

ARIANI CAVAZZANI SZKUDLAREK

**EFEITOS DA MUTAÇÃO DA TROPOMIOSINA GLU180GLY NOS
PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE DO MÚSCULO ESTRIADO
CARDÍACO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Rosalvo T. H. Fogaça

CURITIBA

2004

ARIANI CAVAZZANI SZKUDLAREK

**EFEITOS DA MUTAÇÃO DA TROPOMIOSINA GLU180GLY NOS
PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE DO MÚSCULO ESTRIADO
CARDÍACO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Rosalvo T. H. Fogaça

CURITIBA

2004

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, que dedicaram toda
a vida aos filhos.

AGRADECIMENTOS

É muito bom passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer, e querer a tantos homenagear ...

É muito bom dizer **obrigada** a tanta gente que, neste período, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço, alegrias, conseguiu se manter simplesmente presente. Por isso, as homenagens.

Ao bom Deus, a Graça de estar simplesmente viva, e de poder ter chegado até aqui.... Foi justamente no primeiro ano do Mestrado que um "incidente" - bem no meio de um tremendo clima acadêmico - acrescentou um milhão de motivos para que eu possa dizer *Graças a Deus!*

A meu Pai, Ariadne. Pelo imenso amor, constante estímulo, enorme compreensão e pelas orações.

A minha Mãe, Erenice. Pelo amor imenso, carinho constante, confortável força e pelas orações.

Ao meu irmão, Denilson, sempre incentivador e orgulhoso e sua esposa, minha amiga, Carla Daniele, pela grande amizade e apoio.

Aos meus tios e tias, primos e primas, que são parte muito importante de minha vida.

A Professora Beata Wolska, pela eterna paciência em acompanhar todos os ritmos deste trabalho e por tantas luzes que me deu.

Ao Professor Fogaça, que teve importância fundamental nos momentos mais decisivos do meu trabalho, cujas valiosas orientações permitiram a conclusão deste trabalho.

A Professora Ilana, que me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica e de Educação, além de me apoiar e acreditar no meu trabalho.

Aos demais professores do departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação acadêmica e para realização deste trabalho.

Ao Fernando L. Dias, pelos inúmeros ensinamentos sobre técnicas laboratoriais, programas de computador, além da amizade e apoio permanente para realização deste trabalho.

A Cibele R. Dias, pela amizade e ajuda fundamental na aquisição de dados experimentais.

Ao Edson, que muitas vezes foi amigo e professor .

A Daniele Medeiros que esteve a meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos e amigas, que embora não tenham contribuído diretamente, estão sempre ao meu lado.

Em especial aos meus sobrinhos Ana Letícia, Ana Luísa e Denilson Júnior por “lerem” meus artigos e livros muitas vezes junto comigo...

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VIII
RESUMO.....	X
1.0 INTRODUÇÃO.....	02
1.1 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO – CONTRAÇÃO NO MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO.....	04
1.2. ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO DO MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO.....	05
1.2.1 Sarcolema e Túbulos Transversos.....	06
1.2.2 Retículo Sarcoplasmático (RS).....	09
1.2.3 Mitocôndria	10
1.2.4 Miofilamentos.....	10
1.2.5 Participação do Cálcio na Fisiologia do Músculo Cardíaco.....	11
1.3 BOMBA DE CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (SERCA2) E FOFOLAMBANO (FL).....	13
1.3.1 Relaxamento da célula muscular cardíaca.....	15
1.4 REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO PELA TROPOMIOSINA.....	16
1.5 CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA FAMILIAR (FHC).....	20
1.6 OS EFEITOS DA MUTAÇÃO GLU180GLY.....	22
2.0 OBJETIVOS.....	29
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 ANIMAIS.....	30
3.2 PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	

(PCR).....	31
3.2.1 Obtenção de amostras e extração de DNA.....	31
3.2.2 PCR para TM Glu180Gly.....	31
3.2.3 Experimentos com músculo papilar.....	32
3.2.4 Análise Estatística.....	33
4.0 RESULTADOS.....	35
4.1 MORFOLOGIA CARDÍACA DE CAMUNDONGOS NÃO – TRANSGÊNICOS (TG) E TRANSGÊNICOS (TG) COM SEIS SEMANAS DE VIDA.....	35
4.2 PCR para TM glu180gly.....	36
4.3 ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA.....	36
4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ISO NA FORÇA DESENVOLVIDA.....	37
4.4.1 Duas semanas de vida.....	38
4.4.2 Camundongos entre três e quatro semanas de vida.....	39
4.5 RELAÇÃO FORÇA – FREQUÊNCIA.....	42
4.6 PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE.....	45
4.6.1 Camundongos entre duas e três semanas de vida.....	45
4.6.2 Camundongos com três a quatro semanas de vida.....	51
5.0 DISCUSSÃO.....	56
6.0 CONCLUSÃO.....	63
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 01 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO NO MÚSCULO CARDÍACO
- FIGURA 02 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS TÚBULOS T E RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO ASSOCIADOS COM INÚMERAS MIOFRIBILAS EM MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RÃ.
- FIGURA03 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS TÚBULOS T E RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO E MIOFILAMENTOS EM MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO DE MAMÍFEROS.
- FIGURA 04 DESENHO ESQUEMÁTICO DO MODELO DOS TRÊS ESTADOS DE CONTRAÇÃO MUSCULAR
- FIGURA 05 RECONSTRUÇÕES TRIDIMENSIONIAS DOS FILAMENTOS FINOS INTERAGINDO COM OS FILAMENTOS GROSSOS.
- FIGURA 06 REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO SARCÔMERO MOSTRANDO OS FILAMENTOS FINOS E GROSSOS E A LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE SÃO MUTADAS NA FHC.
- FIGURA 07 MORFOLOGIA CARDÍACA DOS CAMUNDONGOS TG PORTADORES DA MUTAÇÃO GLU180GLY DA TM (LINHA SUPERIOR) E NTG (LINHA INFERIOR) DE 1 À 5 MESES DE IDADE.
- FIGURA 08 RELAÇÕES CÁLCIO-FORÇA EM BANDAS DE FIBRAS DESMEMBRADAS DE CAMUNDONGOS GLU180GLY (TG) E NTG COM 2,5 MESES DE IDADE
- FIGURA 09 MORFOLOGIA CARDÍACA DE CAMUNDONGO NÃO – TRANSGÊNICO (A) E TRANSGÊNICO (B) COM SEIS SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 10 PCR PARA TM GLU180GLY.
- FIGURA 11 ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA EM CAMUNDONGOS NTG E TG NAS IDADES ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA E ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 12 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO DESENVOLVIMENTO DE FORÇA EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) E TRANSGÊNICOS (TG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 13 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO DESENVOLVIMENTO DE FORÇA EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS NÃO – TRANSGÊNICOS E TRANSGÊNICOS ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 14 REGISTRO DA CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR À 3 HZ, MOSTRANDO OS EFEITOS DA AÇÃO DE ISO NAS DOSES DE 10, 100 E 1000 η M. A) ANIMAIS NTG; B) ANIMAIS TRANSGÊNICOS.
- FIGURA15 RELAÇÃO FORÇA – FREQUÊNCIA EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDODE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA. TEMPERATURA: 25 GRAUS CELSIUS; CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA

- FIGURA 16 RELAÇÃO FORÇA – FREQUÊNCIA EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA. TEMPERATURA: 25 GRAUS CELSIUS; CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA
- FIGURA 17 REGISTRO DA CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR MOSTRANDO AS FREQUÊNCIAS DE 0,2, 1, 2 E 3 HZ.
- FIGURA 18 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO DE CONTRAÇÃO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO -TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 19 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO DE CONTRAÇÃO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO-TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA
- FIGURA 20 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 21 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 22 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 23 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA
- FIGURA 24 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 25 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA
- FIGURA 26 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO DE CONTRAÇÃO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO -TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 27 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO DE CONTRAÇÃO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO-TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 28 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA
- FIGURA 29 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS

- TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA.
- FIGURA 30 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA
- FIGURA 31 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA
- FIGURA 32 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA
- FIGURA 33 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA - American Heart Association (Associação Americana do Coração)

ATP - Trifosfato de Adenosina

cTnC - Troponina C cardíaca

cTnI - Troponina I cardíaca

cTnT - Troponina T cardíaca

DNA - Ácido desoxirribonucléico

FHC - Cardiomiopatia Hipertrófica Familiar

FFR – Relação Força - Frequência

g - Gramas

Hz - Hertz (unidade de frequência)

NTG – Animais Não - Transgênicos

η M - Nanomolar

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RT50 – Tempo para 50% do relaxamento muscular

RT75 – Tempo para 75% do relaxamento muscular

RT90 – Tempo para 90 do relaxamento muscular

TG – Animais Transgênicos

TM - Tropomiosina

TTP- Tempo para o pico de contração

RESUMO

A Cardiomiopatia Hipertrófica Familiar (FHC) é causada por uma mutação em uma das proteínas do aparato contrátil cardíaco, incluindo a α - tropomiosina (α - TM). Este estudo usou músculo papilar esquerdo de camundongos transgênicos (TG) com uma mutação na α - TM, sendo esta uma substituição de aminoácidos no códon 180 da molécula (Glu180Gly) e músculo papilar esquerdo de camundongos não – transgênicos (NTG), ambos nas idades de 2 à 3 semanas de vida e de 3 à 4 semanas de vida. Estes músculos papilares foram estimulados eletricamente à diferentes frequências (0,2, 1, 2 e 3 Hz) e estimulados β - adrenergicamente com o uso de Isoproterenol na frequência de 3 Hz, na temperatura de 25^oC. Foi mostrado que a mutação Glu180Gly da α - TM leva a uma grande disfunção diastólica que está presente no estado basal e também após estimulação β - adrenérgica (Isoproterenol). No entanto, os animais TG apresentaram um maior índice de aceleração do relaxamento em resposta ao aumento da frequência de estimulação e em resposta a estimulação β - adrenérgica, demonstrando que os animais portadores da mutação da TM Glu180Gly apresentam capacidade de responder adequadamente ao aumento da frequência de estimulação e à estimulação β - adrenérgica com aumento da velocidade de relaxamento, porém, estes não reverteram a disfunção diastólica encontrada. O índice de hipertrofia cardíaca (peso do coração em miligramas/peso corporal em gramas) foi maior nos animais TG. Além disso, os animais TG apresentaram uma relação força – frequência (FFR) descendente na temperatura de 25^oC e contração isométrica, enquanto os animais NTG apresentaram uma FFR inicialmente bifásica que posteriormente tendeu a se manter em um determinado nível de força nas mesmas condições. Assim, especula-se que a superexpressão da SERCA2 possivelmente aumentaria as velocidades de relaxamento e contração cardíaco, além de aumentar o estoque de cálcio e assim sua disponibilidade para contração, tendo um efeito inotrópico positivo sobre o coração. Uma inibição parcial da expressão de FL possivelmente teria o efeito de aumentar as velocidades de contração e relaxamento cardíacos, portanto também tendo um efeito inotrópico positivo sobre o coração, o que, em última análise, pode vir a ser um importante recurso para os pacientes portadores desta mutação quando diagnosticada precocemente.

Palavras – chave: α - tropomiosina (α - TM), Cardiomiopatia Hipertrófica Familiar (FHC), Transgenia, Contratibilidade cardíaca.

1. INTRODUÇÃO

Existem bilhões de tipos de moléculas orgânicas conhecidas. Apenas muito poucas são utilizadas para as atividades essenciais à vida. Os mesmos padrões são empregados repetidas e repetidas vezes, conservativamente e engenhosamente para diferentes funções (SAGAN, 1980).

A tropomiosina é uma molécula essencial para a vida de muitos animais. Esta proteína faz parte da unidade funcional muscular: o sarcômero. Neste trabalho foi estudado uma das mutações que podem ocorrer nos genes que codificam a molécula de tropomiosina encontrada em músculo cardíaco (α - Tropomiosina). Esta mutação altera sua estrutura e principalmente seu funcionamento, o que em última análise, leva a deficiência e falência cardíaca.

Uma das propriedades do músculo estriado cardíaco é a contratilidade.

O músculo cardíaco está acoplado a um sistema circulatório que opera, juntamente com os outros sistemas, para manter a homeostasia dos líquidos corporais.

Para funcionar adequadamente, o coração necessita, além de outras, da expressão adequada das proteínas sarcoméricas. As proteínas sarcoméricas estão essencialmente envolvidas no processo de contração. Cada uma destas proteínas possui diferentes isoformas, de acordo com o tipo muscular na qual é expressa. Mutações dos genes que codificam as proteínas sarcoméricas alteram a estrutura protéica, o que altera, em última instância, o funcionamento cardíaco.

As doenças cardiovasculares são as que mais matam no mundo (REDWOOD 1999, AHA), portanto constituem um foco importante e permanente de pesquisas científicas.

Neste estudo visou-se mostrar as alterações nos parâmetros de contratilidade do músculo estriado cardíaco que ocorrem em um subtipo de patologia cardíaca. Conhecida como a “doença do sarcômero”, a patologia cardíaca cientificamente chamada cardiomiopatia hipertrófica familiar (FHC) envolve uma mutação nos genes que codificam uma de 6 proteínas que fazem parte do aparelho contrátil cardíaco.

Esta patologia, muitas vezes não é diagnosticada e os indivíduos portadores possuem hipertrofia ventricular que pode evoluir para uma morte repentina principalmente durante a prática de exercícios físicos ou estresse emocional (WOLSKA *et al.*, 1998).

Neste trabalho foi estudado apenas um subtipo de mutação da Tropomiosina, apesar de que na FHC outros tipos de mutação podem ser encontradas. Existem 4 mutações da Tropomiosina (TM) que podem ser encontradas na FHC: Ala63Val, Lys70Thr, Asp175Asn e Glu180Gly, que foi a mutação estudada neste trabalho. Esta mutação estudada envolve uma permuta de aminoácidos na posição 180 da TM, sendo que ácido glutâmico é trocado por glicina. Ocorre uma mudança em apenas um nucleotídeo (GAG para GGG) que corresponde a substituição de aminoácidos no códon 180 da molécula de TM.

Animais transgênicos foram escolhidos para este estudo pois são muito úteis na pesquisa científica em fisiologia cardíaca, assim como em outras áreas porque permitem a correlação das propriedades contráteis bioquímicas e celulares com mudanças agudas e a longo prazo na função cardiovascular ao nível de órgão e de todo o organismo (LORENZ, 2002). Os experimentos foram feitos em camundongos, pois são nestes animais que as técnicas de transgenia são mais avançadas e utilizadas. Além disso, foi feito um controle preciso de todos os animais utilizados para os experimentos através de reação em cadeia da polimerase (PCR), com o objetivo de identificar quais eram os camundongos transgênicos (portadores da mutação Glu180Gly da tropomiosina) e quais eram os não - transgênicos.

Embora camundongos tenham algumas propriedades diferentes de humanos, ao nível de órgão e ao nível de todo o organismo, as alterações encontradas nos parâmetros contráteis dos animais portadores da mutação Glu180Gly da tropomiosina devem se refletir em humanos, já que é conhecida toda sequência de aminoácidos da molécula cardíaca de tropomiosina de camundongos e de humanos e mostrou-se que estas são iguais.

Atualmente alcançou-se um nível onde geneticistas de camundongos podem criar genocópias de qualquer aberração ou mutação encontrada em uma patologia. Assim, pode-se estudar os papéis fisiológicos e patológicos de qualquer proteína funcional ou regulatória no animal intacto (LORENZ, 2002). Portanto, a

utilização de animais transgênicos permite uma pesquisa avançada, sendo um recurso indispensável em muitos trabalhos.

É mostrado por alguns estudos (PRABHAKAR *et al.*, 2001; GOLITSINA *et al.*, 1997; MICHELE *et al.*, 1999; MUTHUCHAMY *et al.*, 1999), que a mutação Glu 180 Gly da TM leva a um prejuízo severo das funções contráteis e de relaxamento, que são associadas com hipertrofia severa e morte precoce. Sendo este subtipo de FHC altamente prejudicial às funções cardíacas, este estudo é de grande importância.

1.1 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO – CONTRAÇÃO NO MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO

Acoplamento excitação contração é o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável até a liberação de cálcio do Retículo sarcoplasmático (RS) e contração da célula muscular.

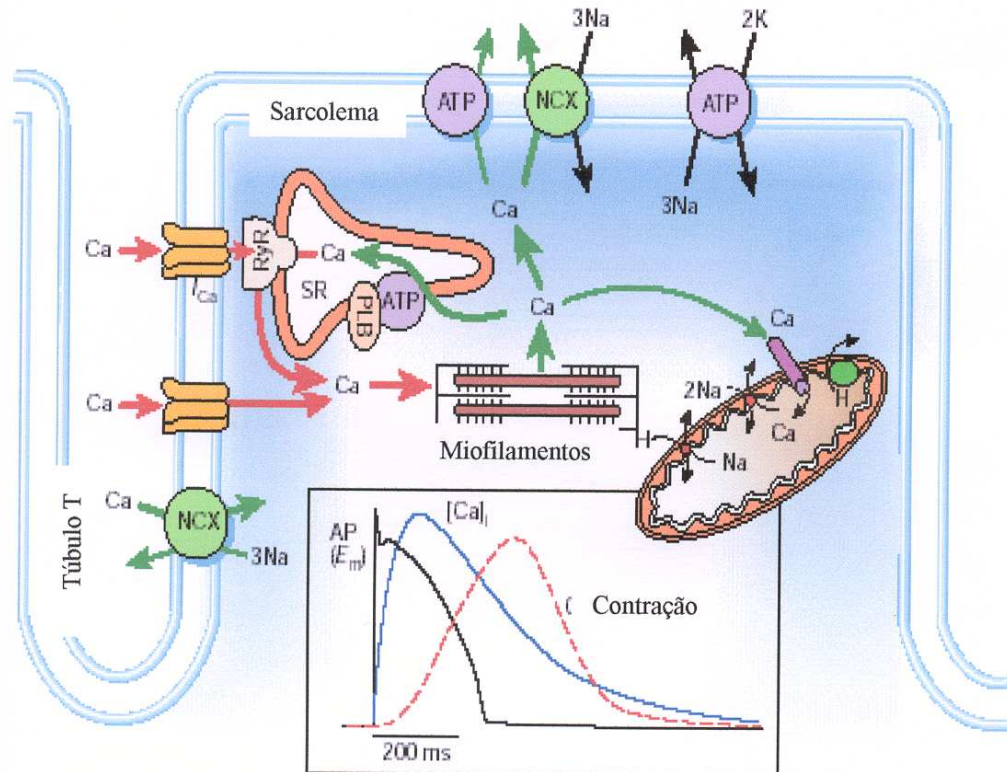
A figura 01 mostra esquematicamente o acoplamento excitação – contração no músculo estriado cardíaco.

O íon cálcio é essencial para atividade elétrica cardíaca juntamente com outros íons, sendo o ativador direto dos miofilamentos, induzindo contração, o que propulsiona o sangue.

Durante o potencial de ação cardíaco íons cálcio provenientes do meio extracelular alcançam o meio intracelular principalmente através dos canais lentos de cálcio, contribuindo para o platô do potencial de ação. Além disso, existe uma contribuição de menor significância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ agindo no sentido reverso, desta forma ajudando a elevar os níveis intracelulares de cálcio. O aumento do cálcio intracelular estimula (entre 2 à 3 ms) a abertura de canais de liberação de cálcio na membrana do retículo sarcoplasmático, chamados canais rianodínicos, e a combinação destas duas vias eleva a concentração intracelular deste íon e, como consequência da ligação do mesmo a sítios de baixa afinidade presente na subunidade da troponina C, provocam a ativação da contração muscular. É notável o fato que apenas uma pequena fração dos canais lentos de cálcio e dos canais rianodínicos do RS precisam abrir para produzir o fluxo adequado de cálcio (BERS, 2001).

No músculo cardíaco, o cálcio age principalmente como fator excitatório no processo contrátil. De modo inverso, uma diminuição da concentração fisiológica deste íon produz um efeito inotrópico negativo, ou seja, diminuindo a força de contração muscular, conseqüentemente diminuindo o débito cardíaco.

FIGURA 01 – ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO NO MÚSCULO CARDÍACO



FONTE: Bers, Donald M. Excitation Contraction Coupling and Cardiac Contraction Force, Kluwer Academic Publishers, 2001; 40.

1.2 ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO DO MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO

Como definido anteriormente, acoplamento excitação - contracção é o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável até a liberação de cálcio do RS e a contracção da célula muscular.

1.2.1 Sarcolema e Túbulos Transversos

O sarcolema e os túbulos transversos (Túbulos – T) são estruturas de membrana contínuas que formam uma barreira semi-permeável entre o interior da célula muscular cardíaca e o meio extracelular. Embora o nome sugira, na verdade os túbulos transversos (Túbulos T) existentes nas células cardíacas possuem vários componentes longitudinais e oblíquos, além de serem muito mais largos que os da célula muscular estriada esquelética, como mostrado nas figuras 02 e 03 (Bers, 2001). Nestas estruturas de membrana se localizam canais iônicos, transportadores de membrana e outras especializações de membrana. Canais de sódio, canais de potássio e bombas de Na^+/K^+ -ATPase são mais frequentes no sarcolema do que na superfície dos Túbulos-T em músculo estriado esquelético. Por outro lado, a densidade de canais de Cálcio (como canais dihidropiridínicos - DHPRs) é quatro vezes maior nos Túbulos -T (ALMERS *et al.*, 1981). Ainda, 30 a 50% da área sarcolemal de ventrículo de mamíferos é composta de Túbulos -T, e em átrio esta porcentagem cai para apenas 15% ou menos (BERS, 2001). Além disso, o diâmetro das células atriais é menor que o das células ventriculares em mamíferos e portanto necessitam menos Túbulos-T para ativação do que as células ventriculares (BERS, 2001).

Os Túbulos-T, no músculo estriado esquelético, estão envolvidos em complexos triádicos com o Retículo Sarcoplasmático (RS), onde dois lados de Túbulo-T, em sua face citoplasmática, estão justapostas e se acoplam com uma cisterna terminal de RS. Porém, em músculo estriado cardíaco, este acoplamento entre Túbulo- T e RS ocorre mais comumente como complexos diádicos, podendo ocorrer na superfície do sarcolema, ocupando 4 a 8% da área de superfície sarcolemal e na superfície dos Túbulos- T, ocupando 20 a 50% da área de superfície dos Túbulos-T (BERS, 1985).

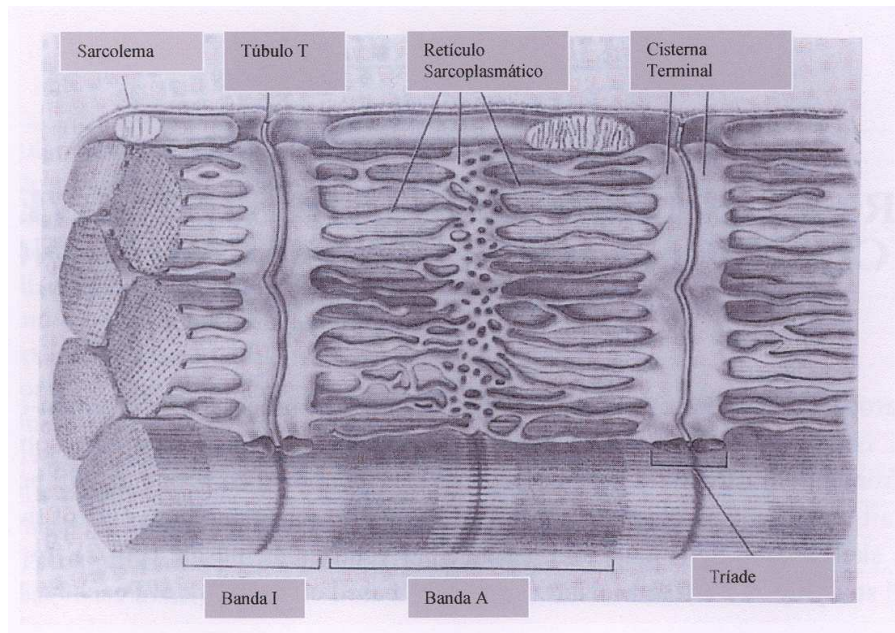
As figuras 02 e 03 representam a organização estrutural das células musculares de músculo estriado esquelético de rã (figura 02) e de músculo estriado cardíaco de mamíferos (figura 03), onde se percebe a maior organização estrutural das células musculares estriadas esqueléticas do que das células musculares estriadas cardíacas.

As invaginações de membrana denominadas cavéolas de 50 à 80 nm de diâmetro, ocupam cerca de 10% da superfície sacolermal e de túbulos-T (Anderson, 1993). Nestas cavéolas localiza-se a proteína caveolina-3, bem como proteínas receptoras sinalizadoras como sintase do óxido nítrico e a proteína quinase C (SONG *et al.*, FERON *et al.*, RYBIN *et al.*, 1999).

Discos intercalados também ocorrem na superfície do sarcolema e separam uma célula cardíaca da outra. Estes discos possuem três regiões diferenciadas. A primeira conhecida como junção aberta são as predominantes nos discos intercalados e servem como vias de baixa resistência elétrica, permitindo assim que as células musculares cardíacas funcionem como um sincício elétrico. A segunda região é conhecida como junção intermediária e a terceira como desmossomo. Estas últimas constituem importantes conectores mecânicos entre as células cardíacas (BERS, 2001).

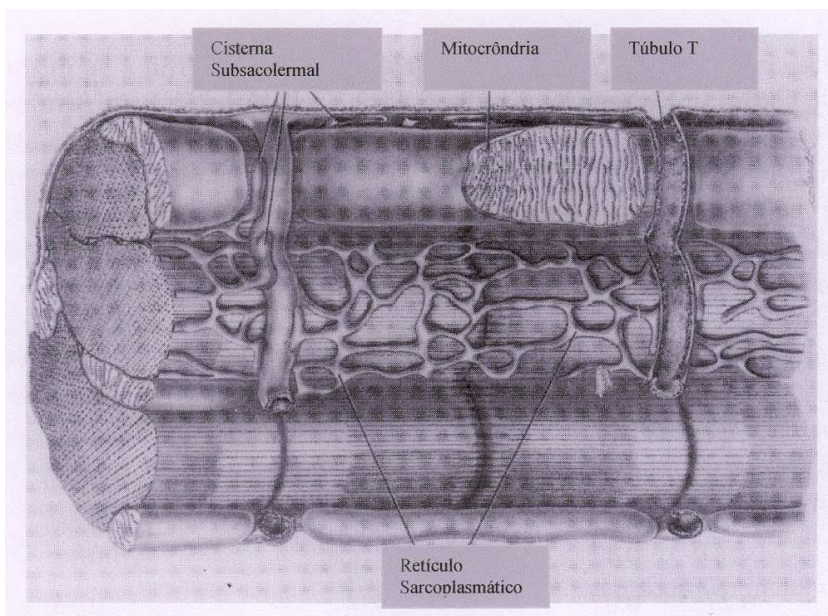
É importante ressaltar que as células musculares estriadas cardíacas (miócitos) estão em proximidade com o espaço vascular, que ocupa cerca de 59% do espaço extracelular cardíaco, permitindo desta forma um fácil acesso ao conteúdo vascular necessário para o metabolismo fornecedor de energia para estes miócitos (BERS, 2002).

FIGURA 02 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS TÚBULOS T E RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO ASSOCIADOS COM INÚMERAS MIOFIBRILAS EM MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RÃ.



FONTE: Bers, Donald M. *Excitation Contraction Coupling and Cardiac Contraction Force*, Kluwer Academic Publishers, 2001; 02-03.

FIGURA 03 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS TÚBULOS T E RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO E MIOFILAMENTOS EM MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO DE MAMÍFEROS.



FONTE: Bers, Donald M. *Excitation Contraction Coupling and Cardiac Contraction Force*, Kluwer Academic Publishers, 2001; 02-03.

1.2.2 Retículo Sarcoplasmático (RS)

O RS é uma organela fundamental no processo de acoplamento-excitação-contração de todas as células musculares, embora seja mais abundante em células musculares esqueléticas do que em miócitos, o que demonstra sua maior contribuição para ativação da contração na célula muscular estriada esquelética.

O RS armazena e libera o Cálcio do e para o mioplasma. O local de liberação de íons Cálcio é a cisterna terminal do RS. Nesta região se encontra uma proteína que está ancorada na membrana da cisterna terminal do RS e esta proteína projeta alças em formato de “dedos de pé” para a superfície externa do RS. Esta proteína é conhecida como receptor rianodínico (devido a alta afinidade do alcalóide rianodina). Este receptor é um canal de liberação de Cálcio. Cada monômero tem massa molecular de 560 kDa, sendo que o receptor funciona como tetrâmero (SAITO *et al.*, 1988; WAGENKNECHT *et al.*, 1989, 1994, 1995; SERESHEVA *et al.*, 1995, 1999). Um receptor rianodínico (RyR) se acopla com dois DHPRs em células musculares esqueléticas e quatro RyR se acoplam com dez DHPRs em miócitos ventriculares de mamíferos (BERS & STIFFEL, 1993; WIBO *et al.*, 1991). Este acoplamento funcional permite que um potencial de ação propagado através da membrana do sarcolema e/ou túbulo-T seja transmitido pelos DHPRs para os RyR levando a liberação de Cálcio para o mioplasma da célula muscular.

A membrana do RS é aproximadamente homogênea, com exceção das regiões de acoplamento entre RS, sarcolema e túbulos-T. Nesta membrana localiza-se a bomba de Cálcio, importantíssima para remoção dos íons Cálcio do mioplasma para dentro do RS.

Na cisterna terminal do RS existe uma proteína que se liga aos íons Cálcio com alta capacidade e baixa afinidade conhecida como calsequestrina. Esta mantém um estoque de íons Cálcio que podem prontamente ser usados para contração, ao mesmo tempo que diminui a concentração de íons Cálcio livres no RS, minimizando a energia necessária para remoção dos íons Cálcio do mioplasma para dentro do RS pela bomba de Cálcio do RS (BERS, 1985; BERS, 2001).

A localização de proteínas do RS foi estudada por Scriven *et al.* (2000). Primeiramente foi encontrado que todos os DHPRs se encontram próximos dos RyR, entretanto alguns RyR não se encontram próximos de DHPRs. Canais de

Sódio e trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ não estão localizados nas regiões de acoplamento entre DHPRs e RyR, portanto, estes tem função limitada no acoplamento excitação contração.

1.2.3 Mitocôndria

Em mamíferos, 35% do volume das células musculares ventriculares é ocupado por mitocôndrias, já que estas são as responsáveis pela grande produção de energia necessária para o funcionamento das células musculares estriadas cardíacas. A produção de energia ocorre através da fosforilação oxidativa e do ciclo do ácido cítrico. No coração, as mitocôndrias são usualmente cilíndricas, embora possam se achatar um pouco por falta de espaço dentro das células (BERS, 2001).

Além de gerar energia para a contração muscular, as mitocôndrias possuem um papel direto, ainda que muito pequeno, no acoplamento excitação – contração da célula muscular cardíaca.

A mitocôndria possui um sistema de uniporte de íons cálcio que captura o íon para o interior da organela, contribuindo para o relaxamento da célula muscular cardíaca. Porém, esta contribuição é de 1% a no máximo 3% do total de íons cálcio que são recaptados durante o relaxamento muscular (BERS, 2002).

1.2.4 Miofilamentos

Os miofilamentos ocupam 45 à 60% do volume celular em ventrículo de mamíferos e uma fração menor que esta em átrio e células de Purkinge (especializadas em condução elétrica). São compostos de filamentos finos (actina), filamentos grossos (miosina), proteínas contráteis associadas e proteínas do citoesqueleto.

Os miofilamentos são os responsáveis pela transdução da energia química em energia mecânica e trabalho na forma de contração muscular.

Cada filamento grosso contém cerca de trezentas moléculas de miosina além de outras proteínas como titina e proteína-C. Cada cadeia pesada de miosina, com peso molecular (PM) de 450.000 possui uma longa α -hélice e uma cabeça globular,

com atividade ATPase, a qual forma as pontes cruzadas que interagem com a actina no filamento fino (BERS, 2001).

O filamento fino possui duas cadeias da proteína globular actina-G, formando um polímero filamentar chamado actina-F. A tropomiosina (TM) é uma proteína longa flexível em α -hélice que cobre sete monômeros de actina (LEHRER *et al.*, 1997). Um complexo Troponina se liga a tropomiosina e assim a actina a cada sete monômeros de actina. Este complexo é formado de três subunidades: Troponina-C (TnC), que é a subunidade ligadora de Cálcio, Troponina-T (TnT), que é a subunidade que se liga a tropomiosina e a Troponina-I (TnI), que é a subunidade inibidora e que também se liga a actina. A TnT possui uma região carboxi-globular e uma forma alongada que percorre a molécula de tropomiosina e três monômeros de actina, assim a TnT pode controlar a posição da TM. A TnI, próximo de sua região amino-terminal, interage com a região carboxi-terminal de ambas TnT e TnC. Esta interação depende da ligação de Cálcio ou Magnésio no sítio carboxi-terminal da TnC, que em geral, está quase totalmente ocupado. Durante o relaxamento da célula muscular, a região carboxi-terminal da TnI também se liga a actina, impedindo a cabeça da miosina de se ligar com a actina. Após o aumento da concentração intracelular de íons Cálcio, estes se ligam na região amino-terminal da TnC, o qual possui um sítio de ligação para Cálcio e dois sítios que ligam Cálcio ou Magnésio competitivamente, então, parte da TnC se liga a região carboxi-terminal da TnI e isto causa a dissociação da TnI da actina. A TnT provoca o movimento da Tropomiosina descobrindo os sítios de ligação de alta afinidade entre as cabeças de miosina e a actina permitindo a interação actino-miosina (FLICKER *et al.*, 1982; BERS, 2001).

1.2.5 Participação do Cálcio na Fisiologia do Músculo Cardíaco

Como citado anteriormente, o íon cálcio é um dos íons essenciais para atividade elétrica cardíaca e é o ativador primário dos miofilamentos, causando contração, o que promove a elevação da pressão intracavitária e conseqüentemente propulsiona o sangue através do sistema circulatório.

O fluxo de cálcio para o interior da célula cardíaca se faz principalmente através de canais lentos dependentes de voltagem (canais de Cálcio tipo L). A

regulação destes canais dá-se por vários mecanismos, incluindo: níveis de adenosina trifosfato (ATP), mudanças no pH celular e os níveis de nucleotídeos cíclicos como o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e o monofosfato cíclico de guanina (GMPc). O AMPc, presumivelmente através da fosforilação dos canais ou de proteínas quinases (PK-A) reguladoras, estimula a abertura destes canais, aumentando o fluxo de cálcio para o interior da célula e iniciando a contração muscular. A formação de AMPc é regulada ou estimulada pela ação de uma série de agentes, incluindo o neurotransmissor simpático noradrenalina ou a epinefrina circulante. Ambos através da ligação com receptores beta-adrenérgicos. Outros agentes capazes de elevar os níveis de AMPc são a histamina, e inibidores da fosfodiesterase como a teofilina e a cafeína.

Já o GMPc tem efeito antagônico, ou seja, fosforila proteínas quinases inibitórias (PK-G), que inativam os canais lentos de cálcio. A ativação de receptores muscarínicos pela acetilcolina (neurotransmissor parassimpático), aumenta os níveis celulares de GMPc, diminuindo a contração muscular. Os níveis de ATP estão principalmente relacionados a canais de potássio, os quais têm sua atividade suprimida quando os níveis celulares daquele elemento estão diminuídos, o que ocorre, por exemplo durante isquemia ou hipóxia. A menor atividade dos canais de potássio reduz o efluxo deste íon, levando a um menor nível do potencial elétrico transmembrana, diminuindo a contração muscular.

Além dos canais lentos de cálcio, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, atuando de forma reversa também pode levar ao influxo de cálcio e disparar a liberação deste íon do RS, contudo, sob condições fisiológicas sua contribuição para a elevação na concentração mioplasmática de cálcio é muito menor que a dos canais lentos de cálcio.

Além dos mecanismos citados, o músculo cardíaco tem ainda uma variedade de vias intrínsecas e extrínsecas de regulação do influxo de cálcio. Esses mecanismos asseguram que a força e frequência de contração sejam controladas e ajustadas à demanda fisiológica (SPERELAKIS, 1987 e 1988).

1.3 BOMBA DE CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (SERCA2) E FOSFOLAMBANO (FL)

A velocidade de sequestro de íons cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático (RS) é o maior determinante da velocidade de relaxamento muscular (WOLSKA *et al*, 1993).

O RS tem um papel central na contração e no relaxamento cardíaco através da regulação da concentração intracelular de cálcio.

Existe um conjunto de bombas de Cálcio que se localizam na membrana do retículo sarcoplasmático (em células musculares) e endoplasmático (em células não – musculares) (SERCA2) que recapturam cálcio do meio intracelular para dentro da organela, levando a um relaxamento da célula muscular.

A deficiência de recaptção de cálcio para dentro do RS que ocorre em várias condições fisiopatológicas, inclusive em vários tipos de patologia cardíaca, entre elas, em vários subtipos de FHC, se torna mais aparente a altas frequências de estimulação (à partir de 2 Hz) (HASHIMOTO *et al*, 1999). Segundo Hashimoto *et al*. (1999), a inabilidade de recaptar e liberar cálcio suficiente para e do RS atenua o aumento da força que é normalmente observado a altas frequências de estimulação (a relação força frequência positiva). Porém, a baixas frequências de estimulação (0,2 a 0,5 Hz), o intervalo de tempo disponível para recaptção de cálcio para o RS é suficiente, portanto havendo pouca ou nenhuma diferença entre camundongos controle e camundongos portadores de uma patologia cardíaca específica que leva a deficiência da recaptção de cálcio para o interior do RS.

Durante o acoplamento excitação - contração, a liberação de cálcio do RS também contribui para inativação dos canais lentos de cálcio dependente de voltagem em aproximadamente 50%. Portanto, a liberação de cálcio pelo RS e o influxo do mesmo através dos canais lentos de cálcio criam um mecanismo de retroalimentação no influxo de cálcio. Desta forma, quando o influxo ou a liberação de cálcio é alto, existem mecanismos que impedem a sua continuidade. Este mecanismo eficiente de retroalimentação mostra o curtíssimo espaço de tempo entre o influxo de cálcio através dos canais lentos de cálcio do sarcolema e a liberação de cálcio do RS através dos canais rianodínicos.

Estudos nos quais a isoforma cardíaca de SERCA, chamada SERCA2, foi superexpressada (HASHIMOTO *et al.*, 2000; CHAUDHRI *et al.*, 2002; DAVIA *et al.*, 2001), foi encontrado aceleração da velocidade de relaxamento cardíaco e portanto elevação dos parâmetros contráteis, assim como estudos em camundongos heterozigotos para SERCA2 resultaram em diminuição da pressão ventricular sistólica e das velocidades de contração e relaxamento. Entretanto camundongos nos quais a expressão de SERCA2 foi totalmente inibida morrem ainda no útero (REDWOOD *et al.*, 1999). Por outro lado, Katsuji Hashimoto *et al.*, (1999), também estudando os efeitos da superexpressão de SERCA2, encontrou um efeito na habilidade do RS em estocar cálcio, aumentando os depósitos de cálcio no RS, portanto aumentando a disponibilidade de cálcio para ser liberado durante cada batimento cardíaco, principalmente a altas frequências de estimulação. No entanto não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo superexpressando SERCA2 na velocidade de relaxamento cardíaco. Embora esta velocidade tenha sido maior, não alcançou valores estatisticamente significativos. Além disso, os camundongos superexpressando SERCA2 exibiram uma relação força - frequência positiva, enquanto esta relação foi atenuada no grupo controle (sem superexpressão de SERCA2) e também apresentaram um aumento da amplitude do cálcio transiente comparado com o grupo controle e um aumento da geração de força em altas frequências de estimulação (2Hz), demonstrando sua maior habilidade para estocar cálcio no RS.

As enzimas transportadoras de cálcio presentes na membrana do RS (SERCAs) estão ligadas a uma fosfoproteína chamada fosfolambano que funciona inibindo continuamente estas bombas, porém, após fosforilação do fosfolambano pela proteína quinase A (PKA) ou pela proteína quinase C (PKC) esta inibição é atenuada e as bombas aumentam grandemente sua atividade (WOLSKA *et al.*, 1998). Portanto, deve haver uma perfeita relação entre inibição e liberação para um funcionamento adequado do músculo cardíaco.

Camundongos nos quais a expressão FL foi totalmente inibida são viáveis e indistinguíveis dos NTG em nível histológico. Porém, estudos bioquímicos e fisiológicos indicam uma afinidade maior da SERCA2 por cálcio e aumento das velocidades de contração e relaxamento. Além disso, há uma atenuação da estimulação dos parâmetros contráteis por agonistas β -adrenérgicos (PRABHAKAR

et al., 2001). Por outro lado, camundongos transgênicos superexpressando duas vezes mais FL, apesar de também não apresentarem alterações morfológicas, demonstram uma diminuição das velocidades de contração e relaxamento e esta diminuição está provavelmente associada à uma menor afinidade da SERCA2 por Cálcio (PRABHAKAR *et al.*, 2001).

1.3.1 Relaxamento da célula muscular cardíaca

Para que o relaxamento da fibra muscular ocorra é necessário que a concentração intracelular de cálcio diminua para os valores de repouso. Isso é conseguido por intermédio de três principais mecanismos:

1. A ativação da cálcio adenosina trifosfatase (SERCA2) na membrana do retículo sarcoplasmático, o que promove a recaptação do cálcio pelo retículo, sendo que este é o principal mecanismo recaptador de cálcio.

2. A ativação da Ca^{+2} -ATPase do sarcolema, a qual permite a saída do íon para o meio extracelular. O estímulo para que esses dois processos ocorram parece ser o próprio aumento do cálcio intracelular.

3. O trocador Ca^{+2} - Na^{+} presente na membrana celular, o qual utilizando a energia proveniente do gradiente eletroquímico do íon sódio transporta 3 íons sódio para o meio extracelular e um íon cálcio no sentido inverso. Tal mecanismo opera também em sentido reverso. Portanto, este sistema contribui tanto para a elevação quanto para a diminuição da concentração de cálcio intracelular, modulando assim a contração e o relaxamento. Além disso, com a repolarização celular ocorre a inativação dos canais lentos de cálcio, impedindo o fluxo do íon para o interior do sarcoplasma.

Além destes mecanismos, as mitocôndrias possuem um uniporte de cálcio, porém a contribuição para o relaxamento muscular é mínimo. Além destes, o sarcolema também possui um canal transiente de cálcio, porém, este é quase inexistente na maioria dos miócitos ventriculares.

1.4 REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO PELA TROPOMIOSINA

A tropomiosina é essencial para o perfeito funcionamento dos miofilamentos contráteis (CHO *et al.*, 1990; LEHRER *et al.*, 1997; CRAIG *et al.*, 2001; WOLSKA, 2003)

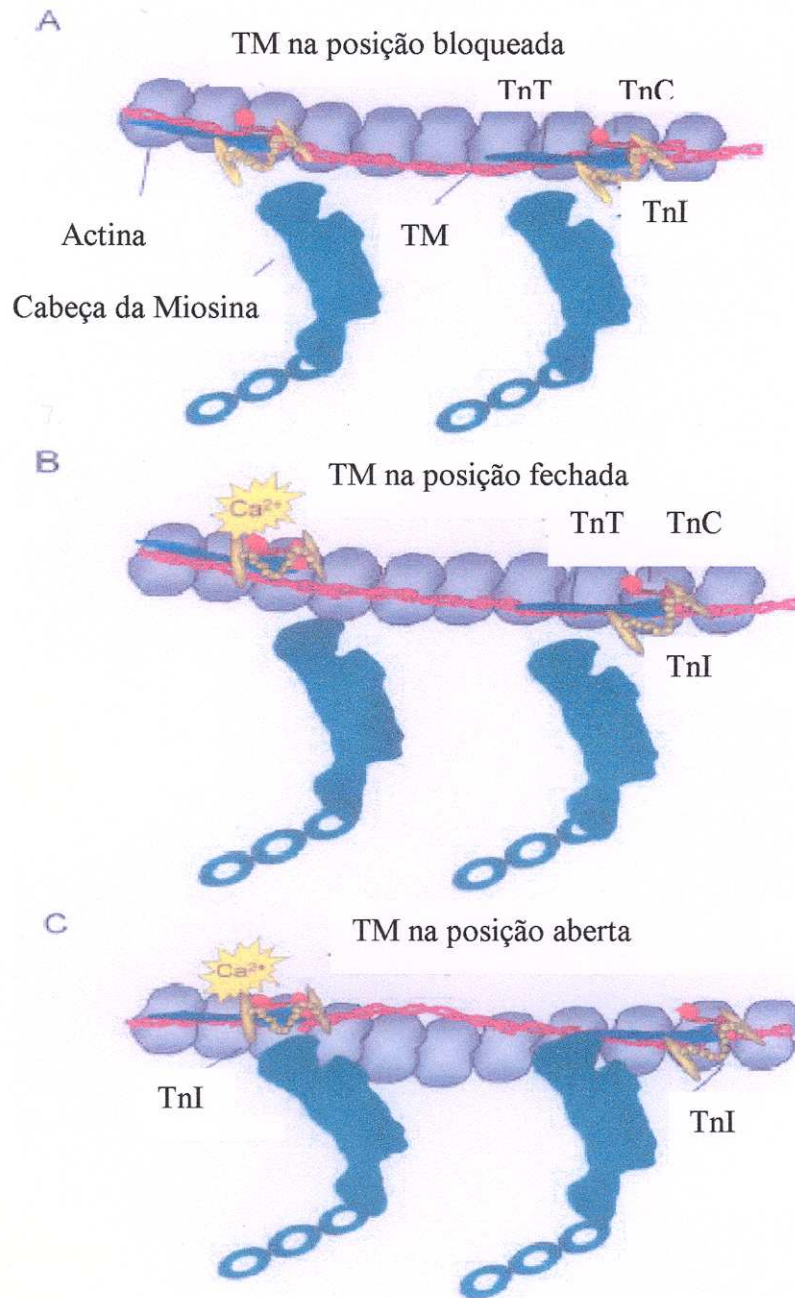
A TM se liga com sete monômeros de actina (com resíduos hidrofóbicos na primeira e quarta posições) e com o complexo Troponina, inibindo a ligação da actina com as cabeças globulares de miosina, inibição esta que é liberada quando íons cálcio se ligam a TnC e induzem uma alteração conformacional da tropomiosina, afastando-a dos sítios de ligação para miosina presente nos monômeros de actina e, portanto, permitindo que as cabeças de miosina se liguem à actina formando o que se denomina pontes cruzadas. Mais especificamente quando a concentração de íons cálcio é baixa, a tropomiosina bloqueia fisicamente os sítios de ligação de alta afinidade para miosina presentes na junção externa dos domínios externos e internos da actina, o que impede as pontes cruzadas de ciclar e induz relaxamento (figura 04 e 05). Entretanto esta posição da tropomiosina não bloqueia sítios de ligação eletrostática da miosina na periferia da actina, ou seja, ligações fracas da cabeça da miosina com a actina são ocasionalmente possíveis mesmo na ausência de cálcio (CRAIG *et al.*, 2001; WOLSKA, 2003).

A ativação da contração por cálcio parece ocorrer em duas etapas, nas quais a TM tem participação fundamental. Primeiramente a ligação de cálcio aos sítios na TnC libera a TnI da actina e permite movimento da TM para uma posição no domínio interno da actina (chamada posição fechada), descobrindo a maioria dos sítios de ligação de alta afinidade para miosina, mas ainda cobrindo um grupo de resíduos de aminoácidos envolvidos no estado de forte ligação com a miosina (figura 04 e 05). Esse estado permite a reação de pontes cruzadas fracas. Dessa forma, a TM está pronta para movimento, porém, a transição para o estado aberto da TM, na qual ocorre a ligação forte das cabeças de miosina com a actina, gerando força, ainda é parcialmente inibida.

Com o aumento do cálcio intracelular, a transição das pontes cruzadas fracas para pontes cruzadas fortes, geradoras de força, empurra a TM para uma terceira

posição (aberta), mais para dentro do domínio interno da actina (figura 05). Na posição aberta as cabeças de miosina apresentam polaridade. (CRAIG *et al.*, 2001).

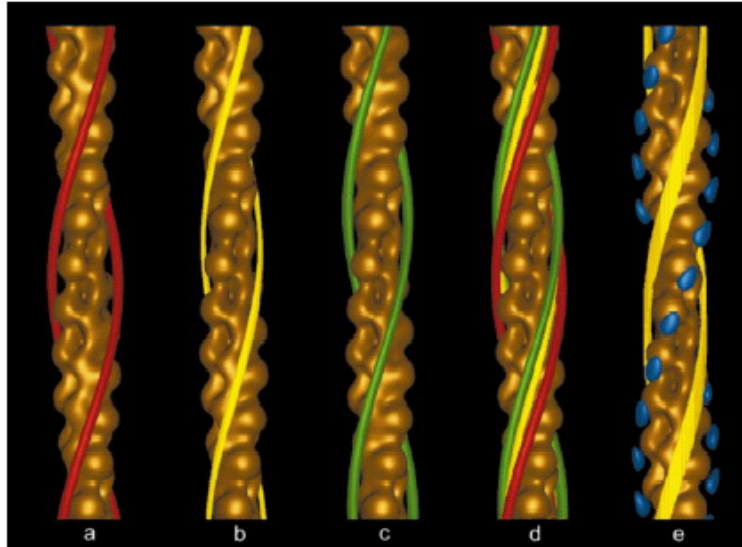
FIGURA 04 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO MODELO DOS TRÊS ESTADOS DE CONTRAÇÃO MUSCULAR.



FONTE: Wolska B. *Et al.* *The role of tropomyosin in the regulation of myocardial contraction and relaxation.* *European Journal of Physiology*, 2003; 446: 1-8.

NOTA: A TM É MOSTRADA NAS TRÊS POSIÇÕES: A) BLOQUEADA B) FECHADA C) ABERTA.

FIGURA 05 – RECONSTRUÇÕES TRIDIMENSIONAIS DOS FILAMENTOS FINOS INTERAGINDO COM OS FILAMENTOS GROSSOS.



FONTE: Craig R., et al. *Cross Bridge and Tropomyosin Positions Observed in Native, Interacting*

Thick and Thin Filaments. Journal of Molecular Biology, 2001; 311:1027-1036

NOTA: Nesta figura, durante relaxamento é mostrado a TM em vermelho (A), durante ativação é mostrado a TM em amarelo (B) e no estado de rigor é mostrado a TM em verde (C). Comparação das três posições da TM (d); filamentos ativados (e) também mostrando uma densidade adicional em azul não vista durante relaxamento e rigor observada na periferia do domínio externo da actina que representa o local de ligação da miosina no final do ciclo de pontes transversas.

Em condições de contração isotônica, na qual ocorre o deslizamento dos filamentos contráteis e encurtamento muscular, pontes cruzadas fortemente ligadas são transientes e raras, sendo estimadamente apenas 10% ou menos da população inteira de pontes cruzadas. Durante contração isométrica, na qual as cabeças de miosina se ligam com a actina não ocorrendo deslizamento dos filamentos e portanto sem encurtamento muscular, o número de pontes cruzadas fortemente ligadas sustentadoras de força aumenta consideravelmente.

A predominância de pontes cruzadas na posição não geradora de força sustenta a idéia que um número significativo de pontes cruzadas estão fracamente ligadas a actina no músculo em contração, enquanto apenas uma pequena porcentagem em um dado momento está fortemente ligada e gerando força. Esta

afirmação é verdadeira tanto para contração isotônica quanto para a contração isométrica, embora na última, o número de pontes cruzadas gerando força num dado momento é muito maior.

1.5 CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA FAMILIAR (FHC)

O sarcômero (unidade funcional muscular), é uma estrutura complexa com uma estequiometria exata e sítios múltiplos de interação entre as proteínas que o compõe.

A Cardiomiopatia Hipertrófica Familiar (FHC), conhecida como a “doença do sarcômero”, possui um caráter autossômico dominante, no qual o peptídeo mutante é expresso de forma estável e é capaz de se incorporar dentro do sarcômero. A FHC é caracterizada por hipertrofia ventricular direita e/ou esquerda, sendo geralmente assimétrica e pode afetar diferentes regiões do ventrículo (REDWOOD *et al.*, 1999). Além disso, o septo ventricular é comumente afetado. Em geral, o volume ventricular é diminuído ou normal (BONNE *et al.*, 1994).

A FHC possui uma incidência de 0,1 à 0,2% em adultos.

As alterações morfológicas incluem hipertrofia dos miócitos cardíacos, perda contínua de tecido conjuntivo e fibrose ao redor, levando a um prejuízo da função cardíaca e hipertrofia compensatória. Arritmias, angina e morte prematura são comuns (BONNE *et al.*, 1994).

Alterações na expressão de proteínas podem ocorrer em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos durante a vida neo-natal e/ou adulta.

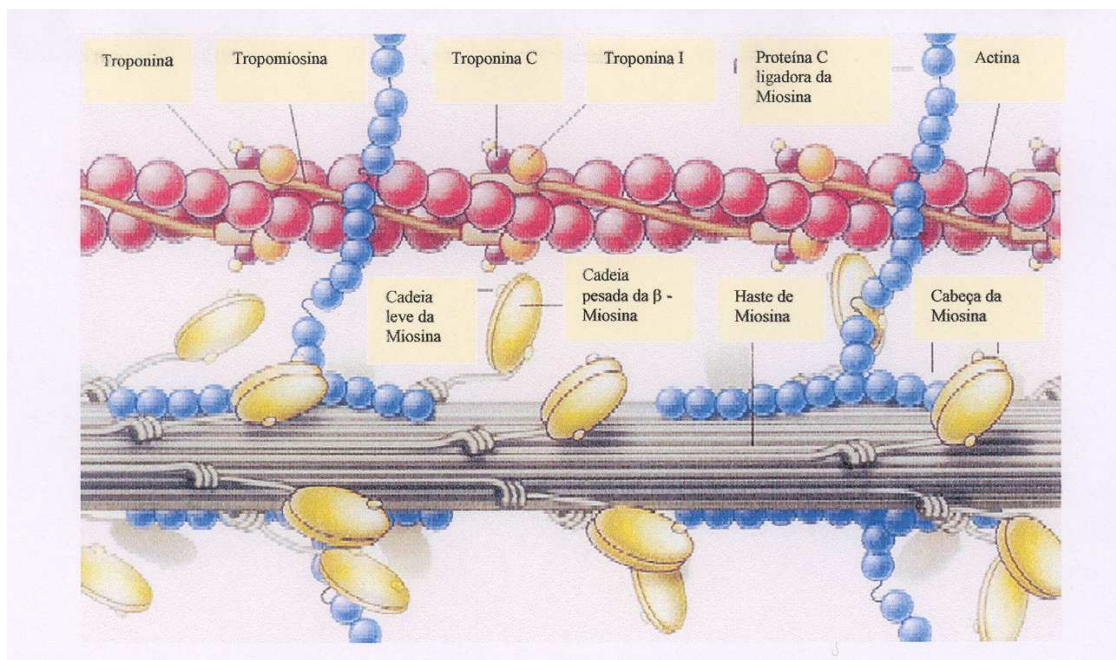
Resultados de inúmeros estudos mostram que a FHC é uma patologia que afeta o funcionamento cardíaco através de alterações na expressão de uma das seguintes proteínas sarcoméricas: cadeia pesada da miosina - β (β -MyHC), TM, Troponina I cardíaca (cTnI), Troponina T cardíaca (cTnT), proteína C ligadora da miosina (MyBPC), cadeia leve essencial da miosina-1 (MLC-1s/v) e cadeia leve reguladora da miosina -2 (MLC-2s/v). As diferentes proteínas que podem estar envolvidas, embora façam parte do sarcômero, tem diferentes propriedades e funções. Estas mutações estão representadas na figura 06. Algumas tem papel enzimático e de geração de força (como por exemplo a cadeia pesada da miosina, enquanto outras tem papel estrutural (como por exemplo a proteína C ligadora da

miosina) e outras tem funções reguladoras (como por exemplo a TnT e TnI e a α -TM). Ainda algumas vezes, uma mesma proteína tem mais de uma função na atividade contrátil do músculo cardíaco. Além disso, podem existir outros genes responsáveis por desenvolvimento de FHC e que ainda não foram identificados, incluindo genes que expressam componentes adicionais do sarcômero (BONNE *et al.*, 1998).

O fenótipo de FHC em humanos é caracterizado por hipertrofia ventricular esquerda e/ou direita, desarranjo miocitário, fibrose e arritmias. Os sintomas clínicos variam de benignos até muito severos, sendo estes dispnéia, angina, arritmias e a patologia muitas vezes evolui para morte repentina (WOLSKA *et al.*, 1998). Na verdade, a FHC é a causa mais comum de morte em jovens, que muitas vezes não tem conhecimento de serem portadores de FHC e a morte pode ocorrer principalmente de forma repentina durante a prática de exercícios. Entretanto, dentro de uma mesma família ainda existe uma significativa variação do fenótipo, portanto, não existindo uma história natural “benigna” ou “maligna”, já que as influências ambientais tem seu papel no desenvolvimento do fenótipo da patologia (REDWOOD *et al.*, 1999).

Um dos grandes desafios da ciência na pesquisa básica em cardiologia é decifrar os mecanismos através dos quais uma mutação em uma das proteínas sarcoméricas resulta na patologia hipertrófica familiar.

FIGURA 06 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO SARCÔMERO MOSTRANDO OS FILAMENTOS FINOS E GROSSOS E A LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE SÃO MUTADAS NA FHC.



FONTE: Redwood, C., et al. *Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy*. *Cardiovascular Research*, 1999; 44:20-36.

1.6 OS EFEITOS DA MUTAÇÃO GLU180GLY

A isoforma cardíaca de TM (α -TM) é expressa nos miócitos ventriculares e em fibras esqueléticas de contração rápida (tipos IIA e IIX) (BONNE *et al.*, 1998).

Análise mutagênica mostrou que a sequência de aminoácidos das extremidades da TM são mais importantes para ligação cooperativa da actina comparado com as sequências de aminoácidos dos intervalos da molécula (GOLITSINA *et al.*, 1997).

A Troponina cobre mais que 1/3 da TM e regiões de ligação incluem Cys 190 carboxi-terminal, incluindo a região de sobreposição com a porção amino-terminal da próxima TM no filamento de actina (GOLITSINA *et al.*, 1997). Existem quatro mutações pontuais na α -Tropomiosina (α -TM), as quais estão envolvidas no desenvolvimento de FHC: Ala63Val, Lys70Thr, Asp175Asn e Glu180Gly,. Duas destas estão localizadas na região Cys 190 onde a TM se liga a TnT: Asp175Asn e Glu180Gly. Ambas alteram a função diastólica miocárdica (EVANS *et al.*, 2000)

desestabilizando a estrutura da TM e aumentando sua flexibilidade, porém, foi mostrado por alguns estudos que a mutação Glu180Gly aumenta a flexibilidade da TM três vezes mais, desta forma diminuindo a afinidade pela F-actina três vezes mais comparado com a mutação Asp175Asn ou em camundongos que não possuem nenhuma mutação na molécula de TM. Dessa forma, a mutação Glu180Gly compromete mais severamente as funções contráteis e de relaxamento cardíaco, levando a morte dos camundongos transgênicos (TG) em 2 à 4 meses de idade (PRABHAKAR *et al.*, 2001). Da mesma forma, como citado anteriormente, em seres humanos, esta forma de FHC está associada a arritmias prematuras e à morte repentina em pessoas jovens e principalmente durante a prática de exercícios (BONNE *et al.*, 1998).

Em humanos, as TM encontradas em músculo cardíaco são α -TM. As mutações encontradas são dominantes, onde uma cadeia polipeptídica é mutante e a outra não (GOLITSINA *et al.*, 1998). Visto que 100% dos aminoácidos entre a TM cardíaca de humanos e camundongos são iguais, as alterações encontradas nos estudos usando camundongos como modelo experimental devem se refletir em humanos.

A figura 07 mostra a morfologia cardíaca de camundongos não – transgênicos (NTG) e de camundongos transgênicos (TG) portadores da mutação Glu180Gly da TM de um a cinco meses de idade, exemplificando a grande hipertrofia ventricular e atrial que ocorre nos camundongos portadores da mutação Glu180Gly da TM.

FIGURA 07 – MORFOLOGIA CARDÍACA DOS CAMUNDONGOS TG PORTADORES DA MUTAÇÃO GLU180GLY DA TM (LINHA SUPERIOR) E NTG (LINHA INFERIOR) DE 1 À 5 MESES DE IDADE.



FONTE: Prabhakar R. *et al.* A Familial Hypertrophic Cardiomyopathy α -Tropomyosin Mutation

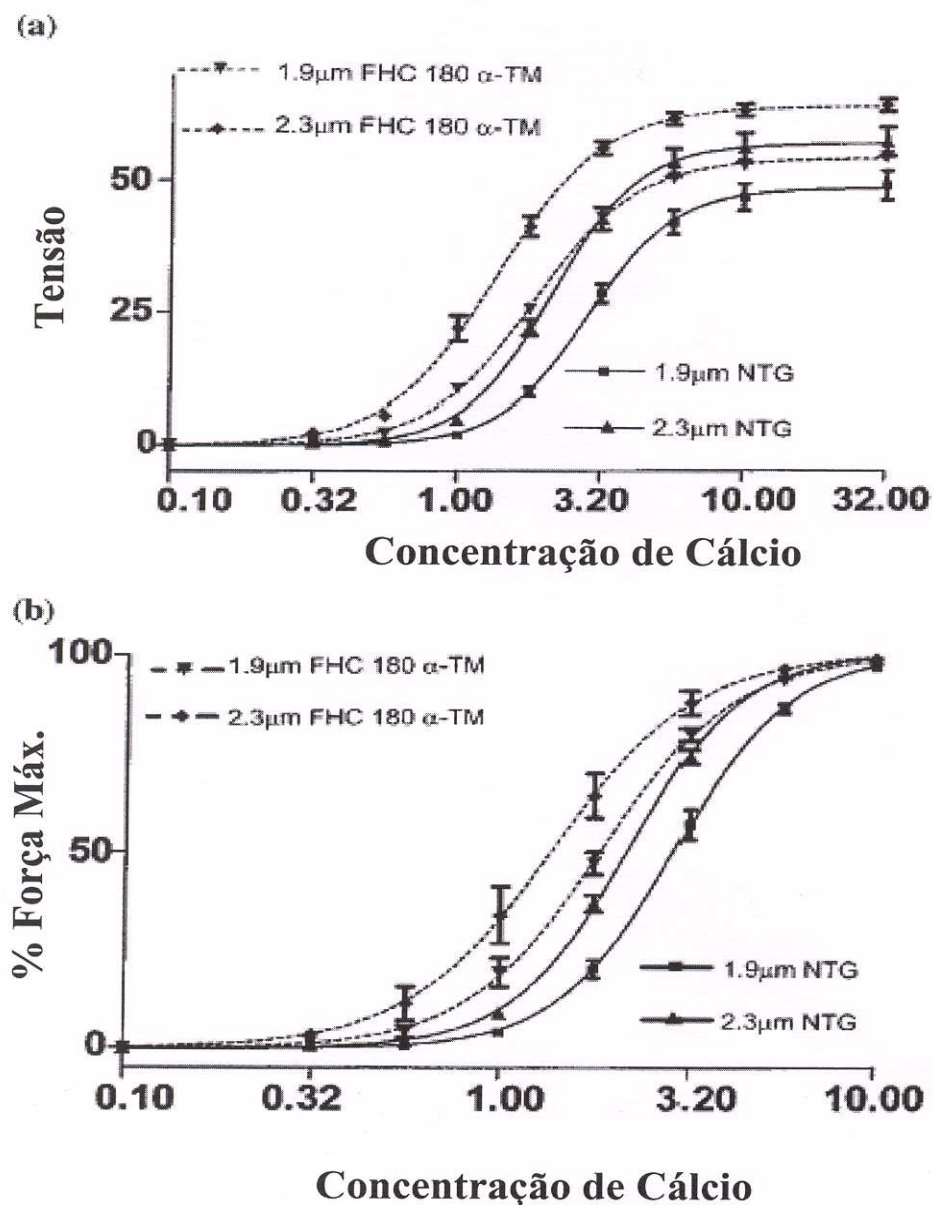
Causes Severe Cardiac Hypertrophy and Death in Mice. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 2001; 33: 1815-1828.

NOTA: É possível perceber nesta figura a grande hipertrofia cardíaca desenvolvida pelos animais portadores da mutação Glu180Gly da TM.

Outro importante achado de alguns estudos (MICHELE *et al.*, 1999; PRABHAKAR *et al.*, 2001) é que a mutação na TM Glu180Gly atenua a resposta dos cardiomiócitos a administração de isoproterenol (ISO), um importante agonista β -adrenérgico que estimula ambos, contração e relaxamento dos miócitos cardíacos. Além disso, existe um aumento da sensibilidade dos miofilamentos aos íons Cálcio, que se mostra independente do comprimento do sarcômero e da geração de tensão máxima (PRABHAKAR *et al.*, 2001; MICHELE *et al.*, 1999), como mostrado na fig 08 em bandas de fibras desmembranadas. Ou seja, os miofilamentos portadores da mutação da TM Glu180Gly produzem, no estado basal, uma força próxima da máxima. Dessa forma, o aumento de tensão máxima poderia predizer um leve aumento na velocidade de contração enquanto o aumento da sensibilidade prediz uma lentificação da velocidade de relaxamento. No estudo feito por Rethinasamy Prabhakar encontrou-se aumento do tamanho dos átrios e ventrículo esquerdo em camundongos portadores da mutação Glu180Gly da TM

com dois meses de idade, sendo que a hipertrofia do ventrículo esquerdo se mostrou concêntrica e homogênea, além de alguns camundongos apresentarem também hipertrofia septal. Aos três meses de idade estes camundongos tinham um número aumentado de células intersticiais, desorganização dos miócitos e aumento da fibrose. Aos cinco meses de idade 70% dos camundongos estão mortos como consequência das alterações encontradas. Utilizando a técnica de coração isolado (MUTHUCHAMY *et al.*, 1995; MUTHUCHAMY *et al.*, 1999) os parâmetros fisiológicos foram estudados no estado basal e após administração de doses crescentes de ISO. Estes parâmetros são: frequência cardíaca (FC), pressão aórtica média (PAM), pressão intraventricular esquerda (PVE) (sistólica, diastólica e diastólica final), tempo para metade do relaxamento (RT1/2), tempo para pico de pressão (TPP), velocidade de desenvolvimento de pressão (+dP/dt) e velocidade de diminuição de pressão (-dP/dt). Aos dois meses e meio de idade os camundongos portadores da mutação da TM Glu180Gly apresentaram -dP/dt muito diminuída, mas TPP se mostrou similar. Além disso, apresentaram pressão diastólica final muito aumentada. Após a administração de ISO a resposta aos parâmetros contráteis (+dP/dt e TPP) foi muito atenuada e a resposta aos parâmetros de relaxamento (-dP/dt e RT1/2) foi similar aos camundongos não-trangênicos, porém, a diferença inicial foi mantida. Aos quatro meses e meio de idade o coração estava muito hipodinâmico e praticamente não respondeu a administração de ISO. Os autores especulam que a grande diminuição da -dP/dt pode refletir alterações não apenas no filamento fino, mas também na rede de citoesqueleto e de controle da membrana do fluxo de Cálcio (MUTHUCHAMY *et al.*, 1995; MUTHUCHAMY *et al.*, 1999).

FIGURA 08 – RELAÇÕES CÁLCIO-FORÇA EM BANDAS DE FIBRAS DESMEMBRADAS DE CAMUNDONGOS PORTADORES DA MUTAÇÃO GLU180GLY (TG) E NTG COM 2,5 MESES DE IDADE.



FONTE: Prabhakar R., et al. A Familial Hypertrophic Cardiomyopathy α -Tropomyosin Mutation

Causes Severe Cardiac Hypertrophy and Death in Mice. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 2001; 33: 1815-1828.

NOTA: Os sarcômeros tiveram comprimentos de 1,9 e 2,3 μ m. (A) mensuração cálcio-tensão em feixes de fibras desmembradas. (B) dados normalizados para a % de força máxima das mensurações da relação tensão-cálcio.

As mutações na α -TM apresentam um efeito de alta produção de força a concentrações submáximas de Cálcio. Dessa forma, a desestabilização da estrutura da TM pode favorecer uma conformação ligadora de Cálcio no filamento fino. Estes corações portadores da mutação Glu180Gly da TM desenvolvem hipertrofia provavelmente pela inabilidade de responder adequadamente quando a demanda de força é aumentada, como por exemplo, durante estimulação simpática ou durante exercícios físicos (MICHELE *et al.*, 1999).

Golitsina *et al.*, 1997 mensurando a afinidade da TM Glu180Gly, da TM Asp175Asn e da TM nativa pela actina em três diferentes condições experimentais: ligação da TM com F-actina, ligação com F-actina + Tn + Cálcio e ligação com F-actina + Tn + EGTA (quelante de cálcio), encontrou que a Tn aumenta a afinidade da TM pela actina e que a TM Glu180Gly tem afinidade diminuída pela actina, preferencialmente do que com a Tn. De fato, experimentos usando fluorescência, neste mesmo estudo, mostram que a mutação não altera a ligação da TM com a TnT na região da mutação. Esses resultados são consistentes com o aumento da afinidade pela actina da TM nativa (sem mutação), TM Glu180Gly e Asp175Asn dada pela Tn, assim como observações que mudanças na sequência codificadora proximal do exon 6 ou deleção deste, não altera a afinidade da TM por Tn (HAMMELL & HITCHCOCK-DEGREGORI, 1997).

Quando o subfragmento S1 da miosina se liga à actina-TM, é induzido ligação da TM com actina e isso promove mudança conformacional da TM, havendo um aumento da flexibilidade da TM próximo da região Cys 190, o que não ocorre em TM Glu180Gly. Na TM nativa (sem mutação) é necessário apenas a ligação de duas moléculas S1 a cada seis ou sete monômeros de actina, porém, na TM Glu180Gly é necessário seis a sete moléculas S1 a cada seis ou sete monômeros de actina, indicando que a mutação afeta a conformação da TM no estado aberto da actina-TM induzido por S1 (GOLITSINA *et al.*, 1997). Portanto, a TM Glu180Gly, possui afinidade três vezes menor por actina e conformação alterada quando ligada a actina no estado aberto do filamento fino induzido por S1. No entanto, a estabilidade na região da mutação é apenas um pouco alterada e a interação com o complexo Tn ou com TnT não é afetada.

A mutação da TM Glu180Gly foi escolhida para este estudo devido a grande alteração cardíaca estrutural e funcional encontrada nos camundongos portadores

desta mutação e devido ao fato de ainda não existir dados referentes aos parâmetros de contratilidade cardíaca em músculo papilar destes animais assim como não existem dados referentes as etapas do desenvolvimento animal na qual essas alterações já podem ser encontradas.

2.0 OBJETIVOS

1. Determinar os efeitos da mutação Glu180Gly da tropomiosina nos parâmetros de contratilidade cardíaca (velocidade de contração e de relaxamento, tensão máxima desenvolvida), em músculo papilar de ventrículo esquerdo de camundongos transgênicos (TG) portadores da mutação Glu180Gly da TM antes (estado basal) e após a administração de doses crescentes de agonista β - adrenérgico (Isoproterenol – ISO) e em etapas precoces do desenvolvimento animal.
2. Comparar o índice de hipertrofia entre os animais não – transgênicos (NTG) e os animais transgênicos (TG) portadores da mutação Glu180Gly da TM, determinando a etapa do desenvolvimento que a hipertrofia já se faz presente.
3. Comparar a relação força – frequência entre os animais não – transgênicos (NTG) e os animais transgênicos (TG) portadores da mutação Glu180Gly da TM.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados para os experimentos camundongos não-transgênicos (NTG) usados como grupo controle e camundongos transgênicos (TG) que possuem uma mutação na posição 180 da molécula de TM, sendo que o aminoácido ácido glutâmico é substituído por glicina.

O protocolo experimental foi realizado utilizando – se animais nas idades entre duas e três semanas de vida e animais na idade entre três e quatro semanas de vida.

Os animais transgênicos foram gerados no Departamento de Genética, Bioquímica e Microbiologia Molecular do Curso de Medicina da University of Cincinnati, Cincinnati e então transferidos para a University of Illinois at Chicago. A mudança no único nucleotídeo (GAG>GGG) correspondente à substituição em um aminoácido no códon 180 (Glu180Gly) foi feita utilizando-se Reação de cadeia da polimerase (PCR) mediada por mutagênese sítio-dirigida. Os cDNAs da TM 180 foram ligados na extremidade 5' ao promotor α - MHC (cadeia pesada da Miosina) específico cardíaco. A região sinalizadora e terminal do hormônio de crescimento humano poly (A) foi ligado a extremidade 3'.

Os animais foram cedidos pelo biotério do Setor de Medicina da University of Illinois at Chicago (UIC) e receberam alimentação de rotina sem restrições. Estes camundongos foram cuidadosamente controlados, não permitindo que houvesse mistura entre diferentes linhagens de camundongos existentes no biotério e utilizados para cruzamento sucessivas vezes até conseguir - se o número ideal de experimentos utilizando estes animais. A confirmação do genótipo de todos os camundongos utilizados para experimentos foi feita através do procedimento para reação em cadeia da polimerase (PCR).

Todo o protocolo experimental foi avaliado e aprovado pela comissão de cuidados com animais da University of Illinois at Chicago, que representa o órgão controlador de animais da mesma Universidade.

3.2 PROCEDIMENTO PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

3.2.1 Obtenção de amostras e extração de DNA

As amostras utilizadas para extração de DNA foram obtidas a partir de pedaços das caudas dos animais e mediram aproximadamente de 1 a 1,5 centímetro. As caudas após cortadas, foram transferidas para um tubo plástico de 1 ml e quando não utilizadas no mesmo momento foram armazenadas à -20°C .

A lise das amostras foi iniciada adicionando-se 500 μl de tampão de lise com a seguinte composição: TRIS-HCl 50mM (pH:8.0), 100 mM EDTA, 1% SDS (dodecil sulfato de sódio), 100 mM NaCl, 500 $\mu\text{g/ml}$ de Proteinase K [diluída em 10 mM TRIS-HCl (pH:7.5), 20 mM CaCl_2 e 50 % Glicerol]. Incubou-se as amostras durante a noite à 55°C em contínua agitação.

A seguir, centrifugou-se as amostras à 14.000 rpm durante 6 minutos (min.). Ao final transferiu-se o supernadante para tubos novos, adicionando-se a este o mesmo volume (aproximadamente 400 μl) de isopropanol, misturando-se às amostras até a precipitação do DNA. Centrifugou-se a seguir a 14.000 rpm por 1 minuto descartando-se desta vez o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de Etanol 75%. Misturou-se a amostra e centrifugou-se à 14.000 rpm por 4 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as amostras foram deixadas para secar por aproximadamente 20 a 30 minutos. A seguir, dissolveu-se o DNA em TE buffer (Tampão TRIS-EDTA) e misturou-se utilizando o aparelho Thermomixer a uma temperatura de 65°C por 10 a 15 min.

3. 2.2 PCR para TM Glu180Gly

Adicionou-se às amostras obtidas conforme descrito acima, uma solução contendo 10 mM de dNTPs, 5% DMSO e 2,5 mM de MgCl_2 e dois diferentes “primers” para amplificação denominados de 3` e 5` além de Taq-enzima. Para a reação de amplificação foi usado um ciclo de desnaturação de 4 minutos à 94°C , seguido de ciclo de amplificação (35 vezes) na sequência de : 30 segundos à 94°C , 30 segundos à 65°C e 30 segundos à 72°C ; ciclo de complementação de 10

minutos à 72°C e por fim, 1 hora à 4°C. As bandas ficaram em torno de 200 bp.

3.2.3 Experimentos com músculo papilar

Para estes experimentos os camundongos foram previamente injetados intraperitonealmente com Heparina sódica na dose de 5 U/g, 30 minutos antes de serem sacrificados. Os animais foram então anestesiados intraperitonealmente com tri-bromo-etanol 2% na dose de 22 μ L/g. O tórax, a seguir, foi rapidamente aberto e o coração retirado e lavado em solução para dissecação (abaixo descrita) à temperatura ambiente, sendo pesado e após isto colocado em um recipiente para dissecação sob microscópio ótico. A dissecação de músculo papilar, especialmente em camundongos que tem uma câmara cardíaca comparativamente pequena em relação a câmara cardíaca de ratos deve ser feito com cautela, evitando-se qualquer contato ou estiramento que possa lesionar o músculo. Após a remoção do coração foi realizado a canulação da artéria aorta e esse órgão foi perfundido retrogradamente (Langerdoff) com a solução de dissecação Krebs – Heinseleit (K-H) na seguinte concentração em mM : NaCl 118.5 , KCl 15.0, MgSO₄ 1.2, NaH₂PO₄ 2.0, Na₂(HCO)₃ 2.1, D-Glucose 10.0 e Ca²⁺ 0.4.; previamente e continuamente borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ tendo o pH igual a 7.4.

Após a canulação da aorta, através de acesso pelo Tronco Arterial Pulmonar seccionou-se a parede do ventrículo direito e por acesso através do septo interventricular seccionou-se o ventrículo esquerdo e em seguida, era então dissecado o músculo papilar com uma porção da válvula bicúspide e de miocárdio.

O músculo foi então transferido para uma câmara de 2 mL, tendo uma das extremidades presa a um transdutor de força (FORT – 10, Transduction Laboratories Co.) e a outra à um micromanipulador acoplado a motor (Muscle Lever System Motor, Aurora Scientific Inc.) para manipular o comprimento do músculo, permitindo variações de comprimento na escala de micrômetros (μ m).

A seguir, o músculo foi banhado com solução de perfusão K-H com a seguinte composição (em mM): NaCl 118,5 ; KCl 5,0; MgSO₄ 1.2, NaH₂PO₄ 2,0; NaHCO₃ 2,1; D-Glucose 10,0 e Ca²⁺ 0,4. inicialmente; e borbulhada continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ tendo o pH igual a 7,4. A preparação foi continuamente perfundida, reoxigenada e aquecida através de uma bomba

peristáltica e de um sistema de aquecimento, mantendo a temperatura em 25° C durante todo o experimento. Para confirmação da temperatura durante os experimentos, foi utilizado um termômetro digital (Digi – Sense, Cole Parmer Inc.), sendo que o eletrodo para mensuração da temperatura foi posicionado dentro da câmara com solução onde se encontrava o músculo papilar.

A concentração de cálcio foi então gradualmente aumentada até atingir 1mM. O músculo foi eletricamente estimulado à 0,2 Hz através de ondas quadráticas com as características de pulso para estes experimentos de 5 ms de duração e 25 V de amplitude, sendo a frequência de 0,2 Hz utilizada inicialmente para que o músculo atingisse contrações estáveis.

Após estirado até um comprimento médio, foi esperado um tempo de aproximadamente 30 minutos de estimulação, o qual se observou ser um tempo suficiente para que as contrações do músculo estabilizassem em um determinado valor de força desenvolvida. Após isto, o músculo foi estirado progressivamente até obter-se o maior valor de produção de força (que corresponde ao comprimento ideal do músculo - $L_{máx.}$) e então relaxado até 90% do valor máximo de Força, onde os experimentos foram realizados.

Após cerca de cinco a dez minutos estando a produção de força estável na frequência de 0,2 Hz, aumentou-se a frequência de estimulação para 1 Hz. A seguir, para 2 Hz e, a seguir, para 3 Hz. Esperou-se o tempo necessário para que a produção de força se mantivesse estável a cada frequência de estimulação empregada. Curvas dose – resposta ao ISO foram obtidas na frequência de estimulação de 3 Hz.

Para registro dos dados foi usado o programa LabVIEW.

3.2.4 Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados estatisticamente. Os dados estatísticos para índice de hipertrofia cardíaca e índice de aceleração do relaxamento foram realizados através de Teste – T e para os demais resultados foi utilizado One Way ANOVA analyses of variance e, a “posteriori”, o teste Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando a probabilidade

de ocorrência da hipótese nula foi inferior a 1% ($p < 0,01$) para índice de hipertrofia cardíaca e inferior a 5% ($p < 0,05$) para todos os demais experimentos realizados.

4.0 RESULTADOS

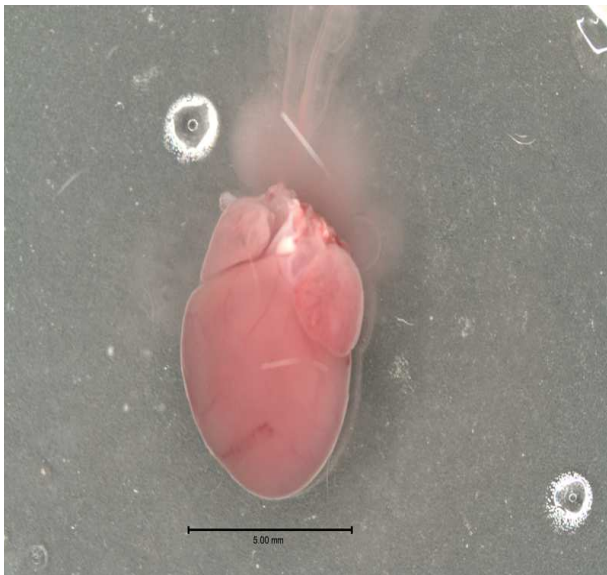
4.1 MORFOLOGIA CARDÍACA DE CAMUNDONGOS NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) E TRANSGÊNICOS (TG) COM SEIS SEMANAS DE VIDA.

Os camundongos portadores da mutação Glu180Gly da TM apresentaram hipertrofia atrial e ventricular, que se inicia já nas primeiras semanas de vida do animal.

A figura 09 compara morfologicamente um coração de camundongo não – transgênico com um coração de camundongo portador da mutação Glu180Gly da TM, ambos com seis semanas de vida. Esta figura é um exemplo típico da grande hipertrofia desenvolvida pelos animais portadores desta mutação.

FIGURA - 09 MORFOLOGIA CARDÍACA DE CAMUNDONGO NÃO – TRANSGÊNICO (A) E TRANSGÊNICO (B) COM SEIS SEMANAS DE VIDA.

A)



B)

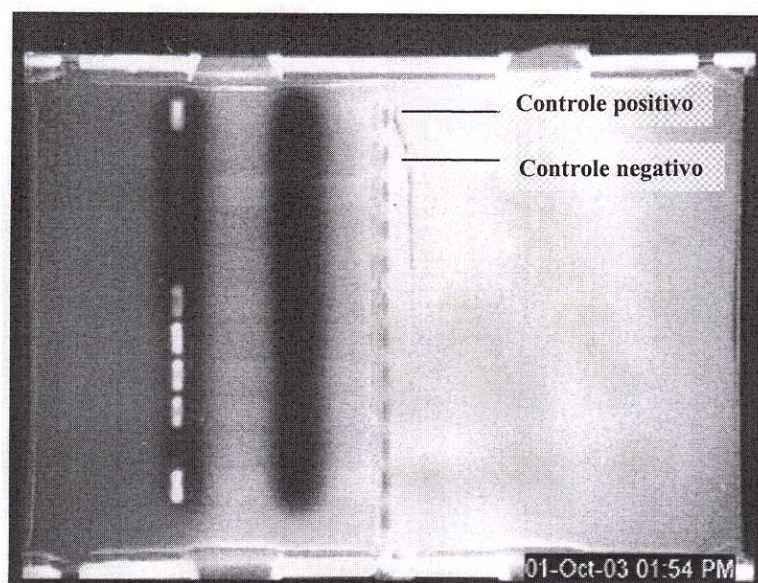


4.2 PCR PARA TM GLU180GLY

Todos os camundongos utilizados para os experimentos foram avaliados quanto ao genótipo com o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A figura 10 é um exemplo de resultado obtido em um PCR para TM Glu180Gly, mostrando as bandas positivas para TM glu180Gly e as bandas negativas que correspondem aos animais NTG.

FIGURA – 10 PCR PARA TM GLU180GLY.



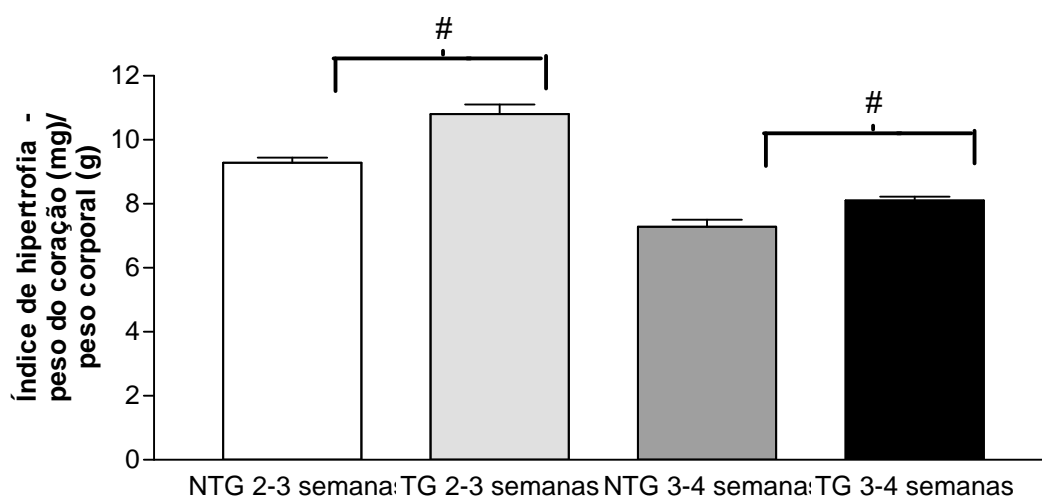
4.3 ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA

O índice de hipertrofia cardíaca foi mensurado em todos os animais utilizados através da razão entre o peso do coração em miligramas (mg) e o peso corporal em gramas (g). Esta mensuração é um dos indicativos de desenvolvimento de hipertrofia cardíaca.

Como mostrado na figura 11, os animais com idade entre duas e três semanas de vida, assim como os animais com idade entre três e quatro semanas de

vida apresentam uma significativa diferença nos índices de hipertrofia cardíaca, indicando que os camundongos portadores da mutação Glu180Gly apresentam hipertrofia cardíaca em ambas as idades. Isso sugere uma alteração estrutural e, dessa forma, funcional que se instala precocemente nestes animais. A diferença encontrada entre os animais tanto transgênicos quanto não – transgênicos com duas a três semanas de vida e nos com três a quatro semanas de vida foi devido a idade destes camundongos e não a uma suposta hipertrofia nos camundongos entre duas e três semanas de vida.

FIGURA – 11 ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA EM CAMUNDONGOS NTG E TG NAS IDADES ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA E ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA.



NOTA: # Diferença significativa comparado com camundongo com a mesma idade. ($p < 0,01$).

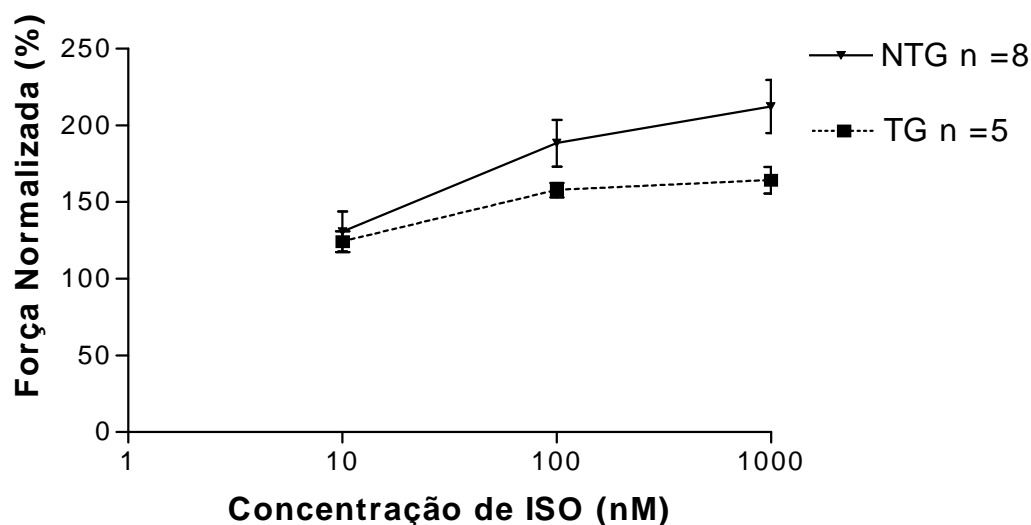
4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ISO NA FORÇA DESENVOLVIDA POR PAPILARES DE CAMUNDONGOS NTG E TG

4.4.1 Camundongos de duas a três semanas de vida

A figura 12 mostra a ação da administração de ISO em doses crescentes até ativação máxima do miofilamento, em músculo papilar esquerdo de camundongos NTG e TG estimulados eletricamente a 3 Hz.

Na figura 12 pode-se perceber o aumento da força desenvolvida após a administração de ISO em ambos os grupos. Tal incremento foi mais proeminente no grupo NTG que no grupo TG, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, demonstrando que os camundongos TG, mesmo ainda na segunda semana de vida, já possuem uma tendência de não responder adequadamente à estimulação β - adrenérgica com aumento de força.

FIGURA – 12 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO DESENVOLVIMENTO DE FORÇA EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) E TRANSGÊNICOS (TG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA.



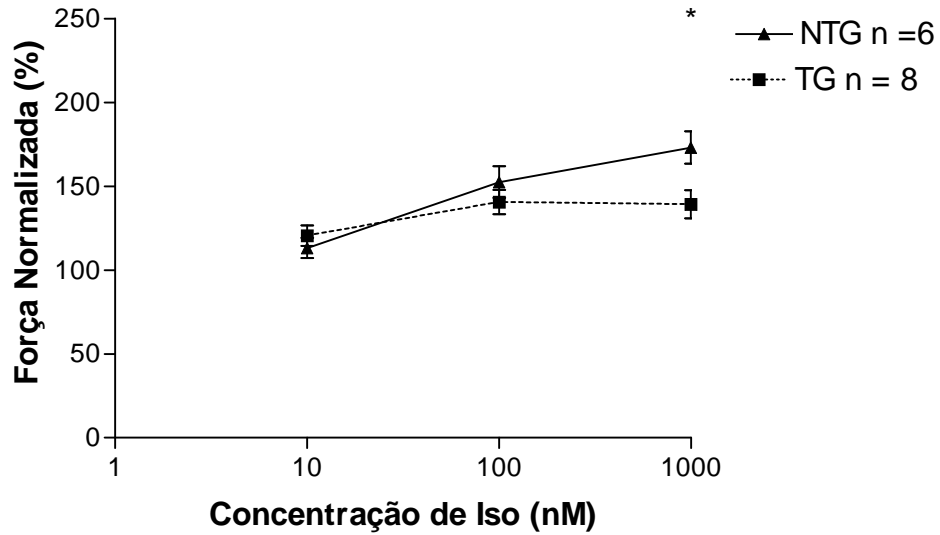
4.4.2 Camundongos entre três e quatro semanas de vida

A figura 13 demonstra os dados de força de contração após administração de ISO em doses crescentes em músculo papilar isolado esquerdo de camundongos NTG e TG.

Como mostrado na figura 13, a força desenvolvida após administração de ISO foi dose dependente, porém, o efeito de ISO foi estatisticamente maior nos camundongos NTG que nos camundongos TG, demonstrando a incapacidade dos camundongos TG de responder adequadamente quando a demanda de força para o músculo cardíaco é aumentada.

A figura 14 é um registro original de um experimento típico da contração de músculo papilar estimulado a 3 Hz, demonstrando os efeitos da ação de ISO nas doses de 10, 100 e 1000 η M. Em A) o registro foi feito em músculo papilar de ventrículo esquerdo de camundongo NTG, portanto, pode-se notar a grande resposta à estimulação β - adrenérgica. Em B), o registro foi feito em músculo papilar de ventrículo esquerdo de camundongo TG, portanto, pode-se notar a menor resposta à estimulação β - adrenérgica.

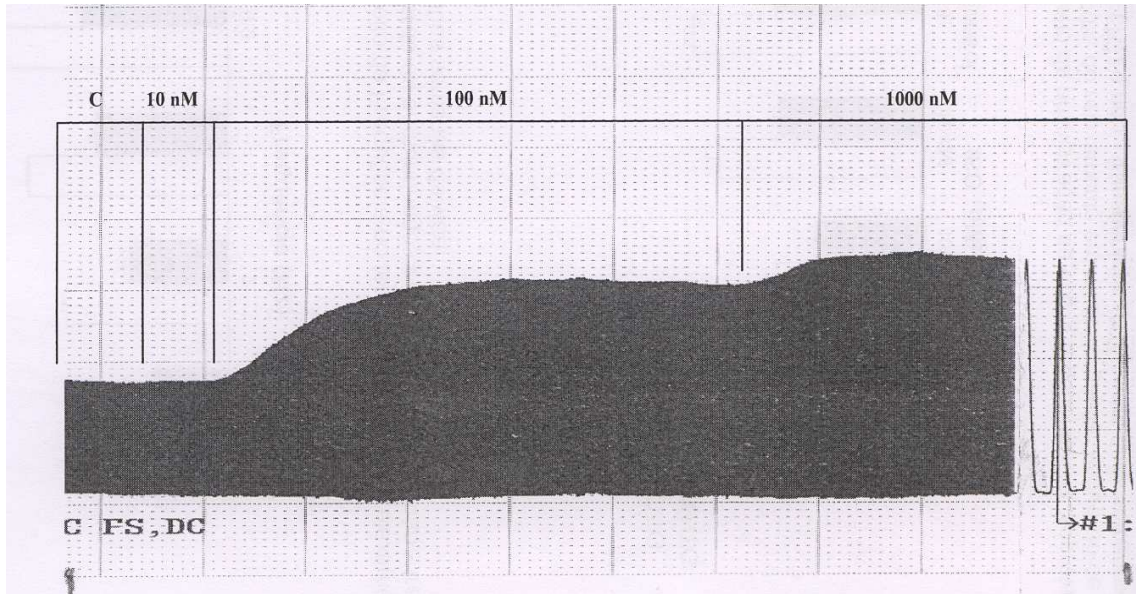
FIGURA – 13 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO DESENVOLVIMENTO DE FORÇA DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS NÃO – TRANSGÊNICOS E TRANSGÊNICOS ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA.



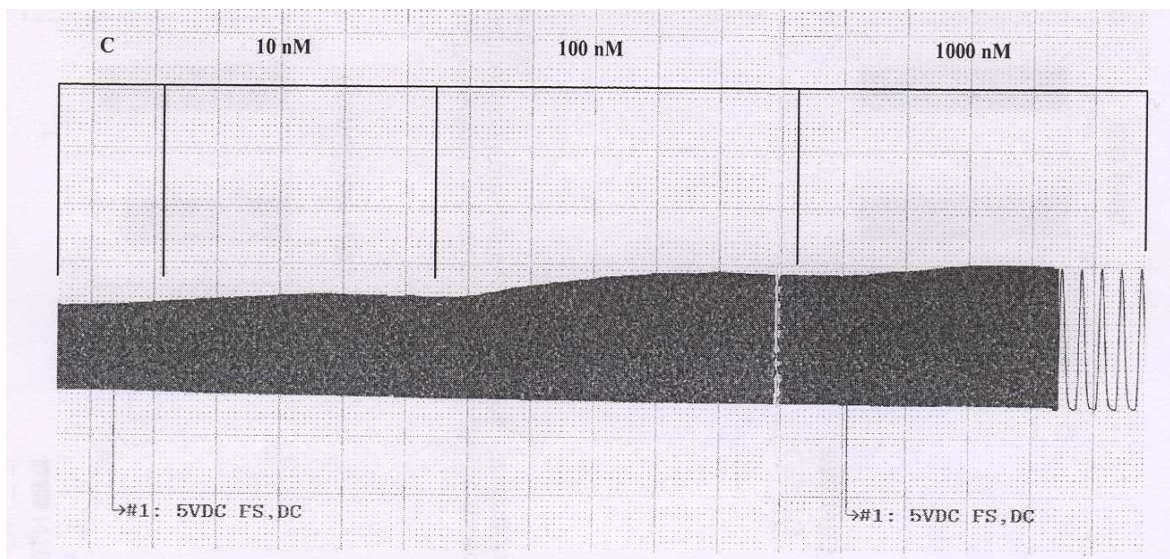
NOTA: Os dados estão expressos em percentual da média mais erro padrão e foram normalizados. * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG na concentração de 1000 nM de ISO ($p < 0,05$).

FIGURA 14 – REGISTRO ORIGINAL DE FORÇA DE CONTRAÇÃO DE UM EXPERIMENTO TÍPICO DE MÚSCULO PAPILAR ESTIMULADO ELETRICAMENTE À 3 HZ, DEMONSTRANDO OS EFEITOS DA AÇÃO DE ISO NAS DOSES DE 10, 100 E 1000 η M. A) ANIMAIS NTG; B) ANIMAIS TRANSGÊNICOS.

A)



B)

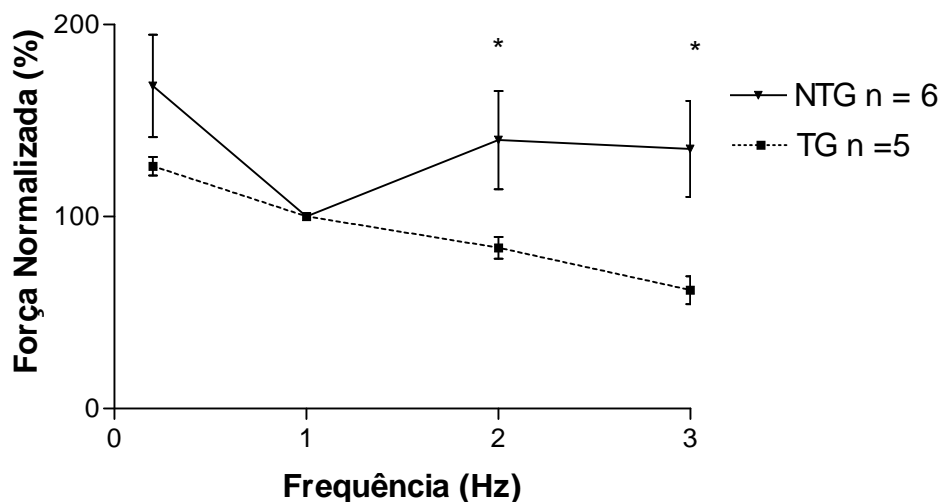


4.5 RELAÇÃO FORÇA – FREQUÊNCIA

A figura 15 mostra a Relação Força – Frequência (FFR) de músculo papilar esquerdo de camundongos transgênicos (TG) e não - transgênicos (NTG) de duas a três semanas de vida.

A FFR relaciona o aumento ou diminuição da força quando a frequência é aumentada. Como mostrado na figura 14, A FFR é inicialmente bifásica e posteriormente tende a se manter em um determinado nível de força para os camundongos não – transgênicos e é descendente para os camundongos transgênicos, diferença esta que é estatisticamente diferente ($p < 0,05$).

FIGURA – 15 RELAÇÃO FORÇA – FREQUÊNCIA EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE DUAS E TRÊS SEMANAS DE VIDA. TEMPERATURA: 25 GRAUS CELSIUS; CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA.



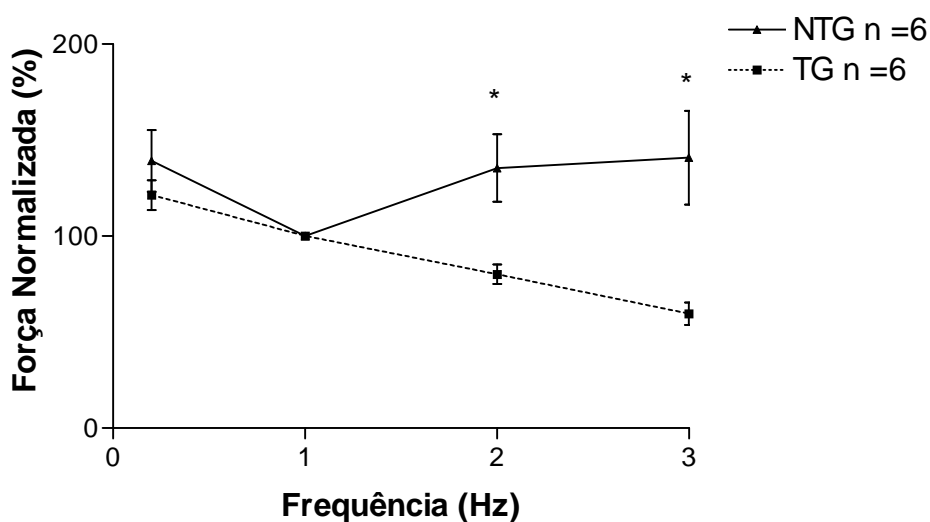
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG quando compara-se a força na frequência de 2 e 3 Hz com a força na frequência de 1Hz.

A figura 16 mostra a Relação Força – Frequência (FFR) em músculo papilar esquerdo de camundongos transgênicos (TG) e não - transgênicos (NTG) entre três e quatro semanas de vida. Como mostrado na figura 16, A FFR é inicialmente bifásica e posteriormente tende a se manter em um determinado nível de força para os camundongos não – transgênicos e descendente para os

camundongos transgênicos, diferença esta que é estatisticamente diferente. Na frequência de 0,2 Hz a força é maior. Sugere-se que isto ocorra devido ao fenômeno de potenciação pós – repouso (Redel, et al., 2002).

A figura 17 exemplifica um registro de contração de músculo papilar de ventrículo esquerdo de animais NTG (A) e de animais TG (B), mostrando as frequências de 0,2, 1, 2 e 3 Hz.

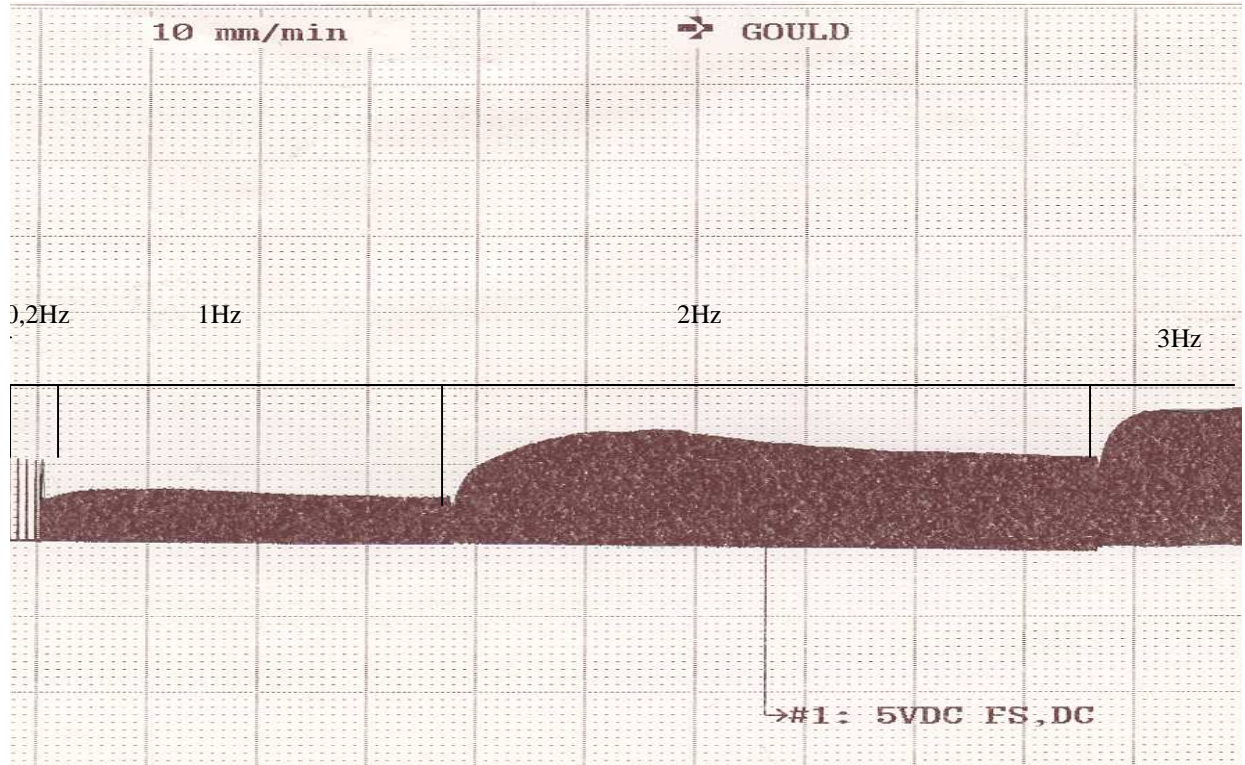
FIGURA – 16 RELAÇÃO FORÇA – FREQUÊNCIA EM MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) ENTRE TRÊS E QUATRO SEMANAS DE VIDA. TEMPERATURA: 25 GRAUS CELSIUS; CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA.



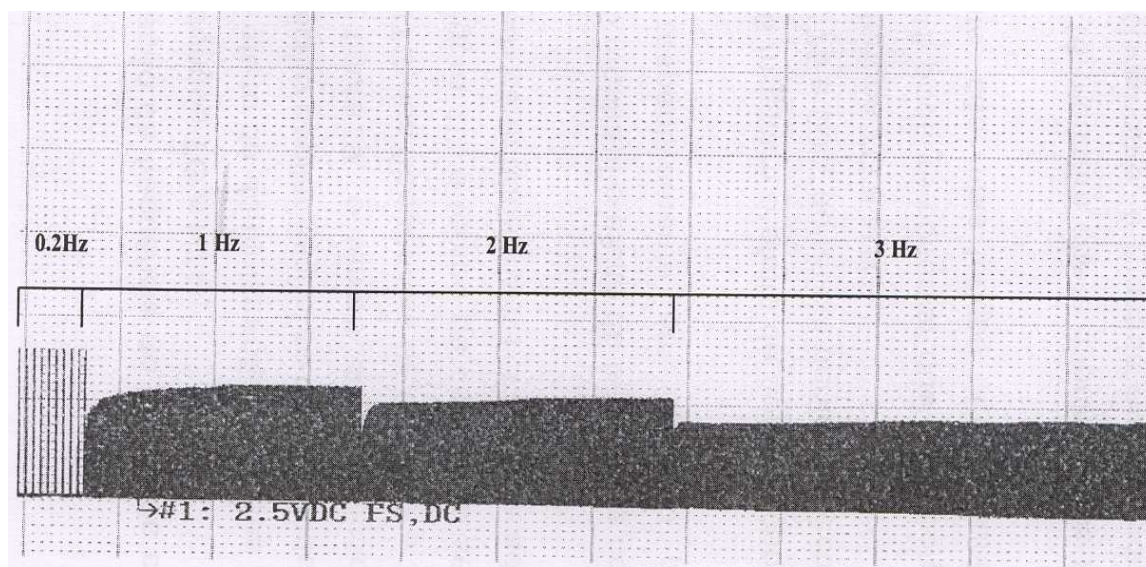
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG quando compara-se a força na frequência de 2 e 3 Hz com a força na frequência de 1Hz.

FIGURA 17 – REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO TÍPICO DA CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR DE ANIMAL NTG (A) E TG (B) MOSTRANDO AS FREQUÊNCIAS DE 0,2, 1, 2 E 3 HZ.

A)



B)



4.6 PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE

4.6.1 Camundongos de duas a três semanas de vida

A figura 18 mostra a ação da frequência no tempo para o pico de contração em músculo papilar esquerdo de camundongos NTG e TG.

A figura 19 mostra o efeito da administração de doses crescentes de ISO no tempo para o pico de contração em músculo papilar esquerdo de camundongos NTG e TG.

Como mostrado na figura 18, o tempo para o pico de contração foi significativamente mais longo em camundongos TG que em NTG nas frequências de 0,2, 1 e 2.

Como mostrado na figura 19, o tempo para o pico de contração se manteve apenas levemente mais longo em camundongos TG que em camundongos NTG após a administração de doses crescentes de ISO, diferença está não significativa, indicando que o estimulador β - adrenérgico reverteu este parâmetro.

As figuras 20, 22 e 24 mostram o efeito da frequência nos tempos para 50, 75 e 90% do relaxamento respectivamente em músculo papilar esquerdo de camundongos TG e NTG.

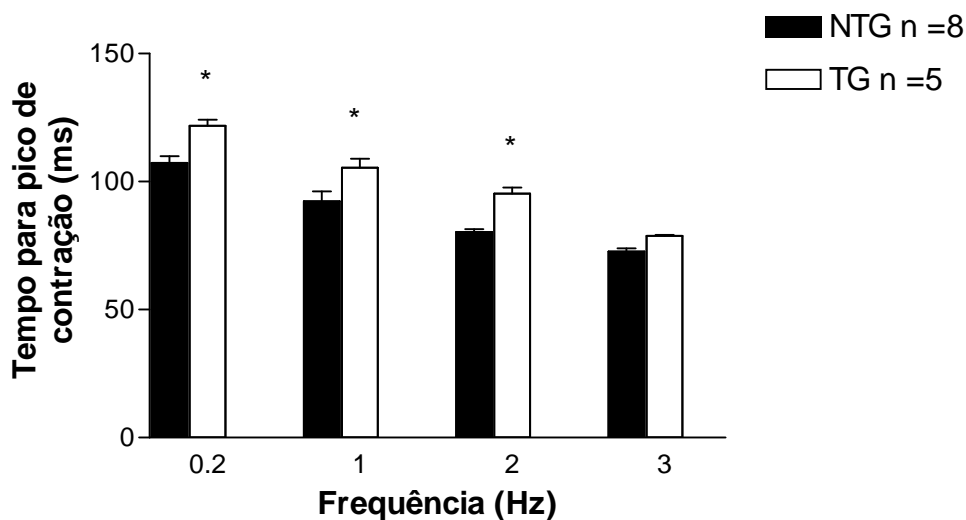
As figuras 21, 23 e 25 mostram o efeito da administração de doses crescentes de ISO nos tempos para 50, 75 e 90% do relaxamento respectivamente em músculo papilar esquerdo de camundongos TG e NTG.

Nas figuras 20, 22 e 24 pode-se observar que o tempo para 50, 75 e 90% do relaxamento respectivamente, são significativamente mais longos nos camundongos TG que nos camundongos NTG nas frequências de 0,2, 1, 2 e 3Hz.

As figuras 21, 23 e 25 mostram que a diferença nos tempos para 50, 75 e 90% do relaxamento respectivamente, é mantida após a administração de doses crescentes de ISO.

Ainda nos gráficos que representam os tempos para 50, 75 e 90% do relaxamento, podemos perceber que os tempos de relaxamento dos camundongos tanto TG quanto NTG entre duas e três semanas de vida são mais curtos que os mesmos tempos de relaxamento dos camundongos tanto TG quanto NTG entre três e quatro semanas de vida. A causa para esta diferença não é conhecida.

FIGURA – 18 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA O PICO DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO -TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA.



NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG nas frequências de 0,2, 1 e 2 Hz ($p < 0,05$).

FIGURA – 19 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA O PICO DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO-TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA ESTIMULADOS ELETRICAMENTE À 3 HZ.

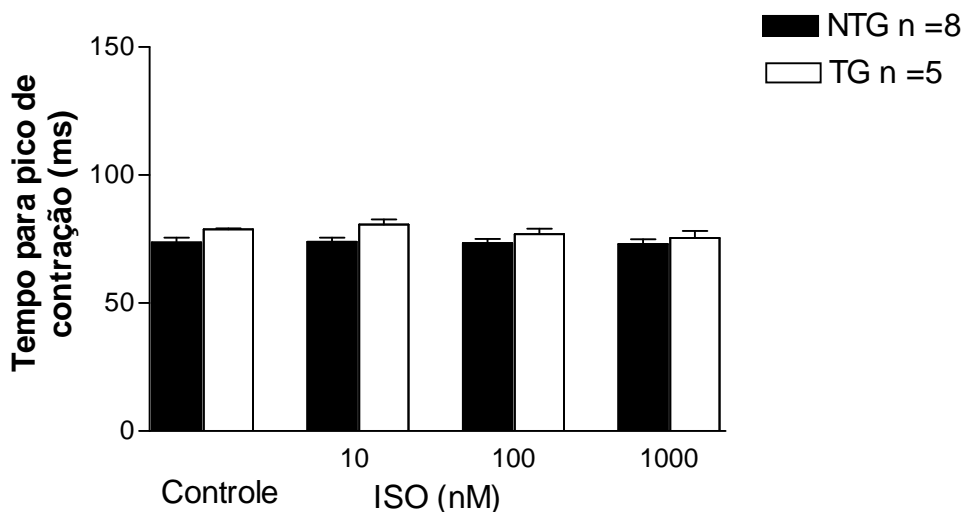
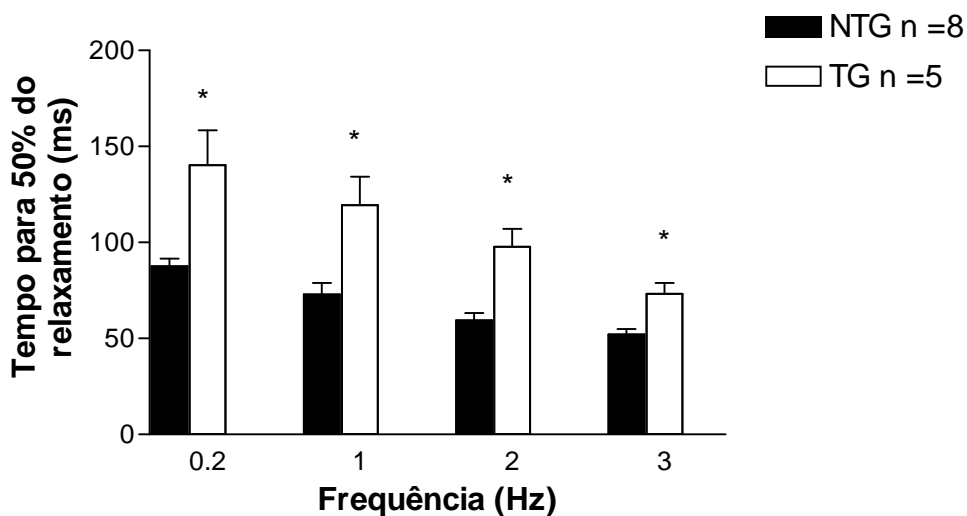
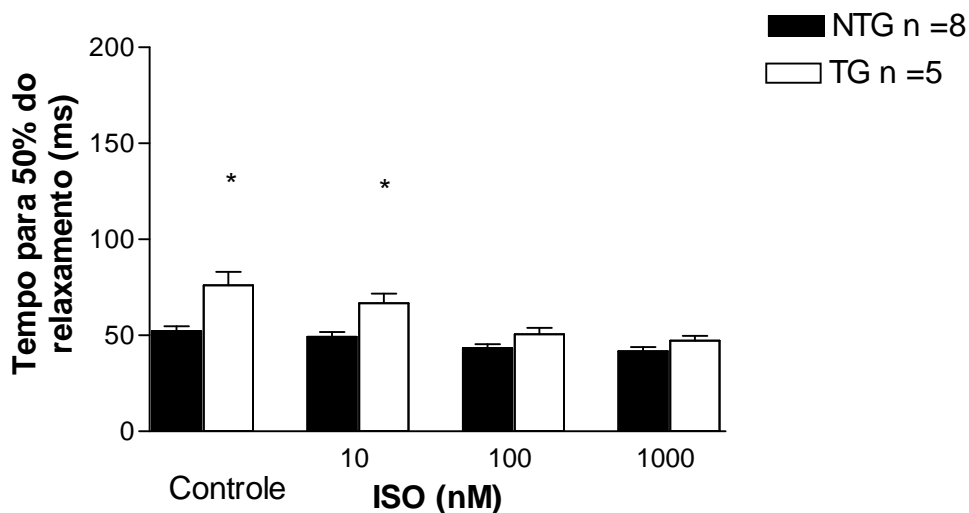


FIGURA – 20 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA.



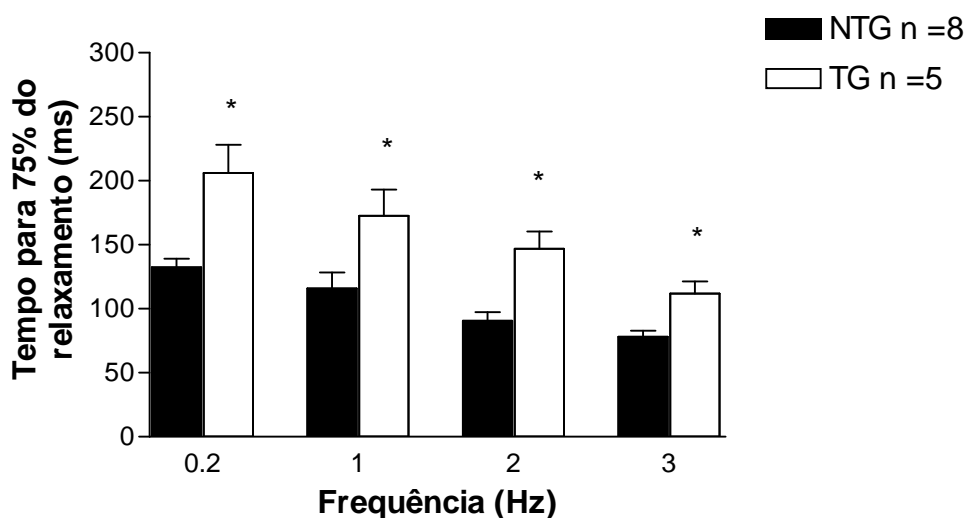
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG nas frequências de 0,2, 1, 2 e 3Hz ($p < 0,05$).

FIGURA – 21 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA ESTIMULADOS ELETRICAMENTE À 3 HZ.



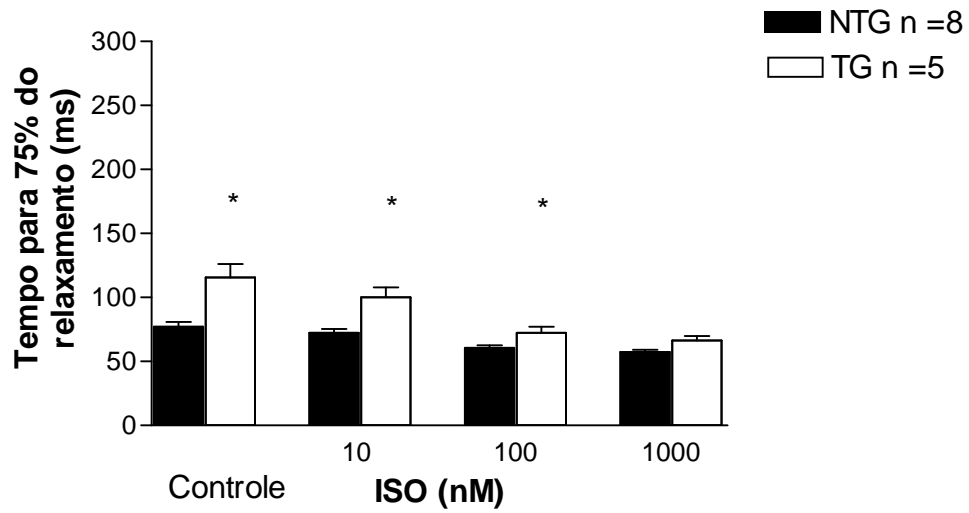
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG no estado basal (controle) e na dose de 10 nM de ISO ($p < 0,05$).

FIGURA – 22 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA.



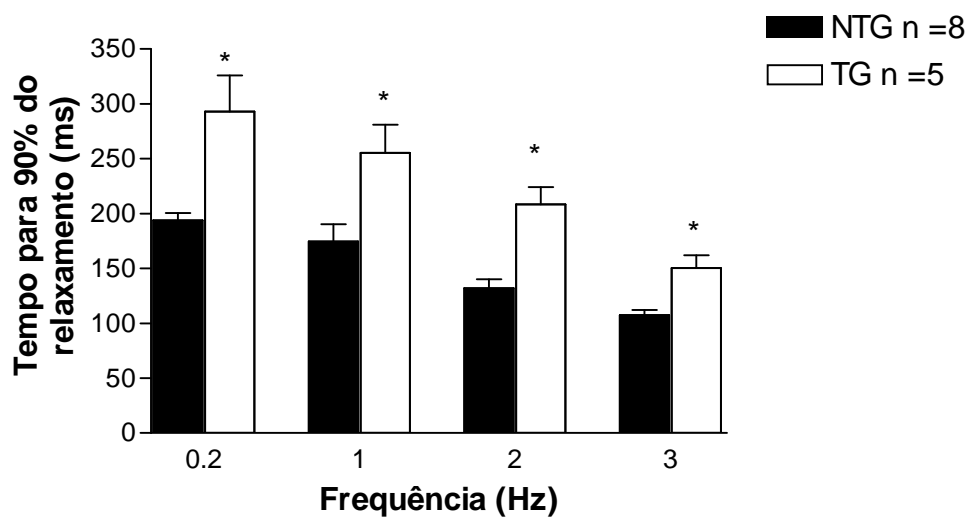
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG nas frequências de 0,2, 1, 2 e 3 Hz ($p < 0,05$).

FIGURA – 23 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO – TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA ESTIMULADOS ELETRICAMENTE À 3 HZ.



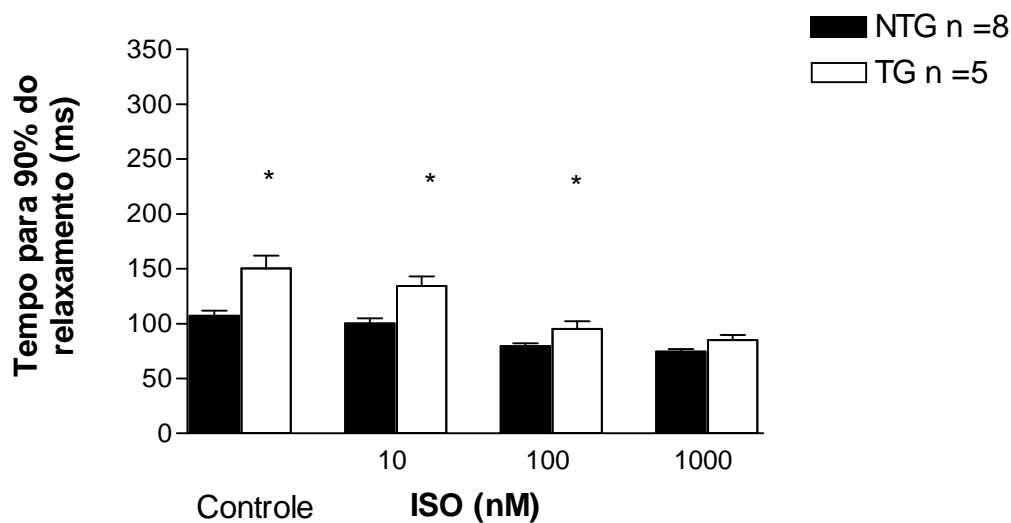
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG no estado basal (controle) e nas doses de 10 e 100 nM de ISO ($p < 0,05$).

FIGURA - 24 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA.



NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG nas frequências de 0,2, 1, 2 e 3 Hz ($p < 0,05$).

FIGURA - 25 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE DUAS A TRÊS SEMANAS DE VIDA.



NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG no estado basal e nas doses de 10 e 100 nM de ISO ($p < 0,05$).

4.6.2 Camundongos com três a quatro semanas de vida

As figuras 26 e 27 mostram os efeitos da alteração da frequência de estimulação elétrica ou da exposição de músculos papilares a doses crescentes de Isoproterenol, um estimulador β - adrenérgico que estimula ambos, contração e relaxamento cardíaco, no tempo para o pico de contração em músculo papilar esquerdo de camundongos transgênicos (TG) e não – transgênicos (NTG).

Nas figuras 26 e 27 pode-se observar que não há diferença significativa no tempo para o pico de contração entre camundongos TG e NTG. De fato, inúmeros trabalhos (PRABHAKAR *et al.*, 2001; GOLITSINA *et al.*, 1997; MUTHUCHAMY *et al.*, 1999; MICHELE *et al.*, 1999) encontraram um efeito primário e mais proeminente da mutação da TM Glu180Gly no tempo de relaxamento do que no tempo para o pico de contração.

FIGURA - 26 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA O PICO DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO -TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA.

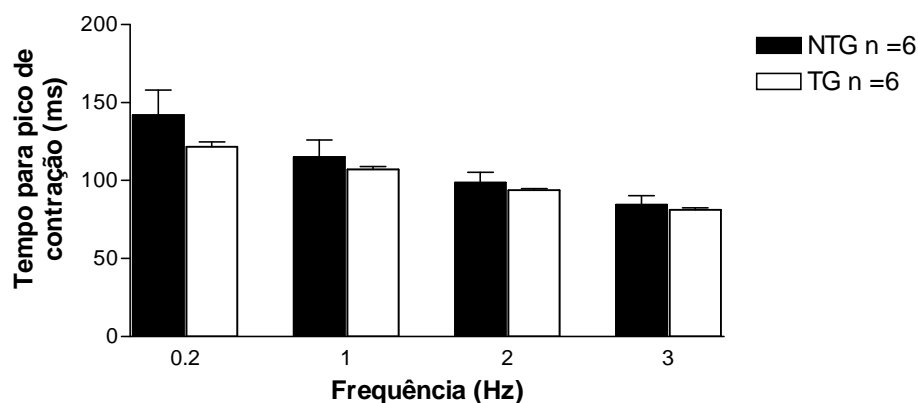
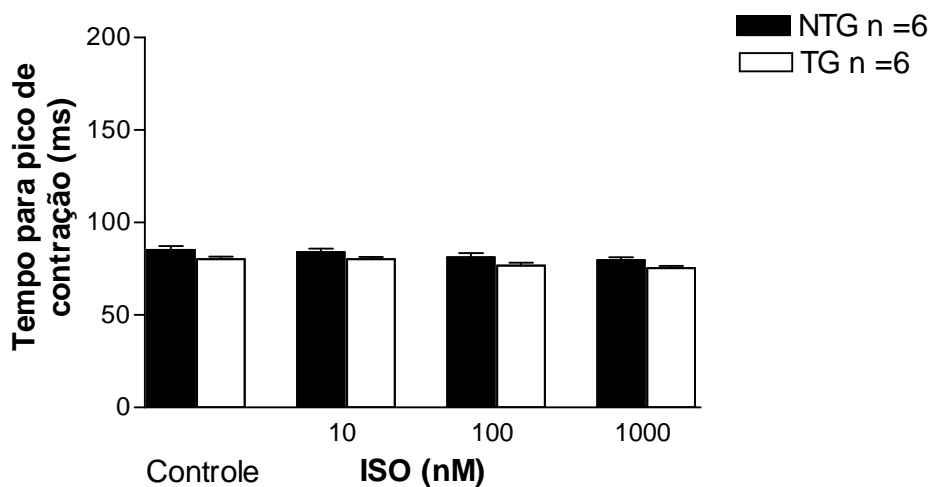


FIGURA – 27 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA O PICO DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO-TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA ESTIMULADOS ELETRICAMENTE A 3 HZ.

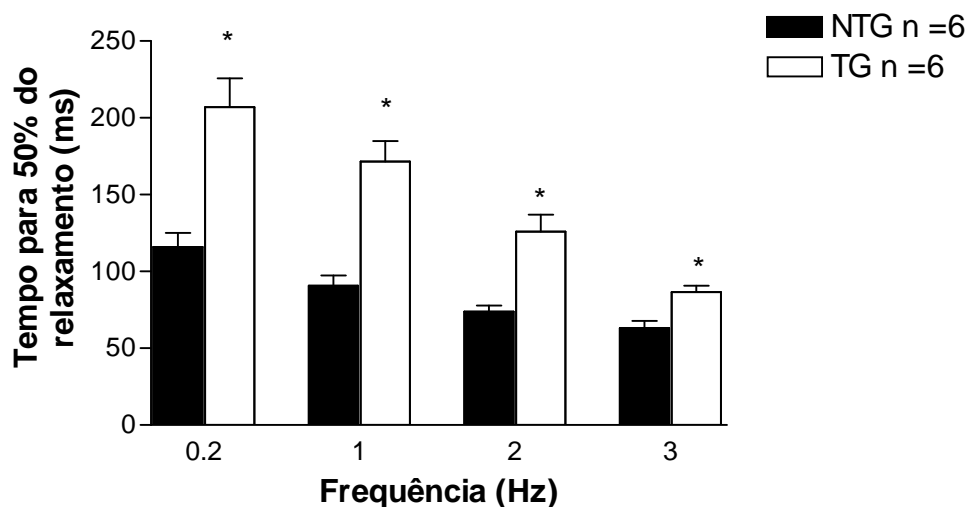


As figuras 28, 30 e 32 mostram a ação da frequência nos tempos para 50, 75 e 90% do relaxamento respectivamente, em músculo papilar esquerdo de camundongos TG e NTG.

As figuras 29, 31 e 33 mostram o efeito da administração de doses crescentes de Isoproterenol (ISO) nos tempos para 50, 75 e 90% do relaxamento respectivamente, em músculo papilar esquerdo de camundongos TG e NTG.

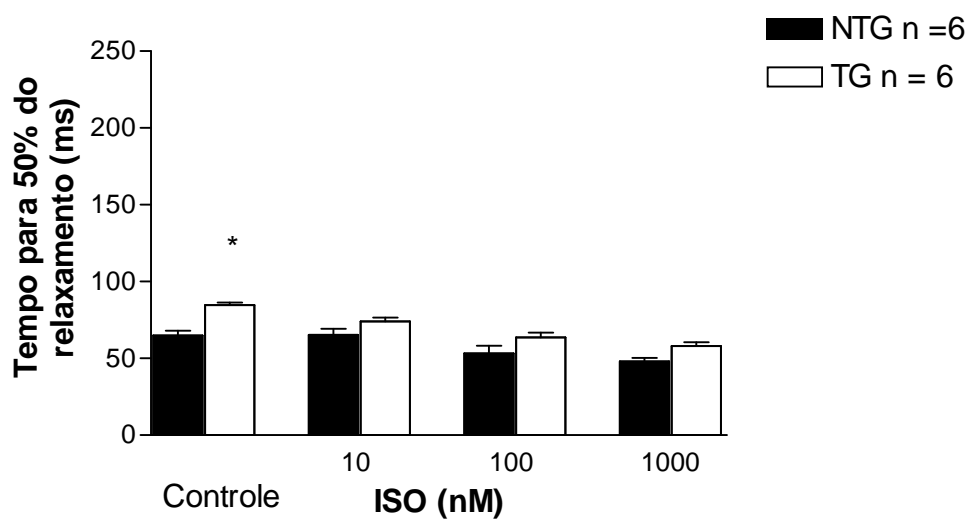
Como mostrado nas figuras 28, 29, 30, 31, 32 e 33 o tempo para 50, 75 e 90% do relaxamento é significativamente maior em camundongos TG que em NTG nas frequências de 0,2, 1 e 2 e 3 Hz e também mesmo após a administração de doses crescentes de Isoproterenol (ISO).

FIGURA – 28 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA.



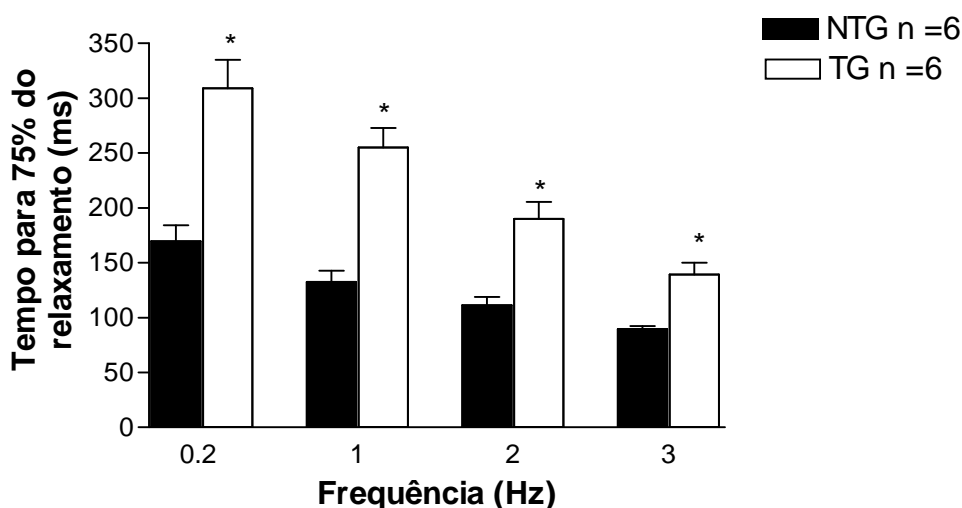
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG nas frequências de 0,2, 1, 2 e 3 Hz ($p < 0,05$).

FIGURA – 29 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA ESTIMULADOS ELETRICAMENTE A 3 HZ.



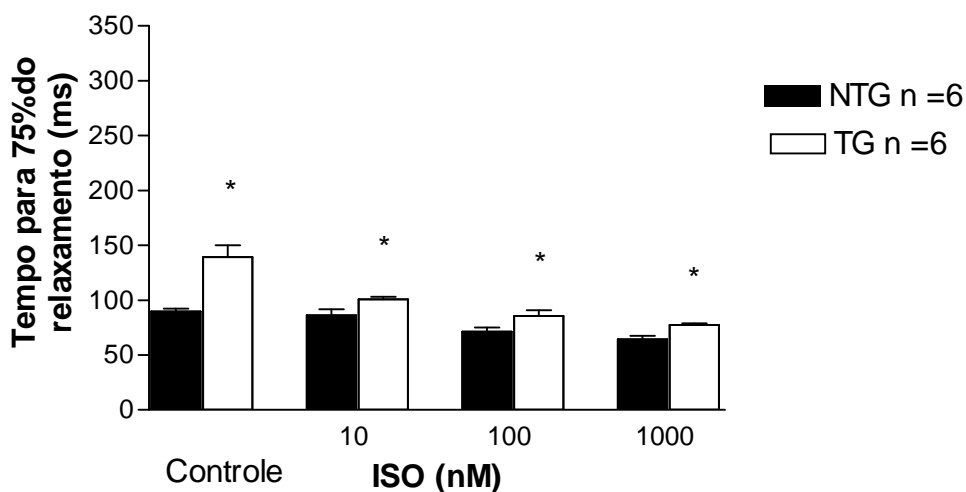
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG no estado basal ($p < 0,05$).

FIGURA – 30 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA.



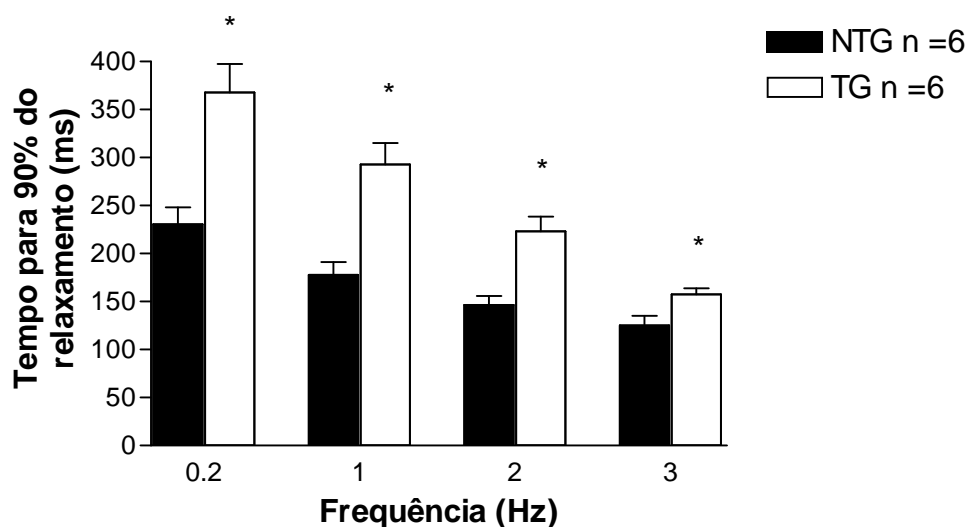
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG nas frequências de 0,2, 1, 2 e 3 Hz ($p < 0,05$).

FIGURA – 31 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 75% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA ESTIMULADOS ELETRICAMENTE A 3 HZ.



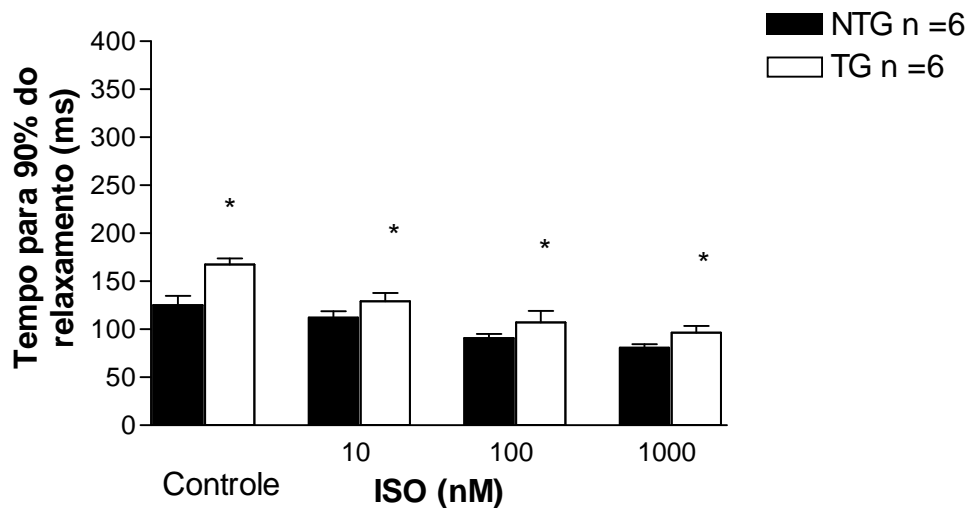
NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG no estado basal e após a administração de 10, 100 e 1000 nM de ISO ($p < 0,05$).

FIGURA - 32 EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA.



NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG nas frequências de 0,2, 1, 2 e 3 Hz ($p < 0,05$).

FIGURA - 33 EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE ISOPROTERENOL (ISO) NO TEMPO PARA 90% DO RELAXAMENTO DE MÚSCULO PAPILAR ESQUERDO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (TG) E NÃO - TRANSGÊNICOS (NTG) DE TRÊS A QUATRO SEMANAS DE VIDA.



NOTA: * diferença estatisticamente significativa entre animais NTG e TG no estado basal e após a administração de 10, 100 e 1000 nM de ISO ($p < 0,05$).

5.0 DISCUSSÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as que mais matam no mundo segundo Redwood, 1999 e também segundo a Associação Americana do Coração (AHA).

A FHC é a causa mais comum de morte em jovens, que se não fosse por essa patologia que muitas vezes não é diagnosticada, seriam saudáveis. Muitos desses jovens morrem precocemente durante estresse físico ou emocional. Entretanto, dentro de uma mesma família portadora de algum tipo de mutação em uma das proteínas sarcoméricas ainda existe uma significativa variação, portanto, não existindo uma história natural “benigna” ou “maligna”, já que as influências ambientais tem seu papel no desenvolvimento do fenótipo da patologia (REDWOOD *et al.*, 1999).

A incidência de FHC é de 0,1 à 0,2% da população, sendo que a molécula de tropomiosina é uma das sete proteínas sarcoméricas que podem estar mutadas em FHC. Uma mutação desta proteína afeta o funcionamento cardíaco já que esta é essencial para o perfeito funcionamento dos miofilamentos contráteis cardíacos.

Existem quatro mutações pontuais na α -Tropomiosina (α -TM), as quais estão ligadas ao desenvolvimento de FHC: Ala63Val, Lys70Thr, Asp175Asn e Glu180Gly. Duas destas estão localizadas na região Cys 190 onde a TM se liga a TnT: Asp175Asn e Glu180Gly. Ambas alteram a função diastólica miocárdica (EVANS *et al.*, 2000) desestabilizando a estrutura da TM, aumentando sua flexibilidade, porém, foi mostrado por alguns estudos (GOLITSINA *et al.*, 1997; PRABHAKAR *et al.*, 2001) que a mutação Glu180Gly aumenta a flexibilidade da TM três vezes mais, desta forma diminuindo a afinidade pela F-actina três vezes comparado com a mutação Asp175Asn ou em camundongos nativos. Dessa forma a mutação Glu180Gly compromete mais severamente as funções de contratilidade cardíaca, levando a morte dos camundongos TG em 2 à 4 meses de idade (PRABHAKAR *et al.*, 2001). Da mesma forma, em seres humanos, esta forma de FHC está associada a arritmias prematuras e à morte repentina em pessoas jovens (BONNE *et al.*, 1998).

Neste estudo objetivou-se mostrar as alterações nos parâmetros de contratilidade dos camundongos portadores da mutação da TM Glu180Gly. Os achados dos experimentos com camundongos de duas a três e de três a quatro semanas de vida mostram primariamente a deficiência no relaxamento destes camundongos, visto que os tempos de relaxamento são significativamente mais longos em todas as frequências estudadas, demonstrando que os miofilamentos destes papilares podem ser mais sensíveis ao cálcio. Da mesma forma, PRABHAKAR *et al.*, 2001, utilizando miofibrilas cardíacas isoladas de camundongos portadores da mutação Glu180Gly da TM, demonstrou grande disfunção diastólica e aumento da sensibilidade ao cálcio das miofibrilas cardíacas provenientes desses animais. Esse aumento da sensibilidade ao cálcio ocorre devido a desestabilização da estrutura da TM, que favorece uma conformação ligadora de cálcio no filamento fino (PRABHAKAR *et al.*, 2001; DANIEL *et al.*, 1999).

Neste estudo mostrou-se que o relaxamento foi grandemente acelerado nos animais TG quando se compara com animais NTG quando se aumenta a frequência de estimulação para 1, 2 e 3 Hz, respectivamente, embora continue mais longo a cada frequência nos animais TG. Essa aceleração é dada pelo índice de aceleração do relaxamento (Tempo para 50, 75 e 90% (respectivamente) do relaxamento à 1, 2 e 3 Hz (respectivamente)/ Tempo para 50, 75 e 90% (respectivamente) do relaxamento à 0,2 Hz) ($p < 0,05$). A aceleração do relaxamento dependente do aumento da frequência de estimulação é devido a fosforilação do FL e/ou da SERCA2 pelo complexo cálcio-calmodulina (CaMKII) (BERS, 2001). Assim, é possível que os papilares dos animais TG ativem mais a CaMKII em resposta ao aumento da frequência de estimulação, como também este efeito de aceleração pode ser devido a uma supressão de FL que age inibindo a SERCA2 e esta inibição é grandemente atenuada quando se aumenta a frequência de estimulação. Também especula-se que a aceleração do relaxamento mais pronunciada nos animais TG pode ser devido a um aumento na expressão de SERCA2 nestes animais. A SERCA2 é continuamente inibida por FL até que o aumento da frequência de estimulação inicie o mecanismo que leva a fosforilação de ambos: FL e SERCA2. Ainda especula-se que estes mecanismos possam atuar em conjunto. Ainda é importante ressaltar que embora os níveis de fosforilação de FL e/ou SERCA2 nos animais TG possam estar sendo grandemente aumentados pelo

aumento da frequência de estimulação, quando se analisa cada frequência separadamente, estes níveis podem ser ainda menores do que nos animais NTG. Ainda é importante ressaltar que embora o relaxamento seja grandemente acelerado nos animais TG quando se aumenta a frequência de estimulação, este ainda é estatisticamente mais longo do que nos animais NTG, demonstrando uma disfunção diastólica em todas as frequências estudadas.

Mecanicamente, vários fatores contribuem para a regulação do relaxamento cardíaco em camundongos e em seres humanos. Estes fatores incluem a regulação da SERCA2 pelo FL e a desativação da contração pela $cTnI$, ambos alvo de fosforilação pela PKA. Entretanto, tanto em camundongos quanto em humanos em condições fisiológicas, a $cTnI$ se encontra quase totalmente fosforilada. Isto sugere que sob condições fisiológicas basais, a reserva cardíaca é pequena e estimulação β - adrenérgica não pode acelerar o relaxamento significativamente através da fosforilação de FL. Dessa forma, o fato de a mutação Glu180Gly da TM causar uma lentificação do relaxamento mostra que a inativação da contração pelo filamento fino deve ter um importante papel na regulação do relaxamento.

A diferença nos tempos de relaxamento se manteve mesmo após a administração de doses crescentes de ISO, um importante agonista β - adrenérgico que estimula ambos, contração e relaxamento dos miócitos cardíacos. No entanto, pode-se perceber que a ação de ISO de aumentar a velocidade de relaxamento foi mais pronunciada nos animais TG do que nos animais NTG em ambas as idades, já que o índice de aceleração do relaxamento (Tempo para 50, 75 e 90% (respectivamente) do relaxamento com ISO na concentração de 1000 nM/ Tempo para 50, 75 e 90% (respectivamente) do relaxamento no estado basal) foi maior nos animais TG do que nos animais NTG ($p < 0,05$). Isso demonstra que os animais TG, em ambas as idades, ainda possuem capacidade de responder à estimulação β - adrenérgica com aceleração da velocidade de relaxamento. Importante ressaltar que os efeitos da estimulação β - adrenérgica nos papilares dos animais TG não deve ser devido a uma diferença na densidade dos receptores β - adrenérgicos, pois foi mostrado por EVANS *et al*, 2000, que a densidade destes receptores é a mesma tanto nos animais TG quanto nos animais NTG. A estimulação β - adrenérgica eleva a concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), o que

eleva a concentração de proteína quinase A (PKA) e esta fosforila proteínas-chave no processo de acoplamento excitação-contração como a cTnI (diminuindo a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio) e FL (atenuando a inibição sobre as SERCAs2), o que acelera a velocidade de relaxamento (FENTZKE, *et al*, 1999; WOLSKA *et al*, 2002; WOLSKA *et al*, 2003) . Portanto, após estimulação β - adrenérgica a recaptação de íons cálcio para dentro do RS é grandemente aumentada. Especula-se que no estado basal (3 Hz), nos animais TG, os níveis de fosforilação de cTnI e/ou fosfolambano devem se encontrar em um nível menor do que nos animais NTG. Dessa forma, a fosforilação destes pela PKA levaria a uma grande aceleração da velocidade de relaxamento. Por outro lado, também existe a possibilidade de os animais TG superexpressarem SERCA2, porém, no estado basal, esta bomba é continuamente inibida por FL, inibição essa que começa a ser atenuada com o aumento da frequência e estimulação β - adrenérgica. Além disso, uma superexpressão de FL nos animais TG também poderia estar correlacionado com esses resultados encontrados, já que no estado basal (antes da administração de ISO) a SERCA2 se encontraria altamente inibida por esta proteína, inibição esta que seria atenuada com a fosforilação do FL pela PKA após estimulação β - adrenérgica. Ainda é importante ressaltar que embora o relaxamento seja grandemente acelerado nos animais TG quando se administra doses crescentes de ISO, este ainda é estatisticamente mais longo do que nos animais NTG, demonstrando que a disfunção diastólica não é revertida por estimulação β - adrenérgica.

Este estudo mostrou também que não há diferença significativa no tempo para o pico de contração entre camundongos TG e NTG. De fato, inúmeros trabalhos (PRABHAKAR *et al.*, 2001; GOLITSINA *et al.*, 1997; MUTHUCHAMY *et al.*, 1999; MICHELE *et al.*, 1999) encontraram um efeito primário e mais proeminente da mutação da TM Glu180Gly no tempo de relaxamento do que no tempo para o pico de contração, porém, diferenças no tempo de contração podem ser encontrados mesmo em estágios iniciais de hipertrofia, portanto, necessitando mais estudos para uma conclusão. Neste estudo, encontramos uma diferença no tempo para o pico de contração nos camundongos entre duas e três semanas de vida, porém, não foi encontrada esta alteração nos camundongos entre três e quatro

semanas de vida. Por outro lado, em estudos feitos por Prabhakar *et al*, 2001 e Daniel *et al*, 1999, os camundongos TG para TM Glu180Gly, apresentam um aumento da tensão máxima no estado basal à concentrações submáximas de cálcio, o que pode se refletir em uma velocidade de contração levemente mais rápida. Dessa forma, mais estudos se fazem necessários.

Outro importante achado deste estudo é que a mutação na TM Glu180Gly atenua a resposta de aumento de força dos cardiomiócitos à administração de isoproterenol, demonstrando a incapacidade destes cardiomiócitos de responder adequadamente quando a demanda de força é aumentada por agonistas β - adrenérgicos. Este efeito pode ser devido a maior sensibilidade dos miofilamentos ao íon cálcio, e dessa forma, uma contração muscular no estado basal já está próxima da força máxima obtida pelo músculo, assim como por um desequilíbrio no transporte de íons cálcio pelo sarcolema (através dos canais lentos de cálcio e/ou trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$), embora ainda não exista estudos que suportem esta hipótese.

Foi mostrado por este estudo que os animais portadores da mutação Glu180Gly da TM possuem uma Relação Força – Frequência descendente na temperatura de 25°C e contração isométrica, enquanto os camundongos NTG possuem uma Relação Força – Frequência inicialmente bifásica e que posteriormente tende a se manter em um determinado nível de força nestas mesmas condições. Este fenômeno pode ocorrer devido a uma incapacidade dos animais TG de recaptar cálcio para dentro do RS adequadamente, principalmente quando se aumenta a frequência de estimulação. A inabilidade de estocar cálcio adequadamente no RS atenua o aumento na força que é normalmente encontrada a altas frequências de estimulação, já que a concentração de cálcio disponível para liberação a cada batimento cardíaco é diminuída. Na frequência de 0.2 Hz a força é pode ser maior devido ao fenômeno de potenciação pós – repouso (Redel, et al., 2002), no qual, devido a um grande intervalo de tempo entre uma contração e outra, é possível estocar grande quantidade de cálcio dentro do RS em ambos animais TG e NTG, tendo o íon sempre disponível, em concentração adequada, para contração. Entretanto, como a estimulação é estável à 0,2 Hz, está hipótese de potenciação pós – repouso pode não ser verdadeira. Especula-se que nos animais TG possa haver um desequilíbrio no transporte de íons cálcio através do sarcolema que se torna mais proeminente à altas frequências de estimulação, quando um transporte

mais rápido e eficiente de íons cálcio para dentro e fora da célula e do RS, é necessário.

Também encontrou-se um dado referente aos tempos de relaxamento entre camundongos tanto TG quanto NTG entre duas e três semanas de vida e entre três a quatro semanas de vida. Os camundongos TG e NTG entre duas e três semanas de vida apresentam uma maior velocidade de relaxamento do que os camundongos TG e NTG entre três e quatro semanas de vida. Isso reflete o desenvolvimento cardíaco que ainda não está completo nos camundongos entre duas e três semanas de vida. Os camundongos neonatos ainda não possuem ou possuem Túbulos – T apenas em pequena quantidade e não adequadamente formados, além do RS estar esparso e com uma capacidade existente, porém, limitada de estocar e liberar cálcio, já que o RyR ainda não se acopla a DHPR e a atividade e densidade da SERCA2 ainda são pequenas (MAHONY, LYNN, 1996; HINTZ *et al.*, 2002; TIBBITS *et al.*, 2002; DAVIES *et al.*, 1996). A contração e relaxamento (MAHONY, LYNN, 1996; HINTZ *et al.*, 2002; TIBBITS *et al.*, 2002; DAVIES *et al.*, 1996; RIEDER *et al.*, 2002; MURREL *et al.*, 1994) nos neonatos ocorrem principalmente pelo inverso (contração) ou o modo normal (relaxamento) do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ da membrana plasmática, que estão presentes em densidade três vezes maior em neonatos que em adultos e possuem atividade maior que em adultos (TIBBITS *et al.*, 2002; HARRER *et al.*, 1997; RIEDER *et al.*, 2002; MURREL *et al.*, 1994). Portanto, os camundongos entre duas e três semanas de vida se encontram num estágio intermediário, onde não são neonatos, porém, ainda não houve completo desenvolvimento das estruturas e proteínas contráteis. Também foi encontrado que a força absoluta (em Newtons) é menor nestes camundongos jovens (dados não mostrados). Assim, especula - se que a velocidade de relaxamento é maior nos camundongos entre duas e três semanas de vida porque a atividade contrátil deste ainda é um misto entre ação do RS (não completamente desenvolvido) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, desta forma estes camundongos ativam menos os miofilamentos, produzem menos força e a remoção da menor quantidade de cálcio é portanto mais rápida. A medida que ocorre maturação, a força aumenta porque aumenta a quantidade de proteínas contráteis e a disponibilidade de cálcio para os miofilamentos e assim, o tempo de relaxamento se prolonga até atingir aquele de adultos.

Neste trabalho objetivou-se determinar e comparar as alterações nos parâmetros fisiológicos que ocorrem nos camundongos TG com mutação da TM Glu 180Gly e NTG, em músculo papilar esquerdo em diferentes semanas de vida a diferentes frequências e após a administração de diferentes doses de isoproterenol. Foi encontrado que os camundongos TG apresentam um relaxamento mais lento, refletindo uma deficiência diastólica, assim como uma relação força frequência descendente, refletindo seu desequilíbrio nos sistemas de transporte e armazenamento de íons cálcio e uma maior aceleração do relaxamento antes (diferentes frequências) e após estimulação β - adrenérgica, refletindo diferenças na expressão e/ou fosforilação de proteínas-chave, além de uma menor resposta ao agente β - adrenérgico isoproterenol com aumento de força, refletindo sua inabilidade de responder adequadamente quando se aumenta a demanda de força para o músculo cardíaco, refletindo sua maior sensibilidade aos íons cálcio.

Mutação da TM Glu180Gly leva a um prejuízo severo do relaxamento cardíaco, desta forma, a superexpressão da SERCA2 possivelmente aumentaria as velocidades de relaxamento e contração cardíaco, além de aumentar o estoque de cálcio e assim sua disponibilidade para contração, tendo um efeito inotrópico positivo sobre o coração. Uma inibição parcial da expressão de FL possivelmente teria o efeito de aumentar as velocidades de contração e relaxamento cardíacos, portanto também tendo um efeito inotrópico positivo sobre o coração, o que, em última análise, pode vir a ser um importante recurso para os pacientes portadores desta mutação quando diagnosticada precocemente .

É preciso entender as diferenças no aparato celular de cálcio e de fosforilação e expressão de proteínas dos miofilamentos entre os camundongos portadores da mutação da TM Glu180Gly e os camundongos NTG para que se possa comparar e esclarecer os mecanismos celulares responsáveis pela disfunção contrátil e encontrar caminhos que levem ao tratamento e cura de seres humanos portadores da mesma mutação.

6.0 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou pela primeira vez as alterações nos parâmetros contráteis em músculo papilar de ventrículo esquerdo de camundongos e delimitou a idade que essas alterações já estão presentes nestes animais.

Foi mostrado por este estudo que a mutação da TM Glu180Gly leva a um prejuízo severo das funções contráteis cardíacas, já que os camundongos portadores desta mutação apresentam alterações nos parâmetros de contratilidade mesmo ainda muito jovens, à partir de duas semanas de vida.

A mutação Glu180Gly da TM produz um grande e predominante efeito lusitrópico negativo, ou seja, de lentificação da velocidade de relaxamento cardíaco (disfunção diastólica). Este efeito está presente no estado basal devido a maior sensibilidade dos miofilamentos cardíacos ao cálcio e também após a administração de doses crescentes do estimulador β - adrenérgico Isoproterenol. No entanto, os animais TG apresentaram um maior índice de aceleração do relaxamento em resposta ao aumento da frequência de estimulação e em resposta a estimulação β - adrenérgica, demonstrando que os animais portadores da mutação da TM Glu180Gly apresentam capacidade de responder adequadamente ao aumento da frequência de estimulação e à estimulação β - adrenérgica com aumento da velocidade de relaxamento, porém, estes não reverteram a disfunção diastólica encontrada.

Este estudo também demonstrou que os animais portadores da mutação Glu180Gly possuem um índice de hipertrofia cardíaca significativamente maior quando compara-se com o índice de hipertrofia de animais NTG com a mesma idade. Dessa forma, mesmo na idade de duas a três semanas de vida, estes camundongos TG já apresentam sinais de hipertrofia cardíaca.

Por último, foi mostrado por este estudo que os animais portadores da mutação Glu180Gly da TM possuem uma Relação Força – Frequência descendente na temperatura de 25°C e contração isométrica, enquanto os camundongos NTG possuem uma Relação Força – Frequência inicialmente bifásica e que posteriormente tende a se manter em um determinado nível de força nestas mesmas condições. Isso pode demonstrar uma incapacidade dos animais TG de

estocar cálcio no interior do RS, especialmente quando estimulados eletricamente à altas frequências.

7.0 REFERÊNCIAS

1. **Almers W and Palade PT.** Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. *J Physiol* 312: 159-176, 1981.
2. **An RH, Davies MP, Doevendans PA, Kubalak SW, Bangalore R, Chien KR and Kass RS.** Developmental changes in beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ channels in embryonic mouse heart. *Circ Res* 78: 371-378, 1996.
3. **Anderson RG.** Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10909-10913, 1993.
4. **Bers DM.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205, 2002.
5. **Bers DM.** Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci* 7: d1697-d1711, 2002.
6. **Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH and Meyer M.** Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H249-H255, 2000.
7. **Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B and Schwartz K.** Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* 83: 580-593, 1998.
8. **Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, Pellegrino MA, Maron BJ, Spirito P, Watkins H and Reggiani C.** A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ Res* 82: 106-115, 1998.

9. **Chaudhri B, del Monte F, Hajjar RJ and Harding SE.** Interaction between increased SERCA2a activity and beta -adrenoceptor stimulation in adult rabbit myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2450-H2457, 2002.
10. **Cho YJ, Liu J and Hitchcock-DeGregori SE.** The amino terminus of muscle tropomyosin is a major determinant for function. *J Biol Chem* 265: 538-545, 1990.
11. **Coviello DA, Maron BJ, Spirito P, Watkins H, Vosberg HP, Thierfelder L, Schoen FJ, Seidman JG and Seidman CE.** Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutation of a "hot spot" in the alpha-tropomyosin gene. *J Am Coll Cardiol* 29: 635-640, 1997.
12. **Craig R and Lehman W.** Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments. *J Mol Biol* 311: 1027-1036, 2001.
13. **Davia K, Bernobich E, Ranu HK, del Monte F, Terracciano CM, MacLeod KT, Adamson DL, Chaudhri B, Hajjar RJ and Harding SE.** SERCA2A overexpression decreases the incidence of aftercontractions in adult rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1005-1015, 2001.
14. **Davia K, Hajjar RJ, Terracciano CM, Kent NS, Ranu HK, O'Gara P, Rosenzweig A and Harding SE.** Functional alterations in adult rat myocytes after overexpression of phospholamban with use of adenovirus. *Physiol Genomics* 1: 41-50, 1999.
15. **Davies MP, An RH, Doevendans P, Kubalak S, Chien KR and Kass RS.** Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. *Circ Res* 78: 15-25, 1996.
16. **DeSantiago J, Maier LS and Bers DM.** Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34: 975-984, 2002.
17. **Evans CC, Pena JR, Phillips RM, Muthuchamy M, Wieczorek DF, Solaro RJ and Wolska BM.** Altered hemodynamics in transgenic mice harboring mutant

- tropomyosin linked to hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2414-H2423, 2000.
18. **Fentzke RC, Buck SH, Patel JR, Lin H, Wolska BM, Stojanovic MO, Martin AF, Solaro RJ, Moss RL and Leiden JM.** Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart. *J Physiol* 517 (Pt 1): 143-157, 1999.
 19. **Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA and Michel T.** Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 22810-22814, 1996.
 20. **Flicker PF, Phillips GN, Jr. and Cohen C.** Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J Mol Biol* 162: 495-501, 1982.
 21. **Golitsina N, An Y, Greenfield NJ, Thierfelder L, Iizuka K, Seidman JG, Seidman CE, Lehrer SS and Hitchcock-DeGregori SE.** Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations on alpha-tropomyosin structure and function. *Biochemistry* 36: 4637-4642, 1997.
 22. **Golitsina N, An Y, Greenfield NJ, Thierfelder L, Iizuka K, Seidman JG, Seidman CE, Lehrer SS and Hitchcock-DeGregori SE.** Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations on alpha-tropomyosin structure and function. *Biochemistry* 38: 3850, 1999.
 23. **Gordon AM, Homsher E and Regnier M.** Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80: 853-924, 2000.
 24. **Gordon AM, Regnier M and Homsher E.** Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci* 16: 49-55, 2001.
 25. **Hardouin SN and Nagy A.** Mouse models for human disease. *Clin Genet* 57: 237-244, 2000.

26. **Harrer JM, Haghghi K, Kim HW, Ferguson DG and Kranias EG.** Coordinate regulation of SR Ca²⁺-ATPase and phospholamban expression in developing murine heart. *Am J Physiol* 272: H57-H66, 1997.
27. **He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockman HA, McDonough PM, Bluhm WF, Meyer M, Sayen MR, Swanson E and Dillmann WH.** Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 100: 380-389, 1997.
28. **Hintz KK, Norby FL, Duan J, Cinnamon MA, Doze VA and Ren J.** Comparison of cardiac excitation-contraction coupling in isolated ventricular myocytes between rat and mouse. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 191-198, 2002.
29. **Holubarsch C, Hasenfuss G, Thierfelder L, Pieske B and Just H.** The heart in heart failure. Ventricular and myocardial alterations. *Eur Heart J* 12 Suppl C: 8-13, 1991.
30. **Holubarsch C, Hasenfuss G, Thierfelder L, Pieske B and Just H.** The heart in heart failure. Ventricular and myocardial alterations. *Eur Heart J* 12 Suppl C: 8-13, 1991.
31. **James JF, Hewett TE and Robbins J.** Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res* 82: 407-415, 1998.
32. **Lehrer SS, Golitsina NL and Geeves MA.** Actin-tropomyosin activation of myosin subfragment 1 ATPase and thin filament cooperativity. The role of tropomyosin flexibility and end-to-end interactions. *Biochemistry* 36: 13449-13454, 1997.
33. **Lorenz JN.** A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R1565-R1582, 2002.

34. **Luo W, Wolska BM, Grupp IL, Harrer JM, Haghghi K, Ferguson DG, Slack JP, Grupp G, Doetschman T, Solaro RJ and Kranias EG.** Phospholamban gene dosage effects in the mammalian heart. *Circ Res* 78: 839-847, 1996.
35. **Mahony L.** Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart. *Cardiovasc Res* 31 Spec No: E61-E67, 1996.
36. **Maier LS and Bers DM.** Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34: 919-939, 2002.
37. **Maier LS, Bers DM and Pieske B.** Differences in Ca(2+)-handling and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2249-2258, 2000.
38. **McKillop DF and Geeves MA.** Regulation of the acto.myosin subfragment 1 interaction by troponin/tropomyosin. Evidence for control of a specific isomerization between two acto.myosin subfragment 1 states. *Biochem J* 279 (Pt 3): 711-718, 1991.
39. **McKillop DF and Geeves MA.** Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys J* 65: 693-701, 1993.
40. **Meyer M, Bluhm WF, He H, Post SR, Giordano FJ, Lew WY and Dillmann WH.** Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *Am J Physiol* 276: H779-H785, 1999.
41. **Michele DE, Albayya FP and Metzger JM.** Direct, convergent hypersensitivity of calcium-activated force generation produced by hypertrophic cardiomyopathy mutant alpha-tropomyosins in adult cardiac myocytes. *Nat Med* 5: 1413-1417, 1999.
42. **Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J, Jr., Kranias EG, Giles WR and Chien KR.** Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 99: 313-322, 1999.

43. **Minamisawa S, Sato Y, Tatsuguchi Y, Fujino T, Imamura S, Uetsuka Y, Nakazawa M and Matsuoka R.** Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 1-4, 2003.
44. **Montgomery DE, Wolska BM, Pyle WG, Roman BB, Dowell JC, Buttrick PM, Koretsky AP, Del Nido P and Solaro RJ.** alpha-Adrenergic response and myofilament activity in mouse hearts lacking PKC phosphorylation sites on cardiac Tnl. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H2397-H2405, 2002.
45. **Murrell WG, Masters CJ, Willis RJ and Crane DI.** On the ontogeny of cardiac gene transcripts. *Mech Ageing Dev* 77: 109-126, 1994.
46. **Muthuchamy M, Pieples K, Rethinasamy P, Hoit B, Grupp IL, Boivin GP, Wolska B, Evans C, Solaro RJ and Wieczorek DF.** Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in alpha-tropomyosin manifests cardiac dysfunction. *Circ Res* 85: 47-56, 1999.
47. **Pan BS, Hannon JD, Wiedmann R, Potter JD, Kranias EG, Shen YT, Johnson RG, Jr. and Housmans PR.** Effects of isoproterenol on twitch contraction of wild type and phospholamban-deficient murine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 31: 159-166, 1999.
48. **Pieples K, Arteaga G, Solaro RJ, Grupp I, Lorenz JN, Boivin GP, Jagatheesan G, Labitzke E, DeTombe PP, Konhilas JP, Irving TC and Wieczorek DF.** Tropomyosin 3 expression leads to hypercontractility and attenuates myofilament length-dependent Ca(2+) activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1344-H1353, 2002.
49. **Prabhakar R, Boivin GP, Grupp IL, Hoit B, Arteaga G, Solaro JR and Wieczorek DF.** A familial hypertrophic cardiomyopathy alpha-tropomyosin mutation causes severe cardiac hypertrophy and death in mice. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1815-1828, 2001.
50. **Prabhakar R, Boivin GP, Hoit B and Wieczorek DF.** Rescue of high expression beta-tropomyosin transgenic mice by 5-propyl-2-thiouracil.

Regulating the alpha-myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem* 274: 29558-29563, 1999.

51. **Redel A, Baumgartner W, Golenhofen K, Drenckhahn D and Golenhofen N.** Mechanical activity and force-frequency relationship of isolated mouse papillary muscle: effects of extracellular calcium concentration, temperature and contraction type. *Pflugers Arch* 445: 297-304, 2002.
52. **Redwood CS, Moolman-Smook JC and Watkins H.** Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 44: 20-36, 1999.
53. **Rethinasamy P, Muthuchamy M, Hewett T, Boivin G, Wolska BM, Evans C, Solaro RJ and Wieczorek DF.** Molecular and physiological effects of alpha-tropomyosin ablation in the mouse. *Circ Res* 82: 116-123, 1998.
54. **Rieder CV and Fliegel L.** Developmental regulation of Na(+)/H(+) exchanger expression in fetal and neonatal mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H273-H283, 2002.
55. **Rybin VO, Xu X and Steinberg SF.** Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae : stimulation of local protein phosphorylation. *Circ Res* 84: 980-988, 1999.
56. **Saito A, Inui M, Radermacher M, Frank J and Fleischer S.** Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 107: 211-219, 1988.
57. **Scriven DR, Dan P and Moore ED.** Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79: 2682-2691, 2000.
58. **Serysheva II, Orlova EV, Chiu W, Sherman MB, Hamilton SL and van Heel M.** Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel. *Nat Struct Biol* 2: 18-24, 1995.

59. **Serysheva II, Schatz M, van Heel M, Chiu W and Hamilton SL.** Structure of the skeletal muscle calcium release channel activated with Ca²⁺ and AMP-PCP. *Biophys J* 77: 1936-1944, 1999.
60. **Song LS, Sham JS, Stern MD, Lakatta EG and Cheng H.** Direct measurement of SR release flux by tracking 'Ca²⁺ spikes' in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 512 (Pt 3): 677-691, 1998.
61. **Stojanovic MO, Ziolo MT, Wahler GM and Wolska BM.** Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C342-C349, 2001.
62. **Stuyvers BD, McCulloch AD, Guo J, Duff HJ and ter Keurs HE.** Effect of stimulation rate, sarcomere length and Ca(2+) on force generation by mouse cardiac muscle. *J Physiol* 544: 817-830, 2002.
63. **Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG and Seidman CE.** Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77: 701-712, 1994.
64. **Tibbits GF, Xu L and Sedarat F.** Ontogeny of excitation-contraction coupling in the mammalian heart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132: 691-698, 2002.
65. **Vemuri R, Lankford EB, Poetter K, Hassanzadeh S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ and Epstein ND.** The stretch-activation response may be critical to the proper functioning of the mammalian heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1048-1053, 1999.
66. **Vetter R, Studer R, Reinecke H, Kolar F, Ostadalova I and Drexler H.** Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na⁺-Ca(2+)-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1689-1701, 1995.

67. **Wagenknecht T, Berkowitz J, Grassucci R, Timerman AP and Fleischer S.** Localization of calmodulin binding sites on the ryanodine receptor from skeletal muscle by electron microscopy. *Biophys J* 67: 2286-2295, 1994.
68. **Wagenknecht T, Grassucci R, Berkowitz J, Wiederrecht GJ, Xin HB and Fleischer S.** Cryoelectron microscopy resolves FK506-binding protein sites on the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biophys J* 70: 1709-1715, 1996.
69. **Wagenknecht T, Grassucci R, Frank J, Saito A, Inui M and Fleischer S.** Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 338: 167-170, 1989.
70. **Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman JG and .** Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 332: 1058-1064, 1995.
71. **Watkins H, Seidman JG and Seidman CE.** Familial hypertrophic cardiomyopathy: a genetic model of cardiac hypertrophy. *Hum Mol Genet* 4 Spec No: 1721-1727, 1995.
72. **Wibo M, Bravo G and Godfraind T.** Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circ Res* 68: 662-673, 1991.
73. **Williams RS and Wagner PD.** Transgenic animals in integrative biology: approaches and interpretations of outcome. *J Appl Physiol* 88: 1119-1126, 2000.
74. **Wolska BM, Arteaga GM, Pena JR, Nowak G, Phillips RM, Sahai S, de Tombe PP, Martin AF, Kranias EG and Solaro RJ.** Expression of slow skeletal troponin I in hearts of phospholamban knockout mice alters the relaxant effect of beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* 90: 882-888, 2002.
75. **Wolska BM, Keller RS, Evans CC, Palmiter KA, Phillips RM, Muthuchamy M, Oehlenschlaeger J, Wieczorek DF, de Tombe PP and Solaro RJ.**

Correlation between myofilament response to Ca^{2+} and altered dynamics of contraction and relaxation in transgenic cardiac cells that express beta-tropomyosin. *Circ Res* 84: 745-751, 1999.

76. **Wolska BM, Stojanovic MO, Luo W, Kranias EG and Solaro RJ.** Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular Ca^{2+} . *Am J Physiol* 271: C391-C397, 1996.
77. **Wolska BM and Wieczorek DM.** The role of tropomyosin in the regulation of myocardial contraction and relaxation. *Pflugers Arch* 446: 1-8, 2003.

(38-57)

(4; 5; 16; 36; 37; 58-77)

(1-3; 6-15; 17-35)

