) do músculo esquelético, levando os autores a concluir que uma parte dos doentes com MCH e variantes no gene <i>MYH7</i> tenham DNC. ^[66]
53	Estudos <i>in vitro</i> mostraram que a proteína variante MYH7 – Arg246Gln conduz a uma diminuição da translocação da actina, associada a menor atividade ATPase, em comparação com a proteína <i>wild-type</i> . ^[63, 64]

58	Estudos <i>in vitro</i> revelaram que a proteína variante MYL2 -Arg58Gln altera substancialmente as propriedade de ligação ao cálcio, em comparação com a proteína <i>wild-type</i> . ^[67, 68]
59	Estudos <i>in vitro</i> mostraram que a proteína variante MYL2 – Glu22Lys está associada a alteração das propriedades de ligação ao cálcio das miofibrilas e a défice no relaxamento muscular. ^[67, 69–72] Análise histopatológica de ratinhos transgênicos MYL2 – Glu22Lys demonstrou aumento das dimensões do septo interventricular e dos músculos papilares em comparação com os <i>wild-type</i> . ^[71]
60	Estudo funcional realizado a partir de mRNA revelou que esta alteração conduz a uma variante <i>frameshift</i> e substituição dos últimos 32 codões por outros 20, com consequente alteração do domínio C-terminal da proteína. ^[58]
61	Estudo de motilidade <i>in vitro</i> demonstrou que a proteína variante MYL3- Met149Val está associada a uma translocação dos filamentos de actina mais rápida que a miosina <i>wild-type</i> . ^[73]
63	Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> revelaram que a proteína variante está associada a um aumento da sensibilidade ao cálcio, induz uma menor afinidade para a cadeia pesada da miosina e diminui a força máxima por secção muscular, em comparação com a proteína <i>wild-type</i> . O coração de ratinhos transgênicos para esta variante apresenta maior grau de fibrose e hipertrofia que os <i>wild-type</i> . ^[74, 75]
64	Estudo funcional demonstrou que a proteína variante resulta numa diminuição da interação entre a troponina cardíaca I e as troponinas cardíacas C e T. ^[76]
65	Estudos <i>in vitro</i> revelaram que a proteína variante TNNI3 – Arg192His sensibiliza os filamentos finos ao cálcio. ^[77–79] Foi desenvolvido estudo <i>in vivo</i> através de ratinhos transgênicos expressando TNNI3-Arg193His. As imagens de ecografia cardíaca mostraram alterações no relaxamento do miocárdio. Não foi evidenciada hipertrofia ou dilatação ventricular significativa nas amostras de tecido cardíaco recolhidas. ^[112]
70	Estudo <i>in vitro</i> revelou que a proteína variante está associada a uma redução significativa nas interações funcionais com a troponina cardíaca C. ^[76]
72	Estudo <i>in vitro</i> mostrou que a proteína variante conduz a um aumento da sensibilidade da contração muscular cardíaca ao cálcio. ^[80]
73	Estudos <i>in vitro</i> revelaram que as fibras constituídas por proteínas variantes apresentam um aumento tanto da força máxima dependente de cálcio, como da atividade ATPase, em comparação com <i>wild-type</i> . Foi ainda evidenciado um aumento da sensibilidade ao cálcio, tanto para o desenvolvimento da força como da atividade ATP ase. ^[79, 81, 82]
74	Múltiplos estudos funcionais revelaram que a proteína variante está associada a um aumento da afinidade dos filamentos finos para o cálcio. ^[78, 83–89]
77	Foi realizado um estudo funcional em que proteínas TNNT variantes foram incorporadas em fibras de tecido muscular cardíaco suíno, em conjunto com troponinas cardíacas I e T <i>wild-type</i> . O desenvolvimento de força isométrica dependente de cálcio nestas fibras foi medido, tendo-se verificado que a proteína variante TNNT-Ser179Phe altera as propriedades contrácteis das fibras cardíacas e aumenta a sensibilidade do desenvolvimento da força ao cálcio em comparação com as proteínas <i>wild-type</i> . ^[90]
78	Estudos experimentais mostraram que cardiomiócitos desenvolvidos a partir de células estaminais pluripotentes, provenientes de doentes da mesma família com Miocardiopatia Dilatada (MCD) e portadores da variante, exibem alteração da cinética do cálcio, diminuição da contractilidade e proteína sarcomérica α -actinina anormal, em comparação com cardiomiócitos de indivíduos controlo pertencentes à mesma família. Estudo <i>in vitro</i> revelou que a proteína variante está associada a alteração da cinética do cálcio nos filamentos finos. ^[91]
79	Múltiplos estudos funcionais sugerem que a proteína variante afeta a dinâmica da contractilidade do músculo cardíaco, diminuindo a sensibilidade da activação ao cálcio, reduzindo a afinidade da ligação do complexo troponina ao cálcio, e/ou aumentando o ratio de dissociação do cálcio dos filamentos finos. ^[77, 88, 91–95]
80	Foi realizado um estudo funcional em que proteínas TNNT variantes foram incorporadas em fibras de tecido muscular cardíaco suíno, em conjunto com troponinas cardíacas I e T <i>wild-type</i> . O desenvolvimento de força isométrica dependente de cálcio nestas fibras foi medido, tendo-se verificado que a proteína variante TNNT-Arg130Cys altera as propriedades contrácteis das fibras cardíacas e aumenta a sensibilidade do desenvolvimento da força ao cálcio, em comparação com as proteínas <i>wild-type</i> . ⁽⁵⁶⁾
83	Estudos funcionais demonstraram que várias substituições entre os codões 91 e 110 da proteína TNNT2, incluindo a Arg92Gln, comprometem as funções da troponina T dependentes da tropomiosina. Estudos experimentais revelaram ainda que esta alteração resulta num aumento da sensibilidade do desenvolvimento de força ao cálcio. ^[77, 98, 99, 182, 183]
84	Estudo funcional <i>in vitro</i> revelou que a proteína variante reduz a interação entre TNNT e a tropomiosina, alterando a relação do cálcio com os filamentos finos. ^[96–98] Foi realizado um estudo funcional em que proteínas TNNT variantes foram incorporadas em fibras de tecido muscular cardíaco suíno, em conjunto com troponinas cardíacas I e T <i>wild-type</i> . O desenvolvimento de força isométrica dependente de cálcio nestas fibras foi medido, tendo-se verificado que a proteína variante TNNT-Arg102Trp altera as propriedades

	<p>contrácteis das fibras cardíacas e aumenta a sensibilidade do desenvolvimento da força ao cálcio, em comparação com as proteínas <i>wild-type</i>.^[50]</p> <p>Estudo funcional <i>in vivo</i> no qual foi desenvolvido um modelo de ratinho transgénico TNNT-Arg102Trp revelou que a consequente proteína variante altera as propriedades dinâmicas e bioquímicas da troponina T cardíaca e que estas alterações conduzem a activação precoce de vias de sinalização que regulam o crescimento das células musculares. Os autores concluem que, em última instância, tal pode conduzir a <i>remodeling</i> cardiovascular patogénico.^[59]</p>
86	<p>Troponinas T, I e C cardíacas humanas <i>wild-type</i> e troponina T variantes associadas à MCH (incluindo TNNT2- Ile79Asn) foram expressas por <i>Escherichiacoli</i>, posteriormente purificadas e incorporadas em miofibrilas cardíacas de coelhos. A sensibilidade da atividade ATPase ao cálcio das miofibrilas destas preparações foi medida, tendo-se verificado um aumento associado à proteína variante TNNT-Ile79Asn.^[99]</p> <p>Foi ainda desenvolvido um estudo funcional <i>in vivo</i> em que a performance cardíaca de ratinhos transgénicos expressando TNNT – Ile 79Asn humana e TNNT – <i>wild-type</i> humana foi comparada. Medições <i>in vivo</i> indicaram que a função sistólica de base é superior nos ratinhos expressando TNNT – Ile79Asn.^[113, 114]</p>
87	<p>Estudos funcionais <i>in vitro</i> revelaram que a proteína variante está associada a um aumento da sensibilidade ao cálcio, bem como a uma diminuição da atividade ATPase, da velocidade máxima de deslizamento dos filamentos e da tensão máxima dependente de cálcio. Foi ainda evidenciado que a proteína variante apresenta menor conteúdo α-helicoidal e estrutura mais desorganizada que a <i>wild-type</i>.^[100-103]</p>
88	<p>Estudo <i>in vivo</i> utilizando ratinhos transgénicos expressando TPM1-Asp175Asn no coração adulto revelou comprometimento tanto da contração como do relaxamento cardíacos.^[104]</p> <p>Múltiplos estudos <i>in vitro</i> demonstraram que a proteína variante induz alteração nos mecanismos de activação dos filamentos finos, com redução da afinidade da tropomiosina para a actina.^[100, 102, 104-109]</p>
89	<p>Estudo <i>in vitro</i> mostrou que a proteína variante tem um efeito inibitório major na função do sarcómero, em comparação com a proteína <i>wild-type</i>.^[110]</p>

Tabela 2. Descrição dos Estudos Familiares Utilizados como Fundamento de Patogenicidade das Variantes Seleccionadas

Variante Nº	Número de Famílias e Indivíduos Estudados	Nº	Nº de Famílias e Indivíduos Estudados
1	Estudados 134 indivíduos, pertencentes a 8 famílias não relacionadas: ^[115-117] 65 G+; F+/ 2 G+; F-/ 67 G-; F- A positividade do fenótipo refere-se a características clínicas de MCH, defeitos do septo interventricular ou ventrículo esquerdo não-compactado	4	Estudados 18 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^[50] 6 G+; F+/ 1 G+; F-/ 11 G+; F-
5	Estudados 29 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^[118] 9 G+; F+/ 6 G+; F-/ 14 G-; F-	6	Estudados 13 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^[118, 119] 5 G+; F+/ 3 G+; F-/ 5 G-; F-
8	Estudados 18 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^{[120][118]} 9 G+; F+/ 1 G+; F-/ 8 G-; F-	12	Estudados 9 indivíduos pertencentes à mesma família: ^[121] 5 G+; F+/ 2 G+; F-/ 2 G-; F-
19	Estudados 15 indivíduos, pertencentes a mesma família: ^[121] 5 G+; F+/ 2 G+; F-/ 8 G-; F-	20	Estudados 23 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^[50, 122] 7 G+; F+/ 5 G+; F-/ 11 G-; F-
21	Estudados 8 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[123] 3 G+; F+/ 1 G+; F-/ 4 G-; F-	30	Estudados 47 indivíduos, pertencentes a 3 famílias não relacionadas: ^[121, 122] 13 G+; F+/ 9 G+; F-/ 25 G-; F-
32	Estudados 9 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[121] 5 G+; F+/ 2 G+; F-/ 2 G-; F-	33	Estudados 8 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[123] 3 G+; F+/ 1 G+; F-/ 4 G-; F-
36	Estudados 13 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[125] 3 G+; F+/ 4 G+; F-/ 6 G-; F-	38	Estudados 25 indivíduos, pertencentes a 3 famílias não relacionadas: ^[124] 15 G+; F+/ 0 G+; F-/ 10 G-; F-
42	Estudados 26 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^[126] 10 G+; F+/ 0 G+; F-/ 5 G-; F- A positividade do fenótipo refere-se a características clínicas de MCH ou Miocardiopatia Dilatada (CMD).	43	Estudados 75 indivíduos, pertencentes a 7 famílias não relacionadas: ^[127, 128] 10 G+; F+/ 23 G+; F-/ 32 G-; F-
48	Estudados 6 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[134] 4 G+; F+/ 2 G+; F-/ 0 G-; F-	49	Estudados 71 indivíduos, pertencentes a 6 famílias não relacionadas: ^[43, 129-133] 30 G+; F+/ 3 G+; F-/ 38 G-; F-
52	Estudados 145 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[135] 22 G+; F+/ 17 G+; F-/ 106 G-; F-	53	Estudados 78 indivíduos, pertencentes a 3 famílias não relacionadas: ^[44, 136, 137] 18 G+; F+/ 8 G+; F-/ 51 G-; F-
59	Estudados 18 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^[138, 139] 4 G+; F+/ 3 G+; F-/ 5 G-; F-	61	Estudados 34 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[75] 13 G+; F+/ 0 G+; F-/ 21 G-; F-

62	Estudados 11 indivíduos, pertencentes a 2 famílias não relacionadas: ^[140] 8 G+; F+/ 0 G+; F-/ 3 G-; F-	63	Estudados 56 indivíduos, pertencentes a 3 famílias não relacionadas: ^[141, 142] 10 G+; F+/ 15 G+; F-/ 31 G-; F-
66	Estudados 40 indivíduos, pertencentes a 4 famílias não relacionadas: ^[143-145] 12 G+; F+/ 9 G+; F-/ 19 G-; F-	70	Estudados 30 indivíduos, pertencentes a 3 famílias não relacionadas: ^[176, 144, 146] 9 G+; F+/ 14 G+; F-/ 7 G-; F-
71	Estudados 22 indivíduos, pertencentes a 4 famílias não relacionadas: ^[144, 149] 7 G+; F+/ 8 G+; F-/ 7 G-; F-	73	Estudados 47 indivíduos, pertencentes a 6 famílias não relacionadas: ^[145, 144, 147, 148] 14 G+; F+/ 17 G+; F-/ 16 G-; F- A positividade do fenótipo refere-se a características clínicas de MCH ou Cardiomiopatia Restritiva (CMR)
74	Estudados 12 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[150] 4 G+; F+/ 0 G+; F-/ 8 G-; F-	75	Estudados 18 indivíduos, pertencentes a 3 famílias não relacionadas: ^[144, 149] 4 G+; F+/ 6 G+; F-/ 8 G-; F-
77	Estudados 8 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[153] 3 G+; F+/ 4 G+; F-/ 1 G-; F-	78	Estudados 39 indivíduos, pertencentes a 3 famílias não relacionadas: ^[151, 152] 22 G+; F+/ 0 G+; F-/ 17 G-; F-
79	Estudados 63 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[154] 14 G+; F+/ 6 G+; F-/ 43 G-; F-	84	Estudados 63 indivíduos, pertencentes a 6 famílias não relacionadas: ^[155-157] 18 G+; F+/ 16 G+; F-/ 29 G-; F-
85	Estudados 6 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[159] 3 G+; F+/ 0 G+; F-/ 3 G-; F-	86	Estudados 19 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[158] 9 G+; F+/ 0 G+; F-/ 10 G-; F- A positividade do fenótipo refere-se a características clínicas de MCH, CMD ou CMR.
87	Estudados 56 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[103] 14 G+; F+/ 0 G+; F-/ 42 G-; F-	88	Estudados 99 indivíduos, pertencentes a 10 famílias não relacionadas: ^[160-162] 55 G+; F+/ 5 G+; F-/ 39 G-; F-
89	Estudados 39 indivíduos, pertencentes à mesma família: ^[110] 15 G+; F+/ 4 G+; F-/ 10 G-; F-		

G+, Genótipo positivo, isto é, portadores da variante genética em causa; G-, Genótipo negativo, isto é, não expressam a variante em causa. F+, Fenótipo positivo para MCH (e/ou outra cardiomiopatia quando especificado na tabela). F- Fenótipo negative, isto é, sem características clínicas de MCH.