

Cardiomiopatia Hipertrófica: Como as Mutações Levam à Doença?

Hypertrophic Cardiomyopathy: How do Mutations Lead to Disease?

Júlia Daher Carneiro Marsiglia e Alexandre Costa Pereira

Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP – Brasil

Resumo

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é a doença cardíaca genética monogênica mais comum, com uma prevalência estimada de 1:500 na população em geral. Clinicamente, CMH é caracterizada por hipertrofia das paredes do ventrículo esquerdo, principalmente o septo, geralmente assimétrica, na ausência de qualquer doença cardíaca ou sistêmica que leve a uma hipertrofia secundária. A manifestação clínica da doença tem grande heterogeneidade, variando desde sintomas leves até insuficiência cardíaca, em idade avançada, e morte cardíaca súbita, em jovens, sendo causada por uma mutação em um dos genes que codificam uma proteína do sarcômero, disco Z ou controladores intracelulares de cálcio. Apesar de muitos genes e mutações já serem conhecidos por causar CMH, as vias moleculares que levam ao fenótipo ainda não são claras. Esse artigo teve como foco os mecanismos moleculares da CMH, as vias da mutação ao fenótipo clínico e como o genótipo da doença se correlaciona com o fenótipo.

Introdução

A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é a doença cardíaca genética monogênica mais comum, com prevalência estimada de 1:500¹. A CMH é caracterizada por hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), especialmente do septo, geralmente assimétrica, na ausência de qualquer doença cardíaca ou sistêmica, que leva a uma hipertrofia secundária. O curso clínico apresenta uma grande heterogeneidade inter e intrafamiliar, que variam de sintomas leves de insuficiência cardíaca, em idade avançada, até morte súbita cardíaca, em indivíduos jovens. Além da hipertrofia cardíaca, há acentuado desarranjo histológico de miofilamentos e diferentes graus de fibrose².

A doença é uma importante causa de incapacidade e morte em pacientes de todas as idades, embora a morte súbita e inesperada em indivíduos jovens seja talvez o componente mais devastador de sua história natural. Essa revisão se concentrou sobre os mecanismos moleculares da CMH, quais são as vias da

mutação para o fenótipo clínico e como o genótipo da doença se correlaciona com o fenótipo. Além disso, apresentamos dados recentes do perfil genético de pacientes com CMH na população brasileira^{1,3}.

Genética da Cardiomiopatia Hipertrófica

A doença é causada por uma mutação em um dos genes que codificam uma proteína do sarcômero, Z-disco ou moduladores intracelulares de cálcio (Tabela 1). Para genes sarcoméricos, as mutações identificadas são, em sua maioria, substituições de um único nucleotídeo e para a maioria dos genes. Acredita-se que a proteína mutante seja incorporada ao sarcômero, exercendo um efeito dominante negativo (mutações dominantes negativas). Até agora, a única exceção é o gene da Proteína C Cardíaca Ligada à Miosina (*MYBPC3*), em que muitas mutações são deleções ou inserções que levam a uma mutação do tipo *frameshift* e a maioria das mutações leva a uma proteína truncada sem função; assim, nesse caso, a doença parece ser causada por um mecanismo de haploinsuficiência⁴. Para outros genes relacionados (Z-disco e mediadores de cálcio), o mecanismo específico ainda não está elucidado. A maioria das mutações é do tipo substituição de um único nucleotídeo (ou mutação de ponto), mas não se sabe se a doença é causada pela dominância negativa ou por haploinsuficiência.

Associação genótipo versus fenótipo

A compreensão das formas moleculares de mutações que levam à doença abre a perspectiva para a identificação de ambas as associações genótipo-fenótipo moleculares e clínicas. Isso poderia levar não somente a melhores modelos de previsão de doenças, mas também servir para orientar a terapêutica. De fato, vários autores têm descrito sugestivas associações genótipo-fenótipo em diversas populações.

Presença ou ausência de uma mutação identificada

A detecção de mutações em um dos genes sarcoméricos está associada com o aumento da gravidade da doença. Um estudo revelou que a razão entre espessura do Septo Intraventricular (SIV) e da parede posterior era significativamente maior nos pacientes com mutações nos genes *MYBPC3*, *MYH7* ou *TPM1* do que em pacientes sem mutações nos genes sarcoméricos⁵. Por outro lado, observou-se que outro grupo de pacientes com hipertrofia apical e um genótipo positivo era mais propenso a ter um histórico familiar positivo para CMH do que pacientes com genótipo negativo. Em todos os outros aspectos, não

Palavras-chave

Cardiomiopatia Hipertrófica; Fenótipo; Genótipo; Genes; Sarcômero.

Correspondência: Júlia Daher Carneiro Marsiglia •
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César. CEP 05403-900, São Paulo, SP – Brasil
E-mail: julia.marsiglia@usp.br; jaune18@yahoo.com.br
Artigo recebido em 13/06/13; revisado em 22/08/13; aceito em 23/08/13.

DOI: 10.5935/abc.20140022

Tabela 1 - Genes envolvidos na cardiomiopatia hipertrófica e sua frequência em pacientes com essa doença

Gene	Proteína	Cromossomo	Frequência (%)
Genes dos miofilamentos			
<i>TTN</i>	Titina	2	<1
<i>MYH7</i>	Beta-miosina de cadeia pesada	14	15-25
<i>MYH6</i>	Alfa-miosina de cadeia pesada	14	< 1
<i>MYL2</i>	Miosina regulatória de cadeia leve	12	< 2
<i>MYL3</i>	Miosina essencial de cadeia leve	3	< 1
<i>MYBPC3</i>	Miosina ligada à proteína C	11	15-25
<i>TNNT2</i>	Troponina T	1	< 5
<i>TNNI3</i>	Troponina I	19	< 5
<i>TPM1</i>	Alfa-tropomiosina	15	< 5
<i>ACTC</i>	Alfa actina cardíaca	15	< 1
<i>TNNC1</i>	Troponina C	3	< 1
Genes do disco Z			
<i>LBD3</i>	Domínio 3 de ligação à proteína LIM	10	1-5
<i>CSRFP3</i>	Proteína muscular LIM	17	< 1
<i>TCAP</i>	Teletonina	17	< 1
<i>VCL</i>	Vinculina/metavinculina	10	< 1
<i>ACTN2</i>	Alfa-actina	1	< 1
<i>MYOZ2</i>	Miozenina	4	< 1
<i>NEXN</i>	Nexilina	1	< 1
Genes mediadores de cálcio			
<i>JPH2</i>	Junctofilina-2	20	< 1
<i>PLN</i>	Fosfolamban	6	< 1

houve diferença entre pacientes com genótipo positivo versus negativo⁶.

Outro grupo descreveu que a morfologia de hipertrofia tem um impacto na positividade dos testes genéticos. Eles compararam os subtipos de hipertrofia sigmoide, reversa, apical e neutra, e constataram que, no subtipo reverso, uma mutação em um dos genes dos miofilamentos pode ser identificada em quase 80% dos pacientes, enquanto que, no tipo sigmoide, menos de 10% dos pacientes carregam uma mutação sarcomérica. Eles sugerem que esses dados podem ser utilizados para a tomada de decisão em relação à execução de testes genéticos⁷. Na população brasileira, os autores encontraram correlação entre a presença de uma mutação identificada com uma maior frequência de taquicardia ventricular não sustentada, menor idade e os pacientes eram mais jovens no momento do diagnóstico, quando comparados com os pacientes sem mutação identificada nos genes *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2*⁸.

Gene mutado

Houve um consenso inicial de que mutações no gene *MYH7* tinham características clínicas variáveis, com algumas alterações malignas^{1,9}; mutações no gene *MYBPC3* estavam relacionadas

com um prognóstico mais benigno^{10,11}; e que mutações no gene *TNNT2*^{12,13} estavam relacionadas com taxas mais altas de morte súbita com pouca ou nenhuma hipertrofia. Para o gene *MYH7*, ainda há uma grande variabilidade entre os pacientes, que varia de doença assintomática até fenótipos muito graves.

No entanto, para os outros dois genes descritos em primeiro lugar e, posteriormente, para os outros genes relacionados com a CMH, ainda não é possível fazer uma suposição baseada no gene mutado. Estudo realizado por Wang e cols.¹⁴ comparou pacientes com mutações nos genes *MYH7* e *MYBPC3* e concluiu que os pacientes com mutações no gene *MYH7* desenvolvem a doença em uma idade mais jovem, têm maior taxa de morte súbita familiar, maior proporção de fibrilação atrial e necessitam de intervenção cirúrgica mais do que o segundo grupo. Outro grupo realizou uma análise de 389 pacientes não relacionados, com e sem mutações no gene *MYH7*. Eles observaram que aqueles com mutações no gene *MYH7* também eram mais jovens no momento do diagnóstico, tinham mais hipertrofia e, mais frequentemente, tinham sido submetidos à miectomia, mas não encontraram diferença no histórico familiar de morte súbita entre os grupos¹⁵.

No entanto, outro grupo encontrou um diâmetro médio maior do SIV em portadores de uma mutação *MYBPC3*, em

comparação com pacientes *MYH7*-positivos¹⁶. Um estudo recente em pacientes brasileiros com CMH mostrou que mutações no gene *MYH7* estão mais relacionadas com o maior tamanho do átrio esquerdo e maior frequência de fibrilação atrial, quando comparadas com mutações no gene *MYBPC3*, sugerindo um pior prognóstico nesses pacientes⁸.

Tipos de mutações

A associação de mutações específicas com o fenótipo clínico da CMH é ainda muito controversa. Desde a descoberta dos genes causadores de doença, vários autores tentaram rotular as mutações como “malignas” ou “benignas”, de acordo com o fenótipo do paciente. No entanto, para a maioria das associações, há uma exceção ou os pesquisadores mais recentes não conseguem replicar os dados em outro grupo de pacientes. Na verdade, esse assunto foi tema de um debate entre os autores Ho¹⁷ e Landstrom e Ackerman¹⁸, e ambos concluíram que ainda é difícil fazer prognósticos com base em uma única mutação.

Algumas mutações apresentam alguma concordância entre os especialistas quanto à sua gravidade, embora a apresentação clínica possa variar. Por exemplo, a mutação R723G no gene *MYH7* foi descrita pela primeira vez em 2000 por Enjuto e cols.¹⁹ com uma taxa elevada de morte súbita e insuficiência cardíaca progressiva, ambas em torno da quinta década de vida. Em 2006, um grupo chinês detectou uma família com a mesma mutação e, nela, apenas um indivíduo do sexo masculino tinha histórico de síncope; os outros cinco indivíduos morreram de insuficiência cardíaca grave, e a média de idade foi de 66 anos à época da morte. Morte súbita não foi descrita¹⁴. Isso sugere que o fenótipo torna-se maligno com a idade, sendo benigno em pacientes mais jovens, embora a apresentação do fenótipo não fosse a mesma.

Por outro lado, não há uma percepção clara em relação a outras mutações, mesmo considerando quão grave o fenótipo pode ser. A mutação Val606Met no gene *MYH7* foi descrita pela primeira vez como uma mutação benigna, com os pacientes portadores dessa alteração apresentando sobrevivência quase normal²⁰. Mais tarde, vários pesquisadores descreveram a mesma mutação como maligna, com risco maior de morte súbita²¹⁻²³.

Temos que concordar com Ho¹⁷ e Landstrom e Ackerman¹⁸ que ainda não é possível determinar o prognóstico com base na mutação. Acreditamos que existem tantas mutações diferentes que podem levar à CMH em tantos genes diferentes, que é difícil encontrar um elevado número de pacientes com a mesma mutação para compará-los e definir com precisão o *endpoint* de fenótipo. Mesmo que tivéssemos essa definição, há várias descrições na literatura sobre o efeito da modulação de genes modificadores sobre o fenótipo; assim, mesmo em pacientes com a mesma mutação, o fenótipo poderá ser, e provavelmente será, diferente.

Número de mutações

Alguns pacientes são portadores de mais do que uma mutação patogênica e a literatura atualmente estima que isso aconteça em 3 a 5% dos pacientes²⁴⁻²⁶. De acordo com

Kelly e Semsarian²⁷, as características clínicas em pacientes com mais de uma mutação são mais graves, com maior risco de morte súbita e hipertrofia do VE. Em sua revisão, eles compararam os dados publicados de pacientes com mutações homozigóticas^{28,29}, heterozigóticas compostas^{30,31} e duplo-heterozigóticas^{25,32} e, na maioria dos casos, o fenótipo é mais grave com a idade de diagnóstico, incluindo pacientes pediátricos. Outro estudo recentemente publicado descreveu um perfil clínico da mutação sarcomérica tripla³³. Eles encontraram quatro pacientes em uma coorte de 488 indivíduos não relacionados com mutação tripla (0,8%) e concluíram que esse cenário é raro, mas provoca um aumento do risco de progressão para fase terminal e arritmias ventriculares. No entanto, mais estudos ainda são necessários para entender completamente como as diferentes combinações de mutações agem para criar o fenótipo final, já que as combinações possíveis são incontáveis.

Genes modificadores

Muito provavelmente, existem genes modificadores que podem modular o fenótipo, tornando o prognóstico baseado em genótipo ainda mais difícil. Por exemplo, algumas variantes no gene do receptor de angiotensina II tipo 2 foram significativamente associadas com o grau de hipertrofia em pacientes com CMH, independentemente de sua pressão arterial³⁴. A enzima conversora de angiotensina também foi implicada como moduladora do fenótipo. Pesquisadores correlacionaram um polimorfismo no gene com a dispersão do QT, que reflete as diferenças regionais na repolarização ventricular e é utilizado como marcador do conteúdo de colágeno (nos pacientes com o genótipo DD, a dispersão do QT é aumentada)³⁵.

Outro grupo estudou, em pacientes com CMH, a presença de resistina, uma nova citocina associada à inflamação e suspeita de induzir hipertrofia em ratos. Eles analisaram ambos os níveis de resistina e o polimorfismo -410C > G no promotor do gene, verificando que ambos os níveis de resistina e o polimorfismo poderiam estar associados com a hipertrofia cardíaca no grupo estudado³⁶.

Outros estudos avaliaram o polimorfismo -34T > A no gene da calmodulina (*CALM3*) e observaram que o polimorfismo é um agente modificador para a CMH porque provavelmente afeta a expressão do gene, que tem um papel fundamental na homeostase do Ca²⁺, atuando como um sensor intracelular dessa molécula³⁷.

Além disso, o papel dos genes dos receptores de hormônios sexuais na hipertrofia ventricular esquerda em pacientes do sexo masculino CMH também foi investigado. Foi descrito que um número menor de repetições (CAG) n no receptor de androgênio estava associado com maior Espessura da Parede do Ventrículo Esquerdo (EPVE) nos indivíduos do sexo masculino. Os indivíduos do sexo masculino portadores do alelo A no SNP rs6915267 da região promotora do gene do receptor de estrogênio 1 tinham uma diminuição de 11% na média da EPVE quando comparados com os indivíduos do sexo masculino homozigotos GG³⁸. Uma vez que há tantos polimorfismos e

genes diferentes envolvidos com o efeito da modulação da CMH, isso pode, pelo menos em parte, explicar a grande variabilidade fenotípica observada na doença.

Desequilíbrio de expressão

Quase todos os pacientes com CMH são heterozigotos para mutações no gene afetado. Assim, presume-se que 50% das proteínas sejam defeituosas. No entanto, Trapathi e cols.³⁹ mostraram, em seu estudo, que há um desequilíbrio entre miofilamentos de tipo selvagem e mutantes em pacientes com mutações nos genes *MYH7* e *MYBPC3*. Também foi relatado que a fração de proteína mutada se correlaciona com a gravidade da doença e é geralmente dependente da mutação específica. Os autores mostraram, em seu artigo, que a expressão do *MYH7*-mRNA mutado é semelhante entre pacientes de gerações diferentes e também entre pacientes não relacionados, e que essa diferença depende da mutação.

Por exemplo, a mutação no gene V606M no gene *MYH7* leva a excisão do exon 16; por isso, é provável que tenha um decaimento mediado por *nonsense*. Por outro lado, os mecanismos subjacentes de regulação dessas mutações não são completamente compreendidos, mas sabe-se que algumas mutações influenciam a eficiência de *splicing* e, então, especula-se que algumas delas possam ter um mecanismo de *splicing* mais eficiente do que a transcrição de tipo selvagem, levando a uma maior taxa de proteínas mutadas no tecido. Relataram também, em seu estudo, que a abundância de proteínas mutadas está relacionada com uma progressão grave da doença em longo prazo e os efeitos óbvios sobre a função do sistema contrátil. Essa parece ser uma descoberta interessante, mas precisa ser replicada em outros estudos.

Modelos animais

A criação de modelos animais adequados de CMH fornece conhecimento considerável sobre a progressão da doença ao longo da vida do animal. Com esse objetivo, vários modelos animais da doença foram criados ao longo do tempo. Em 1996, dois grupos distintos criaram modelos de ratos com CMH com uma mutação *MYH7* que ajudou nos estudos sobre a história natural da doença^{40,41}.

Em 1999, outro grupo criou uma linhagem diferente de camundongos com CMH com uma mutação na miosina alfa-cardíaca de cadeia pesada. Eles descobriram que camundongos heterozigotos tinham as características clássicas da CMH, mas os animais homozigotos morriam logo após o nascimento devido à presença de uma cardiomiopatia dilatada fatal. O grupo também notou que a incorporação da proteína mutante aumentou rapidamente após o nascimento e especulou que essa incorporação variável pudesse ser responsável pela morte focal dos miócitos na CMH⁴².

Recentemente, alguns modelos animais foram utilizados em estudos farmacológicos. Por exemplo, os investigadores mostraram que as mutações da proteína sarcomérica ativam as vias de sinalização que promovem a transcrição

de sinais proliferativos e probióticos em células não miócitos, principalmente por meio de *Transforming Growth factor Beta* (TGF- β) em um modelo de camundongos. Eles administraram anticorpos neutralizadores de TGF- β e observaram que a não proliferação de miócitos, bem como a fibrose, foi abolida. Além disso, a administração crônica de losartana, um antagonista do receptor da angiotensina II, tipo 1, evitou o surgimento de hipertrofia, de proliferação de não miócitos e de fibrose em camundongos positivos para a mutação. Em animais com hipertrofia estabelecida, o fármaco não reverteu o fenótipo, mas reduziu a proliferação de não miócitos⁴³. O estudo foi bem-sucedido ao estabelecer que TGF- β é um mecanismo fundamental para o desenvolvimento de fibrose e abriu as portas para o tratamento de portadores de mutações.

O coração murino é composto principalmente por alfa-miosina, enquanto o coração humano é composto principalmente por beta-miosina. O coelho pode ser um modelo melhor, porque a composição da miosina é semelhante à do coração humano. Assim, um modelo de coelho transgênico com a mutação R400Q no gene *MYH7* foi criado com sucesso⁴⁴. Além disso, uma mutação causadora de CMH, que ocorre naturalmente em gatos Maine Coon, imita os aspectos hereditários, história natural e características patológicas da CMH em seres humanos. Esse modelo animal tem sido uma ferramenta valiosa para estudar a fisiopatologia macroscópica, celular e molecular da doença⁴⁵.

Um modelo de camundongos transgênicos foi criado com quantidades variáveis de um gene *MYBPC3* mutado sem os domínios de ligação da miosina e da titina. Eles descobriram que o peptídeo era estável, mas não se incorporou de forma eficaz no sarcômero. A expressão de proteínas transgênicas leva à diminuição dos níveis de proteína endógena⁴⁶. O mesmo grupo produziu outro transgênico com um gene *MYBPC3*, faltando apenas o sítio de ligação da miosina, e pouca proteína foi encontrada no coração dos camundongos⁴⁷. Os autores acreditam que esses experimentos podem ajudar a compreender os mecanismos genéticos da doença. De acordo com eles, tanto o alelo nulo quanto a hipótese do peptídeo dominante-negativo são relevantes para o fenótipo, e sua importância relativa pode variar consideravelmente, dependendo da mutação *MYBPC3* em particular.

Outro modelo animal muito importante para a CMH é o peixe-zebra. O modelo de peixe é uma ferramenta poderosa para estudar diversas doenças, sendo particularmente importante para o desenvolvimento do coração, devido a algumas características, como o desenvolvimento externo do coração, que permite a análise não invasiva do coração durante sua formação. Além disso, inicialmente, os embriões de peixe-zebra não utilizam o sistema cardiovascular para obter oxigênio, de modo que os mutantes podem sobreviver e continuar o desenvolvimento por vários dias. Finalmente, embora o coração do peixe-zebra seja mais simples em termos de estrutura, os genes essenciais responsáveis pelo desenvolvimento do coração são conservados^{48,49}.

Um grupo desenvolveu um modelo de mutação humana no gene *TNNT2* no peixe-zebra para avaliar seu impacto durante o desenvolvimento do coração. Eles descobriram que a mutação levava ao mesmo fenótipo observado em humanos com mutações: desarranjo sarcomérico e indução maciça de vias hipertróficas miocárdicas. Além disso, observaram que os corações embrionários, em oposição ao coração adulto, desenvolveram hiperplasia dos cardiomiócitos. Eles concluíram que as mutações sarcoméricas podem ter impacto sobre a biologia dos cardiomiócitos muito mais cedo do que pensávamos e com efeitos distintos daqueles observados no coração adulto, apesar de terem as mesmas respostas transcricionais⁵⁰.

Mecanismos moleculares da Cardiomiopatia Hipertrófica

Embora muitos genes e mutações sejam causas conhecidas de CMH, tendo sido amplamente demonstrado em modelos animais, as vias moleculares que levam ao fenótipo não são ainda claras. A primeira hipótese proposta foi a de que a incorporação de uma proteína mutante levaria à diminuição da função contrátil e que isso desencadearia uma hipertrofia compensatória^{51,52}. No entanto, segundo alguns autores, foi demonstrado que essa proposta era inconsistente com evidências laboratoriais e clínicas.

Em sua revisão, Ashrafian e cols.⁵³ listaram três argumentos contra essa hipótese: (1) Inicialmente, as experiências com as proteínas mutantes revelaram uma diminuição da função, especialmente caracterizada por uma redução na mobilidade da proteína. No entanto, com o desenvolvimento de ensaios mais avançados, percebeu-se que, para algumas mutações, há, na verdade, um aumento da mobilidade, sugerindo um ganho funcional da proteína mutada. Assim, a diminuição da função não pode ser o único estímulo para a hipertrofia. Corroborando esses dados, portadores da mutação que não desenvolveram hipertrofia têm uma maior mobilidade no tecido cardíaco, que pode ser visualizado no ecocardiograma; (2) a hipertrofia presente em pacientes com CMH é assimétrica, muito diferente da hipertrofia concêntrica, que é vista em corações com aumento da carga, como na hipertensão; (3) pacientes com CMH geralmente desenvolvem a hipertrofia após a puberdade e essa não parece progredir muito depois disso. Além disso, alguns pacientes só desenvolvem a hipertrofia na idade adulta. Assim, esses padrões não podem ser explicados por um mecanismo compensatório, considerando que a mutação está presente desde o desenvolvimento do coração.

Apesar de todos os argumentos serem bastante convincentes de que não há nenhuma disfunção clínica que precede o desenvolvimento da hipertrofia, eles não abordam a questão principal, isto é, se há disfunção sarcomérica devido a problemas estruturais, ou, alternativamente, se há outros mecanismos epistáticos responsáveis pelo desenvolvimento da hipertrofia. Nesse cenário, a diminuição ou o aumento da mobilidade não são substitutos bem estabelecidos para a função sarcomérica

e, mesmo que sejam, qualquer um dos dois pode ser o resultado de uma ruptura estrutural do sistema de contração molecular; a assimetria da hipertrofia está provavelmente relacionada à interação entre as forças físicas e moleculares dentro do órgão; e não está claro se não há progressão na hipertrofia durante o tempo de vida dos portadores de CMH (o que certamente não é o caso para outros fenótipos associados, como a fibrose).

Muitos estudos se concentram na sensibilidade ao Ca^{2+} , que está alterada no coração hipertrofiado, como um mecanismo que leva a fenótipos de CMH. Há cada vez mais evidências de que as mutações em diferentes genes de proteínas de miofilamentos aumentam a sensibilidade ao Ca^{2+} e o consequente defeito na homeostase, tal como a modulação intracelular de Ca^{2+} , a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e a fosforilação de certas proteínas provavelmente contribuem para vários dos aspectos da doença^{54,55}. Alguns estudos têm mostrado que uma maior sensibilidade miofibrilar ao Ca^{2+} é suficiente para aumentar a probabilidade de arritmias. Em camundongos, foi demonstrado que, com uma maior sensibilidade ao Ca^{2+} , a forma do potencial de ação ventricular tornava-se alterado, resultando em períodos refratários efetivos mais curtos, maior variabilidade batimento-a-batimento da duração do potencial de ação e um aumento da dispersão da velocidade de condução ventricular em frequências cardíacas elevadas. Acredita-se que isso seja suficiente para criar um substrato arritmogênico⁵⁶.

Essa associação foi reforçada pelo estudo de camundongos transgênicos com uma mutação de troponina T, nos quais a carga de arritmias ventriculares tinha uma correlação com o grau de sensibilidade ao Ca^{2+} . Finalmente, o miofilamento sensibilizador do Ca^{2+} EMD 57033 agrava arritmias nesse modelo, enquanto blebistatina, que reverte a sensibilização de Ca^{2+} , eliminou quase completamente a arritmia⁵⁶. Não está claro, contudo, se essas alterações observadas são causadoras da hipertrofia ou, alternativamente, um epifenômeno de todo o processo. Elas poderiam modular o fenótipo clínico e explicar uma grande variabilidade interindividual, mas não podem ser consideradas condições suficientes para o desenvolvimento de hipertrofia de miócitos e desarranjo miofibrilar.

Em conclusão as alterações na homeostase do cálcio estão associadas a fenótipos arritmicos em modelos humanos e animais de CMH. No entanto, o mecanismo que conduz à hipertrofia, provavelmente, o iniciador de processo, permanece obscuro.

Em 2002, Ashrafian e cols.⁵³ afirmaram que a disfunção unificante na CMH era o aumento da demanda de energia devido à utilização ineficiente de ATP sarcomérico e, com base nisso, criaram outra hipótese chamada de “hipótese de depleção de energia”, que propõe que o aumento da demanda compromete a capacidade do cardiomiócito em manter os níveis de energia nos compartimentos subcelulares.

Em 2008, Belus e cols.⁵⁷ estudaram a mecânica de contração e relaxamento de miofibrilas únicas de pacientes portadores da mutação R403Q no gene *MYH7*

e compararam com corações normais e saudáveis, descobrindo que a geração de tensão e relaxamento, após o aumento e a diminuição de Ca^{2+} , era muito mais rápida na miofibrila mutada, mas a um custo de energia mais alto, corroborando a ideia de utilização ineficiente de ATP para a geração de tensão. Essa hipótese também pode fornecer uma explicação para a hipertrofia assimétrica, pois, se a tensão na parede do miocárdio e a demanda de energia não forem uniformes no órgão por inteiro, a necessidade de energia extra pode ser mais prejudicial em regiões específicas do miocárdio.

Mais recentemente, alguns autores descreveram o assim chamado “modelo de quarta fase”, o qual pode ajudar a compreender como a mutação pode agir levando à doença, não apenas em CMH, mas também na cardiomiopatia dilatada e algumas doenças do músculo esquelético^{58,59}. Essa hipótese refere-se à adição de uma quarta fase no bem conhecido modelo de regulação de três fases. Em sua revisão, Lehrer⁵⁸ explica que a compreensão de como o Ca^{2+} e a miosina estão envolvidos na contração muscular é, em grande parte, fenomenológica e a base molecular ainda não está esclarecida. No modelo regular de três fases⁶⁰, a tropomiosina ligada à actina equilibra-se entre as três fases, a ocupação relativa, que é afetada pela concentração de Ca^{2+} e as fortemente ligantes cabeças da miosina. As fases descritas são o “estágio bloqueado”, no qual o filamento fino é incapaz de se ligar à miosina, o “estágio fechado”, no qual o filamento fino pode apenas se ligar à miosina relativamente fraca, e o “estágio aberto”, no qual a miosina pode se ligar e passar por isomerização para atingir uma conformação de ligação mais forte e rígida.

No entanto, de acordo com Lehrer, existem vários fenômenos inexplicáveis na regulação do músculo (por exemplo, aumento da ligação do Ca^{2+} causada por cabeças miosina de forte ligação e força residual ativa com Ca^{2+} baixo no caso de CMH), que podem envolver um estado ativo adicional na ausência de Ca^{2+} . Essa nova proposta considera que existem dois estágios abertos, um na presença de Ca^{2+} e outro estágio aberto miosina-induzido na ausência de Ca^{2+} (Figura 1). Esse estado adicional pode ajudar a entender como uma mutação em qualquer uma das proteínas do sarcômero pode causar mudanças na sensibilidade ao Ca^{2+} na CMH e DC.

Os autores acreditam que a disfunção dos miócitos resulta em hipertrofia. No entanto, mais uma vez o mecanismo não está claro. A principal questão em relação à CMH ainda é exatamente como uma mutação pode levar a diversos fenótipos clínicos e anatômicos, especialmente a hipertrofia. Acreditamos que a disfunção energética e a sensibilidade ao cálcio alterada podem muito bem ser a consequência da disfunção sarcomérica, ao invés de ser a causa primária de hipertrofia.

Análise da expressão global

Compreender a base molecular do desenvolvimento da doença vai além da identificação de diferentes mutações causais. Essa identificação deve levar à caracterização e à compreensão do verdadeiro cenário de alterações

em várias redes de genes. Trabalhos recentes estão se concentrando no transcriptoma, em busca de diferenças de expressão entre indivíduos saudáveis e doentes. Dessa forma, é possível entender como a doença afeta toda a cascata de sinalização. Em relação à CMH, há um estudo que comparou a expressão gênica global que identificou 29 fatores de transcrição distintamente expressos entre os corações do tipo selvagem e pré-hipertrofos de camundongos⁶¹.

Outro estudo foi realizado utilizando um modelo de camundongo não CMH hipertrofico, silenciando a proteína *Gαq* para compreender a ativação das vias de sinalização de hipertrofia cardíaca. Verificou-se que *Gαq* tem efeito mediador da resposta hipertrofica nos miócitos cardíacos, levando a insuficiência cardíaca⁶², então os autores compararam, a partir desse modelo, todo o transcriptoma do tecido cardíaco de camundongos machos transgênicos e não transgênicos, utilizando os sistemas de sequenciamento de próxima geração contra a mesma análise usando um arranjo de expressão. O camundongo transgênico *Gαq* tinha hipertrofia cardíaca, aumento ventricular, fração de ejeção diminuída e aumento da expressão de genes cardíacos fetais, quando comparado com o camundongo não transgênico. Além disso, eles concluíram que essa nova tecnologia é melhor do que os experimentos baseados em arranjos tradicionais.

Custo-efetividade de um programa de triagem em cascata para Cardiomiopatia Hipertrofica

Apesar das dúvidas sobre o mecanismo patológico da doença, é evidente que o diagnóstico genético tem espaço na prática clínica, principalmente sob a forma de triagem em cascata. A triagem em cascata é definida como uma abordagem para a família de um paciente afetado por uma doença genética e uma oferta de teste preditivo de DNA para aqueles em risco potencial, com base em informação sobre uma mutação genética patogênica confirmada⁶³. Essa abordagem tem sido usada com sucesso para diversas doenças genéticas, tais como a hipercolesterolemia familiar⁶⁴, fibrose cística⁶⁵ e síndrome de QT longo⁶³.

Um estudo analisando especificamente o custo-efetividade da triagem genética de CMH mostrou que essa abordagem é custo-efetiva⁶⁶, já que parentes com um resultado genético negativo seriam dispensados de outras avaliações clínicas e indivíduos em risco podem ser diagnosticados precocemente, evitando uma triagem clínica cara e desnecessária. O diagnóstico genético de parentes em risco de desenvolver a doença é particularmente importante porque a CMH pode ser assintomática e ter a morte súbita como primeira manifestação⁶⁷. A triagem em cascata foi usada para a CMH com resultados positivos⁶⁷ e é recomendada pela Sociedade Europeia de Cardiologia⁶⁸. Parentes com um resultado positivo de DNA devem ser encaminhados à um cardiologista e aconselhados a evitar fatores de risco, desencorajados a seguirem carreiras atléticas e encorajados a adquirir hábitos de vida saudáveis.

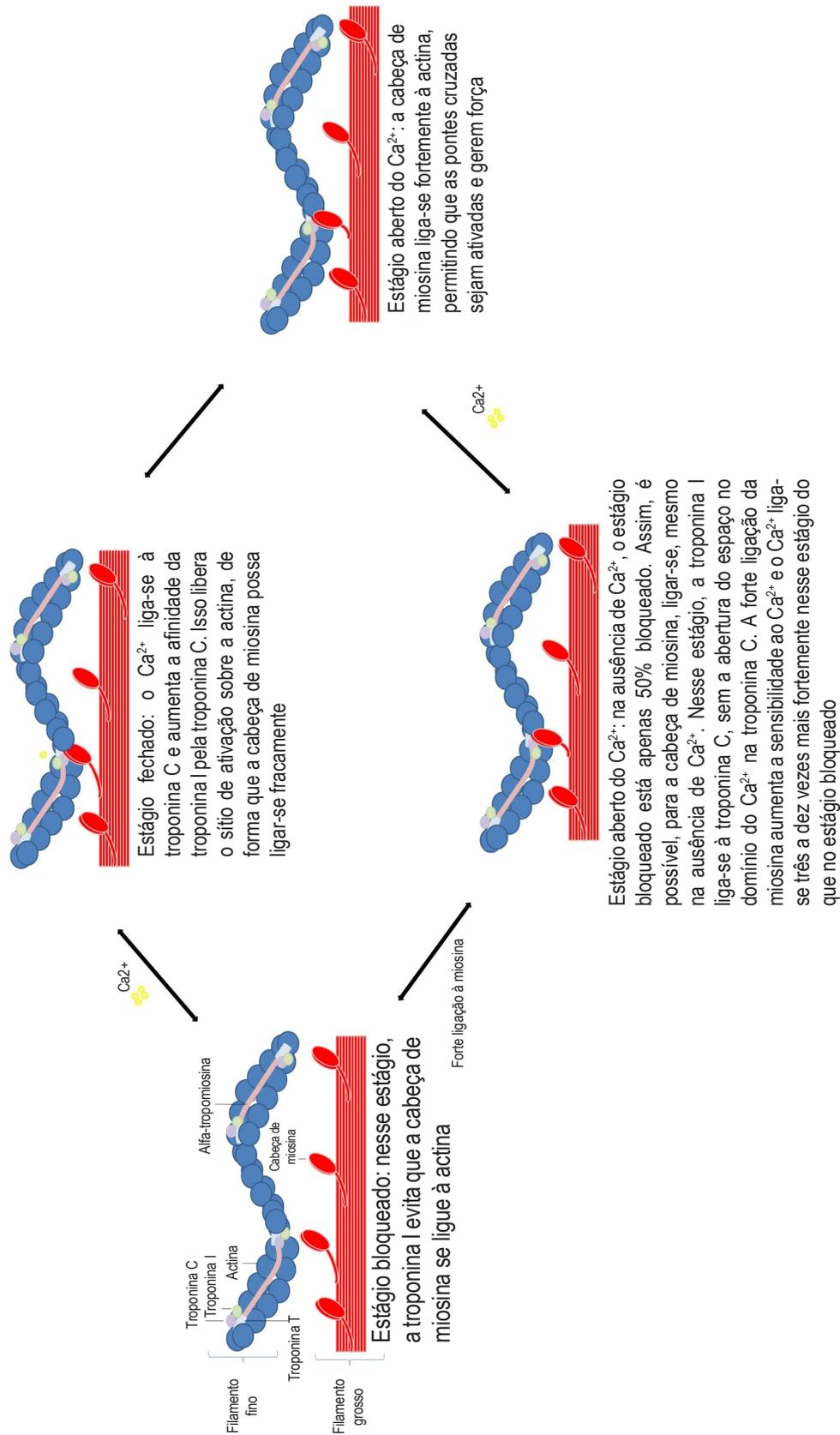


Figura 1 - Figura esquemática do modelo de 4 estágios.

A desvantagem dessa abordagem é o impacto psicológico potencial em ambos os indivíduos assintomáticos afetados, especialmente os mais jovens, e os parentes não afetados. No primeiro caso, a descoberta pode gerar ansiedade e depressão e, no segundo caso, parentes podem sofrer de “culpa do sobrevivente”. Além disso, pacientes com um resultado clínico não claro, que recebem um resultado genético negativo, podem experimentar frustração em relação à incerteza do resultado, uma vez que a doença não pode ser confirmada nem excluída nesse cenário⁶³. O aconselhamento genético é fundamental e deve ser cuidadoso e tão informativo quanto possível, e o paciente deve ter um médico disponível para atendê-lo.

Conclusão

O constante desenvolvimento de novas tecnologias pode ajudar a elucidar os mecanismos dessa doença complexa e intrigante. As tecnologias de sequenciamento de próxima geração nos fornecerão grandes quantidades de dados e, em breve, seremos capazes de sequenciar todo o genoma do paciente, o que poderia nos ajudar a entender como a mutação interage com os genes modificadores para estabelecer o fenótipo. Essa tecnologia também pode ser aplicada ao sequenciamento de RNA e poderemos ter todo o perfil do transcriptoma do paciente, ajudando-nos a visualizar o impacto da mutação na cascata de sinalização.

Referências

1. Marian AJ, Mares AJr, Kelly DP, Yu QT, Abchee AB, Hill R, et al. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. *Eur Heart J*. 1995;16(3):368-76.
2. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002;287(10):1308-20.
3. Marsiglia JD, Batitucci Mdo C, Paula F, Barbirato C, Arteaga E, Araujo AQ. [Study of mutations causing hypertrophic cardiomyopathy in a group of patients from Espirito Santo, Brazil]. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(1):10-7.
4. Marston S, Copeland O, Jacques A, Livesey K, Tsang V, McKenna WJ, et al. Evidence from human myectomy samples that MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency. *Circ Res*. 2009;105(3):219-22.
5. Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, et al. Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J*. 2012;76(2):453-61.
6. Gruner C, Care M, Siminovitch K, Moravsky G, Wigle ED, Woo A, et al. Sarcomere protein gene mutations in patients with apical hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(3):288-95.
7. Binder J, Ommen SR, Gersh BJ, Van Driest SL, Tajik AJ, Nishimura RA, et al. Echocardiography-guided genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy: septal morphological features predict the presence of myofilament mutations. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(4):459-67.
8. Marsiglia JD, Credidio FL, de Oliveira TG, Reis RF, Antunes M de O, de Araujo AQ, et al. Screening of MYH7, MYBPC3, and TNNT2 genes in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2013;166(4):775-82.
9. al-Mahdawi S, Chamberlain S, Chojnowska L, Michalak E, Nihoyannopoulos P, Ryan M, et al. The electrocardiogram is a more sensitive indicator than echocardiography of hypertrophic cardiomyopathy in families with a mutation in the MYH7 gene. *Br Heart J*. 1994;72(2):105-11.
10. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bennaceur M, Carrier L, Camproux AC, et al. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation*. 1998;97(22):2230-6.
11. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, et al. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation*. 2002;105(4):446-51.
12. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1995;332(16):1058-64.
13. Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, et al. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(3):549-55.
14. Wang S, Zou Y, Fu C, Xu X, Wang J, Song L, et al. Worse prognosis with gene mutations of beta-myosin heavy chain than myosin-binding protein C in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol*. 2008;31(3):114-8.
15. Van Driest SL, Jaeger MA, Ommen SR, Will ML, Gersh BJ, Tajik AJ, et al. Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(3):602-10.
16. Waldmuller S, Erdmann J, Binner P, Gelbrich G, Pankuweit S, Geier C, et al; German Competence Network Heart Failure. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure. *Eur J Heart Fail*. 2012;13(11):1185-92.
17. Ho CY. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010;122(23):2430-40.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Pereira AC; Obtenção de dados, Análise e interpretação dos dados e Redação do manuscrito: Marsiglia JDC.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação desse estudo a programas de pós-graduação.

18. Landstrom AP, Ackerman MJ. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010;122(23):2441-9.
19. Enjuto M, Francino A, Navarro-Lopez F, Viles D, Pare JC, Ballesta AM. Malignant hypertrophic cardiomyopathy caused by the Arg723Gly mutation in beta-myosin heavy chain gene. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(12):2307-13.
20. Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, et al. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1992;326(17):1108-14.
21. Havndrup O, Bundgaard H, Andersen PS, Larsen LA, Vuust J, Kjeldsen K, et al. The Val606Met mutation in the cardiac beta-myosin heavy chain gene in patients with familial hypertrophic cardiomyopathy is associated with a high risk of sudden death at young age. *Am J Cardiol*. 2001;87(11):1315-7.
22. Semsarian C, Yu B, Ryce C, Lawrence C, Washington H, Trent RJ. Sudden cardiac death in familial hypertrophic cardiomyopathy: are "benign" mutations really benign? *Pathology*. 1997;29(3):305-8.
23. Nakajima-Taniguchi C, Azuma J, Nagata S, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. A missense mutation in the beta-myosin heavy chain gene in a Japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Circ J*. 1995;59(12):833-7.
24. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(9):1903-10.
25. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003;107(17):2227-32. Erratum in *Circulation*. 2004;109(25):3258.
26. Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet*. 2005;42(10):e59.
27. Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: a marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(2):182-90.
28. Nishi H, Kimura A, Harada H, Adachi K, Koga Y, Sasazuki T, et al. Possible gene dose effect of a mutant cardiac beta-myosin heavy chain gene on the clinical expression of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200(1):549-56.
29. Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(2):391-8.
30. Nishi H, Kimura A, Harada H, Koga Y, Adachi K, Matsuyama K, et al. A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995;91(12):2911-5.
31. Jeschke B, Uhl K, Weist B, Schroder D, Meitinger T, Dohlemann C, et al. A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated beta-myosin heavy chain genes. *Hum Genet*. 1998;102(3):299-304.
32. Richard P, Isnard R, Carrier L, Dubourg O, Donatien Y, Mathieu B, et al. Double heterozygosity for mutations in the beta-myosin heavy chain and in the cardiac myosin binding protein C genes in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*. 1999;36(7):542-5.
33. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, Baldi M, Will ML, Baldini K, et al. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(14):1444-53.
34. Carstens N, van der Merwe L, Revera M, Heradien M, Goosen A, Brink PA, et al. Genetic variation in angiotensin II type 2 receptor gene influences extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy independent of blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12(3):274-80.
35. Kaya CT, Gurlek A, Altin T, Kilickap M, Karabulut HG, Turhan S, et al. The relationship between angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism and QT dispersion in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010;11(3):192-7.
36. Hussain S, Asghar M, Javed Q. Resistin gene promoter region polymorphism and the risk of hypertrophic cardiomyopathy in patients. *Transl Res*. 2010;155(3):142-7.
37. Friedrich FW, Bausero P, Sun Y, Treszl A, Kramer E, Juhr D, et al; EUROGENE Heart Failure Project. A new polymorphism in human calmodulin III gene promoter is a potential modifier gene for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2009;30(13):1648-55.
38. Lind JM, Chiu C, Ingles J, Yeates L, Humphries SE, Heather AK, et al. Sex hormone receptor gene variation associated with phenotype in male hypertrophic cardiomyopathy patients. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(2):217-22.
39. Tripathi S, Schultz I, Becker E, Montag J, Borchert B, Francino A, et al. Unequal allelic expression of wild-type and mutated beta-myosin in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(6):1041-55.
40. Vikstrom KL, Factor SM, Leinwand LA. Mice expressing mutant myosin heavy chains are a model for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Med*. 1996;2(5):556-67.
41. Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, et al. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science*. 1996;272(5262):731-4.
42. Fatkin D, Christe ME, Aristizabal O, McConnell BK, Srinivasan S, Schoen FJ, et al. Neonatal cardiomyopathy in mice homozygous for the Arg403Gln mutation in the alpha cardiac myosin heavy chain gene. *J Clin Invest*. 1999;103(1):147-53.
43. Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3520-9.
44. Marian AJ, Wu Y, Lim DS, McCluggage M, Youker K, Yu QT, et al. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1999;104(12):1683-92.
45. Kittleson MD, Meurs KM, Munro MJ, Kittleson JA, Liu SK, Pion PD, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. *Circulation*. 1999;99(24):3172-80.
46. Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J. A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1292-300.
47. Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J. In vivo modeling of myosin binding protein C familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 1999;85(9):841-7.
48. Beis D, Stainier DY. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol*. 2006;16(2):105-12.
49. Liu J, Stainier DY. Zebrafish in the study of early cardiac development. *Circ Res*. 2012;110(6):870-4.
50. Becker JR, Deo RC, Werdich AA, Panakova D, Coy S, MacRae CA. Human cardiomyopathy mutations induce myocyte hyperplasia and activate hypertrophic pathways during cardiogenesis in zebrafish. *Dis Model Mech*. 2011;4(3):400-10.
51. Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L, Sweeney HL. Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1995;95(3):1409-14.
52. Watkins H, Seidman CE, Seidman JC, Feng HS, Sweeney HL. Expression and functional assessment of a truncated cardiac troponin T that causes hypertrophic cardiomyopathy: evidence for a dominant negative action. *J Clin Invest*. 1996;98(11):2456-61.

53. Ashrafian H, Redwood C, Blair E, Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet.* 2003;19(5):263-8.
54. Robinson P, Mirza M, Knott A, Abdulrazzak H, Willott R, Marston S, et al. Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac troponin T mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by troponin T mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40710-6.
55. Guinto PJ, Haim TE, Dowell-Martino CC, Sibinga N, Tardiff JC. Temporal and mutation-specific alterations in Ca²⁺ homeostasis differentially determine the progression of cTnT-related cardiomyopathies in murine models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(2):H614-26.
56. Baudenbacher F, Schober T, Pinto JR, Sidorov VY, Hilliard F, Solaro RJ, et al. Myofilament Ca²⁺ sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3893-903.
57. Belus A, Piroddi N, Scellini B, Tesi C, Amati GD, Girolami F, et al. The familial hypertrophic cardiomyopathy-associated myosin mutation R403Q accelerates tension generation and relaxation of human cardiac myofibrils. *J Physiol.* 2008;586(Pt 15):3639-44.
58. Lehrer SS. The 3-state model of muscle regulation revisited: is a fourth state involved? *J Muscle Res Cell Motil.* 2011;32(3):203-8.
59. Ly S, Lehrer SS. Long-range effects of familial hypertrophic cardiomyopathy mutations E180G and D175N on the properties of tropomyosin. *Biochemistry.* 2012;51(32):6413-20.
60. McKillop DF, Geeves MA. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys J.* 1993;65(2):693-701.
61. Kim JB, Porreca GJ, Song L, Greenway SC, Gorham JM, Church GM, et al. Polony multiplex analysis of gene expression (PMAGE) in mouse hypertrophic cardiomyopathy. *Science.* 2007;316(5830):1481-4.
62. Fan G, Jiang YP, Lu Z, Martin DW, Kelly DJ, Zuckerman JM, et al. A transgenic mouse model of heart failure using inducible Galpha q. *J Biol Chem.* 2005;280(48):40337-46.
63. Smart A. Impediments to DNA testing and cascade screening for hypertrophic cardiomyopathy and Long QT syndrome: a qualitative study of patient experiences. *J Genet Couns.* 2010;19(6):630-9.
64. Nherera L, Marks D, Minhas R, Thorogood M, Humphries SE. Probabilistic cost-effectiveness analysis of cascade screening for familial hypercholesterolaemia using alternative diagnostic and identification strategies. *Heart.* 2011;97(14):1175-81.
65. Sorensen PL, Gane LW, Yarborough M, Hagerman RJ, Tassone F. Newborn screening and cascade testing for FMR1 mutations. *Am J Med Genet A.* 2012;161A(1):59-69.
66. Wordsworth S, Leal J, Blair E, Legood R, Thomson K, Seller A, et al. DNA testing for hypertrophic cardiomyopathy: a cost-effectiveness model. *Eur Heart J.* 2010;31(8):926-35.
67. Miller EM, Wang Y, Ware SM. Uptake of cardiac screening and genetic testing among hypertrophic and dilated cardiomyopathy families. *J Genet Couns.* 2012;22(2):258-67.
68. Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, et al; European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2010;31(22):2715-26.