

**Universidade Federal do Paraná  
Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular  
Área de concentração em Fisiologia**



**CORREÇÃO DA SENSIBILIDADE AO ÍON CÁLCIO PREVINE A  
DISFUNÇÃO CARDÍACA E O REMODELAMENTO MIOCÁRDICO  
NA CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA FAMILIAR**

**MARCO STEPHAN L. ALVES**

**CURITIBA  
ABRIL 2009**

**MARCO STEPHAN L. ALVES**

**CORREÇÃO DA SENSIBILIDADE AO ÍON CÁLCIO PREVINE A  
DISFUNÇÃO CARDÍACA E O REMODELAMENTO MIOCÁRDICO  
NA CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA FAMILIAR**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular – Área de Concentração em  
Fisiologia, como requisito parcial para  
obtenção do grau de mestre

Orientador: Dr. Rosalvo T. H. Fogaça

**CURITIBA  
Abril 2009**

Aos meus pais, Idevaldo e Joana, e  
à minha esposa Sandra, pelo amor  
sincero e apoio em todos os  
momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Idevaldo e Joana, pela educação e valores que me guiam.

À minha esposa Sandra, com todo meu amor.

Ao professor Dr. Rosalvo T. H. Fogaça pela orientação científica desde a minha graduação e, principalmente, pela amizade construída desde então.

À Dra. Beata M. Wolska e ao Dr. R. John Solaro, pela oportunidade da realização deste trabalho na *University of Illinois at Chicago*.

Ao Fernando A. L. Dias, idealizador e co-autor deste trabalho, e à sua esposa Cibele D. Ribeiro, pelo acolhimento em minha chegada em Chicago e pela amizade construída desde então.

Ao Robert Gaffin, pela amizade e por toda a ajuda no laboratório.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Marco S. L. Alves

## SUMÁRIO

Lista de Figuras _____	III
Lista de Tabelas _____	III
Lista de Abreviaturas _____	IV
Resumo _____	IX
Abstract _____	X

### 1. INTRODUÇÃO

<b>1.2 Contratilidade Cardíaca _____</b>	<b>02</b>
1.2.1 Acoplamento excitação-contração _____	02
1.2.2 O sarcômero como unidade funcional _____	04
1.2.3 Modulação da contratilidade cardíaca _____	08
1.2.4 Fosforilação de proteínas reguladoras da homeostase do $Ca^{2+}$ _____	11
1.2.5 Fosforilação de proteínas sarcoméricas _____	14
<b>1.3 Cardiomiopatia hipertrófica familiar _____</b>	<b>16</b>
1.3.1 Conceito _____	16
1.3.2 Investigação clínica _____	17
1.3.3 Bases genéticas _____	20
1.3.4 Correlação entre genótipo e fenótipo e genes modificadores _____	23
1.3.5 Modelos animais transgênicos _____	25
1.3.6 Patogênese molecular _____	26
1.3.7 Formação do sarcômero _____	27
1.3.8 Atividade ATPásica _____	28
1.3.9 Sensibilidade dos miofilamentos ao $Ca^{2+}$ _____	28
1.3.10 Alterações da função contrátil e remodelamento miocárdico _____	30
1.3.11 Tratamento atual _____	36
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS _____</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS _____</b>	<b>44</b>
3.1 Animais _____	44
3.2 Genotipagem por reação em cadeia da polimerase _____	47
3.3 Expressão total de proteína por SDS-PAGE e <i>Western blot</i> _____	49
3.4 Histologia _____	51

3.5 Fibras cardíacas permeabilizadas por detergente _____	52
3.6 Ecocardiografia de alta resolução _____	54
3.7 Coração isolado perfundido (Langendorff) _____	56
3.8 Estudo hemodinâmico <i>in situ</i> _____	58
3.9 Análise estatística _____	60
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 Morfologia e função cardíaca por ecocardiografia _____	62
4.2 Resposta adrenérgica em corações isolados perfundidos _____	71
4.3 Avaliação hemodinâmica <i>in situ</i> _____	74
4.4 Sensibilidade dos miofilamentos ao Ca <sup>2+</sup> _____	76
4.5 Histopatologia _____	78
4.6 Expressão total de SERCA2a e fosfolambano _____	80
<b>5. DISCUSSÃO</b> _____	<b>82</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Acoplamento excitação-contração _____	04
<b>Figura 2.</b> Organização estrutural e proteínas formadoras do sarcômero _	08
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do DNA transgênico _____	45
<b>Figura 4.</b> Desenho experimental _____	47
<b>Figura 5.</b> Eletroforese em gel de agarose _____	49
<b>Figura 6.</b> Comprimento do sarcômero por difração de raio laser _____	54
<b>Figura 7.</b> Registro original de curvas de PV por catéter de condutância _	59
<b>Figura 8.</b> Morfologia por ecocardiografia _____	63
<b>Figura 9.</b> Dimensões e espessuras por ecocardiografia _____	64
<b>Figura 10.</b> Hemodinâmica e função sistólica por ecocardiografia _____	66
<b>Figura 11.</b> Fluxo transmitral por Doppler pulsado _____	67
<b>Figura 12.</b> Quantificação da função diastólica pelo Doppler pulsado ____	68
<b>Figura 13.</b> Espectro de velocidades miocárdicas pelo TDI _____	70
<b>Figura 14.</b> Quantificação da função cardíaca pelo TDI _____	71
<b>Figura 15.</b> Resposta adrenérgica em corações isolados _____	73
<b>Figura 16.</b> Relação força-pCa em fibras permeabilizadas _____	77
<b>Figura 17.</b> Histopatologia _____	79
<b>Figura 18.</b> Expressão total de SERCA2a e PLB _____	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros hemodinâmicos obtidos por catéter de P-V _____	60
<b>Tabela 2.</b> Avaliação da função ventricular esquerda <i>in situ</i> _____	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\alpha$ -Tm**: alfa tropomiosina  
 **$\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>**: mutação pontual, substituição de E por G na posição 180 da  $\alpha$ -Tm  
**ADP**: difosfato de adenosina  
**AE**: átrio esquerdo  
**AEC**: acoplamento excitação-contração  
**AICAR**: ribonucleosídeo 5-aminoimidazol-4-carboxamido  
**A<sub>m</sub>**: máxima velocidade miocárdica na fase tardia da diástole  
**AMP**: monofosfato de adenosina  
**AMPK**: Proteína quinase ativada por AMP  
**ATP**: trifosfato de adenosina  
**AV**: átrio-ventricular  
**BES**: Ácido N,N-BIS(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico  
**bp**: pares de bases  
**C**: Cisteína  
**Ca<sup>2+</sup>**: cálcio  
**CaMK II**: Ca<sup>2+</sup>/calmodulina quinase II  
**cAMP**: monofosfato de adenosina cíclico  
**CDI**: cardiodesfibrilador automático implantável  
**cGMP**: monofosfato de guanosina cíclico  
**CHF**: cardiomiopatia hipertrófica familiar  
**CHO**: cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva  
**CMD**: Cardiomiopatia dilatada  
**cTnC**: troponina C cardíaca  
**cTnI**: troponina I cardíaca  
**cTnI<sup>S23/24D</sup>**: troponina I pseudofosforilada, S por D nas posições 23 e 24  
**cTnT**: troponina T cardíaca  
**°C**: grau Celsius  
**D**: Ácido aspártico  
**DC**: débito cardíaco  
**ddH<sub>2</sub>O**: água destilada e deionizada  
**DHPR**: receptores diidropiridínicos



**DNA:** ácido desoxirribonucléico  
**dNTPs:** desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
**dP/dt<sub>max</sub>:** valor máximo da taxa de variação da pressão pelo tempo  
**dP/dt<sub>min</sub>:** valor mínimo da taxa de variação da pressão pelo tempo  
**E/A:** razão entre onda E e onda A  
**E/E<sub>m</sub>:** razão entre a onda E (Doppler pulsado) e E<sub>m</sub> (Doppler tecidual)  
**E:** Ácido glutâmico  
**ECA:** Enzima conversora da angiotensina  
**ECG:** eletrocardiograma  
**EF-2:** fator de alongamento protéico 2  
**EGF:** fator de crescimento epidérmico  
**EGTA:** ácido etileno glicol tetra-acético  
**ELC:** cadeia leve da miosina essencial  
**E<sub>m</sub>:** máxima velocidade miocárdica na fase precoce da diástole  
**EP:** encurtamento percentual  
**ETT:** ecocardiografia transtorácica  
**FC:** frequência cardíaca  
**FE:** fração de ejeção  
**F<sub>max</sub>:** força máxima  
**G:** Glicina  
**GDP:** difosfato de guanossina  
**GMP:** monofosfato de guanossina  
**GTP:** trifosfato de guanossina  
**HSA:** hipertrofia septal assimétrica  
**IC:** insuficiência cardíaca  
**ICC:** insuficiência cardíaca congestiva  
**ICD:** insuficiência cardíaca diastólica  
**IER:** índice de espessura relativa  
**IP3:** trifosfato de inositol  
**IVT:** integral da velocidade e tempo  
**K<sup>+</sup>:** potássio  
**kDa:** kilodalton  
**kg:** quilograma  
**mA:** miliampere

**MC/CT:** razão entre a massa cardíaca e comprimento da tibia

**MEC:** Matriz extracelular

**mg:** miligrama

**Mg<sup>2+</sup>:** magnésio

**MLC:** cadeia leve da miosina

**mm:** milímetro

**mM:** milimolar

**mmHg:** milímetro de mercúrio

**MMP:** Metaloproteinase de matriz extracelular

**MSC:** morte súbita cardíaca

**mTOR:** alvo mamífero da rapamicina

**mV:** milivolt

**MyBP-C:** proteína C ligante da miosina

**MyHC:** cadeia pesada da miosina

**µg:** micrograma

**µL:** microlitro

**µm:** micrômetro

**N:** Asparagina

**Na<sup>+</sup>:** sódio

**NCX:** trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

**NTG:** não transgênico

**nm:** nanômetro

**Onda A:** velocidade máxima do fluxo sanguíneo através da mitral na fase tardia da diástole

**Onda E:** velocidade máxima do fluxo sanguíneo através da mitral na fase precoce da diástole

**PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida

**Pak:** proteína quinase ativada por p21

**PBS:** tampão fosfato

**PBS-T:** tampão fosfato com Tween20

**pCa:** logaritmo negativo da concentração de Ca<sup>2+</sup>

**pCa<sub>50</sub>:** logaritmo negativo da concentração de Ca<sup>2+</sup> em 50% da resposta total

**PDF:** pressão diastólica final

**PDFG:** fator de crescimento derivado de plaquetas

**Pi:** fosfato inorgânico  
**PK:** proteína quinase  
**PKA:** proteína quinase A  
**PKC:** proteína quinase C  
**PKG:** proteína quinase G  
**PLB:** fosfolambano  
**PMSF:** inibidor de protease, fluoreto de fenilmetilsulfonil  
**PP:** proteína fosfatase  
**PP1:** proteína fosfatase 1  
**PP2A:** proteína fosfatase 2A  
**Ppos:** parede posterior  
**Promotor  $\alpha$ -MHC:** promotor da cadeia pesada da miosina  
**Psep:** parede septal  
**P-V:** pressão por volume  
**PVE:** pressão do ventrículo esquerdo  
 **$\Delta$ PVE:** variação da pressão do ventrículo esquerdo (pressão desenvolvida)  
 **$\rho$ moles:** picomoles  
 **$\rho$ N:** piconewton  
**Q:** Glutamina  
**R:** Arginina  
**RCP:** reação em cadeia da polimerase  
**RLC:** cadeia leve da miosina regulatória  
**RNM:** ressonância nuclear magnética  
**RPVDF:** relação P-V diastólica final  
**RPVSF:** relação P-V sistólica final  
**RS:** retículo sarcoplasmático  
**RyR:** receptor rianodínico  
**SDS:** sulfato de dodecil sódico  
**Sem:** semana  
**Ser:** serina  
**S<sub>m</sub>:** máxima velocidade miocárdica na sístole  
**ssTnl:** troponina I esquelética lenta  
**TAU:** constante do tempo de relaxamento isovolumétrico  
**TC:** tomografia computadorizada

**TD:** tempo de desaceleração da onda E

**TDI:** Imagem pelo Doppler tecidual

**TG:** transgênico

**Thr:** treonina

**TIMP:** inibidor tecidual das metaloproteinases de matriz extracelular

**Tm180/Tnl-PP:** duplos transgênicos, portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> e cTnl<sup>S23/24D</sup>

**Tm180:** animais transgênicos portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa

**Tnl-PP:** animais transgênicos portadores de cTnl<sup>S23/24D</sup>

**TRIV:** tempo de relaxamento isovolumétrico

**TSC2:** tuberina

**TSPR:** trabalho sistólico pré-recrutável

**Túbulos T:** sistema tubular transverso

**VD:** ventrículo direito

**VE:** ventrículo esquerdo

**VEd:** dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole

**Vej:** volume de ejeção

**VEs:** dimensão interna do ventrículo esquerdo na sístole

**VSVE:** via de saída do ventrículo esquerdo

**W:** Triptofano

**4E-BP1:** fator de iniciação da translação eucariótica

## RESUMO

A cardiomiopatia hipertrófica familiar (CHF) é uma doença genética originada de mutações em proteínas sarcoméricas. Estas mutações geralmente associam-se a um aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , hipertrofia miocárdica, fibrose intersticial e morte súbita. Demonstrou-se previamente que camundongos transgênicos expressando a mutação  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  (Tm180) desenvolvem disfunção diastólica e hipertrofia ventricular, associadas ao aumento na sensibilidade miofilamentar ao  $\text{Ca}^{2+}$ . No presente estudo, avaliamos a hipótese de que a dessensibilização específica dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  pode prevenir o desenvolvimento do fenótipo em portadores de mutações associadas à CHF. Com o intuito de atenuar o aumento da resposta dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  em corações portadores da mutação  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$ , camundongos Tm180 foram cruzados com camundongos portadores de pseudofosforilação dos sítios da PKA na cTnI (cTnI<sup>S23/24D</sup>), os quais apresentam sensibilidade miofilamentar diminuída ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Deste cruzamento foram obtidos animais portadores de ambas as proteínas mutantes,  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  e cTnI<sup>S23/24D</sup> (camundongos Tm180/TnI-PP). A expressão de cTnI<sup>S23/24D</sup> corrigiu parcialmente a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  em animais portadores de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$ . A ecocardiografia demonstrou que os animais Tm180 desenvolveram uma disfunção diastólica progressiva, seguida de déficit na contratilidade e hipertrofia concêntrica importante. Por outro lado, a progressão da disfunção diastólica foi lentificada nos animais Tm180/TnI-PP e uma prevenção completa no remodelamento patológico foi observado. Em preparações de corações isolados de animais com 6 semanas de vida, o grupo Tm180 apresentou déficit inotrópico após o estímulo com isoproterenol, enquanto que os animais Tm180/TnI-PP mantiveram uma resposta adrenérgica adequada. Após 14 semanas, a função sistólica manteve-se melhor nos animais Tm180/TnI-PP quando comparados aos Tm180. O relaxamento esteve prejudicado em ambos os grupos, mas a complacência do VE foi menos alterada no grupo Tm180/TnI-PP, sendo que a deposição de colágeno intersticial foi reduzida nos Tm180/TnI-PP quando comparados aos Tm180. Nossos dados indicam que a dessensibilização dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser um alvo terapêutico na CHF.

## ABSTRACT

Familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) is a genetic disease originating from mutations in sarcomeric proteins. These mutations are often associated with increased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, myocardial hypertrophy, interstitial fibrosis and sudden cardiac death. It has been demonstrated that transgenic mice expressing  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  (Tm180) develop severe cardiac hypertrophy, diastolic dysfunction and increased myofilament sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ . In the present study, we hypothesize that specific  $\text{Ca}^{2+}$  desensitization of the myofilaments could rescue the phenotype of hearts expressing FHC mutations. In order to attenuate the increased Tm180 myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, Tm180 mice were crossbred with mice expressing pseudo-phosphorylation of cardiac troponin I at PKA sites ( $\text{cTnI}^{\text{S23/24D}}$ ), which have decreased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. From this crossbreeding, we obtained mice expressing both  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  and  $\text{cTnI}^{\text{S23/24D}}$  (Tm180/TnI-PP mice). The expression of  $\text{cTnI}^{\text{S23/24D}}$  partially corrected the increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of Tm180 myofilaments. Echocardiography showed that Tm180 mice displayed progressive diastolic dysfunction, followed by impaired contractility and concentric hypertrophy. In contrast, the progression of diastolic dysfunction was delayed in Tm180/TnI-PP and a complete prevention of detrimental LV remodeling was observed. In isolated heart preparations from 6-week old mice, Tm180 hearts showed impaired LV inotropic response to isoproterenol, whereas Tm180/TnI-PP displayed normal adrenergic response. At 14 weeks of age, systolic function improved in Tm180/TnI-PP mice when compared to Tm180. Relaxation was impaired in both groups, but the LV compliance was better in Tm180/TnI-PP, while collagen deposition was less pronounced in Tm180/TnI-PP than Tm180 mice. In conclusion, our data strongly indicate that myofilament desensitization to  $\text{Ca}^{2+}$  may be a useful therapeutic target in FHC.

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.2. CONTRATILIDADE CARDÍACA

#### 1.2.1. Acoplamento excitação-contração

O potencial de repouso da membrana do músculo cardíaco é da ordem de  $-85$  a  $-90$  mV. Este potencial de repouso ocorre pelo equilíbrio dos gradientes eletroquímicos dos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), de acordo com a propriedade de permeabilidade seletiva do sarcolema, sendo que a manutenção do gradiente eletroquímico destes íons ocorre à custa de gasto energético pela ação da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Fabiato & Fabiato, 1979).

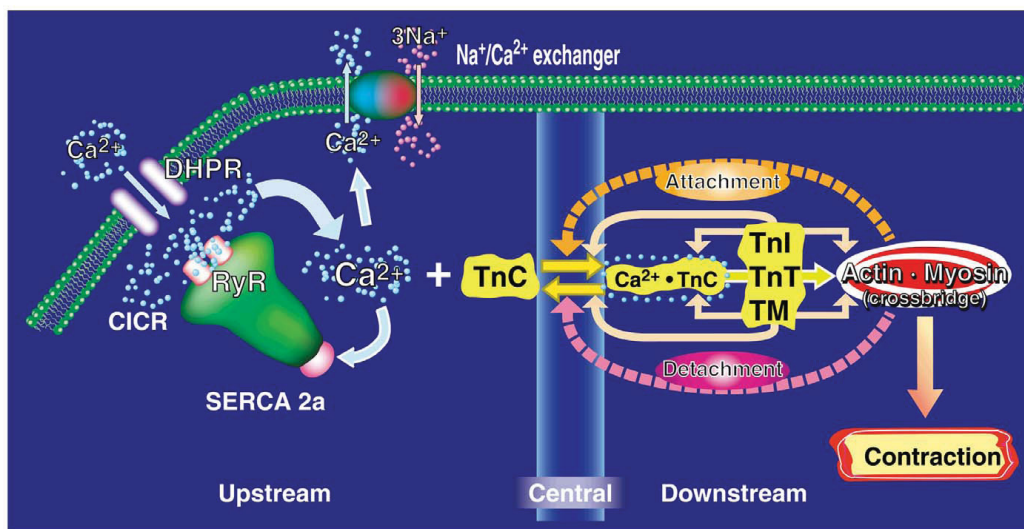
Durante um potencial de ação na célula cardíaca, o potencial de membrana eleva-se para um valor positivo em torno de  $+20$  mV. O potencial de ação de uma célula cardíaca apresenta um platô de cerca de 0,3 segundo no músculo ventricular, fazendo com que a contração no músculo cardíaco tenha uma duração 15 vezes maior do que a do músculo esquelético. Esta diferença ocorre devido ao influxo de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) provenientes do meio extracelular através dos canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$  (também conhecidos como receptores diidropiridínicos – DHPR) no músculo cardíaco, o que não ocorre em músculo esquelético. Esta população de canais possui abertura mais lenta e permanecem abertos por um período mais prolongado, sendo responsável pelo platô do potencial de ação da célula cardíaca.



O mecanismo pelo qual um estímulo externo (potencial de ação cardíaco) é convertido em ativação do aparato contrátil no interior da célula muscular cardíaca, com a conseqüente geração de força, é denominado processo de acoplamento excitação-contração (AEC). Neste processo, o potencial de ação cardíaco propaga-se por uma rede de túbulos formados por invaginações do sarcolema para o interior da célula, denominada sistema tubular transverso ou túbulos T. Nos túbulos T, os DHPR estão localizados justapostos a canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), conhecidos como receptores rianodínicos (RyR2). No músculo cardíaco, a ativação dos DHPR permite um influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do citoplasma, este influxo determina a abertura dos RyR2 e a liberação dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, sendo este mecanismo conhecido como liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Fabiato, 1982; Fabiato & Fabiato, 1979). O súbito aumento da concentração destes íons no citoplasma e sua difusão entre as miofibrilas acarretam a ativação do complexo actomiosina com a conseqüente contração da fibra cardíaca.

Ao final do platô do potencial de ação cardíaco, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  cessa subitamente e os íons  $\text{Ca}^{2+}$  presentes no citoplasma são bombeados novamente para o interior do RS por ação de uma proteína com atividade ATPásica denominada SERCA2a, localizada na membrana do RS, bem como para o meio extracelular por um trocador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  ATPase (NCX), presente nos túbulos T, o que promove a diminuição da concentração destes íons e relaxamento da fibra muscular cardíaca. Em miocárdio humano, 70% da taxa da redução da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  depende da SERCA2a, sendo esta proteína o fator determinante do relaxamento miocárdico em

humanos (Shull *et al.*, 2003). A afinidade desta proteína pelo  $\text{Ca}^{2+}$  é modulada pela sua interação com uma proteína transmembrana localizada no RS conhecida como fosfolambano (PLB) (Maclennan & Kranias, 2003). Em baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta proteína em seu estado não fosforilado liga-se à SERCA2a, inibindo a sua função.



**Figura 1.** Acoplamento excitação-contracção (Endoh, 2008).

### 1.2.2. O sarcômero como unidade funcional contrátil

Os sarcômeros são as unidades funcionais contráteis das células musculares estriadas (Huxley, 2004; Hanft *et al.*, 2008). São compostos pelos filamentos grossos, filamentos finos e proteínas associadas. Em repouso, cada sarcômero mede aproximadamente 2,2  $\mu\text{m}$  de comprimento e é delimitado por duas linhas Z. Os filamentos grossos estão dispostos na região central do sarcômero e delimitam uma zona conhecida como banda A. São formados por um conjunto protéico constituído da cadeia pesada da miosina (MyHC), cadeia

leve da miosina (MLC), sendo uma essencial (ELC) e outra regulatória (RLC), e proteína C ligada à miosina (MyBP-C). Os filamentos finos são formados de actina, troponina I (cTnI), troponina T (cTnT), troponina C (cTnC) e  $\alpha$ -tropomiosina ( $\alpha$ -Tm). Outra importante proteína sarcomérica é a titina, a qual fornece elasticidade às unidades contráteis, colocando-se desde uma linha Z até a linha M (Morimoto, 2008;Maughan, 2005).

A MyHC compreende aproximadamente 1/3 do peso total das proteínas miofibrilares. Duas moléculas se entrelaçam em uma porção chamada “corpo” e terminam em uma região flexível de conexão (“pescoço”), a qual se liga à porção globular da molécula conhecida como “cabeça”. A cabeça contém o sítio de ligação da actina e o domínio de ligação do ATP. O pescoço é a região que permite os movimentos de flexão e extensão da molécula. Os corpos de moléculas vizinhas interagem em uma disposição cauda a cauda para formar o filamento grosso. A miosina sarcomérica apresenta-se ligada à MyBP-C e duas MLC (uma RLC e uma ELC) (Au, 2004).

A ligação do ATP ao seu sítio na cabeça da MyHC enfraquece a interação do complexo actomiosina gerando o estado de ligação fraca. A quebra deste nucleotídeo em ADP e Pi fornece a energia necessária para a extensão da molécula de MyHC e promove uma nova ligação forte entre esta proteína e uma molécula vizinha de actina. A liberação do Pi leva à flexão da molécula, translocando a actina sobre o filamento grosso e gerando encurtamento. A seguir, ocorre a liberação do ADP, permitindo que um novo ciclo inicie. Cada molécula de miosina é capaz da geração de 10 pN de força, os quais são capazes de promover um encurtamento de 10 nm no sarcômero (Ruegg, 1990).

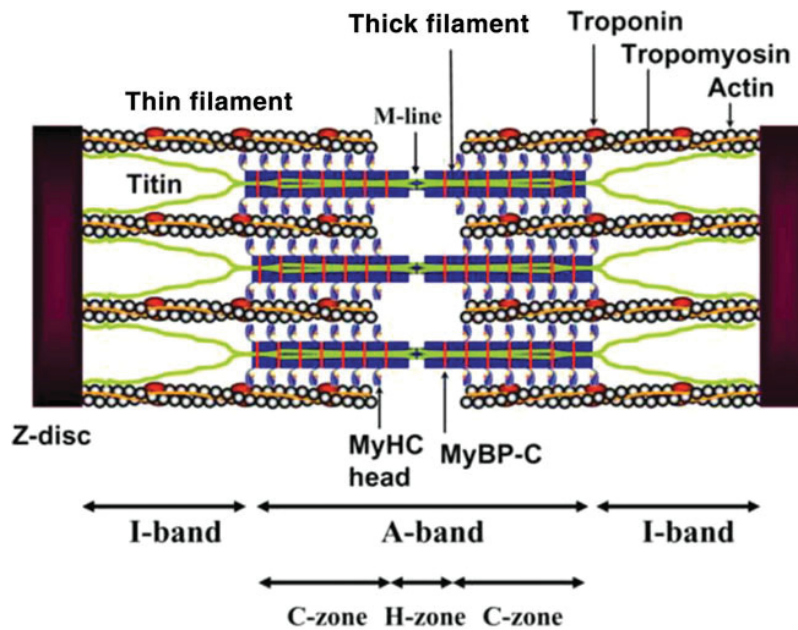
Os filamentos finos são importantes na geração e transmissão de força pelo sarcômero (Kobayashi & Solaro, 2005). A cTnT liga o complexo de troponinas à  $\alpha$ -Tm e esta, uma proteína composta de duas cadeias entrelaçadas em espiral (*coiled-coiled*), dispõe-se sobre a actina (Wolska & Wieczorek, 2003). A  $\alpha$ -Tm forma um homodímero que se liga a sete monômeros de actina, cobrindo os sítios de ligação da miosina na ausência de  $Ca^{2+}$ . A actina cardíaca, parte do filamento fino, é composta de monômeros de  $\alpha$ -actina, uma proteína de 38 kD. A actina cardíaca é responsável pela transmissão da força gerada pela ativação das pontes transversas através de sua ligação com a actinina e a distrofina no citoesqueleto. A cTnI funciona como uma unidade inibitória, modulando a interação do complexo actomiosina através da interposição da tropomiosina sob os sítios de ligação da miosina na actina. Durante a sístole cardíaca gerada por um potencial de ação, o súbito aumento na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  promove a ligação deste íon à sua unidade regulatória na extremidade N-terminal da cTnC. A ligação do íon  $Ca^{2+}$  à cTnC fortalece a interação entre esta proteína e a cTnI e enfraquece a interação entre a cTnI com a actina. Isto influencia o posicionamento da tropomiosina e diminui a inibição desta sobre o complexo actomiosina, permitindo a formação das pontes transversas. A formação das pontes transversas acarreta deslocamento adicional da Tm e permite a mobilização de outras pontes, em um processo de cooperatividade para a geração de força (Lehman *et al.*, 2009; Lehman & Craig, 2008).

A MyBP-C é uma proteína da superfamília das imunoglobulinas a qual se liga à miosina (Flashman *et al.*, 2004). O sítio de ligação da miosina está localizado na porção C-terminal em seu domínio C-10 (Flashman *et al.*, 2007).

Os domínios C-8 e C-10 compartilham a formação do sítio de ligação à titina. A ligação da MyBP-C à miosina e à titina promove estabilidade ao sarcômero. A porção localizada entre os domínios C1 e C2 serve como um sítio de fosforilação para proteínas quinases (PK) dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina ou cAMP e possui importância na modulação da contratilidade cardíaca (Winegrad, 2005; Winegrad, 1999).

A titina é uma proteína sarcomérica gigante a qual ocupa metade do sarcômero, com uma de suas extremidades interagindo com a  $\alpha$ -actinina e  $\alpha$ -actina e conectada ao disco Z e outra extremidade interagindo com a MyHC e a MyBP-C na banda A. Desempenha um papel principal na estruturação do aparato contrátil e estabilização do filamento grosso, na manutenção da tensão de repouso e nas propriedades elásticas do miócito (Fukuda *et al.*, 2008; Linke *et al.*, 1996).

As cadeias leves da miosina RLC e ELC são proteínas de 18-28 kD que se ligam à MyHC e modulam sua função (Moss & Fitzsimons, 2006). A fosforilação da RLC aumenta a produção de força pelo complexo actomiosina, sendo que mutações nos sítios de fosforilação desta proteína levam a uma redução na contratilidade em músculo estriado. Uma mudança na expressão das seis diferentes isoformas de MLC ocorre durante o desenvolvimento cardíaco, sendo importante na adaptação do miocárdio às diferentes condições de carga. Da mesma forma, mudança na expressão das isoformas de MLC, bem como a intensidade das alterações pós-transcricionais nessa proteína, se correlacionam com a piora na performance miocárdica na insuficiência cardíaca (van, V *et al.*, 2003a; van, V *et al.*, 2003b).



**Figura 2.** Organização estrutural e proteínas formadoras do sarcômero (Morimoto, 2008).

### 1.2.3. Modulação da contratilidade cardíaca

A função cardíaca é regulada de acordo com a demanda gerada pelo estresse fisiológico, como o exercício, ou patológico, como a hipertensão, por exemplo. Os diferentes estímulos atuam sobre o miocárdio através de estresse mecânico, neuro-hormonal e químico (redox), os quais são reconhecidos pelo cardiomiócito. Alterações agudas na demanda metabólica periférica se refletem em diferentes condições de carga para as quais o miocárdio deve responder quase que instantaneamente, sendo necessário para isso a utilização de diferentes mecanismos de sinalização intracelular e respostas bioquímicas adaptativas. A manutenção de um estímulo a longo

prazo pode contribuir para uma reprogramação genética do cardiomiócito, induzindo uma resposta mal adaptativa e gerando um estado patológico.

Por exemplo, o estresse mecânico causado pelo aumento da pré ou pós-carga leva a uma deformação do citoesqueleto e modifica o comprimento do sarcômero. No início do século passado, Frank e Starling demonstraram que a força propulsora do ventrículo esquerdo aumenta de acordo com o aumento do volume diastólico final. Estas observações iniciais foram seguidas da constatação de que a geração de força depende em última análise do comprimento do sarcômero. Diversas teorias foram propostas com o intuito de estabelecer os mecanismos moleculares responsáveis por este fenômeno atualmente conhecido como ativação dependente do comprimento (Shiels & White, 2008).

A primeira delas propõe que um aumento gradual do comprimento sarcomérico pelo estiramento levaria a uma melhor proporção de filamentos grossos sobrepostos aos filamentos finos até um estado máximo, o qual se correlacionaria com o aumento na cinética de ativação das pontes transversas e com a máxima produção de força. Outra teoria propõe que o estiramento do miócito e a conseqüente diminuição do espaço entre os filamentos finos e grossos levaria a uma melhor orientação espacial para a formação do complexo actomiosina. Outra explicação seria um aumento na sensibilidade do sistema ao  $\text{Ca}^{2+}$ , porém estudos induzindo redução do espaço interfilamentar por compressão osmótica demonstraram que esta diminuição não foi capaz de provocar um aumento na sensibilidade miofibrilar ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Konhilas *et al.*, 2003).

Recentemente, tem sido proposto que, sob estiramento, a proteína sarcomérica gigante titina poderia alterar o posicionamento da MyHC e influenciar a produção de força, além de adicionar propriedades elásticas ao sarcômero através do armazenamento de energia potencial, a qual seria utilizada durante a fase inicial da contração (Fukuda & Granzier, 2005; Fukuda *et al.*, 2001). Se alguma controvérsia existe, é plausível reconhecer que provavelmente mais de um destes mecanismos contribuem para a modulação da contratilidade dependente do comprimento sarcomérico.

Outro exemplo é a modulação da contratilidade pelo sistema neuro-hormonal, o qual utiliza sinalizadores extracelulares para enviar uma mensagem passível de reconhecimento pelo miócito. Este sinal é convertido através de receptores transmembrana acoplados à proteína G, a qual ativa enzimas transmembrana com capacidade para a síntese de nucleotídeos cíclicos como o cAMP e cGMP. Estes servem como segundos mensageiros intracelulares e ativam proteínas quinases (PKs) envolvidas na sinalização intracelular (Solaro, 2008).

Um exemplo destes receptores são os receptores adrenérgicos- $\beta$ 1, os quais estão acoplados a uma proteína G estimulatória (Gs) que ativa uma adenilato ciclase do sarcolema, com a conseqüente produção de cAMP. O aumento da concentração deste sinalizador intracelular ativa uma proteína quinase específica, a qual age através da transferência de fosfato para resíduos de serina e treonina, promovendo modificações na estrutura terciária de proteínas alvos intracelulares e modulando suas funções (Karooor *et al.*, 2004; Pleger *et al.*, 2007).



A estimulação dos receptores adrenérgicos- $\beta$ 1 são contrabalançados pelos receptores muscarínicos cardíacos do tipo 2 ( $M_2$ ). Estes são ativados pelo sistema parassimpático através da acetilcolina e estão acoplados a uma proteína G inibitória ( $G_i$ ) a qual aciona uma guanilato ciclase para a produção de cGMP. O aumento deste ativa a proteína quinase G (PKG) com efeito em proteínas alvo (Myslivecek & Trojan, 2000).

Um terceiro grupo de receptores transmembrana inclui o receptor adrenérgico- $\alpha$ 1, o receptor da angiotensina II e o receptor da endotelina-1. Estes estão ligados a uma isoforma de proteína G ( $G_q$ ) que age pela ativação da fosfolipase C (Wang *et al.*, 2005). Esta é responsável pela quebra do fosfatidilinositol em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol. Este último atua como um segundo mensageiro intracelular e ativa a proteína quinase C (PKC). Além de modular a contratilidade, evidências atuais ligam estes receptores e suas vias intracelulares com os processos de síntese protéica e crescimento celular responsáveis pelo remodelamento cardíaco na IC (Palaniyandi *et al.*, 2009).

Diversas vias de modulação da contratilidade têm sido identificadas nas últimas décadas e sua importância na adaptação aos estímulos fisiológicos e na patogênese das doenças cardíacas tem sido caracterizada em modelos experimentais, sendo que um melhor entendimento destes fenômenos pode contribuir para a elaboração de novos tratamentos das cardiopatias.

#### 1.2.4. Fosforilação de proteínas reguladoras da homeostase do $Ca^{2+}$

A contração cardíaca depende da elevação e diminuição cíclica da concentração citoplasmática do íon  $Ca^{2+}$ . A cascata de eventos necessária

para a elevação da concentração citoplasmática deste íon inicia-se com o potencial de ação, o qual dispara o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos RDHP levando à subsequente abertura dos RyR no RS e a liberação do estoque intracelular deste íon. Desta forma, a contratilidade cardíaca depende em última análise das proteínas e canais envolvidos no processo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . A modulação de suas funções altera o produto final, ou seja, a produção de força pelo miócito. Por outro lado o relaxamento do músculo cardíaco depende em última análise de proteínas responsáveis pela diminuição da concentração citoplasmática deste íon, como a SERCA2, PLB e NCX (Ikeda *et al.*, 2008).

A amplitude da variação da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  é controlada por modificações pós-transcricionais destas proteínas, através de fosforilação de resíduos específicos por PKs. As principais PKs caracterizadas em músculo cardíaco são a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase II dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMK II). Estas quinases são as principais responsáveis pelo nível de fosforilação total de proteínas citoplasmáticas ou sarcoméricas no músculo cardíaco e são contrabalanceadas pela atividade de proteínas fosfatases (PPs) (Seidler *et al.*, 2007).

Como comentado anteriormente, a PKA é ativada pelo aumento da concentração do cAMP. Este aumento ocorre em resposta ao estímulo adrenérgico. O aumento do cAMP ocorre em subcompartimentos celulares, já que sistema adrenérgico celular (receptores  $\beta_1$ , proteína G e adenilato ciclase) estão concentrados em determinadas porções do sarcolema. Ainda, a atividade das PKs depende também de sua ligação às proteínas ancoradoras (AKAP), co-localizadas com as proteínas alvo (Maclennan & Kranias, 2003). As principais proteínas regulatórias da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  fosforiladas pela PKA

são: RDHP, RyR2 e PLB. Os efeitos da ação da PKA podem ser observados pelo maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  externo pelos DHPRs, aumento da velocidade e amplitude da liberação destes íons pelos RyR e otimização da função de bomba da SERCA2a (devido à sua desinibição pela fosforilação do PLB). O resultado é um aumento da força máxima gerada através da mobilização de um número maior de complexos actomiosina pela cTnC, maior cinética de ativação dos miofilamentos pela atividade ATPásica aumentada da MyHC e aumento da cinética de relaxamento pela otimização da função da SERCA2a (Xiao *et al.*, 1999). Curiosamente, a CaMK II compartilha das mesmas proteínas alvo que a PKA, mas é regulada pela própria oscilação do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, além de fosforilar canais de sódio e potássio dependentes de voltagem do sarcolema, exercendo assim um papel na modulação do AEC (Ikeda *et al.*, 2008).

O contrabalanço da atividade das PKs ocorre pela desfosforilação das proteínas através de PPs. As PPs melhor caracterizadas em músculo cardíaco são a PP1 e a PP2A, compreendendo mais de 90% das PPs nos cardiomiócitos. De forma geral, a PP1 parece apresentar mais afinidade pela desfosforilação de proteínas reguladoras da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  como DHPR, RyR, e PLB. A isoforma PP2A parece estar mais relacionada com a desfosforilação de proteínas miofibrilares como a cTnI e MyBP-C (Ikeda *et al.*, 2008).

Atualmente, tem crescido o número de evidências que apontam que a fosforilação de proteínas e a sua ação na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante mecanismo adaptativo para a manutenção inicial do débito cardíaco na insuficiência cardíaca. Porém, a longo prazo, estes fenômenos tornam-se

deletérios e disparam mecanismos relacionados à reprogramação genética celular direcionada para o remodelamento miocárdico e apoptose celular.

#### 1.2.5. Fosforilação de proteínas sarcoméricas

O papel de proteínas sarcoméricas na modulação da função cardíaca tem sido explorado em artigos originais e revisões e ressaltam a idéia de que estas proteínas não são apenas efetores do sinal iniciado pela ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à cTnC, mas participam efetivamente na adequação do miocárdio à demanda. Estudos demonstram que proteínas sarcoméricas como TnT, TnI, Tm, RLC e MyBP-C são alvos de PKs e participam ativamente no controle das cinéticas de contratilidade e relaxamento do músculo cardíaco. Enquanto a PKA é a quinase mais amplamente estudada, outras quinases com significativa contribuição para a modulação de proteínas sarcoméricas são PKG, PKC, CaMK II e quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) (Solaro, 2008).

A cTnI possui uma extremidade N-terminal de 30 aminoácidos que incluem os resíduos  $\text{Ser}^{23}/\text{Ser}^{24}$ , os quais são os sítios preferenciais e mais rapidamente fosforilados pela PKA. O resíduo  $\text{Ser}^{24}$  é fosforilado inicialmente e, subsequente, uma taxa de fosforilação mais lenta ocorre no resíduo  $\text{Ser}^{23}$ . Outros resíduos na cTnI,  $\text{Ser}^{44}$  e  $\text{Thr}^{143}$ , correspondem a sítios de fosforilação para a PKC. Ainda, uma sobreposição das duas quinases ocorre, com a PKC também atuando sobre os sítios  $\text{Ser}^{23}/\text{Ser}^{24}$ . Evidências recentes obtidas *in vitro* apontam o resíduo  $\text{Ser}^{162}$  como sendo um possível substrato para quinase ativada por p21 (Pak). Entretanto, a atividade celular fisiológica

da Pak parece estar mais relacionada à desfosforilação da cTnI através da ativação da PP2A (Solaro *et al.*, 2008; Kobayashi & Solaro, 2005).

O resultado final da fosforilação dos resíduos Ser<sup>23</sup>/Ser<sup>24</sup> pela PKA é uma diminuição da afinidade da cTnC pelo Ca<sup>2+</sup> e um aumento da taxa de ativação das pontes transversas. Isto promove um aumento nas cinéticas de contração e relaxamento do miocárdico. Enquanto que fosforilação dos sítios preferenciais da PKC parecem deprimir a taxa de ativação das pontes transversas e a produção de força máxima, com efeitos controversos na sensibilidade ao íon Ca<sup>2+</sup> (Solaro *et al.*, 2008).

O principal resíduo fosforilável da cTnT é o Thr<sup>206</sup>, sendo preferencialmente substrato para a PKC. O resultado da fosforilação deste resíduo é uma redução significativa na tensão máxima gerada, na sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> e na atividade ATPásica dos miofilamentos, observados em preparações de fibras permeabilizadas por detergente. Outros sítios preferenciais para a PKC na cTnT parecem influenciar os efeitos funcionais da fosforilação do resíduo Thr<sup>206</sup> (Kobayashi *et al.*, 2008; Kobayashi & Solaro, 2005).

Outras proteínas sarcoméricas parecem atuar como substrato à fosforilação por diferentes PKs, sendo que o significado funcional desses fenômenos ainda não é bem entendido. A MyBP-C tem sido relacionada como substrato tanto para PKA quanto para PKC. A fosforilação desta proteína em sítios preferenciais para PKA parece reduzir a disponibilidade de pontes transversas para interagir com a actina, alterando assim as taxas de contração e relaxamento. Níveis de fosforilação da MyBP-C também têm sido correlacionados com a resposta a isquemia aguda e crônica, sendo identificado

um provável sítio de fosforilação pela CaMK. Outros estudos demonstram que a RLC é fosforilada pela MLCK gerando um efeito inotrópico positivo em preparações de músculo cardíaco do VE (Solaro, 2008).

### 1.3. CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA FAMILIAR

#### 1.3.1. Conceito

A cardiomiopatia hipertrófica familiar (CHF) é uma doença de herança autossômica dominante, associada a mutações em dez diferentes genes relacionados à transcrição de proteínas sarcoméricas. As formas associadas a mutações em proteínas sarcoméricas correspondem a aproximadamente 70% dos casos de CHF. Entretanto, recentemente, mutações em genes não relacionados a proteínas sarcoméricas têm sido associadas com o desenvolvimento do fenótipo desta síndrome (Marian & Roberts, 2001).

A doença se caracteriza pelo desenvolvimento de hipertrofia cardíaca sem uma causa aparente, além de desarranjo miocitário, fibrose intersticial e aumento da apoptose celular. É uma importante forma de doença cardíaca, afetando 1 em 500 indivíduos adultos, sendo a principal causa de morte súbita em jovens (Maron *et al.*, 1995). A apresentação clínica é variável e inclui indivíduos com pouco ou nenhum sintoma, bem como indivíduos em franca insuficiência cardíaca (IC). A heterogeneidade na apresentação dos sintomas é observada entre indivíduos portadores de uma mesma mutação e mesmo dentro de uma mesma família. Essa variabilidade na correlação entre genótipo

e fenótipo leva a uma grande dificuldade diagnóstica, sendo o principal desafio o reconhecimento de indivíduos com risco elevado de eventos letais em fases iniciais da doença, os quais poderiam se beneficiar de estratégias preventivas (Piori *et al.*, 2001).

### 1.3.2. Investigação clínica

A CHF é diagnosticada no contexto de hipertrofia ventricular esquerda sem uma causa aparente. A investigação clínica baseia-se em uma história familiar pormenorizada, exame físico completo, eletrocardiograma de 12 derivações (ECG) e ecocardiografia transtorácica (ETT). A utilização de monitorização cardíaca de 24 horas (Holter), ECG de esforço, estudo eletrofisiológico, hemodinâmica e cineangiocoronariografia invasivas, imagem por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância nuclear magnética (RNM) são opções para o diagnóstico complementar, estratificação de risco e programação do tratamento (Ramaraj, 2008).

O diagnóstico da CHF requer um alto índice de suspeição, já que a grande maioria dos pacientes são oligossintomáticos. Uma história familiar positiva para a doença ou história de morte súbita cardíaca (MSC) na família deve orientar uma investigação diagnóstica. Os principais sintomas são dispnéia, dor torácica, palpitações, lipotímia ou síncope (Wigle, 2001). Em jovens atletas, os sintomas mais comumente referidos são dispnéia e dor torácica (Maron *et al.*, 1996). De forma geral, apenas uma minoria dos pacientes apresenta sintomas de IC, sendo estes principalmente devidos à insuficiência cardíaca diastólica (ICD), com fração de ejeção preservada (Desai

& Fang, 2008). A síncope é um sintoma comumente associado à obstrução da via de saída do VE (VSVE), causada por hipertrofia septal assimétrica (HSA), e pode ser desencadeada até mesmo aos menores esforços em alguns pacientes, dependendo do gradiente pressórico intraventricular desenvolvido. Entretanto, apenas cerca de 20% dos pacientes apresentam CHF obstrutiva (CHO), o que justifica a ausência desse sintoma na grande maioria. A síncope também pode estar relacionada a arritmias graves e pode representar o prenúncio de MSC, a qual ocorre principalmente durante ou logo após esforços. Vale ressaltar que MSC é o sintoma inicial em boa parte dos pacientes jovens portadores de CHF, sendo esta doença responsável pela maioria dos óbitos de atletas em competições (Williams & Frenneaux, 2007).

Ao exame físico, um *ictus cordis* sustentado e de amplitude aumentada pode ser observado em boa parte dos pacientes. Sopro de ejeção sistólico pode ser ouvido na borda esternal esquerda na maioria dos pacientes, o qual se irradia para a fúrcula esternal e aumenta sua intensidade com a manobra de Valsalva. Pulso arterial bífido pode ser observado em pacientes com gradiente de pressão intraventricular. A presença de outros órgãos acometidos no contexto de uma síndrome clínica conhecida como a doença de Fabry ou doença do armazenamento do glicogênio pode levar ao diagnóstico do fenótipo de uma cardiomiopatia hipertrófica de origem metabólica indistinguível clinicamente das cardiomiopatias associadas às mutações em proteínas sarcoméricas (Uyama, 2008).

O ECG de superfície pode ser normal ou apresentar alterações inespecíficas da repolarização ventricular. Ondas T invertidas gigantes nas derivações anteriores podem ser representativas de uma variante apical da



CHF (Smolders *et al.*, 1993). Sobrecarga atrial ou ventricular esquerda são achados comuns, porém inespecíficos, sendo também aparentes em outras causas secundárias de hipertrofia do VE. Da mesma forma que bloqueio completo do ramo esquerdo ou de suas divisões são achados comuns a outras causas de miocardiopatias adquiridas. A presença de taquicardia ventricular não sustentada deve ser encarada como potencial marcador de MSC e deve ser investigada quanto à sua frequência pelo Holter. Além disso, o estudo eletrofisiológico invasivo pode ser útil na determinação da suscetibilidade às arritmias ventriculares (Kusumoto, 2008).

A ETT possui um papel fundamental no diagnóstico, classificação e estratificação do risco na CHF, devido à sua acurácia na determinação e quantificação da hipertrofia do VE, estudo das funções sistólica (geralmente preservada) e diastólica (geralmente alterada) do VE e na exclusão de defeitos anatômicos valvares ou congênitos potencialmente causadores de hipertrofia cardíaca. A classificação do tipo de hipertrofia como simétrica ou assimétrica ajuda na diferenciação diagnóstica com outras causas secundárias. Além disso, uma espessura septal diastólica superior a 30 mm correlaciona-se positivamente com um risco elevado de MSC. Recentemente, demonstrou-se que a presença de disfunção diastólica detectada ao Doppler tecidual (TDI), mesmo na ausência de hipertrofia cardíaca, pode determinar o diagnóstico da CHF em fases iniciais da doença (Uyama, 2008; Teske *et al.*, 2007). Adicionalmente à ETT, outras modalidades diagnósticas por imagem vêm sendo incorporadas para o uso no diagnóstico e na estratificação de risco de MSC na CHF. Entre elas, a presença de realce tardio após administração de gadolínio, detectado por RNM, correlaciona-se com a extensão da fibrose

intersticial e parece adicionar informação quanto ao risco futuro de MSC (Steel & Kwong, 2008; Germans & van Rossum, 2008).

Na avaliação anatomopatológica, a presença de desarranjo miocitário em mais de 5% do miocárdio ventricular esquerdo estudado é o critério diagnóstico mais específico para a CHF. Além dele, a presença de hipertrofia celular, fibrose intersticial e aumento da apoptose celular reforçam o diagnóstico e refletem o substrato histológico para uma incidência elevada de arritmias fatais (Ho & Seidman, 2006).

### 1.3.3. Bases genéticas

A CHF primária é causada por mutações em genes relacionados à transcrição de proteínas sarcoméricas, as quais são herdadas em dois terços e esporádicas em um terço dos pacientes. Trata-se de uma condição de herança autossômica dominante, com penetrância incompleta na vasta maioria dos casos (Marian & Roberts, 2001). Raros casos com herança autossômica recessiva causados por mutações no genoma mitocondrial foram descritos (Taylor *et al.*, 2003). Uma variabilidade substancial na expressão fenotípica intrafamiliar tem sido descrita, sugerindo a idéia de outros genes modificadores relevantes ou fatores ambientais envolvidos no desenvolvimento da cardiopatia (Wigle, 2001). Entretanto, o reconhecimento da herança familiar na CHF leva à necessidade de uma avaliação e aconselhamento genético dos familiares de portadores dessa doença. A genotipagem laboratorial de rotina para CHF não está amplamente disponível no momento, mas em um futuro próximo essa prática poderá vir a ser importante no manejo clínico e servirá de base para o

conhecimento mais aprofundado da correlação entre genótipo e fenótipo da doença (Colombo *et al.*, 2008).

Durante as últimas décadas, muitos genes responsáveis pela gênese da CHF foram identificados. Mais de 140 mutações já foram descritas, provenientes de pelo menos 10 genes responsáveis pelo código de proteínas sarcoméricas (Taylor *et al.*, 2004). O primeiro gene responsável pela CHF foi descrito no locus da  $\beta$ -MyHC (*MYH7*) no cromossomo 14q1 e levou à identificação da mutação pontual R403Q, a qual é a mutação mais comumente encontrada em pacientes com CHF. O gene da  $\beta$ -MyHC é composto de 40 exons e codifica uma proteína de 220 kD. A isoforma  $\beta$  da cadeia pesada da miosina é a predominante no VE de grandes roedores e compreende mais de 90% do total da miosina em ventrículos humanos. Mutações na  $\beta$ -MyHC é a causa mais comum de CHF e correspondem a 50% dos casos, sendo os códons 403 e 719 considerados “hot spots” para mutações (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990).

O segundo gene responsável pela CHF mais comumente descrito é o gene da proteína C ligadora da miosina (*MYBPC3*), o qual está localizado no cromossomo 11q11. As mutações da MyBP-C somam 20-25% dos casos descritos de CHF. Dentre as 29 alterações descritas estão mutações pontuais e deleções, afetando principalmente os sítios de ligação para a MyHC e titina (Niimura *et al.*, 1998). O terceiro gene mais comumente associado é o da cTnT (*TNNT2*), o qual corresponde a 15-20% dos casos de CHF. Está localizado no cromossomo 1q3 e, através de *splicing* alternativo, codifica diferentes isoformas de TnT (Watkins *et al.*, 1995). Mais de 20 mutações já foram descritas, sendo o códon 92 considerado “hot spot” para mutações. A maioria

das mutações é pontual, sendo poucas as deleções descritas. Além destas, outras proteínas sarcoméricas como  $\alpha$ -Tm, cTnI, ELC, RLC,  $\alpha$ -actina e titina são responsáveis por um quarto dos casos de CHF, sendo cada qual responsável por menos de 5% dos casos (Marian & Roberts, 2001; Taylor *et al.*, 2004).

Entretanto, 30% dos casos de CHF não apresentam mutações identificáveis, apesar de uma ampla triagem para genes de proteínas estruturais e contráteis, sugerindo que o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca também poderia resultar de mutações em outras proteínas não sarcoméricas. Reforçando este conceito, recentemente, mutações em três proteínas não sarcoméricas e no genoma mitocondrial foram associadas com o fenótipo de CHF (Taylor *et al.*, 2004).

Dentre as mutações não sarcoméricas recentemente descritas, uma mutação da cadeia  $\gamma^2$  da AMPK (adenosina monofosfato quinase) foi recentemente associada à gênese de uma cardiomiopatia hipertrófica de origem metabólica em humanos (Murphy *et al.*, 2005). Esta enzima citoplasmática é fundamental na manutenção do equilíbrio energético de diversos tipos celulares e atua principalmente através da regulação do metabolismo dos ácidos graxos e do glicogênio para a recuperação dos estoques intracelulares de ATP. É ativada pelo aumento da razão AMP/ATP (ou seja, pela diminuição do substrato energético disponível), e que por este motivo tem sido reconhecida como o “sensor de energia” da célula (Carling, 2004). Além do desenvolvimento de uma cardiomiopatia caracterizada pelo intenso acúmulo de glicogênio citoplasmático, a mutação na subunidade reguladora  $\gamma^2$  da AMPK também esteve associada à síndrome de Wolff-

Parkinson-White nestes pacientes. Estes achados foram recentemente reproduzidos em um modelo experimental murino transgênico expressando a subunidade  $\gamma^2$  mutante da AMPK, o qual confirmou o desenvolvimento do fenótipo descrito em humanos (Arad *et al.*, 2003).

Em adição às mutações descritas anteriormente, uma deleção no gene para o canal de potássio operado por voltagem KCNQ4 localizado no cromossomo 1p34 foi identificada em uma família com surdez congênita e CHF (Marian & Roberts, 2001). Além desta, uma mutação no gene *CSRP3* para a proteína MLP, expressa em miócitos cardíacos e em músculo esquelético, foi descrita por Geier *et al.* A proteína age como um promotor da miogênese e possui um papel estrutural na estabilização da ligação do aparato contrátil com o sarcolema. A mutação descrita parece diminuir a atividade de ligação desta proteína à  $\alpha$ -actinina (Geier *et al.*, 2003).

#### 1.3.4. Correlação entre genótipo e fenótipo e genes modificadores

Na tentativa de determinar o impacto de um gene acometido por uma mutação na expressão do fenótipo da CHF, estudos de correlação entre o genótipo e o fenótipo têm sido realizados em pequenas populações. Até o momento, um número limitado de mutações foi estudado e vários fatores influenciaram negativamente a interpretação dos resultados, como o tamanho reduzido das famílias acometidas, pequeno número de indivíduos com a mesma mutação em questão, variabilidade na expressão fenotípica intrafamiliar e interfamiliar, possibilidade de um grande número de genes modificadores atuando na expressão do fenótipo, etc (Marian & Roberts, 2001).

Em termos gerais, estes estudos demonstram que um determinado fenótipo está associado a uma mutação específica, mas uma determinada mutação exibe uma grande variabilidade na expressão clínica da cardiomiopatia. Há um consenso, entretanto, que uma determinada mutação influencia especificamente a intensidade da hipertrofia e o risco de MSC. Por exemplo, mutações na  $\beta$ -MyHC leva a uma cardiopatia que se manifesta precocemente e está associada a uma hipertrofia mais intensa e com maior chance de MSC quando comparadas com mutações na MyBP-C. Mutações com alta incidência de MSC também parecem associar-se com uma penetrância maior e início mais precoce (Tesson *et al.*, 1998). Em contraste, aquelas com melhor prognóstico apresentam menor penetrância, início tardio e menor intensidade da hipertrofia. Uma exceção a esta regra são as mutações da troponina T (cTnT<sup>R92Q</sup>, por exemplo), as quais apresentam hipertrofia leve ou nenhuma hipertrofia mas uma alta incidência de MSC. Ainda, pacientes homocigotos para uma mutação causal apresentam uma expressão fenotípica mais grave que heterocigotos. Mutações da MyBP-C e  $\alpha$ -Tm apresentam baixa penetrância e hipertrofia moderada, com baixa incidência de MSC. Entretanto, algumas formas de mutações  $\alpha$ -Tm se mostraram malignas (Geier *et al.*, 2003).

A grande variabilidade na expressão do fenótipo entre familiares de portadores de CHF sugere a influência de outros fatores não relacionados à mutação causal, os quais estão associados ao desenvolvimento da hipertrofia, sendo esses possivelmente ambientais (exercício físico, estilo de vida, hipertensão arterial, etc.) ou relacionados a genes modificadores. Genes modificadores fazem parte do painel de fundo genético individual (*background* genético) e apresentam polimorfismo capaz de modular diferentemente a

expressão da doença. Geralmente são insuficientes e não são necessários para causar CHF, mas afetam a severidade da mesma significativamente. Variantes funcionais da enzima conversora da angiotensina (ECA), endotelina-1 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  ( $\alpha$ -TNF) parecem estar associados com a severidade da expressão do fenótipo na CHF. Outros genes modificadores ainda estão para serem estabelecidos e podem tornar-se alvos terapêuticos para o tratamento da CHF (Marian, 2002;Patel *et al.*, 2000).

### 1.3.5. Modelos animais transgênicos

Modelos animais transgênicos têm sido criados para o estudo e elucidação de mecanismos moleculares relacionados à patogênese da CHF. Nestes modelos, mutações sarcoméricas descritas em humanos são expressas em animais, reproduzindo o fenótipo característico da doença.

O primeiro modelo experimental, o qual tem sido amplamente estudado e caracterizado, expressou a mutação  $\alpha$ -MyHC<sup>R403Q</sup> em camundongos, no qual um único alelo da  $\alpha$ -MyHC foi substituído pelo alelo mutante. Neste modelo, várias características reproduzem o fenótipo observado em humanos, incluindo desarranjo miocitário e fibrose (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1996). Outros exemplos de modelos expressando mutações humanas em murinos (cTnT<sup>R92Q</sup>, cTnT<sup>R92W</sup>  $\alpha$ -Tm<sup>D175N</sup>) também reproduziram os achados característicos da CHF (Muthuchamy *et al.*, 1999;Tardiff *et al.*, 1999;He *et al.*, 2007). Nestes, o desarranjo miocitário, fibrose e disfunção diastólica foram achados comuns, porém, a hipertrofia observada foi discreta, contrariando um achado marcante em humanos. A hipertrofia cardíaca tem sido mais claramente caracterizada

em modelos experimentais homocigotos para algumas mutações sarcoméricas em ratos e coelhos. Recentemente, uma mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>, expressa em camundongos, induziu hipertrofia espontânea grave, acompanhada de intenso remodelamento atrial (Prabhakar *et al.*, 2001).

Na grande maioria dos modelos estudados a função sistólica ventricular esquerda foi preservada em animais jovens, sendo diminuída apenas em alguns casos em fases tardias da doença. Porém, a disfunção diastólica é aparente em animais jovens e persiste até o final da vida dos animais transgênicos. Estes achados são compatíveis com o fenótipo compartilhado por pacientes com CHF. Por outro lado, a morte prematura, uma característica marcante da CHF é geralmente incomum nestes modelos experimentais e poucos dados sobre a suscetibilidade a arritmias têm sido publicados.

Em conjunto, uma variedade de anormalidades celulares estruturais e funcionais foi observada nesses modelos experimentais como atrofia ou hipertrofia miocitária, alteração da cinética das pontes transversas, do custo energético, da sensibilidade miofibrilar ao  $Ca^{2+}$ , do acoplamento excitação-contração, gerando uma perturbação na contratilidade miocárdica final e apontando uma diversidade de mecanismos envolvidos na patogênese da doença.

#### 1.3.6. Patogênese molecular

Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados nas últimas duas décadas levaram a um acúmulo de evidências de que as mutações genéticas em proteínas sarcoméricas causam um defeito inerente ao aparato contrátil celular e levam a



uma performance miocárdica alterada. Esse defeito inicial nos processos de contratilidade e relaxamento do miócito desencadeia uma resposta compensatória ao déficit na performance miocárdica por diferentes mecanismos. Esta resposta envolve processos de sinalização intracelular e a interação do miocárdio com fatores neuro-hormonais sistêmicos e fatores parácrinos de crescimento celular, os quais levam à hipertrofia miocitária, proliferação dos fibroblastos e remodelamento da MEC (Franz *et al.*, 2001). Esta seqüência temporal de eventos culmina com o desenvolvimento do fenótipo da CHF e, a despeito de possíveis particularidades, a resposta miocárdica ao defeito inicial causado por mutações sarcoméricas provavelmente compartilha as vias de sinalização finais comuns a outras causas secundárias de hipertrofia, como a sobrecarga ventricular de volume ou pressão ou isquemia miocárdica.

#### 1.3.7. Formação do sarcômero.

Estudos demonstram que a maioria das mutações sarcoméricas descritas produzem proteínas incorporadas nas miofibrilas e não impedem a formação do sarcômero. Porém, a formação desta estrutura depende de uma regulação e coordenação precisas, sendo que mudanças estruturais nas proteínas constitucionais poderiam afetar o resultado final. Desta forma, alguns estudos demonstram que proteínas mutantes são incorporadas com eficiência variável de acordo com diferentes mutações. Além disso, quando incorporadas em altos níveis, podem levar à disgênese sarcomérica e desarranjo miocitário (Becker *et al.*, 1997). Os mecanismos pelos quais a incorporação de proteínas

mutantes levam à disgnese sarcomérica e desarranjo miocitário na CHF ainda não estão elucidados. A questão se o fenótipo característico da CHF depende de uma incorporação insuficiente das proteínas sarcoméricas ou de uma perturbação da estruturação do sarcômero pela presença de proteínas alteradas ainda persiste.

#### 1.3.8. Atividade ATPasica.

A cabeça da MyHC contém o sítio catalítico para a hidrólise de ATP e um sítio de ligação da actina. A contração muscular depende da interação do complexo actomiosina e da hidrólise de ATP em ADP e fosfato inorgânico. Mutações na MyHC e outras proteínas sarcoméricas alteram a atividade ATPasica da MyHC ativada pela actina, mas não a atividade ATPasica intrínseca. Isto se deve a uma afinidade diminuída da MyHC pela actina e varia de acordo com a mutação (Sweeney *et al.*, 1994).

#### 1.3.9. Sensibilidade dos miofilamentos ao $Ca^{2+}$ .

A interação cíclica da MyHC com a actina depende da ligação e dissociação do íon  $Ca^{2+}$  do seu sítio na cTnC. A ligação deste íon à cTnC leva a uma modificação conformacional no complexo de troponinas com o conseqüente deslocamento da tropomiosina de sua posição estacionária sobre a actina, o que expõe os sítios de ligação da miosina, permitindo a formação do complexo actomiosina, ativação das pontes transversas e geração de força. O desligamento do íon  $Ca^{2+}$  da cTnC reverte o processo e permite o relaxamento.

Desta forma, modificações da resposta dos miofilamentos ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  causadas por mutações nas proteínas sarcoméricas podem levar a uma alteração na função miocárdica global (contratilidade e relaxamento).

A vasta maioria dos estudos demonstra uma sensibilidade aumentada dos miofilamentos ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  em modelos de CHF, sendo que a magnitude da alteração parece ser dependente da mutação estudada (Michele *et al.*, 1999). Alguns exemplos de mutações associadas à CHF com aumento da sensibilidade miofibrilar ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  são  $\alpha\text{-Tm}^{\text{D175N}}$ ,  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  e  $\text{cTnT}^{\text{R92W}}$  (Tardiff *et al.*, 1999; He *et al.*, 2007; Muthuchamy *et al.*, 1999).

Alguns estudos avaliaram uma mesma mutação sarcomérica com resultados finais aparentemente controversos, devido à utilização de diferentes técnicas para avaliação da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  em diferentes modelos experimentais. Por exemplo, a mesma mutação da  $\text{cTnT}^{\text{R92Q}}$  levou a uma diminuição da sensibilidade ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos isolados de ratos, enquanto que fibras permeabilizadas de coelhos demonstraram significativo aumento na sensibilidade do aparato contrátil a este íon (Tardiff *et al.*, 1999; Morimoto *et al.*, 1998).

Adicionalmente, diferentes mutações em uma mesma proteína, como por exemplo a  $\alpha\text{-Tm}$ , podem levar a um fenótipo de CHF com aumento da sensibilidade ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ , ou a um fenótipo de cardiomiopatia dilatada (CMD), com diminuição da sensibilidade miofilamentar a este íon (Muthuchamy *et al.*, 1999; Rajan *et al.*, 2007). Em geral, mutações causadoras de aumento da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  levam a um fenótipo de CHF e mutações com diminuição da sensibilidade levam à CMD.

### 1.3.10. Alterações da função contrátil e remodelamento miocárdico

O conjunto de alterações morfológicas desenvolvidas pelo coração em resposta a um estresse é conhecido como remodelamento cardíaco. O termo remodelamento miocárdico também tem sido utilizado para descrever as modificações estruturais, histológicas, funcionais e bioquímicas que ocorrem em resposta ao estresse. Em condições de sobrecarga, o remodelamento é um processo de adaptação à demanda, porém a longo prazo torna-se mal adaptativo, levando à piora na função cardíaca. Na CHF o remodelamento é caracterizado por hipertrofia e desarranjo miocitário, bem como por modificações na bioquímica e estrutura da MEC. O desenvolvimento de hipertrofia na ausência de sobrecarga é uma característica marcante da CHF e uma manifestação tardia da doença, correlacionando-se com um risco aumentado de MSC (Spinale, 2007; Fedak *et al.*, 2005c).

Anormalidades funcionais precedem ao desenvolvimento do remodelamento miocárdico na CHF. Estudos utilizando transfecção de genes por vetores virais para a expressão de proteínas sarcoméricas mutantes em miócitos adultos demonstram que a presença da proteína mutante prejudica a performance antes do desenvolvimento de desarranjo sarcomérico (Rust *et al.*, 1999). Além disso, a avaliação da função cardíaca *in vivo* por ecocardiografia com Doppler tecidual (TDI) demonstrou velocidades miocárdicas reduzidas em um modelo transgênico de  $\beta$ -MyHC<sup>R403Q</sup> antes do desenvolvimento de hipertrofia (Nagueh *et al.*, 2000). Em outro estudo, camundongos transgênicos expressando a mutação cTnT<sup>R92Q</sup> demonstraram prejuízo na performance

contrátil na ausência de hipertrofia e alteração do conteúdo intersticial de colágeno (He *et al.*, 2007).

Desta forma, dados atuais sugerem que a hipertrofia observada na CHF é uma resposta compensatória ao estímulo inicial causado por uma mutação pontual em uma proteína sarcomérica. Este estímulo inicial ativa o programa genético celular direcionado para o crescimento celular e síntese protéica, provavelmente de uma maneira convergente com as vias utilizadas para a resposta hipertrófica em outras patologias cardíacas.

Em situações de sobrecarga, o estímulo mecânico é o gatilho para o início do remodelamento cardíaco através da ativação de vias intracelulares responsáveis pela resposta hipertrófica do miocárdio. Na hipertensão arterial sistêmica, na qual a sobrecarga de pressão leva ao remodelamento concêntrico, acredita-se que o estímulo mecânico é transduzido para o meio intracelular através de proteínas integrinas, que conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto (Hannigan *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2006).

Por outro lado, a perpetuação da resposta hipertrófica parece também estar relacionada com receptores de membrana acoplados à proteína G<sub>Q</sub> (adrenérgicos- $\alpha$ 1, receptores da angiotensina II e endotelina-1) através da exposição crônica destes receptores a fatores externos como a epinefrina, angiotensina-II e endotelina-1. A sinalização intracelular destes estímulos depende de cascatas complexas com a ativação de PKs que termina com a ativação de fatores de transcrição, síntese protéica e crescimento celular (Aplin *et al.*, 2009; Cingolani *et al.*, 2008; Yamazaki & Yazaki, 2000).

Mesmo que pouco entendidos, alguns fatores de transcrição têm sido caracterizados como responsáveis pela gênese da hipertrofia na CHF. Por

exemplo, o alvo mamífero da rapamicina (mTOR) é uma quinase que age como um regulador da síntese protéica. É ativado pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pela insulina. EGF e PDGF ativam o mTOR através da ativação das quinases PI3 e Akt. Esta última fosforila a tuberina (TSC2) e impede a formação do complexo supressor de tumor, o qual tem efeito inibitório sobre o mTOR. O mTOR promove a síntese protéica e proliferação celular através de seus efetores S6-proteína quinase 1 (p70<sup>S6K1</sup> e S6K1) e proteína de ligação do fator de iniciação da translação eucariótica 4E (4E-BP1). Através deles, mTOR dispara o passo de iniciação da síntese protéica (Hardie, 2004; Forsyth & Vary, 2008).

Recentemente, demonstrou-se que a AMPK, quando ativada cronicamente pelo seu agonista AICAR, promove redução da hipertrofia causada pelo modelo de sobrecarga de pressão em camundongos. Esta resposta ocorreu através da inibição da via mTOR por fosforilação da TSC2. Em adição, esta quinase também limitou a síntese protéica através da inibição do fator de alongamento-2 (EF-2). Curiosamente, recentemente demonstrou-se um aumento na ativação de AMPK em pacientes com CHF, levando à hipótese de que diferentes mutações em proteínas sarcoméricas compartilham de uma utilização inadequada do ATP, com diminuição das reservas de energia intracelular. Isto é coerente com o fato de que a ativação crônica da AMPK leva a uma limitação na síntese protéica e crescimento celular, tornando esta quinase um alvo atraente para novos tratamentos da CHF (Li *et al.*, 2007).

Outro aspecto importante na CHF é o remodelamento da MEC. A MEC é constituída de um arranjo complexo de colágeno fibrilar. O coração humano apresenta colágeno tipo I e III. O colágeno tipo I compreende 85% do total,

sendo responsável por dar resistência, sustentação e rigidez à MEC. O colágeno tipo III é menos resistente e fornece elasticidade à MEC. As fibras de colágeno são estabilizadas por modificações pós-transcricionais conhecidas como ligações bioquímicas cruzadas (*crosslinks*), estabelecidas pela lisil oxidase e pela glicosilação não enzimática de resíduos de lisina e hidroxilisina. Estas ligações cruzadas fornecem adicional resistência à tensão, aumento na densidade e espessura, as quais são características do colágeno maduro. Além do colágeno, outras proteínas como elastina, proteoglicanos, laminina e fibronectina fazem parte da constituição da MEC (Fedak *et al.*, 2005a).

A organização tridimensional da MEC fornece a arquitetura necessária para a formação do miocárdio (cardiomiócitos, fibroblastos, endotélio, vasos) e o ambiente para a ocorrência de reações químicas e processos de comunicação celular necessários para a replicação, crescimento e sobrevivência dos cardiomiócitos. O entendimento atual é de que a MEC não é apenas um biomaterial inerte, mas está em constante renovação, sendo uma estrutura capaz de modificar sua composição e organização de acordo com a demanda ambiental e injúria tecidual.

A rede de colágeno fibrilar, principal constituinte da MEC, é sintetizada pelos fibroblastos. Esta rede circunda e interconecta cardiomiócitos individuais e grupos de cardiomiócitos, dando orientação aos mesmos. A lâmina externa ou epimísio circunda todos os feixes de cardiomiócitos. O perimísio circunda e interconecta feixes de fibras, tendo a mesma orientação longitudinal de um feixe, sendo importante na performance cardíaca por direcionar a produção de força de um feixe de fibras em uma mesma direção. O endomísio refere-se à MEC que circunda um determinado cardiomiócito dentro de um feixe. O

conteúdo total de colágeno e a organização da MEC mantém a forma e distensibilidade das câmaras cardíacas, sendo responsável por grande parte da elasticidade e complacência do ventrículo esquerdo (Spinale, 2007).

A deposição de colágeno é uma resposta clássica à injúria cardíaca e fornece suporte ao tecido lesado. Este é um importante mecanismo adaptativo em casos de patologia com perda de tecido, como na geração da cicatriz após o infarto miocárdico. Em condições de sobrecarga crônica de pressão, como na hipertensão arterial ou estenose aórtica, a deposição aumentada de colágeno promove fibrose difusa na ausência de necrose celular e ocorre concomitantemente com a hipertrofia miocitária. A hipertrofia gerada é do tipo concêntrica, com função sistólica preservada, aumento da rigidez do tecido e diminuição da complacência ventricular. Isto pode levar a dificuldade no enchimento ventricular e disfunção diastólica. Este é o tipo de remodelamento comumente visto em pacientes e modelos experimentais de CHF, porém, ao contrário da patologia causada por sobrecarga de pressão, este remodelamento ocorre na ausência de sobrecarga ao ventrículo, mas é disparada por uma mutação em uma proteína sarcomérica (Fedak *et al.*, 2005b; Kato *et al.*, 1995).

O remodelamento concêntrico parece ser um modelo adaptativo à sobrecarga de pressão, com o qual se mantém o volume de ejeção através do aumento do número de cardiomiócitos mobilizados em paralelo para a contração e pela diminuição do estresse da parede através do aumento de sua espessura e diminuição da cavidade ventricular, de acordo com a lei de Laplace. Este modelo atua até certo limite e precede o remodelamento excêntrico, com dilatação das câmaras, afinamento das paredes e disfunção



sistólica vistos na IC terminal. Neste tipo de remodelamento na maioria das vezes observa-se um conteúdo total reduzido de colágeno, em contraposição ao remodelamento concêntrico (Fedak *et al.*, 2005b).

Os mecanismos responsáveis pela transição entre o remodelamento concêntrico e excêntrico são pouco compreendidos e estão em contínua pesquisa, mas parte do processo parece estar relacionada com a degradação e síntese de MEC, sendo que não só a quantidade de colágeno é importante, mas também a composição do mesmo. Alguns estudos demonstram que a quantidade de ligações cruzadas do colágeno é importante para as propriedades da MEC (Spinale *et al.*, 1996).

Para que ocorram as modificações na constituição da MEC, faz-se necessária a ativação e inativação seqüencial de metaloproteinases (MMP) da MEC. As MMPs são uma importante família de enzimas dependentes de zinco capazes de degradar a MEC. Estão implicadas no remodelamento fisiológico e patológico em diversos estudos. Há pelo menos 20 tipos conhecidos, com variável capacidade e especificidade de degradação de diferentes substratos. São classificadas em colagenases (MMP-1 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelisinases (MMP-3) e associadas à membrana (MT-MMP). São constitucionalmente expressadas e respondem a uma variada gama de estímulos como estiramento, fatores de crescimento, citocinas e peptídeos bioativos. Permanecem em estado latente no miocárdio e são ativadas por clivagem e inativadas pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Diversos estudos têm correlacionado a atividade das MMPs com o remodelamento cardíaco na CHF (Ahmad *et al.*, 2005).

### 1.3.11. Tratamento atual da CHF

A maioria dos pacientes com CHF é assintomática ou oligossintomática. Porém, apesar da incidência aumentada de MSC em pacientes assintomáticos portadores de CHF, nenhuma estratégia terapêutica direcionada à prevenção da progressão da doença ou para a reversão do fenótipo foi estabelecida até o momento para esses pacientes. A maioria das opções terapêuticas disponíveis atualmente é direcionada aos pacientes sintomáticos. As opções de tratamento nesses pacientes baseiam-se na presença de CHO, sintomas de IC, arritmias ou história de MSC (Wigle *et al.*, 1995; Wigle, 1995).

Em pacientes portadores de CHO, os beta bloqueadores são os agentes farmacológicos de escolha para a melhora dos sintomas, entretanto não há evidências de sua capacidade na diminuição da mortalidade e prevenção de MSC na CHF. Os agentes beta bloqueadores agem através da diminuição da frequência cardíaca, com melhora no tempo de enchimento ventricular esquerdo e diminuição do consumo de oxigênio. Bloqueadores de canais de cálcio como diltiazem e verapamil devem ser usados com cautela em portadores de CHO já que produzem vasodilatação periférica e aumentam a probabilidade de síncope. A disopiramida, um agente antiarrítmico da classe Ia tem sido usada para a diminuição do gradiente intraventricular devido a sua propriedade inotrópica negativa (Taylor *et al.*, 2004).

A miotomia-miomectomia septal tem sido a opção cirúrgica tradicional de tratamento para pacientes portadores de CHO com gradiente pressórico intraventricular de repouso acima de 50 mmHg e refratários ao tratamento farmacológico. Há uma melhora do gradiente em até 90% dos pacientes

tratados e com melhora persistente nos sintomas em até 70% dos casos. Defeitos da condução AV, bloqueios persistentes de condução intraventricular e insuficiência aórtica são complicações comuns. Não há dados disponíveis sobre a capacidade desta modalidade terapêutica em reduzir a mortalidade por CHF. É o procedimento de escolha em pacientes com indicação cirúrgica por outros motivos como plastia ou substituição valvar e revascularização miocárdica (Ommen *et al.*, 2008).

A ablação septal por etanol utiliza a cateterização percutânea seletiva de ramos septais da coronária descendente anterior para a injeção de etanol desidratado com o objetivo de causar um infarto miocárdico localizado. O remodelamento septal após o infarto reduz o gradiente na VSVE em até 70% dos casos com mortalidade perioperatória de 0-3% em centros experientes. As complicações mais comumente associadas incluem bloqueio AV total com necessidade de implante permanente de marcapasso, embolismo pulmonar e arritmias ventriculares (Knight *et al.*, 1997).

Em pacientes não portadores de CHO as opções terapêuticas mais utilizadas para alívio dos sintomas são os beta bloqueadores e bloqueadores de canais de cálcio como o verapamil e diltiazem. Em pacientes com sintomas de IC e descompensação sistólica, o tratamento para IC congestiva (ICC) deve ser indicado com inibidores da enzima conversora da angiotensina, beta bloqueadores e antagonistas da aldosterona. O uso de digitálicos deve ser considerado de acordo com o caso e cuidado especial com toxicidade e defeitos de condução devem ser tomado. Diuréticos devem ser utilizados com ponderação para evitar diminuições demasiadas nas pressões de enchimento ventricular e reduções no débito cardíaco (Fifer & Vlahakes, 2008).

A CHF é a causa mais comum de morte súbita em jovens e um grande número de indivíduos morrem subitamente durante ou logo após o exercício devido a esta condição. Desta forma, a elaboração de estratégias de prevenção da MSC é uma preocupação fundamental no manejo da CHF. Para tal, a identificação de fatores de risco em indivíduos mais suscetíveis se faz necessária. Os fatores de risco para MSC mais aceitos atualmente são: história familiar de MSC, taquicardia ventricular não sustentada, síncope inexplicada, resposta paradoxal da pressão arterial ao esforço e hipertrofia septal maior que 30 mm. Além desses marcadores clínicos, várias mutações genéticas têm sido implicadas com um risco elevado de MSC, em particular, algumas mutações da cadeia pesada da  $\beta$ -miosina ( $\beta$ -MyHC) como R453C, R403Q e R719W, além de mutações da troponina T (McKenna & Behr, 2002).

De acordo com um algoritmo proposto, indivíduos portadores de CHF sem nenhum dos fatores de risco conhecidos não devem ser submetidos a nenhum tratamento para prevenção de MSC. Indivíduos com um fator de risco têm uma taxa de óbito de 1% ao ano e devem ser considerados para tratamento profilático em base individual. Para pacientes com dois ou mais fatores de risco a taxa de óbito é de 3% ao ano e a terapia profilática é fortemente recomendada (Zipes *et al.*, 2006).

O uso de antiarrítmicos como a amiodarona tem sido controverso quanto a sua eficácia na prevenção da MSC devido à ausência de estudos controlados, pela toxicidade a longo prazo e pelo potencial efeito pró-arrítmico. A utilização de antiarrítmicos na manutenção do ritmo em pacientes portadores de fibrilação atrial em contraposição ao simples controle da frequência cardíaca com betabloqueadores e digitálicos também tem sido motivo de controvérsia,

sendo mais aceito em determinadas subpopulações estudadas, como em pacientes jovens por exemplo (1989;Piccini *et al.*, 2009).

Atualmente, o tratamento de escolha recomendado para a prevenção da MSC em pacientes portadores de CHF é o uso de cardiodesfibrilador implantável automático (CDI). Diversos estudos demonstram sua eficácia como prevenção secundária de MSC, mas seu uso na prevenção primária é um pouco mais controverso, com uma tendência ao uso em pacientes com um ou mais fatores de risco (Zipes *et al.*, 2006).

# JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos demonstram que a modulação da função da cTnI possui um papel fundamental na interação entre a actina e miosina, com alteração das cinéticas de ativação e inativação das pontes transversas, produzindo efeitos notáveis principalmente na performance lusitrópica do miocárdio. Estas propriedades modulatórias ocorrem basicamente pela fosforilação de sítios específicos da porção N-terminal da molécula da cTnI pela PKA em resposta ao estímulo  $\beta$ -adrenérgico (Solaro *et al.*, 2008). A fosforilação dos sítios Ser<sup>23</sup>/Ser<sup>24</sup> pela PKA promove uma diminuição da afinidade da cTnC pelo íon Ca<sup>2+</sup>, aumentando a cinética de dissociação deste íon dos miofilamentos e permitindo sua recaptção pela SERCA2a, com a conseqüente diminuição de sua concentração citoplasmática e aumento do relaxamento.

Por outro lado, um aspecto relevante na patogênese da CHF na maioria das mutações descritas em humanos e reproduzido em modelos animais transgênicos é o aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao íon Ca<sup>2+</sup>, o que leva a uma diminuição da velocidade de dissociação das pontes transversas e relaxamento prolongado. Este fato correlaciona-se com um achado universal na CHF que se manifesta com disfunção predominantemente diastólica e fração de ejeção preservada. Recentes estudos também revelam que a disfunção diastólica antecede as alterações morfológicas na CHF, sendo o gatilho para o remodelamento concêntrico observado nesta doença.

Desta forma, hipotetizamos que a correção da sensibilidade miofilamentar ao íon Ca<sup>2+</sup> através da modulação da cTnI pode prevenir a

disfunção cardíaca e a progressão do fenótipo na CHF, sendo um alvo para o tratamento específico desta doença. Assim, os objetivos deste estudo foram:

1. Testar a hipótese de que a substituição dos resíduos de serina nos sítios de fosforilação da PKA na cTnI (Ser<sup>23</sup>/Ser<sup>24</sup>) por ácido aspártico, gerando um estado compatível com fosforilação constitucional (pseudofosforilação) destes sítios, desensibiliza a resposta miofilamentar ao íon Ca<sup>2+</sup> em um modelo transgênico murino de CHF (mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>).

2. Avaliar se a correção da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca<sup>2+</sup> reduz a disfunção cardíaca e o remodelamento miocárdico causado pela mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>.



# MATERIAL E MÉTODOS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

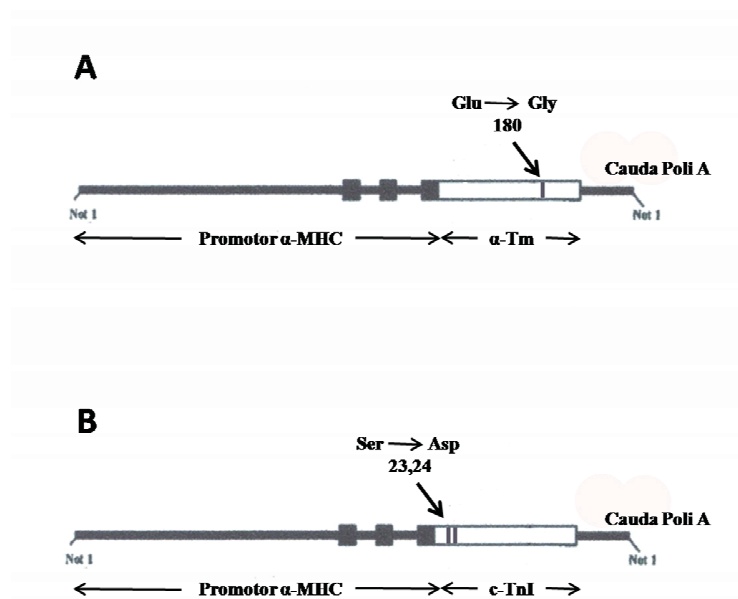
Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a legislação vigente sobre o uso de animais de laboratório em pesquisa publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (*The Public Health Service Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals and The Animal Welfare Act*), sendo o projeto aprovado pelo comitê de ética para cuidados de animais em pesquisa da *University of Illinois at Chicago*.

#### 3.1. Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos transgênicos de ambos os sexos da linhagem FVB gerados previamente nos laboratórios do Dr. Jeffrey Robbins (*Division of Molecular Cardiovascular Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center*) e do Dr. David Wiczorek (*Department of Molecular Genetics, Biochemistry and Microbiology, University of Cincinnati Medical Center*) e mantidos no biotério do *College of Medicine Research Building – University of Illinois at Chicago* com uma rotina de alimentação sem restrições e ciclo sono-vigília de 12 horas.

Os grupos experimentais foram obtidos através do cruzamento de camundongos adultos com 3 meses de idade. O animal do sexo masculino utilizado no cruzamento era portador heterozigoto de uma mutação pontual na posição 180 da cadeia de aminoácidos da  $\alpha$ -Tm ( $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>), na qual um resíduo de ácido glutâmico foi substituído por um resíduo de glicina (Figura

4A). Neste modelo, o conteúdo de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  foi de 65% da  $\alpha\text{-Tm}$  total, sendo que a expressão da proteína mutante não mudou o conteúdo total desta proteína incorporada no sarcômero (Prabhakar *et al.*, 2001). A fêmea utilizada no cruzamento expressava cTnI na qual os resíduos de serina nas posições 23 e 24 da cadeia protéica foram substituídos por ácido aspártico (cTnI<sup>S23/24D</sup>). Essa substituição simula um estado de fosforilação permanente (fosforilação constitucional ou pseudofosforilação) dos sítios da PKA. O relato original deste modelo demonstrou que a expressão da cTnI<sup>S23/24D</sup> substituiu mais de 95% do conteúdo total de cTnI, sem alterar a expressão total desta proteína. Da mesma forma, a expressão de outras proteínas sarcoméricas foi mantida (Sakthivel *et al.*, 2005).

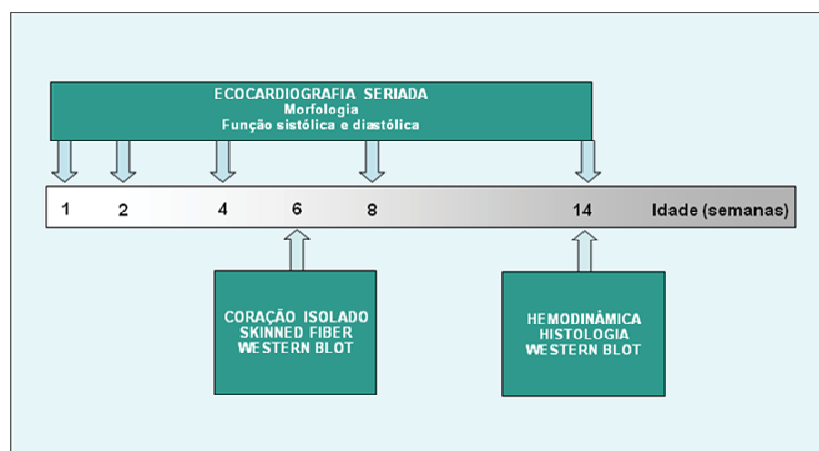


**Figura 3.** Representação esquemática do DNA transgênico. Esquema demonstrando os DNAs transgênicos construídos para a incorporação das mutações nos DNAs genômicos. **A.**  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  **B.** cTnI<sup>S23/24D</sup>. Cada seqüência construída está flanqueada em uma das extremidades pela seqüência promotora da cadeia pesada da miosina e na outra extremidade por uma cauda Poli A (Prabhakar *et al.*, 2001; Sakthivel *et al.*, 2005).

A partir desse cruzamento obtivemos 4 grupos denominados: 1) Tm180 - transgênicos portadores de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  com cTnI normal; 2) TnI-PP -

transgênicos portadores de cTnI<sup>S23/24D</sup> e  $\alpha$ -Tm normal; 3) Tm180/TnI-PP – transgênicos duplos, portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> e cTnI<sup>S23/24D</sup>; 4) NTG – animais normais, sem nenhuma das mutações citadas. Os animais foram mantidos com a fêmea progenitora até 30 dias após o nascimento quando foram separados de acordo com o gênero e genotipados através de reação em cadeia da polimerase (RCP) de acordo com a presença ou ausência das mutações.

O desenvolvimento do fenótipo em cada grupo experimental foi acompanhado por avaliações ecocardiográficas seriadas com 1, 2, 4 e 8 semanas de vida. Com 14 semanas, os animais foram submetidos à cateterização cardíaca *in vivo* para o estudo hemodinâmico, sendo sacrificados após o experimento. Os corações intactos foram removidos e pesados. Deste grupo, 2 animais de cada grupo experimental forneceram tecido para estudo histológico, sendo os restantes imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80 °C para estudos bioquímicos. Um grupo separado de 12 animais com 6 semanas de vida foi utilizado para a realização de experimentos utilizando a técnica de fibras cardíacas permeabilizadas por detergente e outros 18 animais com 6 semanas de vida para a técnica de coração isolado perfundido (preparação de Langendorff).



**Figura 4.** Desenho experimental.

### 3.2. Genotipagem por reação em cadeia da polimerase (RCP)

Os animais obtidos dos cruzamentos foram genotipados para a presença das mutações do estudo através de RCP com quatro semanas através de adaptações do método previamente descrito (Pena & Wolska, 2004). As amostras teciduais para a extração do DNA foram obtidas através da secção de 3 mm da extremidade da cauda do animal. As amostras foram submetidas à extração do DNA logo após a obtenção ou estocadas em tubos de plástico e mantidas em -20 °C para sua posterior utilização.

#### Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se um kit comercial (REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, SIGMA, Saint Louis, MO, USA). As amostras de tecidos foram colocadas em tubos plásticos de 0,5 mL e a estes foi adicionado 100 µL

de solução de extração (código do produto E7526) e 25 µL de solução de preparação tecidual (código do produto T3073). As amostras foram mantidas nesta mistura por 10 minutos em temperatura ambiente e, após isso, 3 minutos adicionais em 96 °C. Após, adicionou-se 100 µL de solução neutralizante (código do produto N 3910).

#### Reação em cadeia da polimerase

Utilizou-se uma solução de mistura para RCP com a seguinte composição: Tampão 10X (5,0 µL), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (5,0 µL), dNTPs 10 mM (0,3 µL), iniciador 3' 125 pmoles/µL (0,2 µL), iniciador 5' 125 pmoles/µL (0,2 µL), Taq Polimerase 5 U (0,2 µL), extrato de DNA (2,5 µL), ddH<sub>2</sub>O 36,8 µL.

cTnI<sup>S23/24D</sup> - Utilizou-se um ciclo de desnaturação de 4 minutos em 94°C, seguido de 35 ciclos compostos de desnaturação em 94 °C de 30 segundos, anelamento em 60 °C de 30 segundos e extensão em 72 °C de 45 segundos, um ciclo de extensão final em 72 °C de 8 minutos e resfriamento final em 4 °C por uma hora. Os iniciadores utilizados apresentam a seguinte seqüência:

*Forward* - 5' ACT CTG ATG CTG CAG ATT GCG AAG 3'

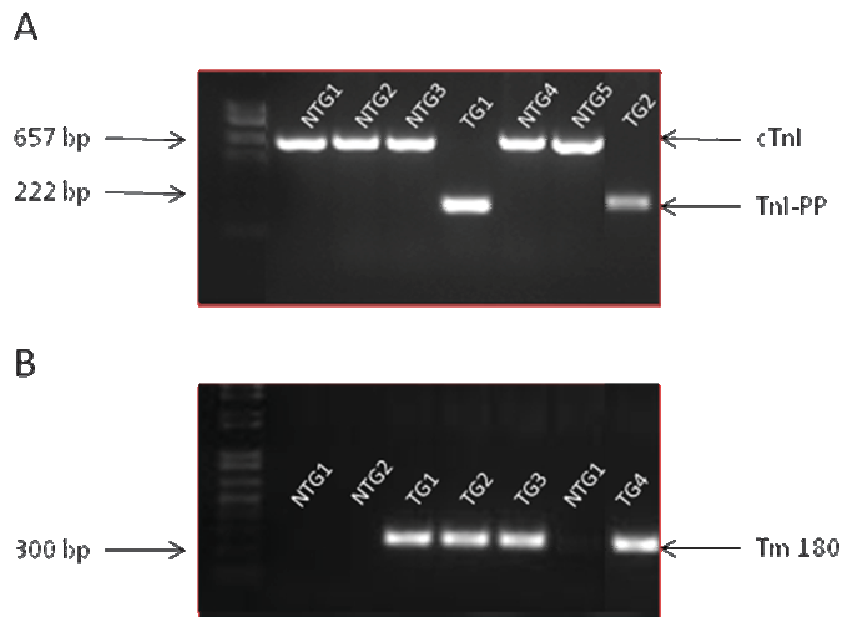
*Reverse* - 5' CTC AGT GAT GTT CTT GGT GAC TTT TG 3'

α-Tm<sup>E180G</sup> - Para a identificação desta mutação utilizou-se um ciclo de desnaturação de 4 minutos em 94 °C, seguido de 35 ciclos compostos de desnaturação em 94 °C de 30 segundos, anelamento em 55 °C de 30 segundos e extensão em 72 °C de 45 segundos, um ciclo de extensão final em

72 °C de 8 minutos e resfriamento final em 4 °C por uma hora. Os iniciadores utilizados apresentam a seguinte seqüência:

$\alpha$ -MHC - *Forward* (5' GCC CAC ACC AGA AAT GAC AGA 3')

$\alpha$ -Tm - *Reverse* (5' TCC AGT TCA TCT TCA GTG CCC 3')



**Figura 5.** RCP e eletroforese em gel de agarose. Identificação de DNA mutante ou endógeno por RCP e eletroforese em gel de agarose 1.0% corado com brometo de etídio. **A.** Identificação do DNA de TnI-PP por banda visível em 222 bp e DNA endógeno para cTnI com banda visível em 657 bp. **B.** Identificação da presença da mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>, com presença de banda visível em 300 bp. TG, transgênico; NTG, não transgênico.

### 3.3. Expressão total de proteína por SDS-PAGE e *Western Blot*

A expressão total de SERCA2a e PLB foi determinada por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot* (Dias *et al.*, 2006). Para tal, utilizaram-se amostras de VE, as quais foram congeladas

imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas em -80 °C até a realização dos experimentos. Os seguintes tampões foram utilizados: PBS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 0,9%), PBS-T (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 0,9%, Tween-20 0,1%).

No dia do experimento, as amostras foram homogenizadas em um tampão com a seguinte composição: Tris-HCl 25 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 1%, SDS 0,1% (RIPA buffer 89900, Pierce, IL, USA), juntamente com um coquetel de inibidores de proteases e fosfatases contendo: PMSF 1 mM, aprotinina, leupeptina e pepstatina 1 µg/mL cada, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM e NaF 1 mM. Após a homogenização, as amostras foram centrifugadas em 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a análise de proteínas.

A separação de proteínas pelo peso molecular foi realizada através de SDS-PAGE com concentrações de 8% de bis-acrilamida (1:29) para SERCA2 ou 15% de bisacrilamida (1:29) para PLB. A separação das proteínas pelo peso molecular foi realizada sob 20 mA para cada gel em um tampão contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3. As proteínas separadas no gel foram então transferidas para membranas de nitrocelulose (com espessura de 0,2 mm para SERCA2 e 0,05 mm para PLB) pelo método sanduíche, sob 50 mA de corrente durante duas horas em uma solução contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,0006%, metanol 20%.

A membrana foi então bloqueada em leite desnatado (5%) diluído em PBS-T por 1 hora em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo primário em PBS-T a 4 °C por 12 horas durante a noite. Para a expressão total de SERCA2, utilizou-se o anticorpo primário em uma diluição de 1:2000 (Anti-SERCA2, clone MA3-919, Mouse monoclonal, ABR Laboratories, USA) e para



a expressão de PLB utilizou-se uma diluição de 1:5000 (Anti-Phospholamban, clone A1, Mouse monoclonal, Upstate Cell Signalling Solutions, NY, USA). Após isso, as membranas foram lavadas em PBS-T diversas vezes e incubadas por uma hora com o anticorpo secundário conjugado com *horseradish peroxidase*, diluído em 1:10000 (Rabbit Anti-mouse IgG HRP, W402B, 21575908, Promega, Madison, WI, USA).

As membranas foram então reveladas por reação de quimiluminescência utilizando-se as soluções immun-Star HRP peroxide e immun-Star HRP Luminol/Enhancer (BIO-RAD Laboratories, CA, USA), seguido da exposição das mesmas a um filme de raio X em câmara escura. Os filmes foram então digitalizados e analisados utilizando-se o software Imagem (Nacional Instituto of Health - NIH).

Após isso, as mesmas membranas foram desnudadas utilizando-se *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) e reutilizadas para a detecção da expressão total de actina pelo mesmo método descrito acima. O anticorpo primário utilizado foi anti-actina 1:10000 (Anti- $\alpha$ -sarcomeric Actin, clone 5C5, Mouse monoclonal, Sigma, MI, USA), sendo o anticorpo secundário na concentração de 1:20000 (Anti-mouse IgM peroxidase conjugate, Sigma, MO, USA). Assim, os níveis de SERCA2 e PLB foram comparados à expressão total de actina em uma mesma amostra.

### 3.4. Histologia

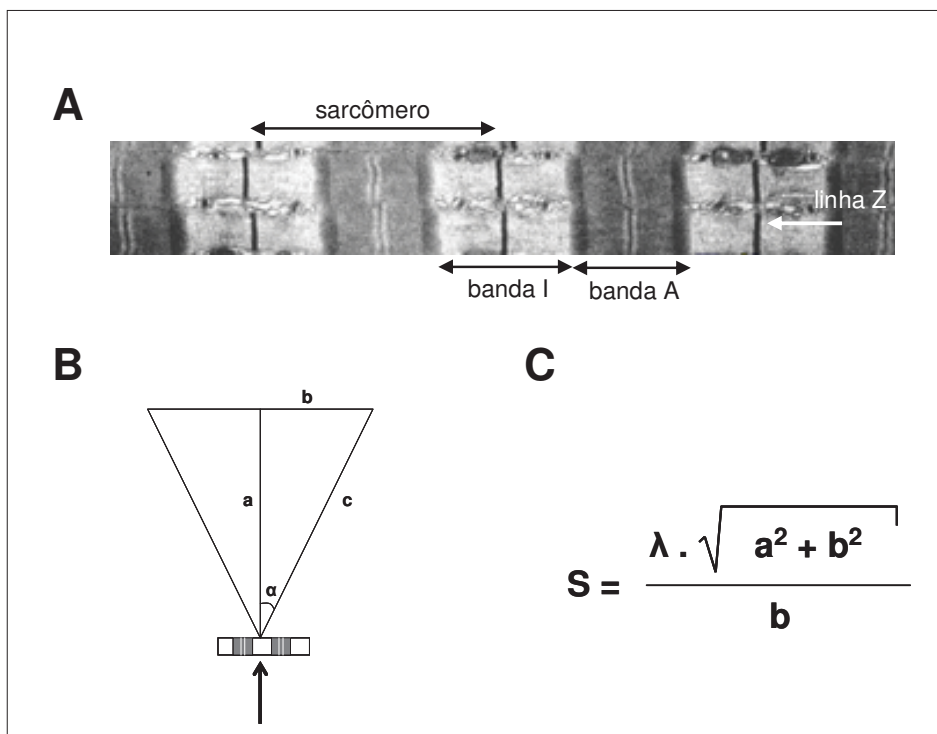
Animais de 14 semanas foram anestesiados usando pentobarbital 50 mg/kg e submetidos ao deslocamento cervical. Após toracotomia, os corações

foram removidos e perfundidos retrogradamente através da aorta com solução salina 0,9%, seguido do fixador Methacarn (BBC, WA, USA). O coração foi então embebido e permaneceu no fixador por mais 12 horas e, após isso, desidratado em etanol, lavado em xileno e conservado em parafina (TissuePrep 2, Fisher Sci, NJ, USA). Cortes de 5  $\mu$ m foram corados com hematoxilina-eosina pelo método convencional. Para a avaliação do conteúdo de colágeno, o tecido foi corado usando a técnica de Picro-Sirius Red. Inicialmente, as secções foram desparafinizadas, reidratadas e encubadas em temperatura ambiente em Sirius Red F3B 0,1% (Direct Red 80, Sigma Chemicals, USA) diluído em ácido pícrico por uma hora. Após isso, as secções foram rapidamente lavadas em água acidificada (ácido acético 0,5% vol./vol.), desidratadas e montadas usando Permount (SP15-100 toluene solution, Fisher Sci, NJ, USA).

### 3.5. Fibras cardíacas permeabilizadas por detergente

A relação força-pCa foi obtida de acordo com o método previamente publicado (Arteaga *et al.*, 2000; Lofrano-Alves *et al.*, 2005). Os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg) e os corações foram removidos rapidamente e imediatamente colocados em solução relaxante (EGTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 60 mM, Na<sub>2</sub>ATP 6.2 mM, fosfato de creatina 10 mM, BES 100 mM, pH 7,0 força iônica 150 mmol/L, pepstatina 2,5 mg/mL, leupeptina 1 mg/mL e PMSF 50 mmol/L). Os músculos papilares foram então rapidamente dissecados e feixes de fibras com diâmetro de aproximadamente 150  $\mu$ m e 4 mm de comprimento foram preparados. Estes feixes foram então submetidos à

solução relaxante contendo o detergente não iônico Triton X-100 (0,5% vol/vol) por 60 minutos. Após isso, as fibras foram novamente colocadas em solução relaxante. Uma das extremidades do feixe foi conectada a um micromanipulador e a outra a um braço metálico conectado a um transdutor de força. O comprimento do sarcômero foi determinado para 2.0  $\mu\text{m}$  através de sua medida por difração de raio laser (Figura 7). Realizou-se então a medida da força produzida por contração isométrica das fibras após a exposição do mesmo a soluções com crescentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (pCa 8,0 a 4.5), nas quais a concentração de EGTA foi reduzido para 0,1 mmol/L. A relação entre força e pCa foi calculada de acordo com a equação de Hill e análise por regressão não linear para obter-se o pCa<sub>50</sub> (concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na qual se obtém 50% da força máxima, um parâmetro utilizado para a comparação entre as sensibilidades das fibras ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ ) e o coeficiente de Hill (um parâmetro utilizado para quantificar a cooperatividade do sistema em relação à ativação das pontes transversas).



**Figura 6.** Cálculo do comprimento do sarcômero por difração de raio laser. **A.** O sarcômero com seu padrão de estriações (banda A, banda I, linha Z). **B.** Esquema demonstrando a difração de um feixe de raio laser com comprimento de onda conhecido ( $\lambda = 632 \text{ nm}$ ) através de um feixe de fibras cardíacas. A diferença nas densidades entre as bandas permite que essas sejam ampliadas e reproduzidas em um anteparo colocado a uma distância conhecida (a). A metade do comprimento da banda I reproduzida corresponde ao segmento b. O comprimento do sarcômero (S) pode ser então calculado pela relação descrita em **C**.

### 3.6. Ecocardiografia transtorácica de alta resolução

Para estes experimentos, os animais foram anestesiados com 2% de isoflurano em 100% de  $O_2$  por máscara facial e mantidos com a menor concentração do anestésico necessária para manter o animal confortável e com reflexo podal suprimido, porém sem deprimir a função respiratória ou cardíaca. Em nossa condição experimental, a concentração ideal de

manutenção foi de 0,5-1,0% de isoflurano. Os animais foram aquecidos através de uma plataforma com temperatura pré-ajustada e monitorizados por termômetro retal. As imagens foram obtidas com um transdutor RMVTM 707B desenvolvido para a aquisição de imagens em tempo real em pequenos animais com centro de frequência de 30 MHz e banda de frequência de 15-45 MHz acoplado a um sistema de aquisição de imagens *Vevo 770 High Resolution In Vivo Imaging System* (Visual Sonics, Toronto, ON, Canadá). Para a padronização das imagens obtidas, foram utilizados planos e janelas tradicionalmente usados em ecocardiografia humana adaptados para a anatomia de camundongos. Todas as medidas ecocardiográficas foram realizadas pelo mesmo ecocardiografista sem o conhecimento do genótipo do animal experimental.

A avaliação morfológica foi realizada através dos modo M anatômico (AM) e bidimensional (modo B), obtendo-se medidas das dimensões intracavitárias e espessuras das paredes septal (Psep) e posterior (Ppos) na diástole, dimensões internas do VE na sístole (VEs) e diástole (VE<sub>d</sub>), dimensões internas da raiz aórtica e AE durante a sístole ventricular. A análise da função sistólica foi obtida pelo cálculo do encurtamento percentual (EP) do VE segundo a relação  $(VE_d - VEs) \times 100/VE_d$ , sendo que as dimensões internas do VE foram obtidas pelo modo AM durante a sístole e diástole em um mesmo ciclo cardíaco. O volume de ejeção (Vej) também foi estimado, sendo calculado através da integralização da área sobre a curva espectral do fluxo da via de saída do VE obtido pelo Doppler pulsado (IVT). Através da multiplicação do Vej pela frequência cardíaca, obtém-se o débito cardíaco (DC).

A avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo foi realizada através da obtenção do fluxo diastólico transmitral pelo Doppler pulsado com o volume da amostra localizado no centro do orifício mitral e distalmente às suas cúspides. Com esta técnica, obtêm-se os seguintes parâmetros: 1) razão E/A – relação entre os picos de velocidades de fluxo transmitral durante a fase de enchimento diastólico precoce (onda E) e durante a contração atrial (onda A), TD - tempo de desaceleração da onda E, o qual é obtido entre o pico da onda E e a linha de base. Para o cálculo do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), o volume da amostra foi deslocado levemente em direção ao trato de saída do VE para a obtenção simultânea dos fluxos diastólico transmitral e sistólico aórtico em uma mesma tela de apresentação. Este parâmetro compreende o tempo entre o fechamento da válvula aórtica e abertura da válvula mitral e representa o período de relaxamento isovolumétrico do VE. As velocidades de deslocamento miocárdicas foram determinadas pelo Doppler Tecidual (TDI) com o volume da amostra localizado no ânulo mitral em sua porção septal a partir de uma janela apical de quatro câmaras. Com essa técnica determinamos os picos de velocidades sistólico ( $S_m$ ), diastólico precoce ( $E_m$ ) e diastólico tardio relacionado à contração atrial ( $A_m$ ) (Nagueh *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2006).

### 3.7. Coração isolado perfundido (preparações de Langendorff)

Animais de 6 semanas foram heparinizados e anestesiados com pentobarbital (25 mg/kg intraperitoneal). Após toracotomia, os corações foram rapidamente removidos através da incisão dos vasos da base e colocados em

solução de Krebs-Henseleit (K-H) com a seguinte composição (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.4, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 10.0. A solução foi borbulhada com uma mistura de O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5% com temperatura mantida em 37 °C e pH 7.4. A aorta foi então canulada sob auxílio de microscopia com uma cânula metálica de 25 mm de comprimento e 1.25 mm de diâmetro (Arteaga *et al.*, 2005).

O coração foi então perfundido retrogradamente com solução de K-H não recirculante sob pressão constante de 60 mmHg. Um balão de látex de 35-40 µL conectado a um tubo de polietileno (PE-90) foi introduzido por uma incisão no átrio esquerdo, atravessando o orifício mitral, até o ventrículo esquerdo. O tubo foi então conectado a um sistema de coluna de água contendo a extremidade distal de um catéter de pressão (1.4 Fr, model SPR-671, Millar Instruments, Houston, TX). A extremidade proximal foi conectada a uma unidade de controle (modelo TCB-500, Millar Instruments, Houston, TX). O sistema de coluna de água comunica-se com uma seringa de 100 µL utilizada para adicionar volume ao balão. Os corações foram estimulados com 400 pulsos por minuto utilizando-se dois eletrodos de cobre conectados ao átrio direito. A estimulação foi realizada com pulsos de polaridade alternadas e 1,5 ms de duração, com a voltagem determinada em 50% acima do limiar de estimulação (estimulador modelo S44, GRASS medical instruments, MA, USA). A pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PVE) foi determinada após a adição de volume ao balão até que a pressão máxima fosse obtida, sendo a pressão diastólica final mantida entre 5-8 mmHg.

Antes do início dos experimentos, os corações foram estabilizados sob as condições descritas por 30 minutos. A frequência cardíaca e a PVE foram

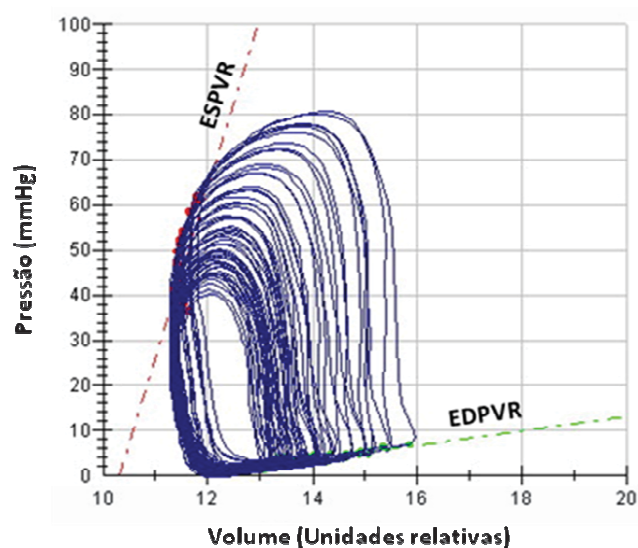
registradas continuamente e os valores utilizados para a análise medidos antes e após a infusão de isoproterenol (25 nM). A partir dos registros da PVE, foram calculadas as derivadas máximas ( $dP/dt_{max}$ ) e mínima ( $dP/dt_{min}$ ) da variação de pressão no tempo, utilizando-se o software Chart for Windows 5.01 (AD Instruments, Australia). Após os experimentos, os corações foram removidos do sistema e rapidamente congelados em nitrogênio líquido.

### 3.8. Estudo hemodinâmico *in situ*

A avaliação hemodinâmica *in situ* foi realizada conforme metodologia previamente descrita (Pena & Wolska, 2004; Shioura *et al.*, 2007). Os animais foram anestesiados com um coquetel de etomidato (10 mg/kg), morfina (1 mg/kg) e uretana (1 mg/kg) por via intraperitoneal, aquecidos através de uma plataforma e lâmpada e monitorizados para uma temperatura entre 36-37°C. Após isso, realizou-se traqueostomia e manteve-se o animal sob ventilação mecânica com oxigênio a 100%, frequência respiratória de 140 incursões por minuto e um volume corrente constante (6,6  $\mu$ L/g). A veia femoral esquerda foi dissecada e canulada com um tubo de polietileno com a finalidade de obtenção de um acesso venoso para a infusão de solução salina 0,9%. Em seguida, a artéria carótida direita foi cuidadosamente dissecada e um catéter de pressão-volume (ultra-miniature P-V catheter 1F PVR1045, Millar Instruments, Houston, TX, USA) foi introduzido retrogradamente e, através da válvula aórtica, avançado até o VE. Durante o experimento, foram monitorizados constantemente a FC, a pressão desenvolvida pelo VE (PVE) e as derivadas máxima ( $dP/dt_{max}$ ) e mínima ( $dP/dt_{min}$ ) da pressão pelo tempo.



Com o intuito de estudar as propriedades de contratilidade e relaxamento intrínsecos do VE em diferentes condições de pré-carga, utilizamos a técnica da oclusão transitória da veia cava inferior em sua porção imediatamente abaixo do diafragma, através de uma incisão cirúrgica abdominal superior. Durante a oclusão transitória da veia cava inferior (diminuição gradual e transitória do retorno venoso), obtivemos curvas de pressão-volume (P-V) do ventrículo esquerdo em diferentes condições de pré-carga (Figura 8). A tabela 1 fornece os parâmetros obtidos pelo estudo hemodinâmico.



**Figura 7.** Registro original de curvas de PV por catéter de condutância. Curvas de PV do VE após oclusão transitória da veia cava inferior (redução transitória da pré-carga ao VE) em um animal NTG. A figura demonstra as retas obtidas por regressão linear para os valores de pressão e volume no final da sístole e da diástole, as quais representam, respectivamente, a relação P-V no final da sístole (RPVSF) e a relação P-V no final da diástole (RPVDF).

**Tabela 1.** Parâmetros hemodinâmicos obtidos por catéter de P-V

<b>Abreviação</b>	<b>Definição</b>
FC	Freqüência cardíaca (ciclos por minuto)
Vej	Volume de ejeção ( $\mu\text{L}$ )
DC	Débito cardíaco (mL/min)
FE	Fração de ejeção (%)
$dP/dt_{\text{máx}}$	Derivada máxima da pressão no tempo (mmHg/s)
$dP/dt_{\text{min}}$	Derivada mínima da pressão no tempo (mmHg/s)
PDF	Pressão diastólica final (mmHg)
RPVSF	Relação pressão-volume sistólica final
RPVDF	Relação pressão-volume diastólica final
Tau	Constante de tempo do relaxamento isovolumétrico (ms)
TSPR	Trabalho sistólico pré-recrutável (mmHg)

### 3.9. Análise estatística

Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão para cada grupo experimental. Para comparação das médias entre os quatro grupos utilizou-se Análise da Variância (One-way ANOVA), com posterior teste de múltiplas comparações de Tukey. Quando o objetivo foi a comparação das médias obtidas para um parâmetro em diferentes tempos de observação em um mesmo grupo utilizou-se ANOVA com medidas repetidas. Para a comparação das médias entre dois grupos utilizou-se o teste t não pareado. Considerou-se a diferença entre os grupos estatisticamente significativa quando  $P < 0.05$ .

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

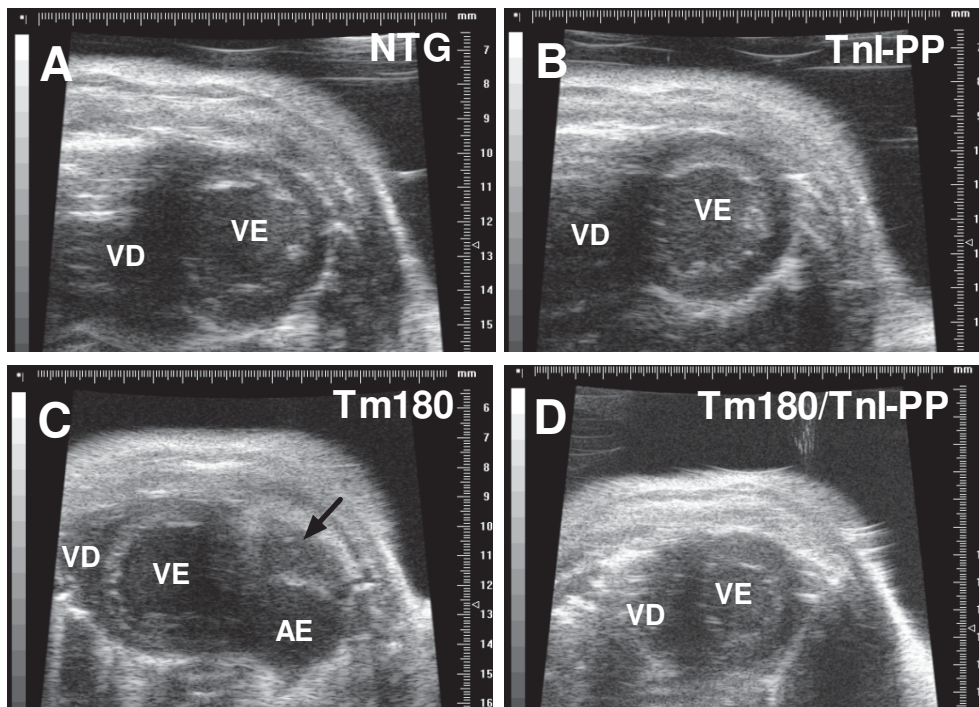
### 4.1 Morfologia e função cardíaca por ecocardiografia

Utilizamos estudos ecocardiográficos seriados para acompanhar o desenvolvimento do remodelamento e disfunção miocárdica associados com a mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>. Os estudos ecocardiográficos foram realizados em cada animal com 1, 2, 4 e 8 semanas de idade.

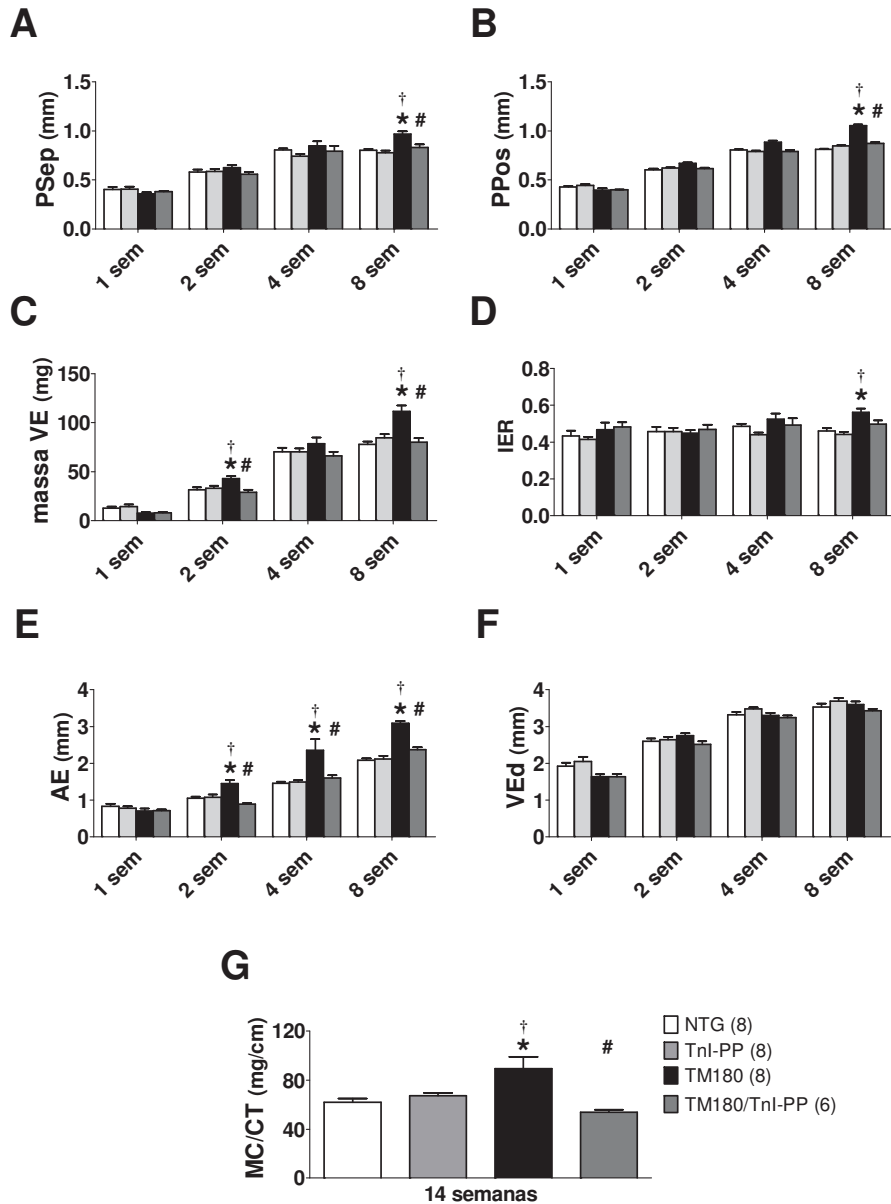
#### Avaliação morfológica

A expressão da mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> induziu intenso remodelamento cardíaco. Os animais Tm180 apresentaram importante hipertrofia ventricular esquerda e dilatação atrial quando comparados com os animais não portadores dessa mutação (Figura 9). A hipertrofia do VE foi do tipo concêntrica, melhor observada a partir de quatro semanas de vida, como pode ser aferida pelo aumento das espessuras das paredes septal e posterior, massa calculada do VE e índice de espessura relativa (Figura 10A-D). Além do remodelamento do VE, os animais Tm180 apresentaram intensa dilatação do AE, a qual foi observada precocemente a partir da segunda semana do nascimento. A dimensão interna do AE foi comparável com a dimensão interna do VE com oito semanas de vida (Figura 10E,F). Em alguns estudos o AE apresentou aumento da ecogenicidade da parede compatível com calcificação, remora sangüínea e trombos intracavitários.

Curiosamente, os animais portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> mas com expressão de cTnI pseudofosforilada (Tm180/TnI-PP) apresentaram uma morfologia cardíaca semelhante aos animais NTG. Houve uma prevenção da hipertrofia do VE e dilatação do AE nesses animais. O remodelamento cardíaco observado por ecocardiografia nos animais Tm180 e a sua prevenção no grupo Tm180/TnI-PP foram confirmados pela observação macroscópica e pela medida direta da massa dos corações de animais com quatorze semanas de idade (Figura 10G).



**Figura 8.** Morfologia por ecocardiografia. Imagens obtidas por ecocardiografia de alta resolução no modo bidimensional no final da diástole, através de janela paraesternal do eixo curto, ao nível dos músculos papilares, em animais de oito semanas de idade. A imagem apresentada em **C** é representativa da morfologia dos animais Tm180 e chama atenção pela presença de um AE bastante dilatado, com dimensão interna comparável ao VE, apresentando contraste espontâneo e trombo intracavitário (seta), levando a um deslocamento do VE para o lado direito da cavidade torácica. A morfologia dos grupos TnI-PP e Tm180/TnI-PP foi semelhante ao grupo controle NTG. VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; AE, átrio esquerdo.



**Figura 9.** Dimensões e espessuras por ecocardiografia. Parâmetros descritivos da morfologia cardíaca obtidos por ecocardiografia com modo M em diferentes idades. **A.** Espessura da P<sub>Sep</sub> na diástole. **B.** Espessura da P<sub>Pos</sub> na diástole. **C.** Massa calculada do VE. **D.** Índice de espessura relativa do VE. **E.** Dimensão ântero posterior do AE. **F.** Dimensão interna do VE em diástole. **G.** Relação entre massa do VE pelo comprimento tibial, obtida por medida direta após sacrifício. \* diferença significativa quando comparado a NTG. # diferença significativa quando comparado a Tm180. † diferença significativa quando comparado a TnI-PP.

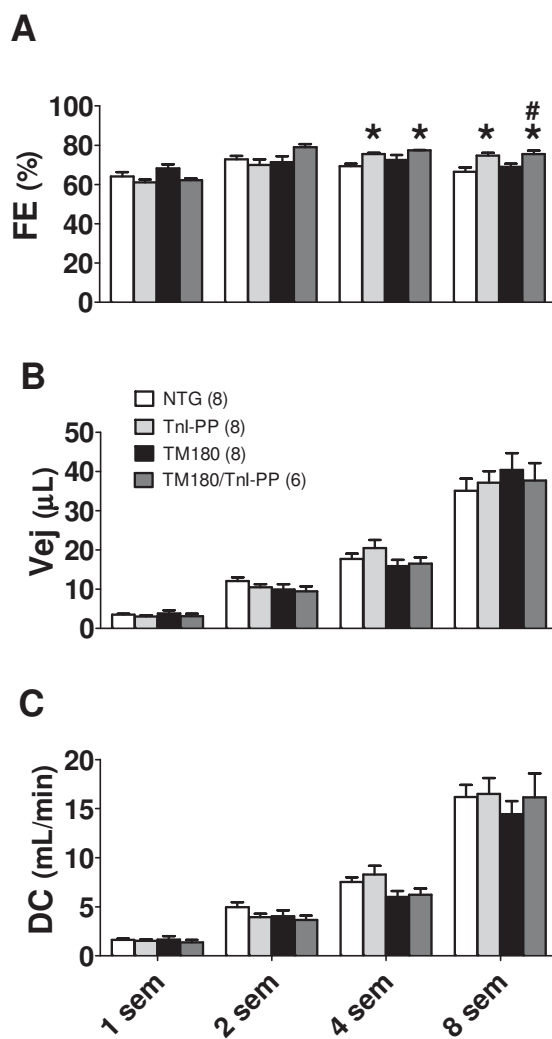
## Avaliação funcional do VE

Observamos que a função sistólica do VE, avaliada através da FE do VE por ecocardiografia pelo modo M, foi normal nos quatro grupos acompanhados até oito semanas. Houve um discreto aumento na FE nos animais portadores de Tnl pseudofosforilada (Tnl-PP e Tm180/Tnl-PP) quando comparados aos NTG. O DC aumentou progressivamente com a idade e tamanho dos animais, com uma tendência a uma redução deste índice no grupo Tm180 em relação aos demais, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa até 8 semanas de idade (Figura 11).

A avaliação do enchimento ventricular esquerdo através do padrão de influxo mitral pelo Doppler pulsado está exemplificada através de registros originais na Figura 12. A comparação entre as médias dos parâmetros obtidos pelo Doppler pulsado pode ser observada na Figura 13. Nos animais NTG, a relação E/A aumentou nas primeiras duas semanas de vida, permanecendo constante após esse período. A relação E/A, TRIV e TD nos animais Tnl-PP não foram significativamente diferentes dos animais NTG até oito semanas de vida.

Por outro lado, os animais portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> apresentaram disfunção diastólica já no período pós natal imediato. O padrão de influxo mitral nos animais Tm180 foi compatível com relaxamento diminuído do VE na primeira semana de vida, com relação E/A diminuída, TRIV e TD aumentados. Esse padrão evoluiu para disfunção diastólica moderada duas semanas após o nascimento, com pseudonormalização da relação E/A. Após quatro semanas, os animais Tm180 demonstraram consistentemente (100% dos animais) um

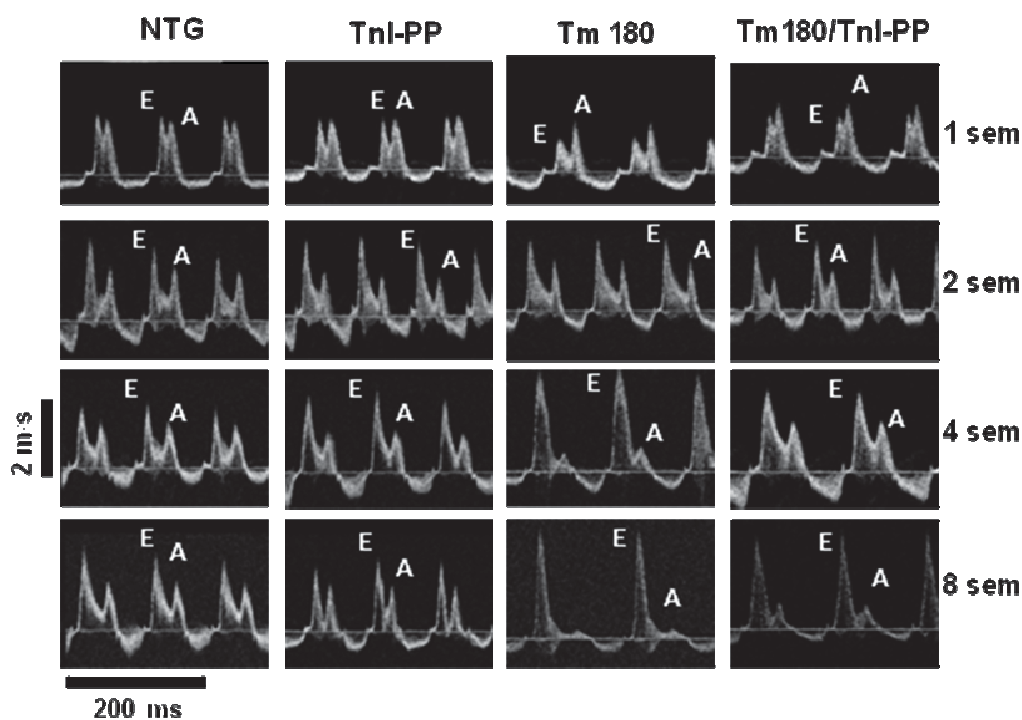
padrão de severa disfunção diastólica (padrão de complacência diminuída ou restritivo), apresentando relação E/A bastante aumentada, TRIV e TD normais ou diminuídos.



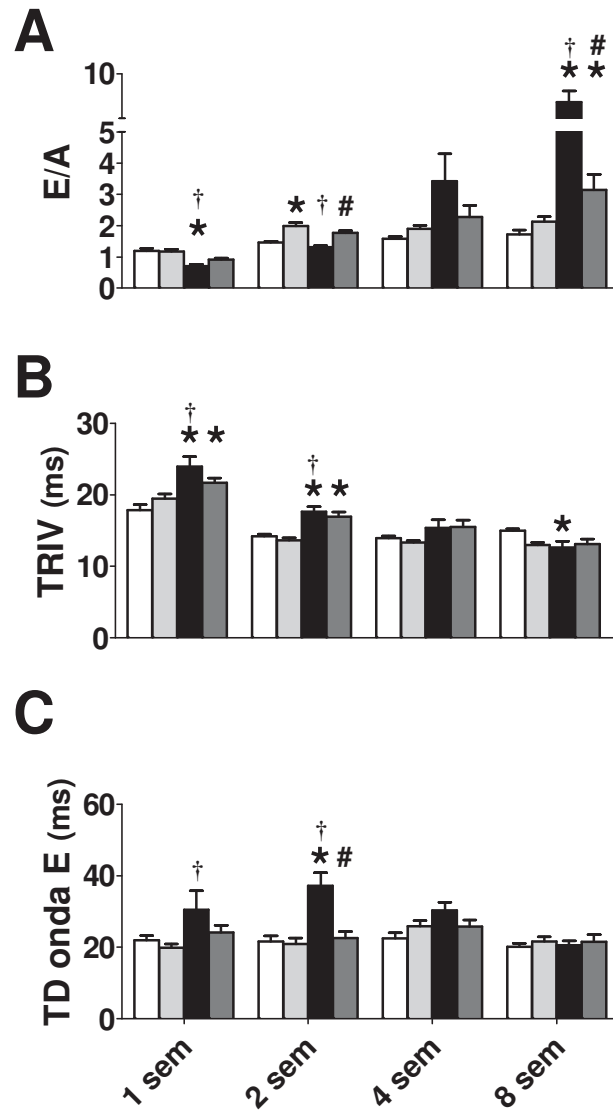
**Figura 10.** Hemodinâmica e função sistólica por ecocardiografia. Comparação da função sistólica e hemodinâmica do VE em diferentes idades. **A.** Fração de ejeção do VE. **B.** Volume de ejeção. **C.** Débito cardíaco. \* diferença significativa quando comparado a NTG. # diferença significativa quando comparado a Tm180.



A intensidade da disfunção diastólica no período pós natal foi significativamente menor no grupo Tm180/Tnl-PP quando comparados aos animais Tm180, conforme aferido pelo TD. Porém, os animais Tm180/Tnl-PP também apresentaram progressão da disfunção diastólica para um padrão compatível com altas pressões de enchimento do VE. Entretanto, a transição para este padrão foi observada apenas após oito semanas neste grupo, sendo lentificada em relação aos animais Tm180.



**Figura 11.** Fluxo transmitral por Doppler pulsado. Registros representativos da evolução do padrão de fluxo diastólico transmitral obtido por Doppler pulsado em diferentes idades. Observa-se um aumento na relação E/A durante o período pós natal no grupo NTG, sendo essa relação mantida estável após quatro semanas de vida. O mesmo padrão foi observado no grupo Tnl-PP. No grupo Tm180 há uma nítida evolução de um padrão de alteração do relaxamento do VE na primeira semana (relação E/A menor que 1), passando por um período de pseudonormalização após duas semanas (relação E/A normal), para um padrão de diminuição da complacência após quatro semanas (relação E/A bastante aumentada). O animal Tm180/Tnl-PP também apresenta a mesma evolução, porém a transição para o padrão de diminuição da complacência parece ser mais lenta, sendo este padrão observado apenas após oito semanas. Sem = semanas.

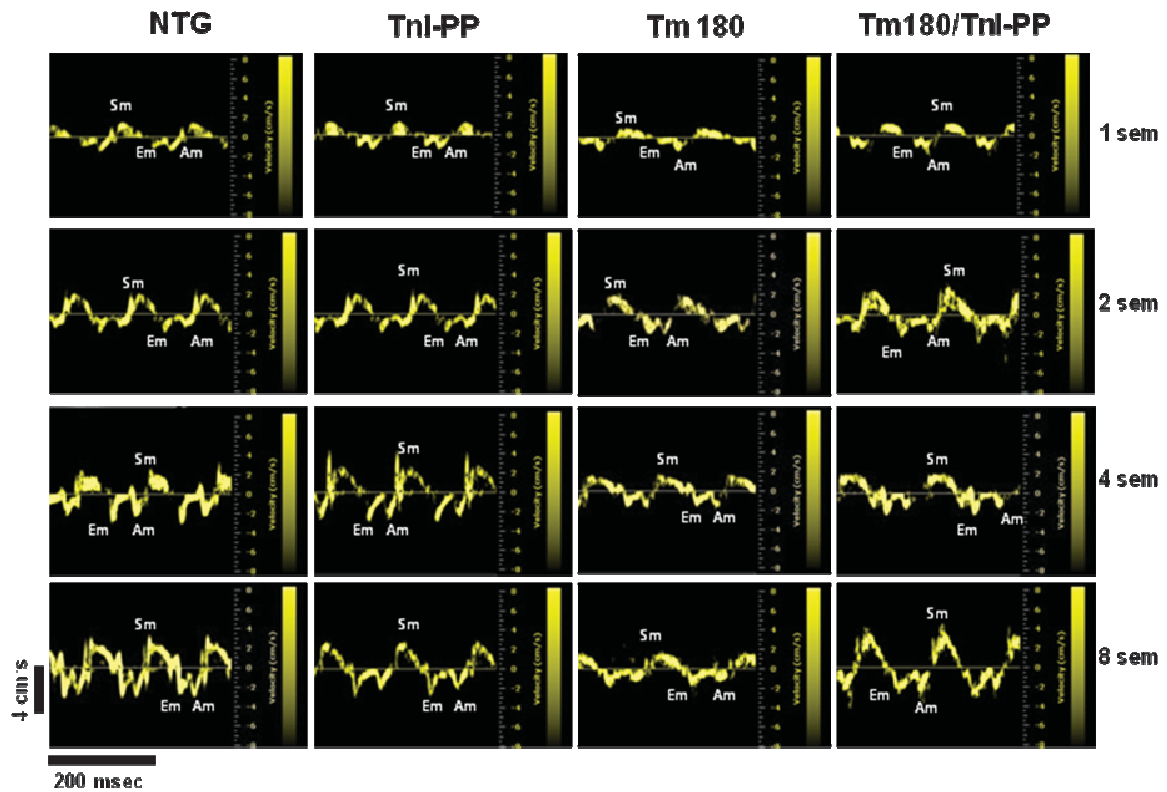


**Figura 12.** Quantificação da função diastólica pelo Doppler pulsado. Parâmetros de avaliação da função diastólica do VE obtidos do influxo transmitral pelo Doppler pulsado. **A.** Relação E/A. **B.** TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico. **C.** TD onda E, tempo de desaceleração da onda E. \* diferença significativa quando comparado a NTG. # diferença significativa quando comparado a Tm180. † diferença significativa quando comparado a Tnl-PP.

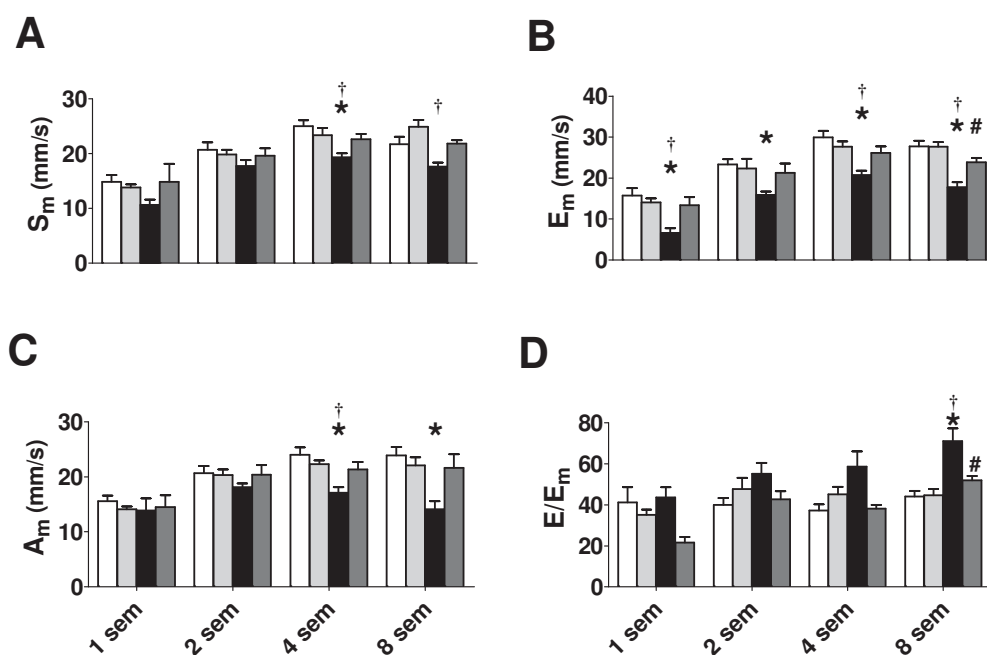
Informações complementares sobre os fenômenos de contratilidade e relaxamento do VE foram obtidas pelo Doppler tecidual (Figura 14). Observamos que, após quatro semanas de vida, o pico de velocidade miocárdica durante a sístole ( $S_m$ ) esteve diminuído nos animais Tm180 quando comparados aos NTG, sugerindo um déficit na contratilidade (Figura 15A). Apesar dos parâmetros derivados do Doppler pulsado (FE,  $V_{ej}$  e DC) demonstrarem uma adequação entre a hemodinâmica do VE e a demanda periférica no repouso nesses animais até oito semanas de vida. A  $S_m$  foi normal nos animais Tm180/TnI-PP.

Quanto ao relaxamento miocárdico, o pico de velocidade miocárdica durante a fase precoce (passiva) de enchimento ventricular ( $E_m$ ) esteve diminuído nos animais Tm180 em relação aos NTG em todas as idades e o pico de velocidade na fase tardia relacionada à contração atrial ( $A_m$ ) esteve diminuída após quatro semanas (Figura 15B,C). Os animais Tm180/TnI-PP apresentaram  $E_m$  significativamente maior que os animais Tm180 com oito semanas de vida.

A razão  $E/E_m$  tem sido utilizada como um índice de avaliação da função diastólica que se correlaciona inversamente com a complacência do ventrículo esquerdo. Esta relação foi significativamente maior nos animais Tm180 em comparação com os Tm180/TnI-PP, sugerindo uma melhor complacência nestes últimos (Figura 15D).



**Figura 13.** Espectro de velocidades miocárdicas pelo TDI. Evolução do espectro de velocidades miocárdicas obtidas por Doppler tecidual em diferentes idades. Os grupos apresentaram um aumento gradativo nas velocidades  $S_m$ ,  $E_m$  e  $A_m$  até quatro semanas, mantendo-se estável após esse período. Comparativamente ao grupo controle, o grupo Tm180 apresentou velocidade  $E_m$  diminuída em todas as idades, sendo que as velocidades  $A_m$  e  $S_m$  foram diminuídas após quatro semanas. Sem = semanas.



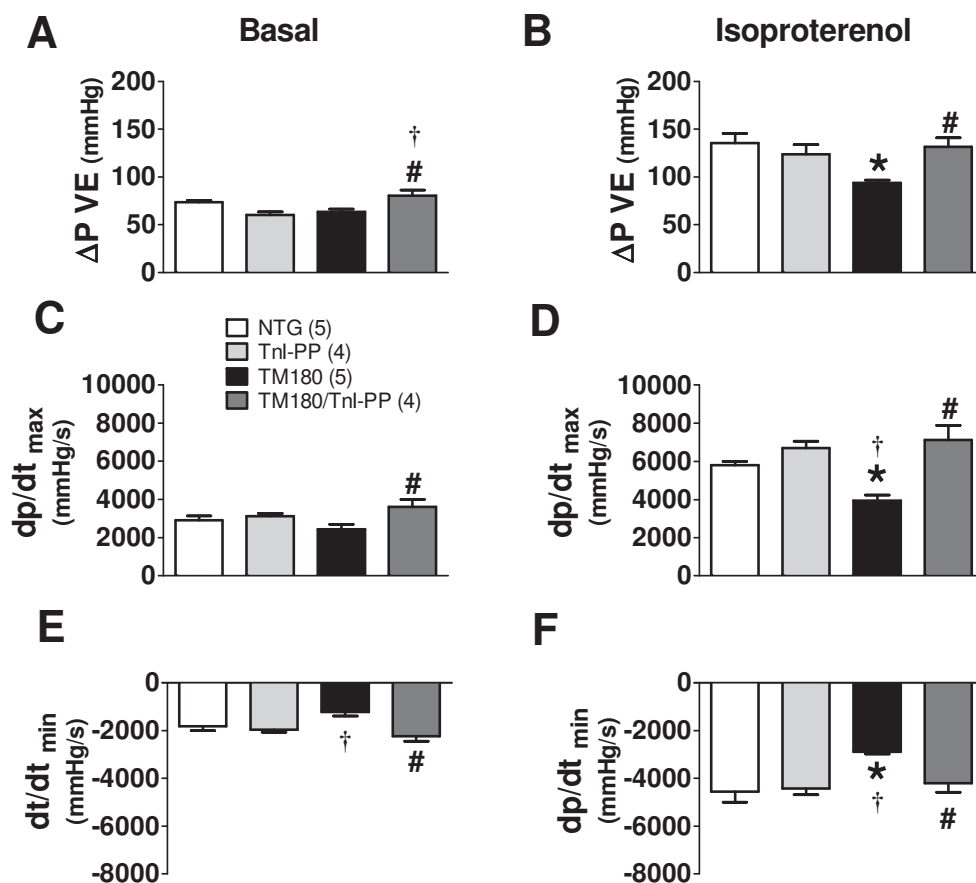
**Figura 14.** Quantificação da função cardíaca pelo TDI. Média dos picos das velocidades miocárdicas obtidas pelo Doppler tecidual. **A.**  $S_m$ , pico de velocidade miocárdica na sístole. **B.**  $E_m$ , pico de velocidade miocárdica na fase de enchimento passivo. **C.**  $A_m$ , pico de velocidade miocárdica na fase de contração atrial. \* diferença significativa quando comparado a NTG. **D.** Relação entre E (Doppler pulsado) e  $E_m$  (TDI). # diferença significativa quando comparado a Tm180. † diferença significativa quando comparado a Tnl-PP.

#### 4.2 Resposta adrenérgica em corações isolados perfundidos

Utilizamos preparações de Langendorff com o intuito de avaliar a performance do VE na ausência do controle autonômico e sua resposta ao estresse induzido pelo agonista beta-adrenérgico isoproterenol. Realizamos estes experimentos em animais de seis semanas devido às diferenças observadas pelo estudo ecocardiográfico em parâmetros de contratilidade e relaxamento entre os animais Tm180 e Tm180/Tnl-PP nesta idade.

Os valores médios da pressão desenvolvida pelo VE ( $\Delta PVE$ ) no grupo Tm180 após o estímulo com isoproterenol foram significativamente menores do que os obtidos no grupo NTG, demonstrando uma capacidade limitada do miocárdio portador de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> em aumentar a pressão ventricular durante o estresse. Por outro lado, os animais Tm180/Tnl-PP não apresentaram diferença significativa em relação aos NTG para os valores de  $\Delta PVE$  após isoproterenol, demonstrando uma adequação à demanda pelo estresse adrenérgico. Comparativamente, a  $\Delta PVE$  no grupo Tm180/Tnl-PP foi maior do que a obtida nos animais Tm180 antes e após o estímulo com isoproterenol (Figura 16A,B). As mesmas conclusões podem ser obtidas quando utilizamos a  $dP/dt_{max}$  como parâmetro de contratilidade do VE (Figura 16C,D).

Observamos também que a  $dP/dt_{min}$  no grupo Tm180 foi significativamente reduzida em relação aos animais NTG após o estímulo com isoproterenol. Isso demonstra uma capacidade limitada do miocárdio portador de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> em aumentar a velocidade de relaxamento em resposta ao estímulo adrenérgico. Por outro lado, os animais Tm180/Tnl-PP apresentaram  $dP/dt_{min}$  normal antes e após o estímulo adrenérgico e significativamente maior do que os animais Tm180 (Figura 16E,F).



**Figura 15.** Resposta adrenérgica em corações isolado. Avaliação da performance do VE e da resposta ao estímulo adrenérgico em preparações de coração isolado perfundido em animais de seis semanas de idade. **A, C, E** Função ventricular esquerda basal. **B, D, F** parâmetros obtidos após infusão de isoproterenol.  $dp/dt_{max}$ , máximo valor da derivada da pressão no tempo durante a contração do VE.  $dp/dt_{min}$ , mínimo valor da derivada da pressão pelo tempo durante o relaxamento do VE.  $\Delta P_{VE}$ , variação de pressão intracavitária (pressão desenvolvida) durante a contração do VE. \* diferença significativa quando comparado a NTG. # diferença significativa quando comparado a Tm180. † diferença significativa quando comparado a Tnl-PP.

### 4.3 Avaliação hemodinâmica *in situ*

Esta técnica permite a medida concomitante dos valores de pressão e volume do VE. O registro das curvas de P-V pode ser obtido em diferentes condições de pré-carga, durante a oclusão transitória da veia cava inferior. Assim, obtivemos uma avaliação da performance hemodinâmica do VE baseada em índices de contratilidade e relaxamento do VE em ambas as condições: 1) dependente ou 2) independente da pré-carga oferecida. Estes índices foram utilizados para a comparação da performance miocárdica em animais de quatorze semanas de idade. Os resultados para os diferentes grupos estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Avaliação da função ventricular esquerda *in situ* por catéter de condutância (P-V) em animais de quatorze semanas.

<b>Load-dependent</b>	<b>NTG (8)</b>	<b>TnI PP (8)</b>	<b>Tm180 (8)</b>	<b>Tm180/TnI-PP (8)</b>	<b>ANOVA</b>
<b>Vej</b> (μL)	16,0±2,51	21,6±1,86	12,6±1,36	16,2±1,67	p = 0,032
<b>DC</b> (mL/min)	8,67±0,68	9,84±1,32	6,25±0,53	8,83±0,84	p = 0,052
<b>FE</b> (%)	72,0±3,82	77,0±3,70	71,3±5,16	80,6±3,16	p = 0,396
<b>PDF</b> (mmHg)	4,21±0,26	4,59±0,16	5,03±0,40	4,51±0,41	p = 0,333
<b>Dp/dt<sub>max</sub></b> (mmHg/s)	6426±455,4	7315±689,4	8095±810,5	9136±713,4	p = 0,054
<b>Dp/dt<sub>min</sub></b> (mmHg/s)	-5803±398,8	-6678±264,9	-3959±268,6	-4197±184,9	p < 0,001
<b>Tau</b> (ms)	6,06±0,16	5,82±0,12	7,55±0,28	7,06±0,29	p < 0,001
<b>Load-independent</b>					
<b>TSPR</b> (mmHg)	69,6±7,29	73,0±4,90	37,9±7,25	61,5±7,66	p = 0,006
<b>RPVSF</b> (mmHg/μL)	6,84±0,51	7,51±1,06	4,47±0,36	7,44±1,37	p = 0,127
<b>RPVDF</b> (mmHg/μL)	0,19±0,04	0,19±0,02	0,36±0,05	0,27±0,05	p = 0,045

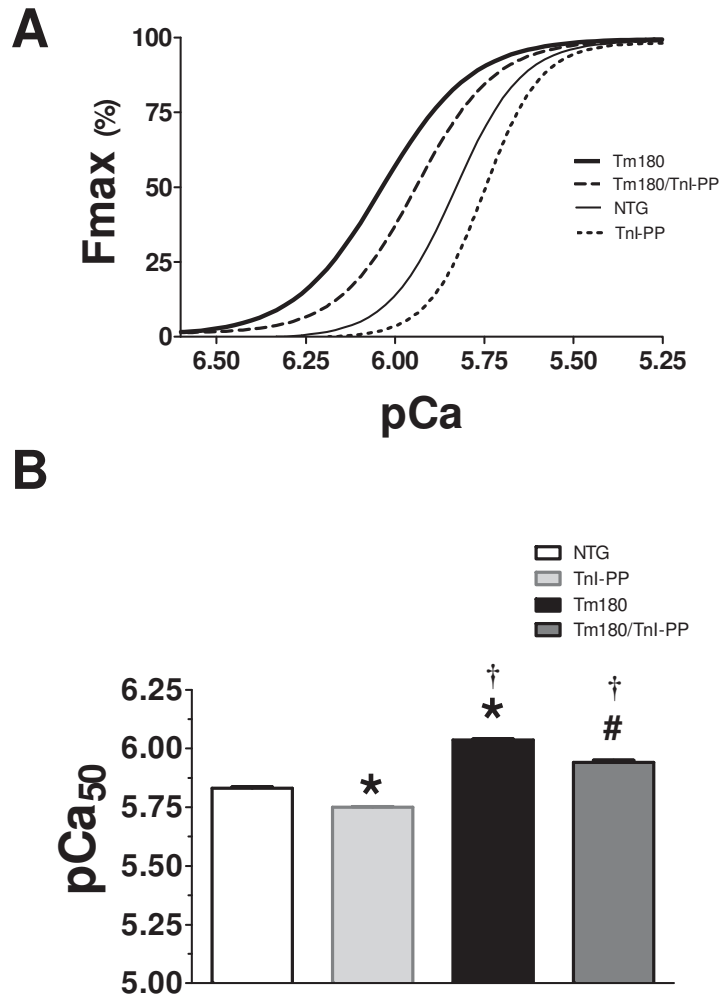


Em relação à performance hemodinâmica do VE, observamos que os animais Tm180 com quatorze semanas de idade apresentaram valores médios reduzidos de  $V_{ej}$  e DC em comparação aos controles NTG e TnI-PP. O pior desempenho hemodinâmico nos animais Tm180 esteve acompanhado de uma diminuição no inotropismo, como pode ser observado pelos valores diminuídos de TSPR, (índice de contratilidade independente da pré-carga). Da mesma forma, o lusitropismo dos animais Tm180 também esteve prejudicado, como observado pelos valores menores de  $dP/dt_{min}$  e um aumento na constante Tau, sendo estes achados reforçados pela maior inclinação da RPVDF.

Houve uma melhora na performance hemodinâmica do VE nos animais Tm180/TnI-PP quando comparados aos Tm180. Os valores médios de  $V_{ej}$  e DC nos animais Tm180/TnI-PP foram maiores quando comparados com os Tm180 e não diferiram significativamente dos controles NTG e TnI-PP. Além disso, os parâmetros relacionados à contratilidade miocárdica TSPR e RPVSF para os animais Tm180/TnI-PP não foram significativamente diferentes dos grupos NTG e TnI-PP, indicando a manutenção das propriedades inotrópicas do miocárdio destes animais. Por outro lado, o relaxamento dos animais Tm180/TnI-PP também esteve diminuído em relação aos NTG, como pode ser observado pelos valores reduzidos de  $dP/dt_{min}$  e um aumento na constante Tau. Entretanto, no que se refere ainda à função diastólica do VE, os valores da RPVDF nos animais Tm180/TnI-PP foi menor do que nos animais Tm180, indicando uma melhor complacência.

#### 4.4 Sensibilidade dos miofilamentos ao $\text{Ca}^{2+}$

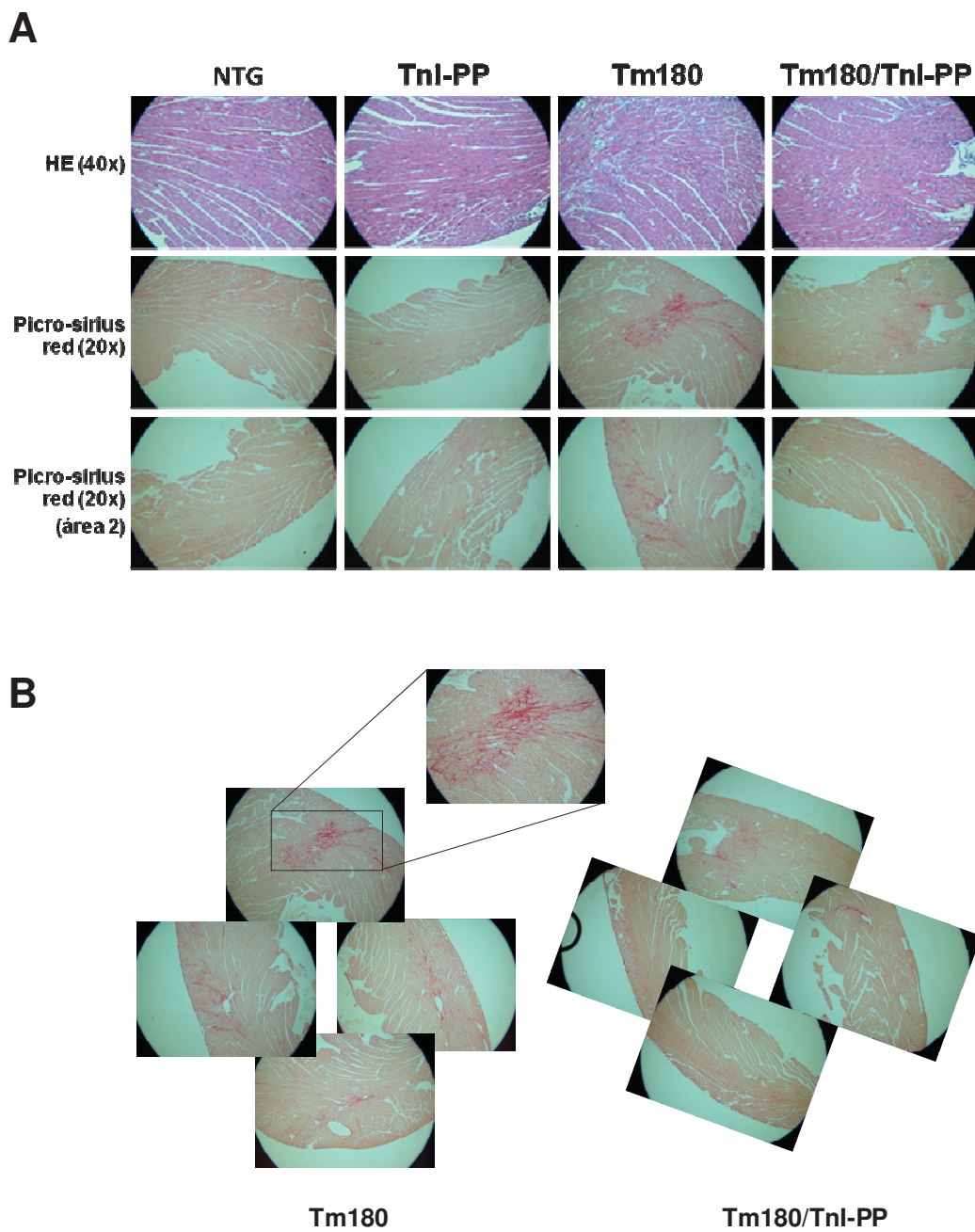
Investigamos a relação entre força e concentração de cálcio em fibras cardíacas permeabilizadas por detergente em animais de seis semanas. A figura 17 demonstra as curvas representativas da relação força-pCa para os quatro grupos. O  $\text{pCa}_{50}$  no grupo NTG foi  $5,83 \pm 0,002$  ( $n=6$  provenientes de 3 corações). Os animais Tm180 apresentaram uma sensibilidade aumentada ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  com  $\text{pCa}_{50}=6.03 \pm 0.003$  ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ , provenientes de 3 corações) e os animais Tnl-PP apresentaram uma diminuição da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  com  $\text{pCa}_{50}=5.75 \pm 0.003$  ( $p < 0.05$ ,  $n=6$  provenientes de 3 corações). A sensibilidade das fibras provenientes de animais Tm180/Tnl-PP foi intermediária entre os Tm180 e NTG com  $\text{pCa}_{50}=5.94 \pm 0.009$  ( $n=6$  provenientes de 3 corações), sendo reduzida significativamente quando comparada ao grupo Tm180 ( $p < 0.01$ ). Não observamos diferenças significativas na força máxima gerada ou na cooperatividade do sistema contrátil (avaliada pelo coeficiente de Hill) entre os quatro grupos estudados.



**Figura 16.** Relação força-pCa em fibras permeabilizadas. Avaliação da sensibilidade dos miofilamentos aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e da cooperatividade do sistema contrátil em fibras cardíacas desmembranadas por detergente obtidas de animais com seis semanas de idade. **A.** Relação entre pCa e força desenvolvida. **B.** Comparação dos  $\text{pCa}_{50}$  para os diferentes grupos.  $\text{pCa} = -\log [\text{Ca}^{2+}]$ . Fmax, força máxima desenvolvida.  $\text{pCa}_{50}$ , pCa necessário para ativação de 50% da Fmax. \* diferença significativa quando comparado a NTG. # diferença significativa quando comparado a Tm180. † diferença significativa quando comparado a Tnl-PP.

#### 4.5. Histopatologia

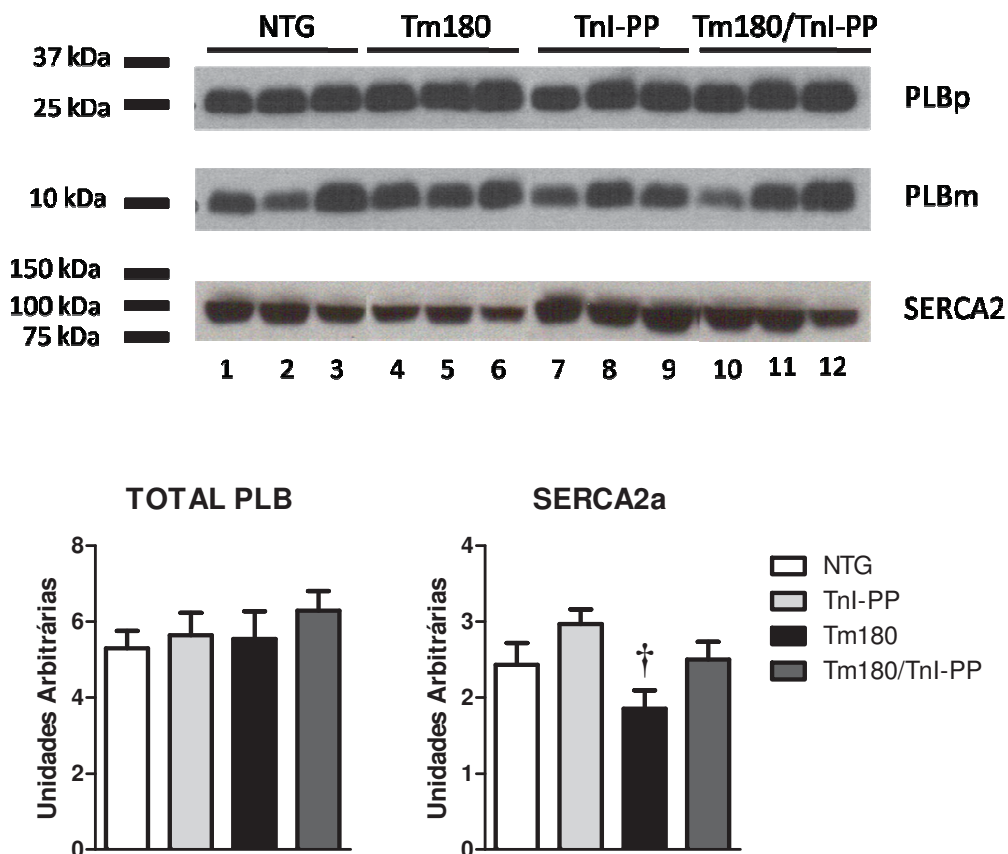
A avaliação histopatológica comparativa entre os quatro grupos de animais com quatorze semanas de idade demonstra que os animais TnI-PP não desenvolveram alterações significativas na morfologia, organização dos cardiomiócitos, ou ainda, no espaço intersticial. Por outro lado, os animais Tm180 apresentaram hipertrofia celular, grande desarranjo dos miócitos e um número aumentado de células intersticiais à coloração HE. Além disso, observa-se um aumento considerável na deposição de colágeno intersticial à coloração de Picro-sirius red. Estas alterações foram evidenciadas em mais de 10% do miocárdio estudado, com maior abundância no septo interventricular, mas também observadas na parede livre do VE. Comparativamente, os animais Tm180/TnI-PP apresentaram uma menor deposição de colágeno intersticial e menor desarranjo miocitário do que os animais Tm180. Estes achados foram bastante característicos e observados em pelo menos 3 animais em cada grupo (Figura 18).



**Figura 17.** Histopatologia. Avaliação histológica em animais de quatorze semanas de idade. **A.** A primeira linha representa cortes do septo interventricular corados com HE e apresentados em aumento de 40x. A segunda linha apresenta cortes do septo interventricular e a terceira linha cortes da parede livre do VE, corados em Picro-sirius red e apresentados com aumento de 20x. No animal Tm180, observa-se um padrão de desarranjo miocitário e aumento da deposição de colágeno intersticial. **B.** Visão panorâmica comparativa entre Tm180 e Tm180/Tnl-PP.

#### 4.6. Expressão total de SERCA2a e PLB

Avaliamos a expressão total de SERCA2a e PLB através de SDS-PAGE e *Western Blot* em animais de 6 semanas de vida. Conforme podemos observar na Figura 19, a expressão de SERCA2a nos animais Tm180 esteve levemente diminuída em comparação aos Tnl-PP, mas não houve diferença significativa quando comparado com os NTG ou Tm180/Tnl-PP. Não observamos diferenças significativas na expressão total de PLB entre os quatro grupos estudados.



**Figura 18.** Expressão total de SERCA2a e PLB. Western blot para expressão total de PLB (visualizando-se as isoformas pentamérica-PLBp e monomérica-PLBm) e Serca2a. Actina foi utilizado como controle interno.

# DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos pela primeira vez que a fosforilação constitutiva (pseudofosforilação) dos sítios da PKA na cTnI reduz a sensibilidade dos miofilamentos ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  em corações portadores de CHF causada pela mutação  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$ . A correção da resposta dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , ainda que parcial, resultou em uma melhora na performance do miocárdio e preveniu o desenvolvimento de hipertrofia.

Vários estudos em populações humanas ou em modelos animais demonstram que mutações pontuais em proteínas sarcoméricas estão relacionadas à gênese da CHF. Em diversos estudos, a presença destas mutações determina uma resposta exacerbada do sistema contrátil ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  (Wolska *et al.*, 1999; Michele *et al.*, 1999). Dentre os modelos animais descritos, a expressão da mutação E180G na  $\alpha\text{-Tm}$  de camundongos leva ao desenvolvimento de um fenótipo que simula os achados em humanos, com disfunção cardíaca predominantemente diastólica, hipertrofia, desarranjo miocitário e fibrose intersticial, levando a uma mortalidade precoce elevada (Prabhakar *et al.*, 2001). Recentemente, um estudo demonstrou que a expressão de uma proteína quimera  $\alpha\text{-}/\beta\text{-Tm}$  levou à correção da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  na presença da mutação E180G (Jagatheesan *et al.*, 2007). Em nosso conhecimento, este estudo foi o primeiro a demonstrar que uma manipulação da constituição bioquímica dos filamentos finos pode corrigir a sensibilidade do sistema contrátil ao  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de uma mutação responsável pela CHF.



Nos últimos anos, intensa curiosidade tem sido despertada pelos mecanismos fisiológicos utilizados para a modulação dinâmica da função dos miofilamentos e sua contribuição para as propriedades contráteis do miocárdio (Solaro, 2008). Novas evidências apontam um papel de destaque para cTnI na modulação da sensibilidade do sistema contrátil ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta a diferentes estímulos. Mais precisamente, tem sido demonstrado que a fosforilação de resíduos específicos de serina e treonina na porção N-terminal da cTnI por diferentes proteínas quinases representa um importante mecanismo fisiológico para a modulação das propriedades dinâmicas dos miofilamentos (Solaro *et al.*, 2008).

Neste contexto, sítios preferenciais de fosforilação pela PKA foram identificados na porção N-terminal da cTnI (Ser<sup>23</sup>/Ser<sup>24</sup>). Com o intuito de avaliar o papel destes sítios, abordagens de intervenção molecular *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a fosforilação destes resíduos altera a sensibilidade dos miofilamentos ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ , deslocando a relação força-pCa para a direita. Isto aumenta a taxa de dissociação do  $\text{Ca}^{2+}$  da cTnC e contribui para o aumento da cinética de relaxamento. Além disso, a fosforilação dos resíduos Ser<sup>23</sup>/Ser<sup>24</sup> aumenta a taxa de ativação das pontes transversas e potencializa a velocidade de encurtamento (Sakthivel *et al.*, 2005).

Os efeitos da cTnI na modulação da contratilidade e relaxamento também têm sido estudados através da geração de modelos animais transgênicos expressando diferentes isoformas de cTnI no miocárdio e comprovam a importância da cTnI na resposta ao estímulo adrenérgico. A expressão da isoforma lenta de músculo esquelético (ssTnI) em camundongos adultos reduziu severamente a resposta lusitrópica induzida por estimulação

adrenérgica e aumentou a resistência à hipercapnia (Pena & Wolska, 2004; Urboniene *et al.*, 2005). Esta isoforma é expressa no miocárdio apenas nas fases fetal e pós natal imediata e não apresenta a seqüência de aminoácidos da porção N-terminal que contém a maioria dos sítios de fosforilação da cTnI, incluindo aqueles preferencialmente fosforilados pela PKA. Além deste, outro modelo murino no qual os resíduos de serina dos sítios da PKA foram substituídos por alanina não fosforilável também apresentou resposta limitada ao estímulo adrenérgico (Pi *et al.*, 2002).

Dados preliminares em nosso laboratório demonstram que 80% da cTnI apresenta-se na sua forma fosforilada e 20% na sua forma não fosforilada em camundongos adultos portadores da mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>. Isto sugere que há uma reserva funcional para a modulação da função da cTnI nos animais portadores dessa mutação. Em nosso estudo, utilizamos um modelo transgênico no qual os resíduos Ser<sup>23</sup>/Ser<sup>24</sup> da cTnI foram substituídos por ácido aspártico (cTnI<sup>S23/24D</sup>), simulando um estado de fosforilação constitutiva dos sítios da PKA na cTnI. Neste modelo, a isoforma pseudofosforilada cTnI<sup>S23/24D</sup> substituiu 95% do total da cTnI (Sakthivel *et al.*, 2005). Do cruzamento destes animais com portadores da mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>, obtivemos animais expressando ambas as mutações. A geração de animais portadores de ambas as mutações nos deu a oportunidade de avaliar a hipótese de que se utilizando a reserva funcional disponível para a modulação da cTnI é possível corrigir a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca<sup>2+</sup> na CHF causada pela mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>.

Com a intenção de avaliar as propriedades funcionais dos miofilamentos neste modelo, determinamos a relação força-pCa em fibras cardíacas

permeabilizadas por detergente. Nossos resultados confirmam os resultados publicados anteriormente em outros estudos, nos quais se observou um aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  em animais portadores de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  (Prabhakar *et al.*, 2001), bem como diminuição da sensibilidade a estes íons em animais portadores de  $\text{cTnI}^{\text{S23/24D}}$  (Sakthivel *et al.*, 2005). No presente estudo, demonstramos pela primeira vez que a pseudofosforilação dos sítios da PKA na  $\text{cTnI}$  reduziu a sensibilidade dos miofilamentos portadores de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  ao  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{pCa}_{50}$  das fibras dos animais Tm180/TnI-PP foi intermediário aos valores de  $\text{pCa}_{50}$  em fibras extraídas dos animais Tm180 e NTG, como pode ser observado na Figura 17.

Nossos resultados demonstram também que a redução da resposta dos miofilamentos ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ , ainda que parcial, foi suficiente para retardar a progressão da disfunção do miocárdio portador de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  e prevenir o seu remodelamento. Utilizando ecocardiografia de alta resolução, demonstramos que os animais portadores de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  apresentaram disfunção cardíaca diastólica já na primeira semana de nascimento e na ausência de hipertrofia cardíaca detectável. Estes dados sugerem que a disfunção diastólica observada é decorrente da alteração primária nos miofilamentos causada pela mutação  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  e não decorrente de adaptações secundárias ao processo de remodelamento miocárdico. Estes resultados estão de acordo com um estudo recente em um modelo de CHF causado por mutação da  $\beta\text{-MyHC}^{\text{R403Q}}$  em coelhos, no qual alterações na função miocárdica detectadas ao TDI antecederam o aparecimento de hipertrofia (Nagueh *et al.*, 2000).

A disfunção cardíaca observada nos portadores de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  foi do tipo diastólica, sendo a função sistólica preservada. A disfunção diastólica

observada nos recém natos foi caracterizada pelo relaxamento miocárdico prolongado, mas com pressões de enchimento do VE normais (disfunção diastólica leve). Esta disfunção piorou concomitantemente com o início do remodelamento miocárdico, atingindo padrões compatíveis com pressões elevadas de enchimento ventricular (diminuição da complacência) em animais de quatro semanas de vida. Curiosamente, os animais portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> e cTnI<sup>S23/24D</sup> também apresentaram disfunção diastólica já ao nascer, mas com intensidade menor do que os Tm180, quando avaliada por índices obtidos pelo Doppler pulsado ou tecidual. Em recém natos, o TD da onda E foi superior nos animais Tm180 quando comparado com os Tm180/TnI-PP. O pico de velocidade miocárdica na fase precoce da diástole (Em) foi superior nos animais Tm180/TnI-PP quando comparado aos Tm180 em todas as idades. A relação E/Em, um índice que se correlaciona positivamente com o aumento da elastância ou diminuição da complacência do VE esteve diminuída nos Tm180/TnI-PP em relação aos Tm180 adultos (Nagueh *et al.*, 2009). Estes resultados demonstram uma melhor cinética de relaxamento e sugerem uma complacência menos alterada nos animais Tm180/TnI-PP.

A causa da progressão da disfunção diastólica e diminuição da complacência do VE nos animais portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> provavelmente relaciona-se com o desenvolvimento de hipertrofia celular e alterações da MEC (Prabhakar *et al.*, 2001). O prejuízo na função cardíaca, observado pela ecocardiografia com Doppler, foi confirmado pela avaliação invasiva com catéter de condutância em animais de quatorze semanas de idade. Esta técnica demonstrou um aumento na RPVDF nos animais Tm180, um índice independente de carga que se correlaciona com o aumento da rigidez

(elastância) ou diminuição da complacência do VE (Burkhoff *et al.*, 2005). Esta idéia foi reforçada pela avaliação histológica, a qual confirmou a presença de hipertrofia e desarranjo miocitários, bem como um importante aumento da deposição de colágeno intersticial nos portadores de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup>. Por outro lado, os animais Tm180/Tnl-PP apresentaram um RPVDF menor quando comparados aos Tm180, indicando uma complacência melhor, o que foi compatível com a menor deposição de colágeno intersticial neste grupo em relação aos Tm180 (Burkhoff *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1999).

Além da progressão na disfunção diastólica, após o início do remodelamento, o miocárdio portador dos animais Tm180 apresentou também déficit de contratilidade, o qual foi detectado pela avaliação não invasiva com TDI após quatro semanas de vida e confirmado por catéter de condutância em animais com quatorze semanas. Este prejuízo contrátil deve ser interpretado como um defeito inerente do miocárdio portador de  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> e provavelmente não é decorrente de variações hemodinâmicas na pré ou pós-carga ao VE, já que foi confirmado pela diminuição do TSPR, um índice de contratilidade independente de carga (Shioura *et al.*, 2007; Burkhoff *et al.*, 2005).

Provavelmente, parte do déficit contrátil observado no grupo Tm180 pode ser devido à desorganização no direcionamento das fibras cardíacas (desarranjo miocitário), causado pelo remodelamento da MEC, levando a uma incoordenação na produção de força pelo miocárdio doente (Spinale, 2007; Fedak *et al.*, 2005b). Porém, não descartamos a possibilidade de outras alterações intracelulares secundárias ao remodelamento, levando à diminuição da contratilidade. Entretanto, esta diminuição do inotropismo não pode ser explicada por alterações na função dos miofilamentos, já que a sensibilidade

destes ao  $\text{Ca}^{2+}$  esteve aumentada nos animais portadores da mutação  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$ . Em outras palavras, a produção de força em fibras permeabilizadas por detergente portadoras de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$  foi maior do que a força produzida pelas fibras de animais dos outros grupos em concentrações fisiológicas (submáximas) de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, a redução da resposta dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a prevenção do remodelamento cardíaco nos animais Tm180/TnI-PP correlacionaram-se com a manutenção da contratilidade a longo prazo, sugerindo que o defeito contrátil nos animais Tm180 é secundário a outras adaptações decorrentes do processo de remodelamento celular devido à disfunção diastólica primária.

Dentre as possíveis alterações secundárias na fisiologia dos cardiomiócitos portadores da mutação  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$ , uma resposta inadequada ao estímulo adrenérgico poderia somar-se para uma função cardíaca prejudicada (Seidler *et al.*, 2007; McNamara, 2008). Esta resposta inadequada poderia estar relacionada a uma regulação negativa dos receptores beta-adrenérgicos ou pela diminuição da expressão total de proteínas envolvidas no processo de sinalização intracelular abaixo dos receptores adrenérgicos, incluindo proteínas envolvidas no AEC e na homeostase do íon  $\text{Ca}^{2+}$  (Azuma & Nonen, 2009). Embora não tenhamos investigado profundamente estes mecanismos, confirmamos que a resposta do miocárdio ao estímulo adrenérgico em preparações de Langendorff foi reduzida em animais Tm180 de seis semanas de idade, sugerindo um defeito intrínseco do miocárdio portador de  $\alpha\text{-Tm}^{\text{E180G}}$ . A expressão de SERCA2a e PLB não esteve significativamente alterada entre os quatro grupos de animais com 6 semanas de idade, tornando menos

provável que estas proteínas sejam as responsáveis por um inotropismo diminuído, o que leva à necessidade de uma investigação mais aprofundada.

Em resumo, nossos dados demonstram que a presença da mutação  $\alpha$ -Tm<sup>E180G</sup> leva a uma disfunção diastólica inicial caracterizada pelo relaxamento prolongado, esta injúria inicial é o gatilho que dispara o processo de remodelamento celular e da MEC, levando à hipertrofia, fibrose intersticial e desarranjo miocitário. Este remodelamento adaptativo inicial torna-se patológico, levando à piora da função diastólica pela diminuição da complacência ventricular e prejuízo secundário na contratilidade. O fenótipo final apresenta ventrículo esquerdo com intensa hipertrofia concêntrica, átrios e ventrículo direito dilatados, sendo essas alterações morfológicas produto da hemodinâmica cardíaca alterada, com pressões elevadas de enchimento das câmaras esquerdas. Este processo parece ser interrompido pela correção da resposta dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  obtida através da modulação da função da cTnI através da pseudofosforilação dos seus resíduos Ser<sup>23</sup>/Ser<sup>24</sup> (sítios preferenciais da PKA).

Acreditamos que o presente trabalho adiciona informações importantes sobre a fisiopatologia da CHF, confirmando a hipótese que uma resposta aumentada dos miofilamentos ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  tem uma participação fundamental na gênese da doença. De fato, como discutido anteriormente, diversos estudos têm demonstrado que a resposta dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  varia nos diferentes modelos de acordo com a mutação implicada. Ainda, mutações em diferentes posições de uma mesma proteína sarcomérica levam a alteração de magnitude variável na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, apesar da existência de outros fatores envolvidos na modulação da severidade da doença, como por

exemplo genes reguladores ou fatores ambientais, a variabilidade na sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  nas diferentes mutações relacionadas à CHF pode ser, em parte, a razão da grande diferença observada na expressão do fenótipo.

Apesar da variabilidade na resposta dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  nas diferentes mutações, esse fenômeno é observado na grande maioria dos casos, sendo um mecanismo que unifica a fisiopatologia da doença. Sendo assim, a correção da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  significaria uma proposta terapêutica abrangente e específica para a maioria dos pacientes com CHF. Neste sentido, nosso estudo contribui também por demonstrar a existência de uma via fisiológica capaz de ser potencializada para a reversão da doença.

Além disso, nossos resultados sugerem que qualquer estratégia de tratamento visando a modulação da função da cTnI com intuito de prevenir a expressão do fenótipo da CHF deveria ser iniciada precocemente, antes do início do remodelamento cardíaco causado pela doença. Isto nos leva à necessidade de estratégias de diagnóstico precoce para o reconhecimento dos portadores e a determinação do momento para o início do tratamento. Em nosso caso, a avaliação da função cardíaca pelo TDI foi capaz de demonstrar alterações funcionais em fases precoces da doença, na ausência de hipertrofia detectável, sendo que este método pode vir a ser importante na triagem de familiares de pacientes com diagnóstico de CHF.

Mais estudos são necessários para o esclarecimento dos mecanismos de sinalização intracelular envolvidos com o aumento da sensibilidade miofilamentar ao  $\text{Ca}^{2+}$  na CHF. A determinação das vias que conectam o



aumento na resposta dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  a uma reprogramação celular direcionada para a hipertrofia é um objetivo importante a ser alcançado. Para isso, acreditamos que o presente trabalho estabelece também um modelo para futuros estudos dirigidos para a elucidação do papel das diferentes proteínas quinases e fatores de transcrição gênica no desencadeamento da resposta hipertrófica e disfunção cardíaca na CHF.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1989). Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. *N Engl J Med* **321**, 406-412.
- Ahmad F, Seidman JG, & Seidman CE (2005). The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**, 185-216.
- Aplin M, Bonde MM, & Hansen JL (2009). Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 15-24.
- Arad M, Moskowitz IP, Patel VV, Ahmad F, Perez-Atayde AR, Sawyer DB, Walter M, Li GH, Burgon PG, Maguire CT, Stapleton D, Schmitt JP, Guo XX, Pizard A, Kupersmidt S, Roden DM, Berul CI, Seidman CE, & Seidman JG (2003). Transgenic mice overexpressing mutant PRKAG2 define the cause of Wolff-Parkinson-White syndrome in glycogen storage cardiomyopathy. *Circulation* **107**, 2850-2856.
- Arteaga GM, Palmiter KA, Leiden JM, & Solaro RJ (2000). Attenuation of length dependence of calcium activation in myofilaments of transgenic mouse hearts expressing slow skeletal troponin I. *J Physiol* **526 Pt 3**, 541-549.
- Arteaga GM, Warren CM, Milutinovic S, Martin AF, & Solaro RJ (2005). Specific enhancement of sarcomeric response to Ca<sup>2+</sup> protects murine myocardium against ischemia-reperfusion dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H2183-H2192.
- Au Y (2004). The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell Mol Life Sci* **61**, 3016-3033.
- Azuma J & Nonen S (2009). Chronic heart failure: beta-blockers and pharmacogenetics. *Eur J Clin Pharmacol* **65**, 3-17.
- Becker KD, Gottshall KR, Hickey R, Perriard JC, & Chien KR (1997). Point mutations in human beta cardiac myosin heavy chain have differential effects on sarcomeric structure and assembly: an ATP binding site change disrupts both thick and thin filaments, whereas hypertrophic cardiomyopathy mutations display normal assembly. *J Cell Biol* **137**, 131-140.

- Burkhoff D, Mirsky I, & Suga H (2005). Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H501-H512.
- Carling D (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* **29**, 18-24.
- Cingolani HE, Perez NG, Aiello EA, Ennis IL, Garcarena CD, Villa-Abrille MC, Dulce RA, Caldiz CI, Yeves AM, Correa MV, Nolly MB, & Chiappe de CG (2008). Early signals after stretch leading to cardiac hypertrophy. Key role of NHE-1. *Front Biosci* **13**, 7096-7114.
- Colombo MG, Botto N, Vittorini S, Paradossi U, & Andreassi MG (2008). Clinical utility of genetic tests for inherited hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Cardiovasc Ultrasound* **6**, 62.
- Desai A & Fang JC (2008). Heart failure with preserved ejection fraction: hypertension, diabetes, obesity/sleep apnea, and hypertrophic and infiltrative cardiomyopathy. *Heart Fail Clin* **4**, 87-97.
- Dias FA, Walker LA, Arteaga GM, Walker JS, Vijay an K, Pena JR, Key Y, Fogaca RT, Sanbe A, Robbins J, & Wolska BM (2006). The effect of myosin regulatory light chain phosphorylation on the frequency-dependent regulation of cardiac function. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 330-339.
- Endoh M (2008). Cardiac Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> sensitizers. *Circ J* **72**, 1915-1925.
- Fabiato A (1982). Calcium release in skinned cardiac cells: variations with species, tissues, and development. *Fed Proc* **41**, 2238-2244.
- Fabiato A & Fabiato F (1979). Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* **41**, 473-484.
- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, & Li RK (2005a). Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol* **14**, 49-60.
- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, & Li RK (2005b). Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol* **14**, 1-11.

- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Skrtic M, & Li RK (2005c). Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). *Cardiovasc Pathol* **14**, 109-119.
- Fifer MA & Vlahakes GJ (2008). Management of symptoms in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **117**, 429-439.
- Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, & Watkins H (2004). Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res* **94**, 1279-1289.
- Flashman E, Watkins H, & Redwood C (2007). Localization of the binding site of the C-terminal domain of cardiac myosin-binding protein-C on the myosin rod. *Biochem J* **401**, 97-102.
- Forsyth S & Vary TC (2008). Partial dissociation of TSC2 and mTOR phosphorylation in cardiac and skeletal muscle of rats in vivo. *Mol Cell Biochem* **319**, 141-151.
- Franz WM, Muller OJ, & Katus HA (2001). Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet* **358**, 1627-1637.
- Fukuda N & Granzier HL (2005). Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the heart. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 319-323.
- Fukuda N, Granzier HL, Ishiwata S, & Kurihara S (2008). Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J Physiol Sci* **58**, 151-159.
- Fukuda N, Sasaki D, Ishiwata S, & Kurihara S (2001). Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation* **104**, 1639-1645.
- Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, van d, V, Furst DO, Vornwald A, von HE, Nurnberg P, Scheffold T, Dietz R, & Osterziel KJ (2003). Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **107**, 1390-1395.
- Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, & Seidman JG (1996). A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* **272**, 731-734.

- Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, & Seidman JG (1990). A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* **62**, 999-1006.
- Germans T & van Rossum AC (2008). The use of cardiac magnetic resonance imaging to determine the aetiology of left ventricular disease and cardiomyopathy. *Heart* **94**, 510-518.
- Hanft LM, Korte FS, & McDonald KS (2008). Cardiac function and modulation of sarcomeric function by length. *Cardiovasc Res* **77**, 627-636.
- Hannigan GE, Coles JG, & Dedhar S (2007). Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. *Circ Res* **100**, 1408-1414.
- Hardie DG (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117**, 5479-5487.
- He H, Javadpour MM, Latif F, Tardiff JC, & Ingwall JS (2007). R-92L and R-92W mutations in cardiac troponin T lead to distinct energetic phenotypes in intact mouse hearts. *Biophys J* **93**, 1834-1844.
- Ho CY & Seidman CE (2006). A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **113**, e858-e862.
- Huxley HE (2004). Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur J Biochem* **271**, 1403-1415.
- Ikeda Y, Hoshijima M, & Chien KR (2008). Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. *Physiology (Bethesda)* **23**, 6-16.
- Jagatheesan G, Rajan S, Petrashevskaya N, Schwartz A, Boivin G, Arteaga GM, Solaro RJ, Liggett SB, & Wiecek DF (2007). Rescue of tropomyosin-induced familial hypertrophic cardiomyopathy mice by transgenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H949-H958.
- Karoor V, Vatner SF, Takagi G, Yang G, Thaisz J, Sadoshima J, & Vatner DE (2004). Propranolol prevents enhanced stress signaling in Gs alpha cardiomyopathy: potential mechanism for beta-blockade in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **36**, 305-312.

- Kato S, Spinale FG, Tanaka R, Johnson W, Cooper G, & Zile MR (1995). Inhibition of collagen cross-linking: effects on fibrillar collagen and ventricular diastolic function. *Am J Physiol* **269**, H863-H868.
- Knight C, Kurbaan AS, Seggewiss H, Henein M, Gunning M, Harrington D, Fassbender D, Gleichmann U, & Sigwart U (1997). Nonsurgical septal reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy: outcome in the first series of patients. *Circulation* **95**, 2075-2081.
- Kobayashi T, Jin L, & de Tombe PP (2008). Cardiac thin filament regulation. *Pflugers Arch* **457**, 37-46.
- Kobayashi T & Solaro RJ (2005). Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu Rev Physiol* **67**, 39-67.
- Konhilas JP, Irving TC, Wolska BM, Jweied EE, Martin AF, Solaro RJ, & de Tombe PP (2003). Troponin I in the murine myocardium: influence on length-dependent activation and interfilament spacing. *J Physiol* **547**, 951-961.
- Kusumoto F (2008). A comprehensive approach to management of ventricular arrhythmias. *Cardiol Clin* **26**, 481-96, vii.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John SM, & Stewart W (2006). Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* **7**, 79-108.
- Lehman W & Craig R (2008). Tropomyosin and the steric mechanism of muscle regulation. *Adv Exp Med Biol* **644**, 95-109.
- Lehman W, Galinska-Rakoczy A, Hatch V, Tobacman LS, & Craig R (2009). Structural Basis for the Activation of Muscle Contraction by Troponin and Tropomyosin. *J Mol Biol*.
- Li HL, Yin R, Chen D, Liu D, Wang D, Yang Q, & Dong YG (2007). Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem* **100**, 1086-1099.
- Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Ruegg JC, & Labeit S (1996). Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol* **261**, 62-71.

- Lofrano-Alves MS, Oliveira EL, Damiani CE, Kassouf-Silva I, & Fogaca RT (2005). Eugenol-induced contractions of saponin-skinned fibers are inhibited by heparin or by a ryanodine receptor blocker. *Can J Physiol Pharmacol* **83**, 1093-1100.
- Lu H, Fedak PW, Dai X, Du C, Zhou YQ, Henkelman M, Mongroo PS, Lau A, Yamabi H, Hinek A, Husain M, Hannigan G, & Coles JG (2006). Integrin-linked kinase expression is elevated in human cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* **114**, 2271-2279.
- MacLennan DH & Kranias EG (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 566-577.
- Marian AJ (2002). Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* **17**, 242-252.
- Marian AJ & Roberts R (2001). The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 655-670.
- Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, & Bild DE (1995). Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* **92**, 785-789.
- Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, & Mueller FO (1996). Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *JAMA* **276**, 199-204.
- Maughan DW (2005). Kinetics and energetics of the crossbridge cycle. *Heart Fail Rev* **10**, 175-185.
- McKenna WJ & Behr ER (2002). Hypertrophic cardiomyopathy: management, risk stratification, and prevention of sudden death. *Heart* **87**, 169-176.
- McNamara DM (2008). Pharmacogenomics for neurohormonal intervention in heart failure. *Cardiol Clin* **26**, 127-35, viii.
- Michele DE, Albayya FP, & Metzger JM (1999). Direct, convergent hypersensitivity of calcium-activated force generation produced by hypertrophic cardiomyopathy mutant alpha-tropomyosins in adult cardiac myocytes. *Nat Med* **5**, 1413-1417.

- Morimoto S (2008). Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* **77**, 659-666.
- Morimoto S, Yanaga F, Minakami R, & Ohtsuki I (1998). Ca<sup>2+</sup>-sensitizing effects of the mutations at Ile-79 and Arg-92 of troponin T in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol* **275**, C200-C207.
- Moss RL & Fitzsimons DP (2006). Myosin light chain 2 into the mainstream of cardiac development and contractility. *Circ Res* **99**, 225-227.
- Murphy RT, Mogensen J, McGarry K, Bahl A, Evans A, Osman E, Syrris P, Gorman G, Farrell M, Holton JL, Hanna MG, Hughes S, Elliott PM, Macrae CA, & McKenna WJ (2005). Adenosine monophosphate-activated protein kinase disease mimicks hypertrophic cardiomyopathy and Wolff-Parkinson-White syndrome: natural history. *J Am Coll Cardiol* **45**, 922-930.
- Muthuchamy M, Pieples K, Rethinasamy P, Hoit B, Grupp IL, Boivin GP, Wolska B, Evans C, Solaro RJ, & Wieczorek DF (1999). Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in alpha-tropomyosin manifests cardiac dysfunction. *Circ Res* **85**, 47-56.
- Myslivecek J & Trojan S (2000). Mechanisms of G-protein coupled receptor regulation. *Sb Lek* **101**, 205-213.
- Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, Waggoner AD, Flachskampf FA, Pellikka PA, & Evangelisa A (2009). Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr* **10**, 165-193.
- Nagueh SF, Kopelen HA, Lim DS, Zoghbi WA, Quinones MA, Roberts R, & Marian AJ (2000). Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **102**, 1346-1350.
- Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, & Seidman CE (1998). Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **338**, 1248-1257.
- Ommen SR, Shah PM, & Tajik AJ (2008). Left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: past, present and future. *Heart* **94**, 1276-1281.



- Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JC, & Mochly-Rosen D (2009). Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovasc Res*.
- Patel R, Lim DS, Reddy D, Nagueh SF, Lutucuta S, Sole MJ, Zoghbi WA, Quinones MA, Roberts R, & Marian AJ (2000). Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 2369-2377.
- Pena JR & Wolska BM (2004). Troponin I phosphorylation plays an important role in the relaxant effect of beta-adrenergic stimulation in mouse hearts. *Cardiovasc Res* **61**, 756-763.
- Pi Y, Kemnitz KR, Zhang D, Kranias EG, & Walker JW (2002). Phosphorylation of troponin I controls cardiac twitch dynamics: evidence from phosphorylation site mutants expressed on a troponin I-null background in mice. *Circ Res* **90**, 649-656.
- Piccini JP, Berger JS, & O'Connor CM (2009). Amiodarone for the prevention of sudden cardiac death: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur Heart J*.
- Pleger ST, Boucher M, Most P, & Koch WJ (2007). Targeting myocardial beta-adrenergic receptor signaling and calcium cycling for heart failure gene therapy. *J Card Fail* **13**, 401-414.
- Prabhakar R, Boivin GP, Grupp IL, Hoit B, Arteaga G, Solaro JR, & Wieczorek DF (2001). A familial hypertrophic cardiomyopathy alpha-tropomyosin mutation causes severe cardiac hypertrophy and death in mice. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1815-1828.
- Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm AJ, Cappato R, Cobbe SM, Di MC, Maron BJ, McKenna WJ, Pedersen AK, Ravens U, Schwartz PJ, Trusz-Gluza M, Vardas P, Wellens HJ, & Zipes DP (2001). Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **22**, 1374-1450.
- Rajan S, Ahmed RP, Jagatheesan G, Petrashevskaya N, Boivin GP, Urboniene D, Arteaga GM, Wolska BM, Solaro RJ, Liggett SB, & Wieczorek DF (2007). Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circ Res* **101**, 205-214.
- Ramaraj R (2008). Hypertrophic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Cardiol Rev* **16**, 172-180.

- Ruegg JC (1990). Towards a molecular understanding of contractility. *Cardioscience* **1**, 163-168.
- Rust EM, Albayya FP, & Metzger JM (1999). Identification of a contractile deficit in adult cardiac myocytes expressing hypertrophic cardiomyopathy-associated mutant troponin T proteins. *J Clin Invest* **103**, 1459-1467.
- Sakthivel S, Finley NL, Rosevear PR, Lorenz JN, Gulick J, Kim S, VanBuren P, Martin LA, & Robbins J (2005). In vivo and in vitro analysis of cardiac troponin I phosphorylation. *J Biol Chem* **280**, 703-714.
- Seidler T, Hasenfuss G, & Maier LS (2007). Targeting altered calcium physiology in the heart: translational approaches to excitation, contraction, and transcription. *Physiology (Bethesda)* **22**, 328-334.
- Shiels HA & White E (2008). The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *J Exp Biol* **211**, 2005-2013.
- Shioura KM, Geenen DL, & Goldspink PH (2007). Assessment of cardiac function with the pressure-volume conductance system following myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H2870-H2877.
- Shull GE, Okunade G, Liu LH, Kozel P, Periasamy M, Lorenz JN, & Prasad V (2003). Physiological functions of plasma membrane and intracellular Ca<sup>2+</sup> pumps revealed by analysis of null mutants. *Ann N Y Acad Sci* **986**, 453-460.
- Smolders W, Rademakers F, Conraads V, & Snoeck J (1993). Apical hypertrophic cardiomyopathy. *Acta Cardiol* **48**, 369-383.
- Solaro RJ (2008). Multiplex kinase signaling modifies cardiac function at the level of sarcomeric proteins. *J Biol Chem* **283**, 26829-26833.
- Solaro RJ, Rosevear P, & Kobayashi T (2008). The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 82-87.
- Spinale FG (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* **87**, 1285-1342.

- Spinale FG, Zellner JL, Johnson WS, Eble DM, & Munyer PD (1996). Cellular and extracellular remodeling with the development and recovery from tachycardia-induced cardiomyopathy: changes in fibrillar collagen, myocyte adhesion capacity and proteoglycans. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1591-1608.
- Steel KE & Kwong RY (2008). Application of cardiac magnetic resonance imaging in cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep* **5**, 128-135.
- Sweeney HL, Straceski AJ, Leinwand LA, Tikunov BA, & Faust L (1994). Heterologous expression of a cardiomyopathic myosin that is defective in its actin interaction. *J Biol Chem* **269**, 1603-1605.
- Tardiff JC, Hewett TE, Palmer BM, Olsson C, Factor SM, Moore RL, Robbins J, & Leinwand LA (1999). Cardiac troponin T mutations result in allele-specific phenotypes in a mouse model for hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **104**, 469-481.
- Taylor MR, Carniel E, & Mestroni L (2004). Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing. *Expert Rev Mol Diagn* **4**, 99-113.
- Taylor RW, Giordano C, Davidson MM, d'Amati G, Bain H, Hayes CM, Leonard H, Barron MJ, Casali C, Santorelli FM, Hirano M, Lightowers RN, DiMauro S, & Turnbull DM (2003). A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **41**, 1786-1796.
- Teske AJ, De Boeck BW, Melman PG, Sieswerda GT, Doevendans PA, & Cramer MJ (2007). Echocardiographic quantification of myocardial function using tissue deformation imaging, a guide to image acquisition and analysis using tissue Doppler and speckle tracking. *Cardiovasc Ultrasound* **5**, 27.
- Tesson F, Richard P, Charron P, Mathieu B, Cruaud C, Carrier L, Dubourg O, Lautie N, Desnos M, Millaire A, Isnard R, Hagege AA, Bouhour JB, Bennaceur M, Hainque B, Guicheney P, Schwartz K, & Komajda M (1998). Genotype-phenotype analysis in four families with mutations in beta-myosin heavy chain gene responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* **12**, 385-392.
- Urboniene D, Dias FA, Pena JR, Walker LA, Solaro RJ, & Wolska BM (2005). Expression of slow skeletal troponin I in adult mouse heart helps to maintain the left ventricular systolic function during respiratory hypercapnia. *Circ Res* **97**, 70-77.

- Uyama E (2008). [Fabry disease in light of recent review]. *Brain Nerve* **60**, 1235-1244.
- van d, V, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G, & Stienen GJ (2003a). Myosin light chain composition in non-failing donor and end-stage failing human ventricular myocardium. *Adv Exp Med Biol* **538**, 3-15.
- van d, V, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G, & Stienen GJ (2003b). The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca<sup>2+</sup> -sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc Res* **57**, 505-514.
- Wang XH, Tong M, Dou D, Usha JR, & Gao YS (2005). [Role of cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* **36**, 299-303.
- Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG, & . (1995). Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **332**, 1058-1064.
- Wigle ED (1995). Novel insights into the clinical manifestations and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* **10**, 299-305.
- Wigle ED (2001). Cardiomyopathy: The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* **86**, 709-714.
- Wigle ED, Rakowski H, Kimball BP, & Williams WG (1995). Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical spectrum and treatment. *Circulation* **92**, 1680-1692.
- Williams L & Frenneaux M (2007). Syncope in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and consequences for treatment. *Europace* **9**, 817-822.
- Winegrad S (1999). Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res* **84**, 1117-1126.
- Winegrad S (2005). Cardiac myosin binding protein C: modulator of contractility. *Adv Exp Med Biol* **565**, 269-281.
- Wolska BM, Keller RS, Evans CC, Palmiter KA, Phillips RM, Muthuchamy M, Oehlenschlaeger J, Wieczorek DF, de Tombe PP, & Solaro RJ (1999).

- Correlation between myofilament response to Ca<sup>2+</sup> and altered dynamics of contraction and relaxation in transgenic cardiac cells that express beta-tropomyosin. *Circ Res* **84**, 745-751.
- Wolska BM & Wieczorek DM (2003). The role of tropomyosin in the regulation of myocardial contraction and relaxation. *Pflugers Arch* **446**, 1-8.
- Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M, & Lakatta EG (1999). Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res* **85**, 1092-1100.
- Yamazaki T & Yazaki Y (2000). Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z Kardiol* **89**, 1-6.
- Yang B, Larson DF, & Watson R (1999). Age-related left ventricular function in the mouse: analysis based on in vivo pressure-volume relationships. *Am J Physiol* **277**, H1906-H1913.
- Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, Gregoratos G, Klein G, Moss AJ, Myerburg RJ, Priori SG, Quinones MA, Roden DM, Silka MJ, Tracy C, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Antman EM, Anderson JL, Hunt SA, Halperin JL, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, & Zamorano JL (2006). ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *J Am Coll Cardiol* **48**, e247-e346.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Molecular and Cellular Cardiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yjmcc](http://www.elsevier.com/locate/yjmcc)

## Review article

Rescue of familial cardiomyopathies by modifications at the level of sarcomere and Ca<sup>2+</sup> fluxes

Marco L. Alves, Robert D. Gaffin, Beata M. Wolska\*

Department of Medicine, Section of Cardiology, Department of Physiology and Biophysics, Center for Cardiovascular Research, University of Illinois at Chicago, 840 S. Wood St. Rm.1112 (M/C 715), IL 60612, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 November 2009

Received in revised form 30 December 2009

Accepted 6 January 2010

Available online xxxxx

## Keywords:

Hypertrophic cardiomyopathy

Dilated cardiomyopathy

Myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivityCa<sup>2+</sup> homeostasis

SERCA2a

Phospholamban

## ABSTRACT

Cardiomyopathies are a heterogeneous group of diseases of the myocardium associated with mechanical and/or electrical dysfunction that frequently show inappropriate ventricular hypertrophy or dilation. Current data suggest that numerous mutations in several genes can cause cardiomyopathies, and the severity of their phenotypes is also influenced by modifier genes. Two major types of inherited cardiomyopathies include familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) and dilated cardiomyopathy (DCM). FHC typically involves increased myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity associated with diastolic dysfunction, whereas DCM often results in decreased myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and systolic dysfunction. Besides alterations in myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity, alterations in the levels of Ca<sup>2+</sup>-handling proteins have also been described in both diseases. Recent work in animal models has attempted to rescue FHC and DCM via modifications at the myofilament level, altering Ca<sup>2+</sup> homeostasis by targeting Ca<sup>2+</sup>-handling proteins, such as the sarcoplasmic reticulum ATPase and phospholamban, or by interfering with the products of different modifiers genes. Although attempts to rescue cardiomyopathies in animal models have shown great promise, further studies are needed to validate these strategies in order to provide more effective and specific treatments.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Contents

1.	Introduction . . . . .	0
2.	Hypertrophic cardiomyopathy . . . . .	0
3.	Dilated cardiomyopathy . . . . .	0
4.	Genetic and molecular pathogenesis. . . . .	0
4.1.	Thick filament mutations . . . . .	0
4.2.	Thin filament mutations . . . . .	0
5.	Experimental strategies to rescue cardiomyopathies . . . . .	0
5.1.	Targeting the myofilaments . . . . .	0
5.2.	Myofilaments versus calcium-handling proteins . . . . .	0
5.3.	Targeting the sarcoplasmic reticulum proteins (SERCA2a and PLB) . . . . .	0
5.4.	Targeting modifier genes. . . . .	0
5.5.	Conclusions . . . . .	0
	Acknowledgments. . . . .	0
	References . . . . .	0

**Abbreviations:** SR, sarcoplasmic reticulum; RyR, ryanodine receptor; SERCA, sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase; ATP, adenosine triphosphate; PLB, phospholamban; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; FHC, familial hypertrophic cardiomyopathy; DCM, dilated cardiomyopathy; MYH7 or  $\beta$ MyHC, beta-myosin heavy chain; TNNT2 or cTnT, cardiac troponin T; TNNI or cTnI, cardiac troponin I; TNNC1 or cTnC, cardiac troponin C; MYBPC3 or MyBPC, myosin binding protein C; TPM1 or  $\alpha$ -Tm, alpha-tropomyosin; MYL2 or RLC, regulatory myosin light chain; MYL3 or ELC, essential myosin light chain; ACTC1 or  $\alpha$ -actin, alpha-actin; TTN, titin; LV, left ventricle; ACE, angiotensin converting enzyme; AR, angiotensin II receptor; TG, transgenic; NMR, nuclear magnetic resonance; PCr, phosphocreatine; Pi, inorganic phosphate; HF, heart failure; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PKD, protein kinase D; PLBKO, phospholamban knockout; RAAS, renin-angiotensin aldosterone system; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A; Tm180, Tm E180G; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; LIM, specific zinc-binding protein domain; G $\alpha$ q, subunit G $\alpha$ q, from the heterotrimeric Gq protein.

\* Corresponding author.

E-mail address: [bwolska@uic.edu](mailto:bwolska@uic.edu) (B.M. Wolska).

0022-2828/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.yjmcc.2010.01.003

Please cite this article as: Alves ML, et al, Rescue of familial cardiomyopathies by modifications at the level of sarcomere and Ca<sup>2+</sup> fluxes, J Mol Cell Cardiol (2010), doi:10.1016/j.yjmcc.2010.01.003



## 1. Introduction

The term “cardiomyopathy” was first used in 1957 and since then the knowledge about this group of complex cardiac diseases has increased substantially. Concomitant with this increasing knowledge has been changes in the classification of cardiomyopathies. Currently, the American Heart Association has adopted the following definition proposed in 2006: “Cardiomyopathies are a heterogeneous group of diseases of the myocardium associated with mechanical and/or electrical dysfunction that usually (but not invariably) exhibit inappropriate ventricular hypertrophy or dilatation and are due to a variety of causes that frequently are genetic. Cardiomyopathies either are confined to the heart or are part of generalized systemic disorders, often leading to cardiovascular death or progressive heart failure-related disability” [1].

Cardiomyopathies can be divided into two groups: (1) primary and (2) secondary. Primary cardiomyopathies describe diseases in which the heart is the sole or predominant organ involved, while secondary cardiomyopathies describe those in which cardiac function is impaired due to systemic disorders [2]. Primary cardiomyopathies can be subdivided into three groups: (a) genetic cardiomyopathies: familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC), arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia, left ventricular noncompaction, glycogen storage cardiomyopathies, conduction system disease cardiomyopathies, mitochondrial cardiomyopathies and ion channel-related cardiomyopathies; (b) mixed (genetic and nongenetic): dilated cardiomyopathy (DCM) and restrictive cardiomyopathy; and (c) acquired: inflammatory, stress-provoked, peripartum, tachycardia-induced and infants of insulin-dependent diabetic mothers [1].

Recent work has done much to identify the genes involved in cardiomyopathies. However, the molecular steps which connect gene defects to clinical phenotypes are still unknown. Genetic and molecular biology studies have provided new insights into the pathophysiology of the cardiomyopathies and are now beginning to have an impact in guiding preventive and therapeutic strategies for these diseases. The current article focuses mainly on genetic cardiomyopathies linked to sarcomeric proteins. We review the recent advances in experimental pharmacological and molecular strategies for treatment of cardiomyopathies with emphasis on interventions affecting calcium handling and sarcomeric proteins.

## 2. Hypertrophic cardiomyopathy

Hypertrophic cardiomyopathy is characterized by unexplained left ventricle hypertrophy, having an overall prevalence of 200 per 100,000 individuals [2]. The genetic form of the disease, referred to as familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC), is inherited as an autosomal trait and has been linked to mutations in sarcomeric protein genes in the vast majority of cases, although phenocopies have been observed in metabolic, mitochondrial and neuromuscular cardiomyopathies [1]. To date, over 400 FHC-causing mutations (see Table 1) in different components of the sarcomere have been reported reflecting its marked genetic heterogeneity [3]. Sarcomere-linked mutations account for up to 65% of all diagnosed cases of FHC [4]. The main genes affected are *MYH7* (beta-myosin heavy chain or  $\beta$ -MyHC), *MYBPC3* (myosin binding protein C or MyBPC), *TNNT2* (cardiac troponin T or cTnT), *TNNI3* (cardiac troponin I or cTnI), *TPM1* (alpha-tropomyosin or  $\alpha$ -Tm), *MYL2* (regulatory myosin light chain or RLC), *MYL3* (essential myosin light chain or ELC), *TNNC1* (cardiac troponin C or cTnC), *ACTC1* (alpha-cardiac actin or  $\alpha$ -actin) and *TTN* (titin) (see Table 1).

FHC is largely identified by the presence of unexplained left ventricle (LV) hypertrophy together with other echocardiographic and histopathological features such as LV outflow tract obstruction, diastolic dysfunction with preserved ejection fraction and increased interstitial fibrosis with myocyte hypertrophy/disarray [5]. The

**Table 1**

Disease genes for FHC and DCM.

Gene	Chromosome location	Number of described mutations	
		FHC	DCM
<b>Thick filament</b>			
<i>MYH7</i> ( $\beta$ -myosin heavy chain)	14q12	190 [165]	13
<i>MYH6</i> ( $\alpha$ -myosin heavy chain)	14q12	2	3
<i>MYL3</i> (regulatory light chain)	3p21.3-p21.2	4	–
<i>MYL2</i> (essential light chain)	12q23-q24.3	10	–
<b>Thin filament</b>			
<i>TNNT2</i> (cardiac TnT)	1q32	29	7
<i>TNNI3</i> (cardiac TnI)	19q13.4	27	6
<i>TNNC1</i> (cardiac TnC)	3p21.3-p14.3	5 [166]	1
<i>TPM1</i> ( $\alpha$ -tropomyosin)	15q22.1	11	2
<i>ACTC1</i> ( $\alpha$ -actin)	15q11-q14	7	2
<b>Sarcomere-associated and Z-disc proteins</b>			
<i>MYBPC3</i> (cardiac MyBPC)	11p11.2	155	3
<i>TTN</i> (Titin)	2q31	2	7
<i>TCAP</i> (T-cap)	17q12	2	1
<i>CSRP3</i> (cardiac LIM protein)	11p15.1	7	2
<i>ACTN2</i> ( $\alpha$ -actinin)	1q42-q43	–	1
<i>OBSCN</i> (obscurin)	1q42.13	2 [167]	–
<i>LDB3</i> (cypher)	10q22.3-q23.2	–	2
<i>DES</i> (desmin)	2q35	1	1
<i>DSP</i> (desmoplakin)	6p24	–	3
<i>MYPN</i> (myopalladin)	10q21.3	–	4 [168]
<i>ANKRD1</i> (ankyrin repeat domain)	10q23.33	3 [169]	5 [170]
<i>MYOZ2</i> (myozenin-2)	4q26-q27	2 [171]	–
<b>Cytoskeleton/sarcolemma</b>			
<i>CAV3</i> (caveolin-3)	3p25	1	–
<i>MVCL</i> (metavinculin)	10q22.1-q23	–	2
<i>DMD</i> (dystrophin)	Xp21.2	–	17
<i>SGCD</i> (Sarcoglycan delta)	5q33-q34	–	1
<b>Others</b>			
<i>COX15</i> (cytochrome c oxidase)	10q24	2	–
<i>LMNA</i> (lamin A/C)	1q21.2-q21.3	–	39
<i>CTF1</i> (cardiotrophin)	16p11.2-p11.1	–	1
<i>TAZ</i> (tafazzin)	Xq28	–	4
<i>JPH2</i> (junctionophilin-2)	20q13.12	3 [172]	–
<i>PLN</i> (phospholamban)	6q22.1	–	2
<i>ABCC9</i> ( $K_{ATP}$ channel)	12p12.1	–	2
<i>SCN5A</i> (cardiac Na channel)	3p21	–	3
<i>CRYAB</i> (crystallin $\alpha$ B)	11q22.3-q23.1	–	2
<i>PRKAG2</i> ( $\gamma$ 2 subunit AMPK)	7q36.1	5	–
Total		470	136

Available at [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php).

diversity of causal mutations, associated with a variable genetic background and the influence of modifier genes, leads to a wide variability in FHC-phenotypic expression [6–8]. FHC follows a variable clinical course, can be diagnosed at any age and manifests itself across a wide spectrum spanning from mild cardiac hypertrophy and no symptoms to marked hypertrophy with diastolic heart failure and sudden death [9].

The current medical therapy of FHC aims to relieve symptoms and includes the use of  $\beta$ -blockers, the  $Ca^{2+}$  channel blocker verapamil and the  $Na^{+}$  channel blocker disopyramide [10–12]. In drug refractory patients, the therapeutic options are surgical myectomy, alcohol septal ablation, dual-chamber (DDD) pacing and heart transplantation [13–15]. Although the overall survival of patients with FHC is similar to the general population, the risk of sudden death is increased, especially in young people and athletes, and is often the first manifestation of the disease.

## 3. Dilated cardiomyopathy

DCM is characterized by enlargement of the cardiac chambers, decreased myocardial contractility and unspecific histopathological findings, such as myocyte loss, increased apoptosis and interstitial fibrosis [1,16]. DCM is an important cause of cardiac morbidity and

mortality and the leading cause of cardiac transplantation, with an estimated prevalence of 36.5 per 100,000 individuals. It has been linked to genetic causes in approximately 25–30% of the cases [17,18]. Autosomal dominance is the most commonly observed pattern of inheritance, but X-linked, autosomal recessive and mitochondrial DNA mutations (matrilineal inheritance) also occur [1]. DCM was initially identified in genes coding for proteins of the cytoskeleton and Z-disc [2]. Thus, it has been described as a disease resulting from impaired force “transmission” due to the role of these proteins in translating force generated by the sarcomere to the extracellular matrix [19,20]. However, a significant number of mutations in sarcomeric proteins that lead to disruption of sarcomere activation have also been demonstrated, thereby implicating impaired force “generation” as an additional mechanism in the pathogenesis of the disease [18,21,22]. Gene mutations linked to DCM are listed in Table 1.

As with FHC, the clinical presentation of DCM is widely variable, ranging from an asymptomatic life-long course to rapid and progressive heart failure requiring cardiac transplantation [17,23]. The diagnosis of asymptomatic patients can be incidental in routine medical screening or after family evaluation of patients with established diagnosis. More typically, however, patients present at the time of diagnosis with symptoms of pulmonary congestion or low cardiac output [17]. DCM is often associated with defects in the conduction system, arrhythmias and sudden death that have been linked to myocardial remodeling and increased fibrosis. Medical treatment includes combined use of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, angiotensin II receptor (AR) antagonists,  $\beta$ -blockers, aldosterone antagonists and diuretics [16]. Despite new advances in the treatment of patients with DCM in the last decade, mortality is still elevated, approaching 50% at 5 years in symptomatic patients [24].

#### 4. Genetic and molecular pathogenesis

Defective proteins resulting from genetic mutations can lead to a disruption of the mechanisms of force production and transmission, resulting in impaired cardiomyocyte contractility and relaxation. However, the mechanism by which a single mutation leads to a specific pathological phenotype, the signaling pathways activated to determine that phenotype, and the role of other genetic and environmental factors that influence the phenotype remain poorly understood. In the past two decades, several studies have demonstrated that genetic FHC and DCM most commonly result from defects in genes encoding proteins of the sarcomere and Z-disc but also involve defective proteins of the cytoskeleton/sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, nuclear membrane, intercalated disc and altered metabolic and transcriptional pathways (Table 1).

##### 4.1. Thick filament mutations

The thick filament consists of myosin associated with the essential (ELC) and regulatory (RLC) light chains. Mutations in  $\beta$ -MyHC account for 20–30% of all FHC patients, and they are also an important cause of DCM [6,18,22,25]. In general, FHC linked to mutations in  $\beta$ -MyHC lead to a clinical phenotype characterized by severe hypertrophy and high risk of sudden death, with an early onset and poor prognosis [25]. Mutations such as R453Q and R1053G are associated with an FHC phenotype that gradually transitions to DCM, while others such as S532P and F764L result in primary DCM [22,26]. Thus, different mutations in the same molecule can lead to diverse phenotypes.

Most of these mutations occur in the globular head or near the head-rod junction of the myosin molecule. The missense mutation R403Q in  $\beta$ -MyHC is located at the base of the surface loop that attaches the myosin head to actin, and was the first to be linked to FHC. Therefore, it is intuitive to hypothesize that a resulting effect of the mutation would be to disrupt the actomyosin interaction. Indeed,

initial *in vitro* studies have described functional abnormalities caused by the R403Q mutation, including decreased actin-activated ATPase activity and reduced actin sliding speed [27–29]. These results suggested that the hypertrophic response observed in R403Q carriers could represent a compensation for decreased force generation. However, other studies using purified myosin or skinned cardiac fibers from TG mice expressing the R403Q mutation have shown increased actin-dependent ATPase, actin sliding speed [30,31] and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity [32,33]. These results suggest that instead of decreasing the power generation, the R403Q mutation actually potentiates it and thereby leads to “gain of function”. Debold et al. [34] have also shown that the FHC-linked mutations R403Q and R453Q increase the force generation per cross bridge in the laser trap assay, while the DCM-linked mutations S532P and F764L show a decrease.

In addition to gain of function, Semsariam et al. [35] have hypothesized that altered biophysical properties of the R403Q mutation lead to  $\text{Ca}^{2+}$  retention by the myofilament ( $\text{Ca}^{2+}$  trapping). According to this hypothesis, increased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  affinity would lead to decreased kinetics of relaxation, which is compatible with the clinical observation that diastolic dysfunction is the primary defect in FHC hearts. Besides the abnormalities of the myofilament, they also suggested that “abnormal SR  $\text{Ca}^{2+}$  responses and reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins are early events in the pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy”. In their study,  $\alpha$ -MyHC R403Q mice exhibit decreased SR  $\text{Ca}^{2+}$  content, decreased calsequestrin and ryanodine receptor (RyR2) expression and increased RyR2 phosphorylation. Although the  $\text{Ca}^{2+}$  trapping hypothesis is attractive, further data are necessary to confirm it.

Finally, Spindler et al. [36] have shown that  $\alpha$ -MyHC R403Q mice have altered myocardial energetics, as demonstrated by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy studies. These studies showed that  $\alpha$ -MyHC R403Q mice had decreased phosphocreatine (PCr), increased inorganic phosphate (Pi) and a decreased calculated free energy release from ATP hydrolysis when compared to wild-type mice. The authors hypothesized that the free energy available during times of high energy consumption in  $\alpha$ -MyHC R403Q hearts would not be enough to maintain the cytoplasmic-SR  $\text{Ca}^{2+}$  gradient, which could result in diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  overload. They also suggested that the energetic abnormalities in  $\alpha$ -MyHC R403Q are likely to be primarily caused by the myosin mutation, with less cross-bridge produced force per ATP hydrolyzed, and are not secondary to hypertrophy. This hypothesis has been supported by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy studies in patients with FHC expressing mutations in  $\beta$ -MyHC (16 patients), TnT (8 patients) and MyBPC (7 patients) in which a decreased PCr to ATP ratio in human FHC hearts was observed irrespective of the degree of hypertrophy [37].

##### 4.2. Thin filament mutations

Functional units of thin filaments consist of seven actin monomers, one coiled-coil Tm protein and one Tn complex, which itself is comprised of three units: TnT, TnI and TnC. The thin filament plays an important role in muscle contraction by translating the  $\text{Ca}^{2+}$  signal into sarcomere activation and force production following a complex sequence of protein-protein interactions. In systole,  $\text{Ca}^{2+}$  binds to the regulatory site on cTnC and brings about conformational alterations in the Tn complex, which in turn shifts the position of Tm on the actin molecule and exposes its myosin binding sites. Activation of the actomyosin complex results in sliding of the thin filament along the thick filament, sarcomere shortening and muscle contraction [38].

It has been demonstrated that modification of this finely tuned mechanism by mutations in thin filament components can lead to the development of FHC and DCM [6,39]. Indeed, studies have revealed that mutations in the *TNNT2*, *TPM1*, *TNNI3*, *ACTC1* and *TNNC1* genes are linked to the pathogenesis of FHC or DCM [22,40]. Thus, any component of the thin filament can be affected, and the development



of FHC or DCM phenotypes is dependent on the specific mutation and other genetic and nongenetic modifier factors [7].

The clinical phenotypes associated with TnT mutations have been extensively described [41,42], whereas phenotypes from mutations in Tm, TnI, TnC and actin are less well characterized in humans due to the limited number of genotype-phenotype studies [43–45]. Taken together, the phenotypes of thin filament-linked cardiomyopathies are quite heterogeneous and include families with a relatively benign course and others with severe or malignant cardiomyopathies. One remarkable characteristic that “defines” thin filament-linked FHC is the apparent dissociation between the degree of hypertrophy and the clinical outcome. On average, thin filament mutations result in less hypertrophy and cardiac remodeling when compared to  $\beta$ -MyHC mutations [40]. However, mutations in TnT have been associated with a high incidence of sudden death and poor prognosis, which implies an associated arrhythmic cellular mechanism, even in the absence of hypertrophy and fibrosis [46].

Several studies have evaluated the effects of thin filament mutations on the mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of the myofilament. Most of the studies have shown that virtually all mutations in TnT, Tm and TnI can modify the myofilament response to  $\text{Ca}^{2+}$  [47]. Moreover, different groups have shown that thin filament FHC-linked mutations increase myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and lead to diastolic dysfunction while DCM-linked mutations have the opposite effect, resulting in systolic dysfunction [48–55] [56,57] [52,58,59,59–61]. Michele et al. [62] have also demonstrated that different FHC-linked mutations in thin filaments fit into a specific hierarchy in their capacity to increase the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and that the magnitude of this increase is transgene dose dependent.

It has been proposed that FHC- and DCM-causing mutations in Tn and Tm result in altered flexibility of these proteins, which might modify their interaction and consequently alter  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent tension development. This hypothesis has been supported by recent work in which the authors used a fluorescent probe to measure the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding affinity to TnC in order to determine the effect of different mutations in the reconstituted thin filament [63,64]. They have shown that FHC- or DCM-linked mutations in thin filament proteins alter the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding affinity of TnC only when incorporated into the fully integrated thin filament, suggesting that the mutations lead to a disruption in thin filament cooperative activation.

## 5. Experimental strategies to rescue cardiomyopathies

### 5.1. Targeting the myofilaments

Although mutations in sarcomeric proteins lead to a wide spectrum of cardiomyopathic phenotypes and result from an array of factors, the primary defect of FHC and DCM lies in altered myofilament properties. Functionally, the major defect and common thread in DCM is systolic dysfunction often associated with decreased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, whereas in FHC the major defect is diastolic dysfunction and in most cases an increase in myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. Examples of this increased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in animal models of human FHC include Tm [48–50], TnT [51–55] or TnI [56,57]. In contrast, animal models of DCM in Tm [58] and TnT [59,60] show decreased myofilament sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ . If the primary defect in sarcomere-linked cardiomyopathies is altered myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, a logical therapeutic approach would be to bring their sensitivity back to normal levels, preferably early in the development of the disease. In heart failure (HF), increasing sarcomeric activity by pharmacological sensitization of the myofilament to  $\text{Ca}^{2+}$  has provided beneficial effects in the short term [65–67]. However, little is known as to whether interventions via sarcomeric sensitization to  $\text{Ca}^{2+}$  might be beneficial in DCM or whether desensitization is beneficial in FHC. In addition, it is not known whether there is a specific time period when the therapy should be

initiated. To the best of our knowledge, there are no published studies concerning early intervention in children from families with familial cardiomyopathies.

There are several possible targets within the myofilament for altering myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, including both thin filament proteins (TnI, TnC and Tm) and thick filament proteins. An example of the therapeutic potential of myofilament desensitization in FHC was shown in TG mice expressing mutated Tm at position 180 (TmE180G or Tm180) [49]. These mice exhibit increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and were crossbred with chimeric Tm TG mice with decreased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity [68]. The result of this cross produced a mouse with  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity similar to wild-type, a decrease in both fibrosis and myocyte disarray compared to Tm180, systolic function equivalent to wild-type, and improved diastolic function for up to 1 year when compared to Tm180 [69].

TnI is also a potential target since its phosphorylation by protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), protein kinase D (PKD) and p21-activated kinase has significant effects on myofilament properties [70–74]. For example, it is well documented that PKA-mediated phosphorylation of cTnI at residues S23 and S24 results in desensitization of the myofilaments to  $\text{Ca}^{2+}$  [75,76]. Furthermore, myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity is increased in hearts from patients with HF due to reduced level of cTnI phosphorylation [77,78]. In addition, a small amount of myofilament desensitization via exercise following myocardial infarction improved LV function compared to infarcted sedentary mice [79]. Since phosphorylation of TnI at residues S23/S24 decreases myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, this effect could be used as strategy to attenuate the increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in FHC and early results using this strategy look promising [80]. Collectively, these data suggest interventions that desensitize the myofilament to  $\text{Ca}^{2+}$  may serve as potential therapies for treating FHC phenotypes associated with increased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.

If the primary defect of sarcomeric-linked DCM is associated with decreased myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, it would be intuitive that resensitizing the myofilaments to normal levels should be beneficial. To this end, the first class of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizers was developed almost 20 years ago. Some, such as levosimendan and pimobendan, reached the clinical trial level, but they have not been used for treatment of DCM patients resulting from sarcomeric protein mutations. Levosimendan acts by binding to TnC [81], and it also shows vasodilatory and anti-ischemic effects by opening ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels in the sarcolemma and mitochondria [82,83]. Thus, levosimendan has two mechanisms of action: increasing inotropism and reducing afterload. In clinically approved doses, levosimendan improves cardiac output without impairing relaxation, yet it inhibits phosphodiesterase only at higher doses [84]. So far levosimendan is used only for the treatment of acute and decompensated HF [67]. To our knowledge, it has not been tested in animal models of DCM. On the other hand, pimobendan, which is also used in acute HF, was recently tested in a mouse model of DCM caused by the deletion mutation  $\Delta\text{K}210$  in TnT [85]. The phenotype of these mice includes cardiac enlargement, reduced cardiac performance and frequent sudden death, while physiological parameters include decreased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity that is compensated by increased  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude. Early intervention with pimobendan had profound effects on the development of DCM as seen in improvements in cardiac performance and morphology, HF and even sudden cardiac death [85]. Although these results are truly compelling, it would also be interesting to determine if the effects of intervention with pimobendan can reverse the process of DCM-induced cardiac remodeling after full development of the phenotype.

### 5.2. Myofilaments versus calcium-handling proteins

Contraction and relaxation of the heart are regulated by complex processes involving the myofilaments,  $\text{Ca}^{2+}$ -handling proteins and the loading conditions of the heart (for a review, see Bers [86]). At the

single cardiomyocyte level, the dynamics of contraction and relaxation are regulated both on a beat-to-beat basis (short-term regulation) and as a result of adaptation and maladaptation to different cardiovascular stresses (long-term regulation). In short-term regulation during systole,  $\text{Ca}^{2+}$  is bound to only 20–25% of troponin C (TnC). Thus, augmented  $\text{Ca}^{2+}$  delivery to the myofilaments or increase in their sensitivity to this ion results in improved contractility. During diastole, extrusion of  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump (SERCA2a), the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, and to a marginal extent the sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  pump, returns systolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration to resting levels and allows for relaxation of the cell [87].

Controversy remains, however, concerning the relative contribution of the myofilaments versus  $\text{Ca}^{2+}$ -handling proteins to the rate of relaxation in cardiac muscle. Some have argued that relaxation is limited by the myofilaments since active force in cardiac papillary muscle is maintained for a considerable period after  $\text{Ca}^{2+}$  concentration returns to resting levels [88]. Others have shown that  $\text{Ca}^{2+}$  uptake limits the late phase of relaxation in experiments using isolated, unloaded cardiomyocytes [89,90]. This controversy may be partially explained by the differences in experimental conditions such as temperature and loaded versus unloaded preparations. Janssen et al. [91] have recently shown that the myofilaments may be the rate limiting factor only near physiological temperatures.

Despite the controversy, there is agreement that when the expression of SERCA2a and phospholamban (PLB) are altered such as in HF,  $\text{Ca}^{2+}$  transient decay significantly contributes to the observed slower relaxation rate (for a review, see Hasenfuss and Pieske [92]). To rectify this, studies with PLBKO mice and mice overexpressing SERCA2a have shown that altering  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis by either method results in a faster rate of relaxation in cells, papillary muscle and the whole heart. This suggests that it is possible to improve cardiac relaxation by decreasing the decay time of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient [93–97]. The next section discusses recent attempts to rescue HF, FHC and DCM by manipulating sarcoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -handling proteins.

### 5.3. Targeting the sarcoplasmic reticulum proteins (SERCA2a and PLB)

In cardiac cells, the SR proteins, SERCA2a and PLB, play a critical role in regulating release and uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  from the SR (for a review, see Brittsan and Kranias [98]). During diastole, SERCA2a pumps  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytoplasm into the SR, but its activity is inhibited by its association with PLB. Phosphorylation of PLB dissociates it from SERCA2a and thus reverses the inhibition allowing for faster  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake into the SR. The rate of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by SR also depends on the levels of SERCA2a and PLB protein expression. The PLB/SERCA2a ratio is critical in the regulation of myocardial contractility [99]. The PLB/SERCA2a ratio also affects the force–frequency relationship as myocytes overexpressing SERCA2a exhibit shortened relaxation times and a negative force–frequency relationship, while myocytes overexpressing PLB exhibit prolonged relaxation and an augmented, positive force–frequency relationship [100]. In HF, the SERCA2a/PLB ratio is decreased, reducing the SR  $\text{Ca}^{2+}$  uptake [101–103]. Thus, because of their importance in the contractile process, modulating levels of either could be beneficial in preventing HF, FHC or DCM. Overexpression of SERCA2a, the muscle-specific isoform, has been used to rescue HF in several instances. In aortic-banded rats, injection of SERCA2a adenovirus into decompensated or failing hearts resulted in normalization of LV systolic pressure, the maximal rate of both pressure development and decline and the rate of isovolumic relaxation [104]. A similar study showed that SERCA2a adenovirus administered to aortic-banded rats during the HF phase normalized left ventricular volumes and improved both the phosphocreatine/ATP ratio and survival rates [105]. SERCA2a overexpression also improved function at the cellular level in human ventricular

myocytes taken from patients with HF. SERCA2a gene transfer induced faster contraction and relaxation velocities, decreased diastolic  $\text{Ca}^{2+}$ , increased systolic  $\text{Ca}^{2+}$  and even normalized the force–frequency relationship [106]. In TG SERCA2a overexpression mice subjected to aortic banding, numerous parameters improved compared to controls including mortality rate, LV systolic function, myocyte fractional shortening and relengthening, calcium transient amplitude and rate of transient decay [107].

While most of these studies have focused on rescuing heart failure resulting from secondary cardiomyopathies, our group has recently shown similar findings in a mouse model of primary FHC, Tm180 [49]. Results indicate that intraventricular injection of SERCA2a adenovirus into one-day-old Tm180 mice increased SERCA2a protein expression for several weeks, delayed development of FHC and restored contractile parameters [108,109]. We believe that this is the only study thus far that attempts to rescue FHC via SERCA2a overexpression. Nonetheless, it is notable that depressed cardiac contractility or diastolic dysfunction resulting from reduced SERCA2a expression can be reversed not only by SERCA2a overexpression but also by overexpressing other  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins such as sorcin [110] or parvalbumin [111]. Moreover, parvalbumin was shown to correct slower relaxation in adult cardiac cells expressing mutated Tm linked to FHC [112]. Similar to SERCA2a overexpression, decreasing PLB expression has similar beneficial effects on cardiomyopathies. In a mouse model of DCM resulting from ablation of muscle LIM protein [113], crossbreeding with PLBKO mice restored numerous morphological abnormalities including cardiac chamber dilation, myofibrillar disarray and large scale fibrosis [114]. At the cellular level, PLBKO also suprarescued contractile parameters and increased calcium transient amplitude, activation and inactivation kinetics. Interestingly, PLB ablation seems to be dose dependent as heterozygotes had an intermediate level of rescue. PLBKO was also used to rescue another mouse model of DCM, overexpression of calsequestrin [115]. Calsequestrin TG mice exhibit hypertrophy, increased hypertrophic marker gene expression, reduced levels of LV contraction and relaxation, depressed calcium transient amplitude despite increased SR load and a decrease in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current [116]. Following crossbreeding with PLBKO mice, these mice displayed increased cardiac performance both *in vivo* and *ex vivo*, decreased inactivation time for L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents and reduced expression levels of hypertrophic marker genes [115]. In contrast, in a third mouse model of DCM, tropomodulin TG, crossbreeding with PLBKO mice failed to rescue their dilated phenotype and juvenile lethality [117].

In addition to DCM, PLB ablation has also been used to rescue HF in both failing human myocytes and animal models. In failing human myocytes, gene delivery of an antisense strand to PLB increased contraction and relaxation velocities, enhanced SR  $\text{Ca}^{2+}$  release and restored the normal frequency response [118]. In a hamster model of HF, *in vivo* gene delivery of pseudophosphorylated PLB increased contractile and relaxation parameters, both in single cardiomyocytes and *in vivo*, and decreased both fibrosis and hypertrophic marker genes. Surprisingly, the effects lasted for 28–30 weeks, giving credence to their newly described method of adenovirus gene delivery [119]. In contrast, PLBKO in the  $\text{G}\alpha\text{q}$  TG model of HF did not improve hemodynamic parameters, hypertrophy or fibrosis even though unloaded, isolated cardiomyocytes displayed a suprarescue of both fractional shortening and calcium transient amplitude [120].

Finally, PLBKO mice have been used to rescue models of FHC. In the Song et al. [120] study listed above, rescue was also attempted in a mouse model of FHC stemming from a mutated form of MyBPC. Unfortunately, the results were similar to those seen in the  $\text{G}\alpha\text{q}$  TG model. Freeman et al. [121] also describe attempts to rescue an FHC mutation, MyHC R403Q, via PLBKO. PLBKO increased systolic function and exercise tolerance in the FHC model yet exacerbated hypertrophy as assessed by heart weight/body weight ratio at 10.5 months. In contrast, we have recently shown that PLB ablation in a mouse model

of FHC, Tm180, provided significant improvement of cardiac function and morphology, including hypertrophy and fibrosis, for up to 1 year [122].

In addition to alterations in the SR proteins, SERCA2a and PLB,  $Ca^{2+}$  fluxes can be modified by using the  $Ca^{2+}$  channel blocker diltiazem. Diltiazem has demonstrated efficacy in two different models of FHC [35,123]. Overall, these data strongly suggest that HF, DCM and FHC can be rescued by modifying  $Ca^{2+}$  fluxes.

#### 5.4. Targeting modifier genes

In addition to incomplete penetrance and diversity of causal mutations in FHC and DCM, studies have shown that the broad heterogeneity in phenotype of these cardiomyopathies is influenced by modifier genes [21,124–127]. Modifier genes compound the individual genetic background that differs within a population due to DNA polymorphism. They are neither necessary nor sufficient to cause disease but exert an important influence in the expression of a genetic disease. Thus, pharmacological or genetic interventions on target signaling pathways under the influence of modifier genes could result in new strategies of treatment for cardiomyopathies.

Several gene polymorphisms have been considered candidates to modify the phenotype expression of FHC or DCM including ACE, angiotensinogen, AR type 1 and 2, aldosterone synthase, endothelin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, insulin-like growth factor-2, transforming growth factor  $\beta$ 1, variants of  $\alpha$ 2c-,  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors and others [126,128–148]. The renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) is one of most widely studied in this context. The role of RAAS in cardiovascular disease such as hypertensive cardiomyopathy, myocardial infarction and HF is well established [149,150]; however, the impact of polymorphisms in key constituents of RAAS on the severity of phenotype in FHC or DCM has been more controversial [151–154]. For example, the ACE gene has a polymorphic region containing an insertion (I) or deletion (D) of a 287-bp fragment (I/D polymorphism). In some studies, the D/D genotype has been associated with increased hypertrophy and high risk of sudden death in patients with FHC [124,125,132], whereas it correlated with reduced LV systolic performance and increased LV cavity size in patients with DCM [126]. Other studies, in contrast, have shown a lack of association [155,156].

The blockade of key steps in RAAS activation has been correlated with improvement in LV function and cardiac remodeling in rodent models of FHC and DCM by reversing the hypertrophic and profibrotic effects of angiotensin II and aldosterone. ACE inhibition using enalapril alone, or in association with the mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone, decreased LV cavity size and collagen density in cardiomyopathic hamsters [157,158]. It has also been shown that aldosterone and aldosterone synthase mRNA levels are elevated in humans with FHC [153]. Aldosterone increases the expression of hypertrophic markers in rat cardiac myocytes through phosphorylation of PKD and the expression of collagens and transforming growth factor- $\beta$ 1 in rat cardiac fibroblasts through upregulation of phosphoinositide 3-kinase [153]. Spironolactone reversed the hypertrophic and profibrotic effects of aldosterone in a mouse model of human FHC caused by a missense mutation in TnT (R92Q), decreasing interstitial fibrosis, myocyte disarray and improving LV diastolic function [153]. Furthermore, blockade of angiotensin II receptors using losartan also reversed the interstitial fibrosis and the expression of collagen-1 $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$ 1 in the same mouse model [159]. Together, these studies suggest RAAS as a therapeutic target in genetic cardiomyopathies. Despite concerns about the vasodilatory properties of ACE inhibitors and AR blockers in the obstructive form of FHC, the safety and efficacies of candesartan and losartan have been described in studies from patients with nonobstructive FHC [160,161].

Additionally, it has been demonstrated that 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors reduce the

levels of important molecules in cardiac hypertrophic signaling. Recently, Patel et al. [162] have shown that the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin reduced hypertrophy and fibrosis and improved cardiac function in  $\beta$ -MyHC-R403Q TG rabbits by reducing the levels of activated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2. Senthil et al. [163] have also demonstrated that another HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, had similar effects in preventing cardiac dysfunction and remodeling in the same model by reducing the levels of membrane-bound Ras and phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK). Furthermore, treatment of TnT-R92Q TG mice with the antioxidant *N*-acetylcysteine reduces markers of oxidative stress, 4-hydroxy-2(E)-nonenal and malondialdehyde, expression levels of the mRNAs for procollagen Col1( $\alpha$ 1), Col1( $\alpha$ 2) and Col3( $\alpha$ 1) and the phosphorylation levels of p44, 42, p38 and c-Jun NH2-terminal kinase [164].

#### 5.5. Conclusions

Although our knowledge about the genetic and molecular pathophysiology of familial cardiomyopathies has increased substantially in the last two decades, the molecular steps which connect gene defect to clinical phenotype remain elusive. Current data suggest that an extensive panel of causal mutations in a number of different genes can cause cardiomyopathies, and the severity of the disease phenotype is also influenced by several modifier genes. Despite the broad diversity of causal mutations, the signaling response triggered by defective proteins seems to converge into two main phenotypes: FHC, characterized by enhanced contractility, impaired diastolic function and concentric hypertrophy; and DCM, characterized by impaired force generation or transmission, systolic dysfunction and eccentric hypertrophy.

A variety of structural and functional myocardial abnormalities have been identified in animal models of human cardiomyopathies, including defects in the sarcomere assembly, cross-bridge kinetics, myofibrillar ATPase activity, myofilament  $Ca^{2+}$ –force relationship, excitation–contraction coupling and energetics. In animal models of cardiomyopathies, the expression of FHC- or DCM-linked mutations often results in altered myofilament sensitivity to  $Ca^{2+}$  concomitant with abnormal function and expression of  $Ca^{2+}$  handling proteins. In agreement with these observations, recent studies have been successful in rescuing cardiomyopathies in animal models by altering either the myofilament response to  $Ca^{2+}$  or the  $Ca^{2+}$  fluxes that activate myofilaments. Data from animal models of human cardiomyopathies suggest the possibility of developing new treatments for patients with primary and even secondary cardiomyopathies, which would involve direct interventions in myofilament properties or  $Ca^{2+}$  regulation. Further studies and more extensive testing are needed to validate these strategies in an attempt to provide more effective and specific treatments for these diseases.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by an NIH RO1 HL79032 grant.

#### References

- [1] Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113:1807–16.
- [2] Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008;29:270–6.
- [3] Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004;363:1881–91.



- [4] Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:201–11.
- [5] Hughes SE. The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. *Histopathology* 2004;44:412–27.
- [6] Tardiff JC. Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. *Heart Fail Rev* 2005;10:237–48.
- [7] Marian AJ. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:242–52.
- [8] Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002;11:2499–506.
- [9] Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 2002;287:1308–20.
- [10] Harrison DC, Braunwald E, Glick G, Mason DT, Chidsey CA, Ross Jr J. Effects of beta adrenergic blockade on the circulation with particular reference to observations in patients with hypertrophic subaortic stenosis. *Circulation* 1964;29:84–98.
- [11] Rosing DR, Kent KM, Maron BJ, Epstein SE. Verapamil therapy: a new approach to the pharmacologic treatment of hypertrophic cardiomyopathy. II. Effects on exercise capacity and symptomatic status. *Circulation* 1979;60:1208–13.
- [12] Sherrid MV, Barac I, McKenna WJ, Elliott PM, Dickie S, Chojnowska L, et al. Multicenter study of the efficacy and safety of disopyramide in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1251–8.
- [13] Olivetto I, Ommen SR, Maron MS, Cecchi F, Maron BJ. Surgical myectomy versus alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy. Will there ever be a randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:831–4.
- [14] Ommen SR, Maron BJ, Olivetto I, Maron MS, Cecchi F, Betocchi S, et al. Long-term effects of surgical septal myectomy on survival in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:470–6.
- [15] Maron BJ, Nishimura RA, McKenna WJ, Rakowski H, Josephson ME, Kieval RS. Assessment of permanent dual-chamber pacing as a treatment for drug-refractory symptomatic patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. A randomized, double-blind, crossover study (M-PATHY). *Circulation* 1999;99:2927–33.
- [16] Luk A, Ahn E, Soor GS, Butany J. Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol* 2009;62:219–25.
- [17] Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:969–81.
- [18] Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000;343:1688–96.
- [19] Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998;280:750–2.
- [20] Nicol RL, Frey N, Olson EN. From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:179–223.
- [21] Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:185–216.
- [22] Chang AN, Potter JD. Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Rev* 2005;10:225–35.
- [23] Mestroni L, Rocco C, Gregori D, Sinagra G, Di LA, Micioc S, et al. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. *Heart Muscle Disease Study Group. J Am Coll Cardiol* 1999;34:181–90.
- [24] Grogan M, Redfield MM, Bailey KR, Reeder GS, Gersh BJ, Edwards WD, et al. Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:80–4.
- [25] Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227–32.
- [26] Schmitt JP, Debold EP, Ahmad F, Armstrong A, Frederico A, Conner DA, et al. Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:14525–30.
- [27] Sata M, Ikebe M. Functional analysis of the mutations in the human cardiac  $\beta$ -myosin that are responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. Implication for the clinical outcome. *J Clin Invest* 1996;98:2866–73.
- [28] Roopnarine O, Leinwand LA. Functional analysis of myosin mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biophys J* 1998;75:3023–30.
- [29] Cuda G, Fananapazir L, Epstein ND, Sellers JR. The in vitro motility activity of  $\beta$ -cardiac myosin depends on the nature of the  $\beta$ -myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *J Muscle Res Cell Motil* 1997;18:275–83.
- [30] Tyska MJ, Hayes E, Giewat M, Seidman CE, Seidman JG, Warshaw DM. Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000;86:737–44.
- [31] Keller DI, Coirault C, Rau T, Cheav T, Weyand M, Amann K, et al. Human homozygous R403W mutant cardiac myosin presents disproportionate enhancement of mechanical and enzymatic properties. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:355–62.
- [32] Palmiter KA, Tyska MJ, Haeblerle JR, Alpert NR, Fananapazir L, Warshaw DM. R403Q and L908V mutant  $\beta$ -cardiac myosin from patients with familial hypertrophic cardiomyopathy exhibit enhanced mechanical performance at the single molecule level. *J Muscle Res Cell Motil* 2000;21:609–20.
- [33] Blanchard E, Seidman C, Seidman JG, LeWinter M, Maughan D. Altered crossbridge kinetics in the  $\alpha$ MHC<sup>403/+</sup> mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1999;84:475–83.
- [34] Debold EP, Schmitt JP, Patlak JB, Beck SE, Moore JR, Seidman JG, et al. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy mutations differentially affect the molecular force generation of mouse alpha-cardiac myosin in the laser trap assay. *Am J Physiol* 2007;293:H284–91.
- [35] Semsarian C, Ahmad I, Giewat M, Georgakopoulos D, Schmitt JP, McConnell BK, et al. The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. *J Clin Invest* 2002;109:1013–20.
- [36] Spindler M, Saupe KW, Christie ME, Sweeney HL, Seidman CE, Seidman JG, et al. Diastolic dysfunction and altered energetics in the  $\alpha$ MHC<sup>403/+</sup> mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998;101:1775–83.
- [37] Crilly JG, Boehm EA, Blair E, Rajagopalan B, Blamire AM, Styles P, et al. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1776–82.
- [38] Solaro RJ, Rarick HM. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res* 1998;83:471–80.
- [39] Bing W, Redwood CS, Purcell IF, Esposito G, Watkins H, Marston SB. Effects of two hypertrophic cardiomyopathy mutations in  $\alpha$ -tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on Ca<sup>2+</sup> regulation of thin filament motility. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:760–4.
- [40] Kimura A. Molecular etiology and pathogenesis of hereditary cardiomyopathy. *Circ J* 2008;72(Suppl A):A38–48.
- [41] Gomes AV, Barnes JA, Harada K, Potter JD. Role of troponin T in disease. *Mol Cell Biochem* 2004;263:115–29.
- [42] Tardiff JC, Hewett TE, Palmer BM, Olsson C, Factor SM, Moore RL, et al. Cardiac troponin T mutations result in allele-specific phenotypes in a mouse model for hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1999;104:469–81.
- [43] Thierfelder L, Watkins H, Macrae K, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, et al.  $\alpha$ -Tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994;77:701–12.
- [44] Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, et al. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1997;16:379–82.
- [45] Mogensen J, Perrot A, Andersen PS, Havndrup O, Klausen IC, Christiansen M, et al. Clinical and genetic characteristics of  $\alpha$  cardiac actin gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet* 2004;41:e10.
- [46] Baudenbacher F, Schober T, Pinto JR, Sidorov VY, Hilliard F, Solaro RJ, et al. Myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3893–903.
- [47] Hernandez OM, Housmans PR, Potter JD. Invited review: pathophysiology of cardiac muscle contraction and relaxation as a result of alterations in thin filament regulation. *J Appl Physiol* 2001;90:1125–36.
- [48] Muthuchamy M, Pieples K, Rethinasamy P, Hoit B, Grupp IL, Boivin GP, et al. Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in  $\alpha$ -tropomyosin manifests cardiac dysfunction. *Circ Res* 1999;85:47–56.
- [49] Prabhakar R, Boivin GP, Grupp IL, Hoit B, Arteaga G, Solaro RJ, et al. A familial hypertrophic cardiomyopathy  $\alpha$ -tropomyosin mutation causes severe cardiac hypertrophy and death in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1815–28.
- [50] Wolska BM, Wiecek DF. The role of tropomyosin in the regulation of myocardial contraction and relaxation. *Pflugers Arch* 2003;446:1–8.
- [51] Nakaura H, Morimoto S, Yanaga F, Nakata M, Nishi H, Imaizumi T, et al. Functional changes in troponin T by a splice donor site mutation that causes hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1999;277:C225–32.
- [52] Szczesna D, Zhang R, Zhao J, Jones M, Guzman G, Potter JD. Altered regulation of cardiac muscle contraction by troponin T mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2000;275:624–30.
- [53] Morimoto S, Yanaga F, Minakami R, Ohtsuki I. Ca<sup>2+</sup>-sensitizing effects of the mutations at Ile-79 and Arg-92 of troponin T in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1998;275:C200–7.
- [54] Chandra M, Rundell VL, Tardiff JC, Leinwand LA, de Tombe PP, Solaro RJ. Ca<sup>2+</sup> activation of myofilaments from transgenic mouse hearts expressing R92Q mutant cardiac troponin T. *Am J Physiol* 2001;280:H705–13.
- [55] Nakaura H, Yanaga F, Ohtsuki I, Morimoto S. Effects of missense mutations Phe110Ile and Glu244Asp in human cardiac troponin T on force generation in skinned cardiac muscle fibers. *J Biochem (Tokyo)* 1999;126:457–60.
- [56] Elliott K, Watkins H, Redwood CS. Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2000;275:22069–74.
- [57] James J, Zhang Y, Osinska H, Sanbe A, Klevitsky R, Hewett TE, et al. Transgenic modeling of a cardiac troponin I mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000;87:805–11.
- [58] Rajan S, Ahmed RP, Jagatheesan G, Petrashevskaya N, Boivin GP, Urbonienė D, et al. Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circ Res* 2007;101:205–14.
- [59] Morimoto S, Lu QW, Harada K, Takahashi-Yanaga F, Minakami R, Ohta M, et al. Ca<sup>2+</sup>-desensitizing effect of a deletion mutation Delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:913–8.
- [60] Lu QW, Morimoto S, Harada K, Du CK, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, et al. Cardiac troponin T mutation R141W found in dilated cardiomyopathy stabilizes the troponin T-tropomyosin interaction and causes a Ca<sup>2+</sup> desensitization. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1421–7.
- [61] Chang AN, Harada K, Ackerman MJ, Potter JD. Functional consequences of hypertrophic and dilated cardiomyopathy-causing mutations in alpha-tropomyosin. *J Biol Chem* 2005;280:34343–9.

- [62] Michele DE, Gomez CA, Hong KE, Westfall MV, Metzger JM. Cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy mutant tropomyosin mice is transgene-dependent, hypertrophy-independent, and improved by  $\beta$ -blockade. *Circ Res* 2002;91:255–62.
- [63] Heller MJ, Nili M, Homsher E, Tobacman LS. Cardiomyopathic tropomyosin mutations that increase thin filament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and tropomyosin N-domain flexibility. *J Biol Chem* 2003;278:41742–8.
- [64] Robinson P, Griffiths PJ, Watkins H, Redwood CS. Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. *Circ Res* 2007;101:1266–73.
- [65] Kota B, Prasad AS, Economides C, Singh BN. Levosimendan and calcium sensitization of the contractile proteins in cardiac muscle: impact on heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13:269–78.
- [66] Pollesello P, Papp Z. The cardioprotective effects of levosimendan: preclinical and clinical evidence. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:257–63.
- [67] Parissis JT, Rafouli-Stergiou P, Paraskevaidis I, Mebazaa A. Levosimendan: from basic science to clinical practice. *Heart Fail Rev* 2008.
- [68] Jagatheesan G, Rajan S, Petrashevskaya N, Schwartz A, Boivin G, Vahebi S, et al. Functional importance of the carboxyl-terminal region of striated muscle tropomyosin. *J Biol Chem* 2003;278:23204–11.
- [69] Jagatheesan G, Rajan S, Petrashevskaya N, Schwartz A, Boivin G, Arteaga GM, et al. Rescue of tropomyosin-induced familial hypertrophic cardiomyopathy mice by transgenesis. *Am J Physiol* 2007;293:H949–58.
- [70] Solaro RJ, Rosevear P, Kobayashi T. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:82–7.
- [71] Solaro RJ. Multiplex kinase signaling modifies cardiac function at the level of sarcomeric proteins. *J Biol Chem* 2008;283:26829–33.
- [72] Sheehan KA, Ke Y, Solaro RJ. P21 activated kinase-1 and its role in integrated regulation of cardiac contractility. *Am J Physiol* 2007;293:R963–73.
- [73] Haworth RS, Cuello F, Herron TJ, Franzen G, Kentish JC, Gautel M, et al. Protein kinase D is a novel mediator of cardiac troponin I phosphorylation and regulates myofilament function. *Circ Res* 2004;95:1091–9.
- [74] Cuello F, Bardswell SC, Haworth RS, Yin X, Lutz S, Wieland T, et al. Protein kinase D selectively targets cardiac troponin I and regulates myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in ventricular myocytes. *Circ Res* 2007;100:864–73.
- [75] Strang KT, Sweitzer NK, Greaser ML, Moss RL.  $\beta$ -Adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats. *Circ Res* 1994;74:542–9.
- [76] Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. Cardiac troponin, I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res* 1995;76:1028–35.
- [77] van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, et al. Increased  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 2003;57:37–47.
- [78] Messer AE, Jacques AM, Marston SB. Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:247–59.
- [79] de Waard MC, Van V D, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, et al. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res* 2007;100:1079–88.
- [80] Dias FA, Alves ML, Gaffin RD, Hinken AC, Biesiadecki BJ, Ribeiro C, et al. Desensitization of the myofilament response to  $\text{Ca}^{2+}$  as a therapeutic target for familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46(5):S36.
- [81] Haikala H, Kaivola J, Nissinen E, Wall P, Levijoki J, Linden IB. Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1859–66.
- [82] Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. Levosimendan, a novel  $\text{Ca}^{2+}$  sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive  $\text{K}^+$  channel in rat arterial myocytes. *Eur J Pharmacol* 1997;333:249–59.
- [83] Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. The novel calcium sensitizer levosimendan activates the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel in rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:375–83.
- [84] Pagel PS, Harkin CP, Hettrick DA, Wartler DC. Levosimendan (OR-1259), a myofilament calcium sensitizer, enhances myocardial contractility but does not alter isovolumic relaxation in conscious and anesthetized dogs. *Anesthesiology* 1994;81:974–87.
- [85] Du CK, Morimoto S, Nishii K, Minakami R, Ohta M, Tadano N, et al. Knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. *Circ Res* 2007;101:185–94.
- [86] Bers DM. Excitation–Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Kluwer Academic Publishers; 2001.
- [87] Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 2002;415:198–205.
- [88] Endoh M, Blinks JR. Actions of sympathomimetic amines on the  $\text{Ca}^{2+}$  transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  mediated through  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors. *Circ Res* 1988;62:247–65.
- [89] Spurgeon HA, DuBell WH, Stern MD, Sollott SJ, Ziman BD, Silverman HS, et al. Cytosolic calcium and myofilaments in single rat cardiac myocytes achieve a dynamic equilibrium during twitch relaxation. *J Physiol* 1992;447:83–102.
- [90] Wolska BM, Kitada Y, Palmiter KA, Westfall MV, Johnson MD, Solaro RJ. CGP-48506 increases contractility of ventricular myocytes and myofilaments by effects on actin-myosin reaction. *Am J Physiol* 1996;270:H24–32.
- [91] Janssen PM, Stull LB, Marban E. Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. *Am J Physiol* 2002;282:H499–507.
- [92] Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:951–69.
- [93] Wolska BM, Stojanovic MO, Luo W, Kranias EG, Solaro RJ. Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Am J Physiol* 1996;271:C391–7.
- [94] Wolska BM, Arteaga GM, Pena JR, Nowak G, Phillips RM, Sahai S, et al. Expression of slow skeletal troponin I in hearts of phospholamban knockout mice alters the relaxant effect of  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Circ Res* 2002;90:882–8.
- [95] Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in  $\beta$ -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol* 2000;278:H769–79.
- [96] Pena JR, Wolska BM. Troponin, I phosphorylation plays an important role in the relaxant effect of  $\beta$ -adrenergic stimulation in mouse hearts. *Cardiovasc Res* 2004;61:756–63.
- [97] Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, et al. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ Res* 1998;83:1205–14.
- [98] Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2131–9.
- [99] Koss KL, Grupp IL, Kranias EG. The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol* 1997;92 (Suppl 1):17–24.
- [100] Meyer M, Bluhm WF, He H, Post SR, Giordano FJ, Lew WY, et al. Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force–frequency relationship. *Am J Physiol* 1999;276:H779–85.
- [101] Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK. Human heart failure: cAMP stimulation of SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol* 1999;277:H474–80.
- [102] Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, et al. Relationship between  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 1999;99:641–8.
- [103] Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 1994;74:555–64.
- [104] Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:793–8.
- [105] del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, et al. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* 2001;104:1424–9.
- [106] Federica DM, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, et al. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999;100:2308–11.
- [107] Ito K, Yan X, Feng X, Manning WJ, Dillmann WH, Lorell BH. Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure. *Circ Res* 2001;89:422–9.
- [108] Pena JR, Goldspink PH, Prabhakar R, del Monte F, Hajjar RJ, Wiecek DF, et al. Neonatal gene transfer of SERCA2a improves the response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in a FHC  $\alpha$ -tropomyosin (Glu180Gly) mouse model. *FASEB J* 2004;18:A1216–7.
- [109] Pena JR, Szkudlarek AC, Goldspink PH, Heinrich LS, Prabhakar R, Monte F, et al. Neonatal gene transfer of SERCA2a alters hypertrophic gene expression and improves the response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in a FHC  $\alpha$ -tropomyosin (Glu180Gly) mouse model. *Circulation* 2006;114:166.
- [110] Suarez J, Belke DD, Gloss B, Dieterle T, McDonough PM, Kim YK, et al. *In vivo* adenoviral transfer of sorcin reverses cardiac contractile abnormalities of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 2004;286:H68–75.
- [111] Huq F, Lebeche D, Iyer V, Liao R, Hajjar RJ. Gene transfer of parvalbumin improves diastolic dysfunction in senescent myocardium. *Circulation* 2004;109:2780–5.
- [112] Coutu P, Bennett CN, Favre EG, Day SM, Metzger JM. Parvalbumin corrects slowed relaxation in adult cardiac myocytes expressing hypertrophic cardiomyopathy-linked  $\alpha$ -tropomyosin mutations. *Circ Res* 2004;94:1235–41.
- [113] Arber S, Hunter JJ, Ross Jr J, Hongo M, Sansig G, Borg J, et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997;88:393–403.
- [114] Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, et al. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 1999;99:313–22.
- [115] Sato Y, Kiriazis H, Yatani A, Schmidt AG, Hahn H, Ferguson DG, et al. Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in caldesmon overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J Biol Chem* 2001;276:9392–9.
- [116] Sato Y, Ferguson DG, Sako H, Dorn GW, Kadambi VJ, Yatani A, et al. Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac caldesmon is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 1998;273:28470–7.
- [117] Delling U, Sussman MA, Molkenin JD. Re-evaluating sarcoplasmic reticulum function in heart failure. *Nat Med* 2000;6:942–3.
- [118] del Monte F, Harding SE, Dec GW, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation* 2002;105:904–7.
- [119] Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y, Minamisawa S, Date MO, Gu Y, et al. Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via *in vivo* cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med* 2002;8:864–71.

- [120] Song Q, Schmidt AG, Hahn HS, Carr AN, Frank B, Pater L, et al. Rescue of cardiomyocyte dysfunction by phospholamban ablation does not prevent ventricular failure in genetic hypertrophy. *J Clin Invest* 2003;111:859–67.
- [121] Freeman K, Lerman I, Kranias EG, Bohlmeyer T, Bristow MR, Lefkowitz RJ, et al. Alterations in cardiac adrenergic signaling and calcium cycling differentially affect the progression of cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2001;107:967–74.
- [122] Pena JR, Goldspink PH, Heinrich LS, Kranias EG, Wieczorek DF, Wolska BM. Phospholamban knockout alters hypertrophic gene expression and improves cardiac function in a HCM  $\alpha$ -tropomyosin (Glu180Gly) mouse. *Circ Res* 2008;103:E40.
- [123] Westermann D, Knollmann BC, Steendijk P, Rutschow S, Riad A, Pauschinger M, et al. Diltiazem treatment prevents diastolic heart failure in mice with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2006;8:115–21.
- [124] Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 1993;342:1085–6.
- [125] Tesson F, Dufour C, Moolman JC, Carrier L, al-Mahdawi S, Chojnowska L, et al. The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:831–8.
- [126] Candy GP, Skudicky D, Mueller UK, Woodiwiss AJ, Sliwa K, Luker F, et al. Association of left ventricular systolic performance and cavity size with angiotensin-converting enzyme genotype in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999;83:740–4.
- [127] Tsoutsman T, Lam L, Semsarian C. Genes, calcium and modifying factors in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:139–45.
- [128] Brugada R, Kelsey W, Lechin M, Zhao G, Yu QT, Zoghbi W, et al. Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig Med* 1997;45:542–51.
- [129] Doolan G, Nguyen L, Chung J, Ingles J, Semsarian C. Progression of left ventricular hypertrophy and the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2004;96:157–63.
- [130] Deinun J, van Gool JM, Kofflard MJ, Ten Cate FJ, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptors and cardiac hypertrophy in women with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 2001;38:1278–81.
- [131] Forleo C, Sorrentino S, Guida P, Romito R, De Te, Iacoviello M, et al. Beta1- and beta2-adrenergic receptor polymorphisms affect susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2007;8:589–95.
- [132] Lechin M, Quinones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, et al. Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92:1808–12.
- [133] Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, Ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, et al. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998;32:825–30.
- [134] Patel R, Lim DS, Reddy D, Nagueh SF, Lutucuta S, Sole MJ, et al. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2369–77.
- [135] Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, Watanabe M, Nakagawa I, Machida M, et al. Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1997;133:184–9.
- [136] Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, et al. The Ile164  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998;102:1534–9.
- [137] Liggett SB.  $\beta_2$ -Adrenergic receptor polymorphisms and sudden cardiac death: a signal to follow. *Circulation* 2006;113:1818–20.
- [138] Paczkowska A, Szperl M, Malek L, Mazurkiewicz L, Skora E, Grzybowski J, et al. Polymorphisms of the  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptors in Polish patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Kardiol Pol* 2009;67:235–41.
- [139] Woodiwiss AJ, Badenhorst D, Sliwa K, Brooksbank R, Essop R, Sareli P, et al.  $\beta_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoreceptor variants as predictors of clinical aspects of dilated cardiomyopathy in people of African ancestry. *Cardiovasc J Afr* 2008;19:188–93.
- [140] Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, Syed FM, Matkovich SJ, Hahn HS, et al. A GRK5 polymorphism that inhibits  $\beta$ -adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nat Med* 2008;14:510–7.
- [141] Badenhorst D, Norton GR, Sliwa K, Brooksbank R, Essop R, Sareli P, et al. Impact of  $\beta_2$ -adrenoreceptor gene variants on cardiac cavity size and systolic function in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Pharmacogenomics J* 2007;7:339–45.
- [142] Fragoso JM, Rodriguez-Perez JM, Gonzalez J, Cruz D, Perez-Mendez O, de Jesus GJ, et al.  $\beta_1$ -adrenergic receptor gene polymorphisms in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol* 2006;80:279–82.
- [143] Forleo C, Rosta N, Sorrentino S, Guida P, Manghisi A, De V L, et al. Association of  $\beta$ -adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med* 2004;117:451–8.
- [144] Herrmann S, Schmidt-Petersen K, Pfeifer J, Perrot A, Bit-Avragim N, Eichhorn C, et al. A polymorphism in the endothelin-A receptor gene predicts survival in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2001;22:1948–53.
- [145] Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, et al. Characterization of a unique genetic variant in the  $\beta_1$ -adrenoreceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *CARDIGENE Group. J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1025–32.
- [146] Loh E, Rebbbeck TR, Mahoney PD, Denofrio D, Swain JL, Holmes EW. Common variant in AMPD1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation* 1999;99:1422–5.
- [147] Yoneya K, Okamoto H, Machida M, Onozuka H, Noguchi M, Mikami T, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1995;130:1089–93.
- [148] Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, et al. Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2005;26:2457–62.
- [149] Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, et al. The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. *Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15:79–87.
- [150] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med* 1999;341:709–17.
- [151] Blauwet LA, Ackerman MJ, Edwards WD, Riehle DL, Ommen SR. Myocardial fibrosis in patients with symptomatic obstructive hypertrophic cardiomyopathy: correlation with echocardiographic measurements, sarcomeric genotypes, and pro-left ventricular hypertrophy polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Pathol* 2009;18:262–8.
- [152] Chai W, Hoedemaekers Y, van Schaik RH, van FM, Garrelts IM, Saris JJ, et al. Cardiac aldosterone in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006;7:225–30.
- [153] Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R, Lutucuta S, Nemoto S, et al. Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;109:1284–91.
- [154] Rao L, Zhou B, Wang B, Wang YP, Li YB, Zhang L. [Study on association between aldosterone synthase gene polymorphism and the left ventricular structure and function of patients with dilated cardiomyopathy in China]. *Sichuan Daxue Xuebao Yixue Ban* 2004;35:809–11.
- [155] Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M. Lack of association of polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Hypertens* 1997;10:921–8.
- [156] Buck PC, Fernandes F, Arteaga E, Matsumoto AY, Araujo AQ, Oliveira EM, et al. Association of angiotensin-converting enzyme activity and polymorphism with echocardiographic measures in familial and nonfamilial hypertrophic cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:717–21.
- [157] Goineau S, Pape D, Guillo P, Ramee MP, Bellissant E. Combined effects of enalapril and spironolactone in hamsters with dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:49–59.
- [158] Laviolle B, Pape D, Turlin B, Bellissant E. Direct effects of 3 combinations of enalapril, metoprolol, and spironolactone on cardiac remodeling in dilated cardiomyopathic hamsters. *J Card Fail* 2006;12:752–8.
- [159] Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001;103:789–91.
- [160] Penicka M, Gregor P, Kerekes R, Marek D, Curila K, Krupicka J. The effects of candesartan on left ventricular hypertrophy and function in nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy: a pilot, randomized study. *J Mol Diagn* 2009;11:35–41.
- [161] Araujo AQ, Arteaga E, Ianni BM, Buck PC, Rabello R, Mady C. Effect of Losartan on left ventricular diastolic function in patients with nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2005;96:1563–7.
- [162] Patel R, Nagueh SF, Tsybouleva N, Abdellatif M, Lutucuta S, Kopelen HA, et al. Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001;104:317–24.
- [163] Senthil V, Chen SN, Tsybouleva N, Halder T, Nagueh SF, Willerson JT, et al. Prevention of cardiac hypertrophy by atorvastatin in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2005;97:285–92.
- [164] Marian AJ, Senthil V, Chen SN, Lombardi R. Antifibrotic effects of antioxidant N-acetylcysteine in a mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy mutation. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:827–34.
- [165] Wang J, Xu SJ, Zhou H, Wang LJ, Hu B, Fang F, et al. A novel mutation of the beta myosin heavy chain gene responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 2009;32:E16–21.
- [166] Landstrom AP, Parvatiyar MS, Pinto JR, Marquardt ML, Bos JM, Tester DJ, et al. Molecular and functional characterization of novel hypertrophic cardiomyopathy susceptibility mutations in TNNC1-encoded troponin C. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:281–8.
- [167] Arimura T, Matsumoto Y, Okazaki O, Hayashi T, Takahashi M, Inagaki N, et al. Structural analysis of obscurin gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:281–7.
- [168] Duboscq-Bidot L, Xu P, Charron P, Neyroud N, Dilanian G, Millaire A, et al. Mutations in the Z-band protein myopalladin gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2008;77:118–25.
- [169] Arimura T, Bos JM, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, et al. Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:334–42.
- [170] Duboscq-Bidot L, Charron P, Ruppert V, Fauchier L, Richter A, Tavazzi L, et al. Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2009;30:2128–36.
- [171] Osio A, Tan L, Chen SN, Lombardi R, Nagueh SF, Shete S, et al. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2007;100:766–8.
- [172] Landstrom AP, Weisleder N, Bataalden KB, Bos JM, Tester DJ, Ommen SR, et al. Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:1026–35.