

THAÍS HOLTZ THEIZEN

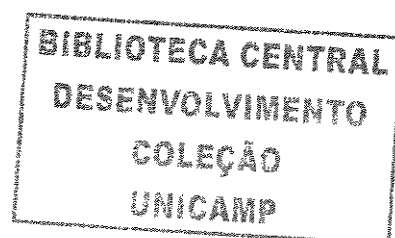
***A IMPORTÂNCIA DO COMPLEXO DE SINALIZAÇÃO
ASSOCIADO A QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK)
EM CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS MDX
SUBMETIDOS À SOBRECARGA PRESSORA***

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2004

i



THAÍS HOLTZ THEIZEN

***A IMPORTÂNCIA DO COMPLEXO DE SINALIZAÇÃO
ASSOCIADO A QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK)
EM CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS MDX
SUBMETIDOS À SOBRECARGA PRESSORA***

Tese de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/ UNICAMP
T341i
V EX
TOMBO BC/ 53651
PROC 16-P.00123-06
C 8
PREÇO 11,00
DATA 04/01/06
NR CPD _____

2004

bib ID: 374348

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

T341i Theizen, Thaís Holtz
A importância do complexo de sinalização associados a quinase de adesão focal (FAK) em corações de camundongos MDX submetidos à sobrecarga pressora / Thaís Holtz Theizen. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Kleber Gomes Franchini
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Coração. 2. Hipertrofia. I. Kleber Gomes Franchini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior

Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/07/2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmão e namorado,
pela ajuda, carinho e paciência
dedicados nesses anos de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela orientação segura e valiosa, pela confiança depositada em meu trabalho e, sobretudo, pelo exemplo profissional e científico.

Aos amigos Graciela Araújo Machado, Daniella Pereira Crosara Alberto, Wilson Nadruz Junior, Silvana Rocco e Rosana Yuri Inoue pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos colegas deste laboratório e de outros em que realizei meu trabalho, pelas inúmeras contribuições.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa.

“ Tua vida é como um livro. O título corresponde ao teu nome.

O prefácio é uma introdução ao mundo. As páginas são as crônicas diárias de teus esforços.

O assunto principal de teu livro pode ser tua profissão, teus negócios, o amor, a literatura, a religião e a ciência.

Dia a dia, teus pensamentos e atos são escritos nele, como prova de teu êxito ou fracasso.

Tudo que tu anotas em cada uma das páginas é de vital importância, pois ficará registrado para sempre.

Um dia, terás de escrever a palavra fim. Faça que, então, possas dizer que teu livro é um modelo de nobres propósitos e serviço generoso ao mundo.

Seja valente, te esforça; dá o melhor de ti e aparecerá escrito o melhor de tua vida.”

	<i>Pág</i>
RESUMO	XXVII
1. INTRODUÇÃO	30
Estímulo mecânico induz hipertrofia cardíaca.....	32
Mecanismos de mecanotransdução em miócitos cardíacos.....	34
Canais iônicos sensíveis ao estiramento.....	34
Secreção de fatores parácrinos/autócrinos induzida por estiramento.....	35
Sistema integrina/citoesqueleto.....	36
Costâmero: Estrutura e função.....	39
Sinalização celular via integrina/ citoesqueleto.....	40
Quinase de adesão focal (Fak).....	41
Distrofina.....	43
Distrofias musculares causadas pela deficiência da distrofina.....	44
Camundongos MDX.....	46
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1- Animais.....	52
3.2- Modelo experimental de Coarctação da aorta em camundongos.....	52
3.3- Cateterização para registros hemodinâmicos.....	53
3.4- Registros hemodinâmicos.....	54
3.5- Pesagem dos corações.....	55
3.6- Processamento do miocárdio para análises histo-morfométricas.....	56

3.6.1- Processamento do miocárdio em parafina.....	56
3.7- Colorações.....	57
3.7.1- Tricrômico de Masson.....	57
3.7.2- Hematoxilina – Eosina.....	58
3.8- Análise histo-morfométrica.....	58
3.9- Isolamento e identificação de proteínas por imunoprecipitação e <i>immunoblotting</i>	59
3.10- Ensaio de fosfatase <i>in vitro</i>	60
3.11- Imunofluorescência e avaliação em microscopia confocal a laser	62
3.12- Protocolos Experimentais.....	62
3.13- Análise Estatística.....	63
4. RESULTADOS	64
4.1- Variáveis hemodinâmicas.....	65
4.2- Efeito da coarctação da aorta na massa e geometria do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX nos experimentos crônicos.....	70
4.3- Expressão e fosforilação da quinase de adesão focal no ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX submetidos à sobrecarga pressora aguda.	80
4.4- Expressão e atividade da SHP2 no ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX submetidos à sobrecarga pressora aguda.....	83
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÕES	96
7. SUMMARY	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE ABREVIATURAS

[¹²⁵I]- Isótopo de iodo 125

Anti- Fak- Anticorpo contra a Fak

Anti-p-Fak- Anticorpo contra a forma fosforilada da Fak

CEMIB- Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas

CoAo-Coarctação da aorta

CT- Animais controles não coarctados

Erk1/2- Quinase Responsiva a estímulos estracelulares (subfamília das MAPKs)

FAK – Quinase de Adesão Focal (Focal Adhesion Kinase)

HE- Coloração de Hematoxilina-Eosina

M- Molaridade

mg/Kg- miligramas por quilo

ml- mililitros

VE- Ventrículo esquerdo

VD- Ventrículo direito

mmHg- milímetros de mercúrio

Try 397- Resíduo de tirosina da Fak no domínio N-terminal

µm- micrometro

DAB-diaminobenzidina

PBS-Tampão fosfato

BSA-bovine serum albumine

EGTA- ácido NNNNtetracético etileno glicol bis (2 aminoetiléter)

HEPES-Ácido (hidroxi-piperazina) etanosulfônico

PSMF- Fluoreto de fenilmetilsulfonila

SDS- Dodecil sulfato de sódio

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
<i>Tabela 1.</i> Parâmetros hemodinâmicos dos grupos de camundongos submetidos constricção da aorta (CoAo) ou cirurgia fictícia aguda.....	68
<i>Tabela 2.</i> Parâmetros hemodinâmicos dos animais após constricção da aorta (CoAo) ou controle nos diferentes tempos crônicos.....	69
<i>Tabela 3.</i> Peso e geometria dos corações de camundongos Swiss nos diferentes tempos de coarctação da aorta (CoAo).....	75
<i>Tabela 4:</i> Peso e geometria dos corações de camundongos MDX nos diferentes tempos de coarctação da aorta (CoAo).....	76
<i>Tabela 5:</i> Espessura dos miócitos cardíacos e a porcentagem intersticial dos cortes de corações dos grupos de camundongos Swiss nos diferentes tempos de coarctação da aorta (do 1° ao 25° dia).....	79
<i>Tabela 6:</i> Espessura dos miócitos cardíacos e a porcentagem intersticial dos cortes de corações dos grupos de camundongos MDX nos diferentes tempos de coarctação da aorta (do 1° ao 25° dia).....	79

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
<i>Figura 1.</i> Esquema representativo da CoAo da aorta em camundongos.....	53
<i>Figura 2.</i> Esquema representativo do registro hemodinâmico em camundongos.	55
<i>Figura3.</i> Comparação das pressões arteriais sistólicas dos dois grupos experimentais (camundongos Swiss e MDX) agudos e crônicos após constricção da aorta em relação ao seu grupo controle (sem constricção da aorta).....	67
<i>Figura 4.</i> Efeito da CoAo na massa do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX nos experimentos crônicos. Relação da massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal dos camundongos Swiss e MDX após CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX em relação ao crescimento da massa do ventrículo esquerdo.....	72
<i>Figura 5.</i> Efeito da CoAo na geometria do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX nos experimentos crônicos.....	73
<i>Figura 6.</i> Efeito da CoAo na espessura do miócito cardíaco e porcentagem intersticial do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX	78

Figura 7. Blots representativos de extratos totais com anticorpos anti-Fak e anti-Fak-Tyr397, obtidos do ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX. O gráfico da figura representa valores médios das variações percentuais da quantidade de Fak fosforilada no resíduo de tirosina 397, comparadas com aquela de camundongos SWISS controle..... 81

Figura 8. Exemplos representativos de secções de miocárdio do ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX controle com dupla marcação com anticorpo anti-Fak e faloidina..... 83

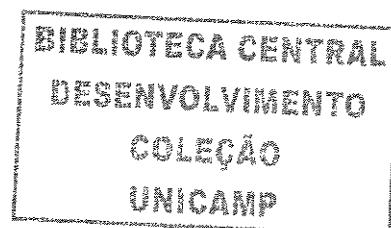
Figura 9. Exemplos representativos de *immunoblottings* de extratos miocárdicos de camundongos Swiss e MDX controle..... 85

RESUMO

Os mecanismos responsáveis pela transdução dos estímulos mecânicos em sinais bioquímicos no músculo cardíaco não estão totalmente esclarecidos. Evidências experimentais demonstram uma participação importante de elementos do citoesqueleto sarcomérico e extra-sarcomérico na transdução dos sinais mecânicos em bioquímicos nos miócitos cardíacos. Presume-se que a participação destas estruturas na transdução mecano-bioquímica se faça através de moléculas sensíveis à tensão ou estiramento provocados pelo estímulo mecânico nas proteínas do citoesqueleto. Evidências experimentais obtidas em células em cultura, bem como em miócitos cardíacos indicam que a Fak apresenta diversas características de molécula sinalizadora de estímulos mecânicos. O principal objetivo do presente estudo foi investigar a expressão e atividade da quinase de adesão focal (Fak) em miocárdio de camundongos que apresentam mutação para o gene da distrofina (MDX). Resultados obtidos por *immunoblotting* demonstraram aumento da fosforilação basal da Fak (cerca de 3 vezes) em animais MDX sem constrição da aorta (CoAo) (MDX controle), quando comparados a camundongos Swiss não submetidos a CoAo (Swiss controle). Por outro lado, não observamos aumento da atividade da Fak após CoAo em animais MDX, mas foi observada fosforilação da Fak em camundongos Swiss submetidos a CoAo. Resultados obtidos através de experimentos de imunofluorescência e posterior avaliação em microscopia confocal a laser demonstraram distribuição regular da Fak, acompanhando o padrão sarcomérico de estriação. De maneira distinta, o miocárdio de camundongos MDX submetidos a CoAo apresentou distribuição irregular da mesma, preferencialmente na periferia das células, com aparência de agregados. Experimentos de imunoprecipitação demonstraram que camundongos MDX apresentam menor associação da tirosina fosfatase-2 (SHP2) com a Fak e menor atividade da SHP2 que camundongos Swiss, apesar de as

quantidades de SHP2 no miocárdio do ventrículo esquerdo serem semelhantes em ambas as cepas. Estes resultados sugerem que a maior fosforilação basal da Fak no miocárdio de camundongos MDX comparados com camundongos Swiss deve-se à menor atividade de tirosina fosfatase da SHP2. Diante de tais resultados sugerimos que a integridade do citoesqueleto é responsável pela manutenção da Fak em estado de baixa fosforilação e atividade, bem como de sua localização em sítios sarcoméricos relacionados à banda A. Paralelamente resultados demonstrados anteriormente, os estudos de morfometria demonstraram que o miocárdio de camundongos MDX submetidos a sobrecarga pressora apresentaram dilatação ventricular precoce, sugestiva de insuficiência cardíaca. A comparação da resposta dos camundongos MDX com aquela dos camundongos Swiss, que desenvolveram hipertrofia concêntrica em resposta à sobrecarga pressora, indica a intolerância do miocárdio dos camundongos MDX frente ao estímulo mecânico.

Em conclusão, foi demonstrado, no presente estudo, hiperfosforilação basal da Fak no miocárdio de camundongos MDX, a este fenômeno sugerimos uma menor interação entre Fak e SHP2 e menor atividade de tirosina fosfatase da SHP2. Além disso, avaliamos as alterações estruturais do ventrículo esquerdo de camundongos MDX tanto no estado basal como em resposta à sobrecarga pressora ao longo de 25 dias. Concluímos que o ventrículo esquerdo de camundongos MDX apresenta aumento de massa e fibrose, quando comparado com camundongos SWISS e também intolerância à sobrecarga pressora, indicada pela dilatação rápida e progressiva do ventrículo esquerdo após a coarctação da aorta. Estudos futuros deverão esclarecer a participação das alterações na sinalização pela Fak-SHP2 na determinação da hipertrofia basal e da intolerância do ventrículo esquerdo de camundongos MDX à sobrecarga pressora.



1. INTRODUÇÃO

A maior parte das doenças cardíacas se acompanha do aumento da massa miocárdica devido a sobrecargas hemodinâmicas prolongadas (KATZ, 1990). O coração adapta-se às condições de sobrecargas hemodinâmicas agudas e crônicas através de ajustes funcionais e estruturais (COOPER, 1987; LORELL & CARABELLO, 2000). Sobrecargas agudas são compensadas através da ativação do mecanismo de Frank-Starling e/ou através do recrutamento de mecanismos neuro-humorais que resultam em aumento da contratilidade (COOPER, 1987; LORELL & CARABELLO, 2000). Quando as sobrecargas são prolongadas, estes mecanismos se tornam limitados, seja por sua adaptação, seja pelo fato de serem deletérios à função contrátil do miocárdio quando mantidos, como é o caso dos ajustes inotrópicos mediados por mecanismos neuro-humorais. Com isso, os ajustes funcionais dão lugar a ajustes estruturais que implicam em aumento da massa miocárdica (GROSSMAN & MC LAURIN, 1975), que é assumido como mecanismo fundamental para a normalização da função cardíaca.

Como mecanismo adaptativo, a hipertrofia cardíaca segue a lei de Laplace, na qual, o aumento de tensão ou carga no miocárdio provocado pela sobrecarga pressora é regido pela seguinte fórmula: $T = P \times R / 2E$ (T= tensão, P = pressão intracavitária, R = raio cavitário, E= espessura da parede) (GROSSMAN & MC LAURIN, 1975). Assim em situações de sobrecarga causada por aumentos de pressão ou por aumento do raio da cavidade, como nas sobrecargas volumétricas, o aumento na tensão da parede pode ser compensado por aumento na espessura relativa ou absoluta da parede ventricular.

Em corações hipertróficos são encontrados aumentos nas dimensões dos cardiomiócitos, sem alteração significativa em seu número, por serem as mesmas células terminalmente diferenciadas (ANVERSA *et al.*, 1986). No entanto, dependendo da

intensidade do distúrbio hemodinâmico e tipo de doença primária, são também encontradas degeneração dos cardiomiócitos e proliferação do estroma conjuntivo miocárdico (ANVERSA *et al.*, 1986). Estas alterações poderiam ser responsáveis pela maior morbidade e mortalidade dos portadores de hipertrofia cardíaca levando à insuficiência cardíaca (LEVY *et al.*, 1990).

Contudo, vários dos aspectos fundamentais sobre os mecanismos celulares envolvidos no crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos e hipertrofia cardíaca através do aumento de tensão por sobrecargas hemodinâmicas e os mecanismos responsáveis pela transdução de forças mecânicas locais em eventos bioquímicos nos miócitos cardíacos não estão totalmente esclarecidos. Neste contexto, diversas vias moleculares envolvidas na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca têm sido descritas (HEFTI *et al.*, 1997; HUNTER & CHIEN., 1999; SUSSMAN *et al.*, 2002; FREY & OLSON., 2003).

Estímulo mecânico induz hipertrofia cardíaca

Tensão mecânica

Diversas evidências têm indicado que o estímulo mecânico provocado por sobrecargas hemodinâmicas ou volumétricas pode ser suficiente para produzir as características do fenótipo hipertrófico. Por exemplo, a hipertrofia cardíaca pode ser induzida por sobrecargas hemodinâmicas após o bloqueio de adreno-receptores (humoral) ou simpatectomia (bloqueio neural), demonstrando a importante participação do estímulo mecânico no crescimento hipertrófico (RUWHOF & VAN DER LAARCE., 2000). Foi

também demonstrado que, em experimentos com corações isolados, submetidos ao aumento de pressão diastólica, houve mudanças qualitativas na expressão de proteínas específicas do fenótipo hipertrófico e aumento quantitativo das proteínas contráteis do miócito cardíaco (XENOPHONTOS *et al.*, 1986; RUWHOF & VAN DER LAARCE, 2000). Em experimentos realizados em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos a estiramento mecânico, observou-se a síntese de proteínas e a expressão de genes fetais característicos de crescimento hipertrófico, sem o envolvimento de fatores neurais e humorais, demonstrando assim, a importância da tensão mecânica sobre a ativação de mecanismos intracelulares envolvidos na hipertrofia de cardiomiócitos (SIMPSON *et al.*, 1989; FINK *et al.*, 2000; RUWHOF & VAN DER LAARCE, 2000).

Dentre os estudos que indicaram a relação entre estímulo mecânico e o crescimento hipertrófico cardíaco merece destaque um estudo realizado em gatos submetidos à bandagem da artéria pulmonar (COOPER *et al.*, 1985). Foram comparados os efeitos da sobrecarga hemodinâmica em músculos papilares desinseridos da parede ventricular direita em uma das extremidades com aqueles normalmente inseridos e, portanto, sujeitos às forças do miocárdio ventricular direito. Os efeitos do simpático foram eliminados por desnervação do ventrículo direito por bloqueio duplo α e β - adrenérgicos. Constatou-se que a área de secção transversal dos cardiomiócitos apresentou correlação estreita com a carga mecânica no músculo papilar, efeito não influenciado pela desnervação ou bloqueio do simpático por fármacos. Esses resultados indicaram que o crescimento hipertrófico do miocárdio depende das condições de carga local no músculo cardíaco e não da carga global imposta ao coração ou de fatores circulantes que pudessem afetar de maneira indistinta os cardiomiócitos de todo o coração.

Portanto, dados de literatura têm demonstrado que o estímulo mecânico parece ser suficiente para desencadear eventos bioquímicos intracelulares e a reprogramação gênica associada ao processo de hipertrofia dos miócitos cardíacos.

Mecanismos de mecanotransdução em miócitos cardíacos

São conhecidos pelo menos três tipos de mecanismos que podem ser responsáveis pela transdução do estímulo mecânico em sinal bioquímico (mecanotransdução) em miócitos cardíacos, que incluem canais iônicos sensíveis a estiramento, secreção de substâncias parácrinas/autócrinas e o complexo integrina/citoesqueleto (IZUMO & SADOSHIMA, 1997).

Canais iônicos sensíveis ao estiramento

A ativação de canais iônicos sensíveis a estiramento pode ser um dos mecanismos pelo qual estímulos mecânicos são traduzidos em sinais bioquímicos de crescimento celular em cardiomiócitos. Neste contexto, inúmeras evidências indicaram a presença de canais iônicos sensíveis a estiramento no miocárdio. A distorção do canal iônico provocada pelo estímulo mecânico pode iniciar fenômenos elétricos localizados representados por despolarização ou hiperpolarização da membrana celular. Além disso, outros estudos sugerem que o estímulo mecânico pode afetar grande variedade de canais iônicos e correntes no coração, como canais K^+ -ATP (VAN WAGONER, 1993), canal de K^+ retificador de corrente (SASAKI *et al.*, 1992), canais de cloro (HAGIWARA *et al.*, 1992), canais de cálcio tipo L (MATSUDA *et al.*, 1996) e corrente gerada pela bomba Na^+/K^+ (SASAKI *et al.*, 1994). Desta forma, fenômenos elétricos locais poderiam também ativar enzimas, dando início à mobilização de cascatas de eventos bioquímicos intracelulares. No

entanto, não existem estudos conclusivos sobre a participação destes canais no efeito hipertrófico provocado pelo estímulo mecânico no coração ou em miócitos cardíacos. Por exemplo, apesar de esses canais poderem atuar como elementos de mecanotransdução em miócitos cardíacos, o bloqueio dos mesmos com Gd^{+3} (gadolínio, metal utilizado como bloqueador do canal de cálcio sensível ao estiramento) não afeta o aumento da síntese protéica induzida por estiramento em cardiomiócitos, sugerindo que canais mecanossensíveis inibidos pelo Gd^{+3} não estão envolvidos nas respostas hipertróficas induzidas por estiramento (SADOSHIMA *et al.*, 1992).

Secreção de fatores parácrinos/autócrinos induzida por estiramento:

A liberação de fatores autócrinos e parácrinos tem sido proposta como um dos mecanismos importantes na patogênese de hipertrofia induzida por estímulo mecânico (KAYE *et al.*, 1996). Desta forma, o estiramento estimularia a produção ou secreção de fatores de crescimento que poderiam mediar o crescimento celular. Há demonstrações de que cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos ao estiramento produz angiotensina II, que teria papel fundamental no crescimento hipertrófico (IZUMO & SADOSHIMA., 1997). Experimentalmente, tratamento de ratos com coarctação da aorta com inibidor da enzima conversora ou bloqueador de receptor AT1 preveniu ou causou regressão da hipertrofia ventricular esquerda (BRUCKSCHLEGEL *et al.*, 1995; KOJIMA *et al.*, 1994). No entanto, tratamento com hidralazina nos mesmos estudos também impediu o aparecimento de hipertrofia cardíaca, indicando que redução na carga hemodinâmica, e não um bloqueio específico do sistema renina-angiotensina, é o responsável pelo fenômeno de regressão ou impedimento do aparecimento da hipertrofia nesse modelo. Estudos em camundongos geneticamente modificados não apresentaram, até o momento, resultados que

indiquem a participação do sistema renina-angiotensina no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por sobrecarga hemodinâmica. Em camundongos Knock-out para o receptor AT1 da angiotensina II (HARADA *et al.*, 1998), a bandagem da aorta produziu hipertrofia ventricular esquerda semelhante àquela observada em animais controle, indicando que estímulos provenientes da ativação dos receptores AT1 não são fundamentais para o desenvolvimento da hipertrofia por sobrecarga pressora em animais intactos. Também há indicações de que a endotelina-1 liberada por estiramento de miócitos cardíacos (BOGOYEVITCH *et al.*, 1994) e FGF (fator de crescimento de fibroblasto) (KAYE *et al.*, 1996) podem ser os mediadores do crescimento hipertrófico. Os mecanismos pelos quais o estiramento induz à liberação de fatores autócrinos e parácrinos são desconhecidos, mas algumas evidências experimentais apontam para o efeito mecânico direto na membrana celular aumentando a permeabilidade aos peptídeos produzidos tanto por cardiomiócitos como por outras células miocárdicas (KAYE *et al.*, 1996).

Sistema integrina/citoesqueleto:

De maneira geral, as células aderentes são sensíveis ao seu ambiente mecânico, sendo que forças mecânicas afetam sua função e estrutura (CHICUREL, CHEN, INGBER, 1998). Evidências obtidas em modelos experimentais e em formas específicas de miocardiopatia de origem genética indicam que o citoesqueleto dos miócitos cardíacos tem função importante na transdução de eventos mecânicos em eventos bioquímicos (SUSSMAN *et al.*, 2002; EPSTEIN & DAVIS., 2003). Sabe-se que o citoesqueleto, uma malha tridimensional intracelular formada por biopolímeros filamentosos transmite força e tensão para as estruturas intracelulares, possibilitando a ativação de vias sinalizadoras intracelulares através de moléculas imobilizadas na estrutura sólida desta malha

(MANIOTIS *et al.*, 1997; JAMMEY., 1998). O citoesqueleto dos miócitos cardíacos inclui estruturas sarcoméricas e extra-sarcoméricas (esqueleto “verdadeiro”, proteínas associadas a membrana, proteínas do disco intercalado). Dentre as estruturas sarcoméricas citam-se proteínas responsáveis por ligações entre os filamentos contráteis à linha Z e a própria linha Z, responsável pela sustentação e ancoragem das proteínas contráteis. Dentre as proteínas sarcoméricas podem ser citadas: a titina, a proteína C, a α -actina e a miomesina. O citoesqueleto extra-sarcomérico “verdadeiro” inclui os microfilamentos de actina, desmina, tubulina, e filamentos intermediários, como a vinculina, espectrina, talina, α -actinina e distrofina que estão associados à membrana, conectando sarcômeros paralelos entre si, com o sarcolema e com membrana de organelas intracelulares (EPSTEIN & DAVIS., 2003; SCHAPER *et al.*, 1991; CLARK *et al.*, 2002). O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui também os microtúbulos, que estabelecem conexões longitudinais entre as estruturas subcelulares dos miócitos cardíacos (SCOPACASA *et al.*, 2003). As proteínas do disco intercalado são a desmina, caderinas, cateninas e conexinas. Estes componentes do citoesqueleto se conectam fisicamente formando uma malha, permitindo que as estruturas do citoesqueleto se mantenham em estado estável e sob tensão mesmo em repouso (SCOPACASA *et al.*, 2003). Esse sistema de construção do citoesqueleto estabiliza a tensão em toda a célula criando um pré-stress interno (INGBER., 1997; INGBER., 2003). Esta tensão mantida em pontos específicos é gerada pelo microfilamento de actina e, provavelmente, permite ao citoesqueleto exercer suas funções de sustentação e mecanotransdução (INGBER., 1997; INGBER., 2003). Também importante, no contexto de mecanotransdução, é a capacidade do citoesqueleto de ancorar e controlar a atividade de

moléculas sinalizadoras que, uma vez ativadas, podem coordenar a expressão gênica e as respostas fenotípicas a estímulos mecânicos (BURRIDGE *et al.*, 1996; JAMMEY., 1998).

O citoesqueleto apresenta acoplamento funcional e estrutural com a matriz extracelular através de proteínas transmembrana conhecidas como integrinas e com as demais células através dos complexos juncionais como caderinas e anexinas. As integrinas são heterodímeros transmembrana compostas de subunidades α e β sem atividade enzimática definida. O sítio citoplasmático da subunidade β da integrina localiza o heterodímero com proteínas do complexo de adesão focal de maneira independente do ligante, e o sítio intracelular α dá especificidade à ligação com o ligante (proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e laminina) (DAMSKI & WERB., 1992; JULIANO & HASKILL., 1993; CLARK & BRUGGE., 1995; ROSS & BORG., 2001). A subunidade β possui sequência específica de aminoácidos localizada na superfície extracelular capaz de interagir com sequência também específica dos ligantes (ROSS & BORG., 2001). Não sem razão, estas proteínas acoplam-se mecanicamente com proteínas intracelulares do citoesqueleto e quinases que podem iniciar eventos bioquímicos sinalizadores. O mais intrigante papel da integrina no coração é a sua habilidade de servir como mecanotransdutor durante o desenvolvimento normal e em respostas a sinais fisiológicos e patofisiológicos de miócitos cardíacos (ROSS & BORG., 2001; TERRACIO *et al.*, 1991). Esses receptores, quando mecanicamente estimulados podem transmitir o sinal mecânico da matriz extracelular para o meio intracelular regulando a expressão gênica, diferenciação e crescimento celular (DAMSKY & WERB., 1992; ROSS & BORG., 2001).

A ativação da sinalização celular por estímulo mecânico via citoesqueleto depende fundamentalmente de agregações das integrinas (“clustering”) (BURRIDGE *et al.*, 1996). As integrinas conectam-se a filamentos de actina filamentar através das proteínas intermediárias vinculina, talina, α -actinina e distrofina (ROSS & BORG., 2001). Estudos em culturas de células de cardiomiócitos (HALL., 1998; MACHESKY & HALL., 1996) indicaram que a agregação dos heterodímeros de integrina e a polimerização e montagem das fibras de tensão do citoesqueleto dependem da ativação da GTPase conhecida como Rho, da família das GTPases de baixo peso molecular (CHRZANOWSKA-WODNICKA & BURRIDGE., 1996). Quando as células sofrem aumentos de tensão, ou quando as células são estimuladas a se contrair por agentes que ativam a Rho GTPase, a ativação da mesma leva à fosforilação da miosina de cadeia leve, fenômeno este que resulta na organização dos filamentos de miosina (CHRZANOWSKA-WODNICKA & BURRIDGE., 1996). A geração de força resultante deste evento alinha os filamentos de actina. A tensão gerada é então transmitida para as integrinas localizadas na membrana, levando a sua agregação. Esta agregação é fundamental para a montagem dos complexos de adesão focal, os quais são também comumente referidos como costâmeros em células esqueléticas e cardíacas.

Costâmero: Estrutura e Função

Costâmeros são complexos de proteínas subsarcolemais que envolvem e se alinham com a linha Z de miofibrilas periféricas, fazendo ligação do sarcômero com o sarcolema em células musculares estriadas. Uma variedade de dados indica que os costâmeros são elaborações de complexos de adesão focal específicas do músculo estriado (ERVASTI., 2003). Proteínas do Complexo de adesão focal como vinculina, desmina, talina, α -actinina,

β 1-integrina e distrofina estão acopladas a uma malha de actina filamentar e são consideradas proteínas costaméricas (DANOWSKI *et al.*, 1992; PARDO *et al.*, 1993; ERVASTI, 2003). Experimentos feitos por Street e colaboradores indicaram que o costâmero pode ter a função de transmitir força contrátil lateral do sarcômero até o sarcolema para a matriz extracelular, podendo minimizar a tensão imposta na bicamada lipídica durante a contração e relaxamento muscular (STREET., 1983; CRAIG & PARDO., 1983). Recentes publicações relataram o papel do eixo costâmero/linhaZ na mecanotransdução, um processo dinâmico através do qual estímulos mecânicos são “sentidos” pelas células musculares e convertidos em sinais bioquímicos (ERVASTI, 2003).

O complexo de adesão focal pode ser responsável pela transdução de forças e iniciar a ativação de mecanismos intracelulares responsáveis pelo crescimento celular em miócitos cardíacos, onde ocorre o recrutamento de várias vias de sinalização intracelular (ERVASTI, 2003).

Sinalização celular via integrina/citoesqueleto:

Seguindo-se assim ao estímulo mecânico, a agregação das integrinas leva a um aumento marcante da fosforilação em tirosina de enzimas presentes no complexo de adesão focal como a Src (quinase relacionada ao oncogene do sarcoma de Roux) e a Fak (quinase de adesão focal) e o recrutamento de várias proteínas sinalizadoras pela malha de actina (BURRIDGE *et al.*, 1992; SCHALLER *et al.*, 1994; BACHELOT *et al.*, 1996; SCHLAEPFER *et al.*, 1994).

Quinase de adesão focal (Fak):

A Fak é uma proteína fosforilada em tirosina, e contém um domínio central catalítico que é flanqueado por uma grande região amino-terminal contendo um sítio de ligação com a β 1-integrina (SCHALLER *et al.*, 1992; SCHALLER *et al.*, 1995), e uma região carboxi-terminal que contém sítios de interação com proteínas costaméricas, incluindo dois domínios ricos em prolina que podem se ligar com p130 CAS ou Rho GTPase (HILDEBRAND *et al.*, 1996; CARY *et al.*, 1998). A região carboxi-terminal da Fak contém sequências responsáveis por sua adesão focal (domínio FAT). Esta molécula sinalizadora foi originalmente descrita em cultura de células como uma proteína tirosina quinase localizada nos sítios de adesão ao substrato, o que despertou o interesse de caracterizá-la como um sinalizador envolvido na mecanotransdução entre o ambiente e as células (WANG *et al.*, 2001). Em estudos do nosso laboratório, foi demonstrado que a Fak está associada à fração dos filamentos de actina não-sarcomérica dos miócitos cardíacos e que sua ativação se acompanha de ativação de vias de sinalização celular envolvidas no crescimento hipertrófico e de outras vias envolvidas na sobrevivência celular. O mecanismo preciso que estabelece o vínculo entre a agregação das integrinas e a ativação da Fak é ainda desconhecido, mas sabe-se que a agregação das integrinas leva à autofosforilação da Fak no resíduo de Tyr-397 (SCHLAEPFER *et al.*, 1994).

Foi também demonstrado anteriormente em nosso laboratório que a quinase de adesão focal (Fak) expressa-se em abundância, sendo rapidamente ativada, quando o miocárdio é submetido a estímulos mecânicos (FRANCHINI *et al.*, 2000). Em corações isolados verificamos que a ativação da Fak é determinada pelo estiramento passivo do miocárdio, mais do que por tensões ativas (DOMINGOS *et al.*, 2002). Em cardiomiócitos

isolados de ratos neonatos, demonstrou-se que o estiramento mecânico aplicado diretamente em miócitos isolados provoca a ativação da Fak (TORSONI *et al.*, 2003). Também foi mostrado, que a ativação da Fak por estiramento em miócitos cardíacos tem papel crítico na regulação da re-expressão de genes do programa fetal induzida por estímulo mecânico (TORSONI *et al.*, 2003). Existe ampla constatação experimental de que a re-expressão do programa gênico fetal é parte essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos (SCHAUB *et al.*, 1997; HOSHIJIMA & CHIEN., 2002). Desta forma, a demonstração da importância da Fak para a expressão de ANF (fator natriurético atrial) em resposta ao estiramento indica o potencial desta enzima como elemento de controle das alterações fenotípicas dos cardiomiócitos induzidas por estímulos mecânicos.

A ativação da Fak por estiramento parece não depender da ativação de fatores parácrinos, indicando que a ativação da Fak pelo estiramento depende de mecanismos intrínsecos do miócito ligados diretamente ao estímulo mecânico (TORSONI *et al.*, 2003). Esta idéia foi confirmada em estudo recente do nosso laboratório que demonstrou, através de sondagens com sistema de duplo-híbrido, ensaios de “pull-down” e imunohistoquímica, a associação direta entre a Fak com a região C-terminal da cadeia pesada de miosina, bem como a dependência desta associação para a ativação da Fak pelo estímulo mecânico em cardiomiócitos (FONSECA *et al.* - submetido). Então, após autofosforilação da Fak no resíduo de Tyr-397, resíduos adicionais de tirosina da Fak são fosforilados através da ação da Src que se liga a Fak nos resíduos Tyr-576-577 via sítio de ligação SH2 (BACHELOT *et al.*, 1996; SCHLAEPFER *et al.*, 1994), incrementando sua atividade. A Src ativada também promove a fosforilação de resíduos adicionais da Fak como a Tyr-925. A este fenômeno se

segue a ligação de outras proteínas com sítios SH2 como a PI-3-quinase e o complexo Grb2/Sos. Esta ligação de Grb2/Sos na Tyr-925 da Fak ativa a sinalização através da via de crescimento celular Ras/Erk_{1/2} (SCHLAEPFER *et al.*, 1994). Essa ativação se acompanha de ativação de vias de inibição da apoptose, representada pela ativação da AKT. Esses resultados sugerem que a ativação da Fak pode ser um elemento central no mecanismo de resposta a estímulos mecânicos em miocárdio, podendo ser um dos principais responsáveis pelo mecanismo de crescimento hipertrófico do miocárdio durante sobrecarga pressora.

Distrofina:

A distrofina é uma das maiores proteínas estruturais conhecidas, com cerca de 427Kda e encontra-se localizada no lado citoplasmático da membrana plasmática de células musculares cardíacas e esqueléticas, contribuindo para a ligação do citoesqueleto interno das fibras musculares com a matriz extracelular (EBIHARA *et al.*, 2000; KAMOGAWA *et al.*, 2001). O domínio amino-terminal da distrofina se liga à actina filamentar (F-actina) no citoesqueleto, e a região carboxi-terminal interage com um complexo de glicoproteínas hetero-oligoméricas transmembranas e associadas à membrana, incluindo as α e β - distroglicanas, α , β , γ , δ - sarcoglicanas, sintrofinas, sarcospana, distrobrevina, caveolina-3 e sintase de óxido nítrico (NO-sintase) (KAMOGAWA *et al.*, 2001; LAPIDOS *et al.*, 2004). Há várias evidências que o complexo associado com a distrofina tem a função de ancorar o sarcolema ao costâmero e estabilizar o sarcolema contra forças físicas transduzidas através dos costâmeros durante contração ou relaxamento muscular. Por causa de sua distribuição sub-sarcolemal e ancoragem, a distrofina pode participar na organização do citoesqueleto, estabilidade, e integridade da membrana (VILQUIN *et al.*, 1998). Foi

também hipotetizado que a distrofina pode estabilizar os canais na membrana e assim participar da homeostase celular (VILQUIN *et al.*, 1998). A ausência ou deficiência da distrofina pode levar a uma instabilidade da membrana, e desregulação da concentração iônica, e assim pode resultar em destruição progressiva das fibras musculares, e progressiva fraqueza muscular (VILQUIN *et al.*, 1998). Anormalidades na distrofina, merosina, e do complexo distrofina/glicoproteínas produz distrofias musculares cardíacas e esqueléticas em humanos e camundongos deficientes da distrofina (MDX), o que prejudica a transferência apropriada do estímulo mecânico para o interior das células (KAMOGAWA *et al.*, 2001).

Distrofias musculares causadas pela deficiência da distrofina:

Distrofias musculares são doenças causadas em humanos por mutação de genes que codificam diversos grupos de proteínas costaméricas e são transmitidas geneticamente. Distrofias musculares causadas por mutação no gene da distrofina resultam em três doenças clinicamente distintas: a distrofia muscular de Duchenne (DMD), a distrofia muscular de Becker (DMB) e um tipo de cardiomiopatia ligada ao X (KAMOGAWA *et al.*, 2001). Dependendo da natureza da mutação, a distrofina está ausente ou presente em níveis reduzidos ou em formas truncadas (DECONINCK *et al.*, 1996). O fenótipo varia da mais severa distrofia muscular (DMD) até a forma mais amena, a distrofia muscular de Becker (DMB) (DECONINCK *et al.*, 1996; VILQUIN *et al.*, 1998).

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença recessiva hereditária ligada ao cromossomo X, no locus p 21 do braço curto do cromosso, afetando ~1 de 3.500 garotos recém nascidos (FASSATI *et al.*, 1997). O gene da distrofina é um dos maiores já descrito, constituindo de 79 exons e 8 promotores específicos de tecido, distribuídos através de

aproximadamente 2,2 Mb de sequências genômicas. A distrofia muscular de Duchenne é a forma mais comum e a mais devastadora das distrofias musculares (MARTINS., 2002). A ausência dessa proteína leva a uma instabilidade sarcolemal que termina em necrose da fibra muscular. As fibras necróticas perdem a capacidade regenerativa fazendo com que o tecido muscular seja substituído por tecido fibroso. O processo patológico se manifesta clinicamente com progressiva fraqueza muscular dos membros inferiores e atrofia do músculo esquelético, e progride até atingir os músculos respiratórios e músculo cardíaco com eventual morte antes dos 16 anos de idade, devido à insuficiência cardíaca e respiratória, quando os pacientes invariavelmente vão a óbito (FASSATI *et al.*, 1997; MARTINS., 2002).

Durante a progressão da DMD, ocorre marcante incidência de cardiomiopatia, com mais de 90% dos pacientes manifestando insuficiência cardíaca (MEGENEY *et al.*, 1999). Neste contexto, tem sido mostrado que a cardiomiopatia é uma causa primária de morte em uma proporção significativa dos pacientes com DMD. Contudo, o desenvolvimento de cardiomiopatia na DMD pode ser influenciada por parâmetros extrínsecos associados com a progressão da doença (MEGENEY *et al.*, 1999). Por exemplo, observou-se em pacientes com DMD que os danos distróficos comuns do músculo esquelético simultâneo com adaptação na postura pode resultar em um aumento da carga hemodinâmica devido ao esforço do coração em aumentar o fluxo sanguíneo para os músculos danificados (MEGENEY *et al.*, 1999). Especificamente a deficiência da distrofina pode predispor os cardiomiócitos à danos estruturais, o que torna-se evidente após longos períodos expostos à tensão mecânica, aumentando o desenvolvimento da patologia cardíaca (MEGENEY *et al.*, 1999). O entendimento da etiologia de cardiomiopatias associadas com a perda da

distrofina pode permanecer incompleto antes de ser definido o grau do envolvimento dos fatores extrínsecos nesta patologia.

Camundongos MDX:

O modelo animal para o estudo da patofisiologia da distrofia muscular é o camundongo MDX. Este modelo foi primeiramente descrito por pesquisadores, quando investigaram uma colônia de possíveis mutantes e observaram através de experimentos a quantidade elevada de piruvato-quinase no plasma e da isoforma muscular da fosfocreatina (CK), e também por anormalidades histológicas do músculo esquelético (VILQUIN *et al.*, 1998; RANDO *et al.*, 2000). O camundongo MDX é deficiente na distrofina subsarcolemal por causa de uma mutação espontânea na posição 3.185 do nucleotídeo do gene da distrofina (VILQUIN *et al.*, 1998; RANDO *et al.*, 2000), que produz uma parada prematura do codon 23 do exon do gene ocorrendo a produção de um peptídeo instável (RANDO *et al.*, 2000). Embora os camundongos MDX possuam um defeito genético similar aos pacientes que possuem DMD, a perda funcional da distrofina, os seus músculos possuem uma alta capacidade regenerativa que assegura um fenótipo mais benigno e função normal (STUPKA *et al.*, 2004).

Camundongos MDX mostram sinais histológicos de distrofias musculares após as 6 semanas de vida (PASTORET & SEBILLE., 1995). Contudo seu curso clínico difere grandemente dos pacientes com DMD. O camundongo MDX mostra pouca fraqueza no músculo cardíaco e esquelético. Parâmetros histológicos mostraram que o músculo cardíaco de camundongos MDX apresentam poucas lesões com 8 semanas de idade. Contudo, algumas pequenas lesões estão presentes após 9 semanas de idade (PONS *et al.*, 1995). O

músculo esquelético de camundongos MDX adulto são geralmente maiores e mais pesados do que o músculo esquelético de camundongos controle (VILQUIN *et al.*, 1998).

Contudo as fibras musculares dos camundongos MDX são mais fracas quando submetidas a alongamento em sua área seccional transversa. Esses dados sugerem que a distrofina protege as células musculares contra danos na membrana induzido por stress severo, especialmente por tensão mecânica. Não é claro por qual mecanismo o miocárdio deficiente na distrofina se mostra vulnerável à tensão mecânica. Contudo, mecanismos têm sido propostos. A concentração de cálcio intracelular em músculos cardíacos e esqueléticos de camundongos MDX se encontra elevada, e esta mudança está associada à velocidade de degradação de proteínas intracelulares. Além disso, estudos eletrofisiológicos revelaram que a abertura de canais de cálcio está aumentada em miotubos distróficos (FONG *et al.*, 1990). O aumento na concentração de cálcio pode ativar proteólises dependente de cálcio e aumentar a degeneração muscular (MARCHAND *et al.*, 2004). Após este período os músculos são invadidos por tecido fibrótico e tornam-se atróficos, fazendo com que o tempo de vida do camundongo MDX seja mais curto do que o do camundongos controle (VILQUIN *et al.*, 1998). Outra possibilidade é a indução de apoptose em cardiomiócitos distróficos. Estudos indicam que a apoptose é induzida em cardiomiócitos de ratos submetidos à sobrecarga pressora (TEIGER *et al.*, 1996) e que as células apoptóticas são encontradas em músculos deficientes da distrofina (TIDBALL *et al.*, 1995).

Através destes conceitos e com o objetivo principal de entendermos melhor os mecanismos envolvidos no complexo de sinalização associados ao sistema integrina/citoesqueleto/fak no coração, resolvemos investigar o(s) mecanismo(s) da mecanotransdução no modelo experimental de camundongos deficientes da distrofina

(MDX). Pesquisadores realizaram experimentos mostrando que o miocárdio de camundongos MDX submetidos a sobrecarga pressora por constrição da aorta é mais vulnerável à tensão mecânica do que o miocárdio normal com sobrecarga pressora *in vivo*, e que o grau de injúria se correlaciona com o nível de pressão sistólica (KAMOGAWA *et al.*, 2001), devido à instabilidade do sarcolema a um aumento de tensão em sua parede. Análises microscópicas revelaram lesão focal na parede do miocárdio de camundongos MDX, miócitos danificados, células inflamatórias e fibrose em último estágio, sendo que no miocárdio dos camundongos controle submetidos à constrição da aorta não foram encontradas estas lesões (KAMOGAWA *et al.*, 2001). Outros pesquisadores realizaram experimentos mostrando que o miocárdio e músculos esqueléticos de camundongos MDX hiper-expressam a integrina, sugerindo que o complexo de adesão focal pode estar hiper-ativado nestas condições, como forma de tentar compensar a ausência funcional da distrofina (BURKIN *et al.*, 2001). No entanto ainda não foram realizados experimentos que mostrassem o comportamento da Fak em camundongos MDX submetidos ou não à sobrecarga hemodinâmica *in vivo*. Nossa hipótese é de que o complexo integrina/Fak esteja hiper-expresso e ativado no miocárdio de camundongos MDX, como uma tentativa de compensar a perda da distrofina em pontos específicos da membrana celular de miócitos cardíacos.

2. OBJETIVOS

-Avaliar o complexo integrina/Fak em corações de camundongos MDX submetidos à sobrecarga pressora.

-Avaliar os padrões morfométricos e histológicos do ventrículo esquerdo dos camundongos MDX submetidos à sobrecarga pressora.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Foram utilizados camundongos swiss, machos, com pesos entre 35 e 40g, assim como camundongos c57bl/10 mdx (camundongo com mutação espontânea do gene da distrofina, como explicado anteriormente na introdução) (VILQUIN *et al.*, 1998; RANDO *et al.*, 2000), machos, pesando entre 35 e 40g, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Os animais foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*.

3.2- Modelo experimental de Coarctação da aorta em camundongos

Primeiramente os camundongos foram anestesiados com uma mistura de 0,065mg/g de Cloridrato de Cetamina (Ketalar^R, Cristália, Brasil) e 0,013mg/g de Xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, Brasil). Após tricotomia e assepsia da região torácica, os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C. Em seguida, foi realizada incisão cutânea transversal, na altura do primeiro espaço intercostal esquerdo, para acesso à cavidade torácica, com a finalidade de localização da crossa da aorta. Para produzir sobrecarga pressora do ventrículo esquerdo (VE), denominada de coarctação da aorta (CoAo) procedeu-se da seguinte maneira: uma agulha 26G (diâmetro de 0,45mm) foi colocada paralelamente à crossa da aorta e com fio cirúrgico 8-0 de algodão e fez-se um nó falso. Este nó foi dado até o fim, de maneira que a aorta ficasse com o diâmetro da agulha e portanto, provocasse uma diminuição do calibre da aorta. Após este procedimento a agulha foi rapidamente removida (figura 1). Após a constrição, a cavidade torácica foi fechada através de sutura em planos da musculatura do espaço intercostal e da pele com fio de algodão 3-0 (Polycot* 3-0 Ethicon, Jonhson & Jonhson, Brasil). Todos os animais foram

tratados com antibiótico profilático intramuscular (Pentabiótico veterinário de pequeno porte – Fort Dodge^R, Brasil – 4,5mg/10g de peso corporal).

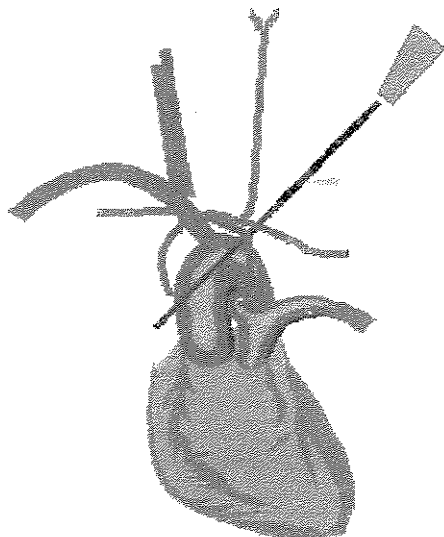


Figura 1: Esquema representativo da CoAo da aorta em camundongos

3.3- Cateterização para registros hemodinâmicos

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina 0,065mg/g (Ketalar^R, Cristália, Brasil) e 0,013mg/g de xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, Brasil) e colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C. A artéria carótida comum direita foi cateterizada com cateter de polietileno PE 50 para verificar as pressões arteriais e os gradientes de pressão. Para a construção deste cateter, tubos de polietileno PE50 (Clay Adams; USA) de 3cm de comprimento foram aquecidos e estirados de forma a reduzir o diâmetro luminal em sua parte distal para cerca de 300 µm. A artéria femoral foi também canulada com o mesmo cateter, sendo que sua extremidade distal foi introduzida até a artéria ilíaca para registro da pressão neste vaso.

3.4- REGISTROS HEMODINÂMICOS

Para os registros das pressões arteriais, os cateteres foram conectados a transdutores de pressão tipo “Strain Gauge” (BLPR-World Precision Performance Plastics CO; EUA), previamente calibrados, preenchidos com soro fisiológico degaseificado e com comprimentos adequados, para que os artefatos de transmissão da onda de pressão fossem eliminados ou minimizados. Os transdutores foram conectados a um amplificador de sinais (GP4A-General Purpose Amplifier-© Stoelting CO; USA) e conectados a uma placa analógico-digital. Esta placa estava conectada a um computador tipo PC. Os dados do pulso de pressão arterial foram registrados com frequência de amostragem de 300Hz, respectivamente.

O software utilizado para monitorização hemodinâmica e pós-processamento foi o Windaq (Dataq Instruments Windaq, Version 1-78, Akron, OH; EUA) e Advanced Codas (Dataq Instruments, Calc. Package, Version 3.19, EUA).

A análise foi realizada com a detecção dos picos sistólicos e diastólicos das ondas de pressão para obtenção das médias aritméticas, batimento a batimento das pressões arteriais sistólicas, diastólicas e médias durante cada etapa dos protocolos experimentais. A frequência cardíaca foi obtida da análise dos intervalos entre picos sistólicos máximos normalizados para 1 minuto. Os valores do pico máximo, pico mínimo, pressão arterial média (obtida da integral da área de cada pulso) e frequência cardíaca foram obtidos pela planilha do Excel® (Windows) geradas com valores do pós-processamento com o programa Advanced Codas. Foram avaliadas também as médias da frequência cardíaca (FC), pressões arteriais sistólicas da artéria femoral (PASF), pressões arteriais diastólicas da artéria femoral (PADF) e pressões arteriais médias (PAM), para eventual comparações.

Os registros hemodinâmicos foram realizados em tempos agudos - 10, 30 e 60 minutos após constrição da aorta e no também em tempos crônicos - 1, 2, 3, 7, 15 e 25 dias após a CoAo.

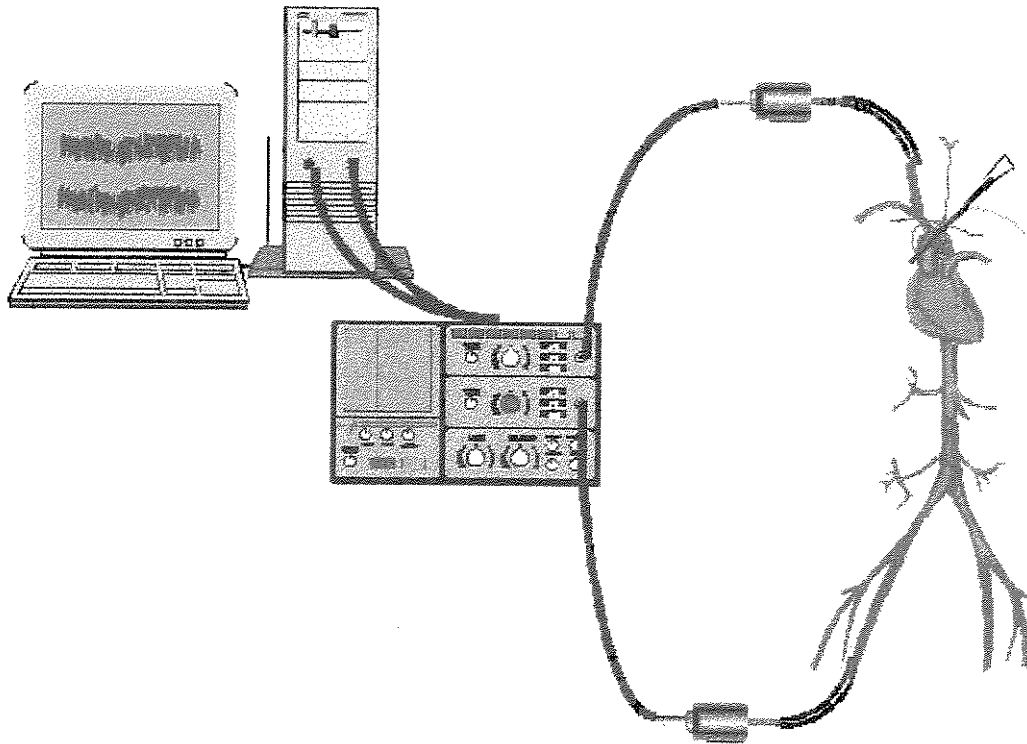


Figura 2: Esquema representativo de registro hemodinâmico em camundongos.

3.5- Pesagem dos corações

Após os registros hemodinâmicos os animais submetidos à constrição da aorta nos períodos de 1, 2, 3, 7, 15 e 25 dias foram sacrificados através de injeção de dose letal de Cloridrato de Lidocaína 2% (xylestesin/sem vasoconstritor), para que os corações parassem em diástole. Os corações foram extraídos, os átrios retirados e as cavidades ventriculares lavadas para retirada do sangue, sendo então determinado o peso dos ventrículos em balança de precisão (SA120; Scientech; USA). Em seguida, o ventrículo direito foi retirado

e o peso do ventrículo esquerdo, incluindo o septo interventricular determinado. A massa cardíaca (g) refere-se ao peso úmido absoluto dos ventrículos esquerdo e direito.

3.6- PROCESSAMENTO DO MIOCÁRDIO PARA ANÁLISES HISTO-MORFOMÉTRICAS

3.6.1- Processamento do miocárdio em parafina.

As análises morfométricas foram realizadas no 1^o, 2^o, 3^o, 7^o, 15^o e 25^o dias após a CoAo dos grupos de camundongos Swiss e MDX. Os animais foram sacrificados através de injeção de dose letal de Cloridrato de Lidocaína 2% (xylestesin/sem vasoconstritor), para que os corações parassem em diástole. O ventrículo esquerdo retirado e colocado em formalina 10% , utilizada como fixador. Após 24 horas de fixação, os corações foram seccionados em cortes transversais ao eixo longo do ventrículo esquerdo na altura do corpo dos músculos papilares do ventrículo esquerdo.

Após lavagem em tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, por 30 minutos, estes fragmentos foram desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados e incluídos em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram coletados em lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina. As lâminas contendo os cortes histológicos para posterior análise morfométrica foram coradas com corante hematoxilina e Eosina (HE) , para a análise morfológica e também corados com Tricrômico de Masson para análise do tecido intersticial.

3.7- COLORAÇÕES

3.7.1- Tricômico de Masson

As lâminas contendo cortes transversais ao eixo longo do ventrículo esquerdo na altura do corpo dos músculos papilares do ventrículo esquerdo foram desparafinizadas e hidratadas. Após mordentadas em solução de Bouin foram coradas com Hematoxilina Férrica de Weigert, solução de Escarlat de Biebrich, solução de ácido Fosfotungstico-Fosfomobilídico e solução de Azul de Anilina. Foram desidratadas, diafanizadas e montadas em resina.

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar;
2. Lavar em água corrente por 5 minutos;
3. Mordentar em solução de Bouin por 60 minutos à 60° C ou preferencialmente overnight em temperatura ambiente;
4. Lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin;
5. Passar em água destilada;
6. Corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos;
7. Lavar em água corrente por 10 minutos;
8. Passar em água destilada;
9. Corar pela solução de Escarlat de Biebrich por 5 minutos;
10. Passar em água destilada;

11. Incubar com solução de Ácido Fosfotungstico-Fosfomolibídico durante 10 a 15 minutos;
12. Passar em água destilada;
13. Corar pela solução de Azul de anilina durante 5 a 10 minutos;
14. Lavar em água destilada;
15. Passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos;
16. Passar em água destilada;
17. Desidratar, diafanizar e montar em resina.

3.7.2- Hematoxilina - Eosina

As lâminas contendo cortes transversais ao eixo longo do ventrículo esquerdo na altura do corpo dos músculos papilares do ventrículo esquerdo foram hidratadas, coradas com solução de hematoxilina de Harris (45 a 90 segundos), lavadas por 10 minutos em água corrente, coradas pela solução de Eosina (10 a 60 segundos), passadas por água destilada rapidamente, logo em seguida desidratadas, diafanizadas e montadas para posterior análise.

3.8- Análise histo-morfométrica

O material corado foi avaliado em microscópio óptico na objetiva de imersão (aumento 100X). As imagens foram capturadas por câmera digital (Sony DSC-S75) e transferidas para o computador através do programa BioColor 2002.

3.9- Isolamento e identificação de proteínas por imunoprecipitação e imunoblotting:

Após a retirada de fragmento de miocárdio, os materiais foram homogeneizados em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização (1% Triton-X 100, 100 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4], 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2 mmol/L PMSF, e 0.1 mg de aprotinina/ml) a 4 °C em homogenizador tipo Polytron PTA 20S (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Foram colocados em cada amostra 10% de triton em relação ao volume de tampão colocado por 30'. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4 °C em centrífuga refrigerada por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foram então utilizado para o ensaio. A determinação da concentração total de proteína nos homogenatos foi realizada pela técnica do biureto (Bradford) utilizando-se reagentes BIO-RAD e solução de albumina bovina como padrão. O sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação com os anticorpos contra as diversas proteínas a serem estudadas e Protein A Sepharose 6 MB.

As proteínas precipitadas usadas para imunoprecipitado foram incubadas com anticorpo específico overnight. No dia seguinte foi colocado proteína A Sepharose 6MB por 2 horas; a proteína A irá se ligar ao complexo proteína/anticorpo, formando um pellet no fundo. Centrifugar as amostras por 15' a 11.000 r.p.m, em seguida retirar o sobrenadante e colocar 1ml de tampão de lavagem(*) e centrifugar 5' repetindo o processo 3 vezes. As proteínas precipitadas usadas para imunoprecipitado ou para extratos totais foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Após este procedimento as proteínas precipitadas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese Bio-

Rad miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 min a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 12 horas com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro ao invés de 5%), ou imunoblottadas com anticorpo específico de acordo com a proteína de interesse no caso de imunoprecipitado por mais 12 horas à 4°C e então lavada por 60 minutos com tampão de bloqueio sem leite em pó. As membranas foram então encubadas com 2 µCi de [¹²⁵I]proteína A (30 µCi/µg) em 10 ml de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente e então lavadas novamente por 30 minutos como descrito anteriormente. A [¹²⁵I]Protein A ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por densitometria de auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

3.10- Ensaio de fosfatase in vitro:

Os ventrículos esquerdo dos camundongos Swiss e MDX foram rapidamente removidos, cortados em pequenos pedaços e homogeneizados imediatamente em aproximadamente 1,5 volumes de tampão de lise para fosfatase (EDTA 5mM, Tris-HCl 20mM, PMSF 2mM, EGTA 1mM, NaCl 130mM e aprotinina) a 4°C usando um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Logo em seguida

será adicionado 10% de Triton do valor adicionado de tampão (150ul) e a amostra será mantida por, no mínimo, 40 min em gelo. Após, os extratos serão centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para a análise por imunoprecipitação.

A dosagem de proteína será realizada pelo método de BIURETO (20ul do sobrenadante + 1000ul do Biureto). Fazer a leitura em espectrofotômetro a 540nm depois de reservar as amostras no escuro por 15 minutos). Para o protocolo de imunoprecipitação, será feita a reação do sobrenadante com 10µg de anticorpos primários, estando as amostras mantidas sob agitação leve na câmara fria durante a noite. Quarenta microlitros de Proteína A-Sepharose 6MB serão acrescentados a cada amostra, mantendo-as sob agitação na câmara fria por mais duas horas. Após centrifugação por 15 minutos a 11000 rpm a 4°C, o sobrenadante será desprezado, e o precipitado será submetido à lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem e ensaio para fosfatase (400ul por amostra) (Hepes 100mM, pH 7,6, NaCl 150mM, EDTA 2mM, DTT 1mM, BSA 0,5 mg/ml). O precipitado (amostra) será ressuspenso em 50ul de tampão de lavagem e ensaio para fosfatase e em seguida será adicionado o peptídeo específico numa quantidade adequada para concentração final de 200ul. A amostra será incubada uma hora a 30^o C.

Após a incubação, uma alíquota de quarenta microlitros será transferida para uma placa de Elisa (placa de 96 poços), à qual será adicionada 100ul do reagente Biomol Green (Reagente for Phosphatase Detection; Biomol Research Laboratories, USA). A Absorbância será medida após 30 minutos da adição do Biomol Green, em aparelho Leitor de Elisa (Labsystems Multishlan MS, Uniscience do Brasil), a 595nm.

3.11- Imunofluorescência e avaliação em microscopia a laser confocal

Os ventrículos esquerdos (VE) de camundongos Swiss e MDX controle (sem constrição da aorta) foram fixados com paraformoldeído 4% em PBS 0,1M, pH 7,4, por 15 minutos em temperatura ambiente. O material fixado foi incluído em parafina. Anteriormente a reação de imunofluorescência, o material foi cortado a 5 μ M e desparafinizados. Os cortes foram incubados em tampão de bloqueio (BSA 3% em PBS 0,1M) contendo Triton X-100 0,6%, por 45 minutos em temperatura ambiente, seguido por incubação com anticorpos primários (1:75 em PBS 0,1M) anti-Fak durante a noite a 4 °C. Após este período, o material foi lavado com PBS 0,1M e incubado com anticorpos secundários conjugados à biotina (1:250 em PBS 0,1M) por 2 horas a 25°C. Após a lavagem, foram incubadas com estreptavidina-Cy2 (1:500 em PBS 0,1M) e faloidina conjugada à rodamina (1:500 PBS 0,1M) por 45 minutos a 25°C e montadas. Os sinais positivos foram visualizados por microscopia confocal a *laser confocal* (Zeiss LM510). Na ausência de anticorpos primários, o uso de anticorpos secundários (controle negativo) não produziu marcação significativa.

3.12- Protocolos experimentais

Foram estudados 4 grupos experimentais agudos e crônicos:

- 1-) *CTsw*: animais swiss controle sem CoAo;
- 2-) *CTmdx*: animais mdx controle sem CoAo;
- 3-) *CoAosw*: animais swiss submetidos a CoAo;
- 4-) *CoAomdx*: animais mdx submetidos a CoAo.

Nos experimentos agudos os animais foram coarctados por 10', 30' e 60 minutos e nos experimentos crônicos, os animais foram coarctados por 1, 2, 3, 7, 15 e 25 dias. Após os diversos períodos de coarctação, os animais foram submetidos, invariavelmente, a monitorização hemodinâmica e os corações foram extraídos para:

- Histomorfometria
- Pesagem dos corações
- Western Blot
- Imunofluorescência para avaliação em confocal

3.13- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. Diferenças entre os valores médios foram analisadas por análise de variância (ANOVA) para dados repetidos. O teste de Bonferroni foi aplicado para análise “post hoc” e a probabilidade para os testes F serem considerados estatisticamente significantes foi $< 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1- Variáveis hemodinâmicas

Para avaliar a sobrecarga pressora nos camundongos submetidos a constrição da aorta (CoAo) monitorizamos a pressão arterial à montante e à jusante da constrição. A pressão arterial à montante foi medida através de cânula posicionada na artéria carótida comum direita, enquanto que a pressão arterial à jusante foi medida através de cateter posicionado na artéria ilíaca direita.

Os valores da pressão arterial basal nos experimentos agudos foram semelhantes nos camundongos Swiss (PAS= $123 \pm 1,4$ mmHg; PAD= $90 \pm 2,4$ mmHg; PAM= $106 \pm 1,3$ mmHg) e MDX (PAS= $116 \pm 4,2$ mmHg; PAD= $79 \pm 2,6$ mmHg; PAM= $97 \pm 3,9$ mmHg). Os valores da pressão arterial basal nos experimentos crônicos foram também semelhantes nos camundongos Swiss (PAS= $126 \pm 3,8$ mmHg; PAD= $83 \pm 2,9$ mmHg; PAM= $105 \pm 3,8$ mmHg) e MDX (PAS= $121 \pm 3,5$ mmHg; PAD= $79 \pm 1,5$ mmHg; PAM= $100 \pm 3,0$ mmHg). Como apresentado na Figura 3 A e B, a coarctação da aorta provocou aumentos agudos e crônicos da pressão arterial sistólica na aorta ascendente de ~ 49 mmHg, semelhante em camundongos Swiss e MDX. Os valores das pressões sistólicas, diastólicas e média de camundongos (Swiss e MDX) controle e camundongos (Swiss e MDX) submetidos a coarctação da aorta aguda (10 min a 1 hora de duração) e crônica (1 a 25 dias de duração) são apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Tanto camundongos Swiss, como MDX, não apresentaram redução significativa da pressão arterial média à jusante da constrição da aorta, quando os valores foram comparados com os medidos em camundongos controle (tabela1). A pressão arterial sistólica à jusante apresentou discreta redução nos camundongos coarctados quando comparada com a pressão arterial de camundongos controle não-coarctados, sendo mais intensa em camundongos MDX que em

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos dos grupos de camundongos submetidos constrição da aorta (CoAo) ou cirurgia fictícia aguda.

	Ct-s	10'-s	30'-s	1h-s	Ct-mdx	10'-mdx	30'-mdx	1h-mdx
	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
PASC (mmHg)	123 ± 1,4	169 ± 3,9*	168 ± 5,3*	163 ± 2,4*	116 ± 4,2	154 ± 5,8*	159 ± 5,7*	158 ± 5,0*
PADC (mmHg)	89 ± 2,3	87 ± 1,3	88 ± 2,9	83 ± 2,7	79 ± 2,5	79 ± 2,6	81 ± 1,2	80 ± 1,3
PASF (mmHg)		120 ± 5,0	120 ± 4,3	118 ± 1,8		106 ± 2,7	111 ± 3,8	108 ± 5,5
PADF (mmHg)		82 ± 1,2	82 ± 1,4	80 ± 2,6		75 ± 2,8	80 ± 1,7	77 ± 4,3
PAM (mmHg)	106 ± 1,3	101 ± 2,2	101 ± 2,0	99 ± 1,4	97 ± 3,9	91 ± 1,6	96 ± 1,7	93 ± 4,8
FC (bpm)	322 ± 5,3	361 ± 11,9	398 ± 18,1	397 ± 11,5	342 ± 20	410 ± 9,8	391 ± 10,8	369 ± 16
GS (mmHg)		49 ± 1,2	48 ± 3,5	45 ± 1,8		48 ± 3,3	47 ± 3,1	49 ± 3,1

Valores médio ± erro padrão da média; * $p < 0,05$ versus Ct; **n**: número de animais; **Ct**: Controle; **CoAo**: constrição da aorta; **PASC**: pressão arterial sistólica na carótida comum direita; **PADC**: pressão arterial diastólica na carótida comum direita; **PASF**: pressão arterial sistólica na aorta abdominal; **PADF**: pressão arterial diastólica na aorta abdominal; **PAM**: pressão arterial média na aorta abdominal; **FC**: frequência cardíaca; **GS**: gradiente sistólico; **mmHg**: milímetros de mercúrio; **bpm**: batimentos por minuto; **s**: swiss.

Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos dos animais após constrição da aorta (CoAo) ou controle nos diferentes tempos crônicos.

	Ct-s	1d- s	3d- s	15d- s	25d-s	Ct-mdx	1d-mdx	3d-mdx	15d-mdx	25d-mdx
	n=7	n=5	n=5	n=6	n=7	n=5	n=5	n=5	n=4	n=5
PASC (mmHg)	126 ± 3,8	172±3,0*	180±8,7*	164±7,4*	172±7,1*	121 ± 3,5	172±4,1*	172±3,2*	172±6,6*	168±1,4*
PADC (mmHg)	893±2,9	85 ± 1,8	94 ± 2,3	87 ± 4,9	87 ± 2,6	79,4± 1,5	85 ± 3,1	94±2,3	91 ± 4,5	87 ± 3,1
PASF (mmHg)		127± 2,0	121 ± 3,8	116 ± 7,0	120 ± 3,2		127 ± 3,1	120 ± 3,1	125 ± 4,0	120 ± 2,2
PADF (mmHg)		79 ± 2,9	85 ± 2,4	82 ± 3,1	86 ± 1,8		79 ± 4,3	85 ± 2,5	84 ± 2,8	83 ± 1,4
PAM (mmHg)	105 ± 3,8	101± 2,6	103 ± 0,8	99 ± 4,0	102 ± 2,1	100 ± 3,0	101 ± 3,8	102 ± 0,3	104,3±3	102 ± 1,4
FC (bpm)	432 ± 29	389±16	422 ± 28	428± 25	422 ± 17	381± 12	403± 16	422 ± 27	430 ± 31	428 ± 19
GS (mmHg)		45 ± 3,5	58 ± 9,1	48 ± 3,6	52 ± 8,9		45 ± 5,3	52 ± 3,4	48 ± 4,0	47 ± 1,5

Valores médio ± erro padrão da média; * p < 0,05 versus Ct; n: número de animais; Ct: Controle; CoAo: constrição da aorta; PASC: pressão arterial sistólica na carótida comum direita; PADC: pressão arterial diastólica na carótida comum direita; PASF: pressão arterial sistólica na aorta abdominal; PADF: pressão arterial diastólica na aorta abdominal; PAM: pressão arterial média na aorta abdominal; FC: frequência cardíaca; GS: gradiente sistólico; mmHg: milímetros de mercúrio; bpm: batimentos por minuto; s: swiss.

4.2- Efeito da coarctação da aorta na massa e geometria do ventrículo esquerdo de camundongos swiss e mdx nos experimentos crônicos.

Os camundongos MDX controle apresentaram menor peso corporal que os camundongos Swiss (tabela 3). Da mesma forma, a massa do ventrículo esquerdo foi menor em camundongos MDX que em Swiss. No entanto, o índice de massa do ventrículo esquerdo foi significativamente maior (19%) em camundongos MDX que nos camundongos Swiss. A constrição da aorta provocou aumento progressivo do índice massa do ventrículo esquerdo no grupo de camundongos Swiss, atingindo aumentos de 44% após 25 dias de constrição (figura 4). Por outro lado, os camundongos MDX apresentaram aumentos discretos da massa do ventrículo esquerdo nos primeiros dias após a constrição da aorta, mantendo-se estável até o 25^o dia (figura 4). Não foram observadas diferenças significativas nos pesos obtidos do ventrículo direito entre os grupos de animais deste estudo, em qualquer tempo após a cirurgia (tabela 3).

Os camundongos MDX controle apresentaram maior espessura do septo (70%) e diâmetro do ventrículo esquerdo (38%), quando comparados com os camundongos Swiss (figura 5 A e B). Da mesma forma a espessura do septo foi maior (70%) nos camundongos MDX (figura 5 C). Em camundongos Swiss, a constrição da aorta provocou aumento progressivo da espessura do septo interventricular (2,3 vezes após 25 dias de constrição), sem que ocorresse variação significativa do diâmetro da cavidade ventricular esquerda. Por outro lado, os camundongos MDX também apresentaram aumento progressivo da espessura do septo interventricular (1,4 vezes após 25 dias de coarctação da aorta), mas apresentaram dilatação progressiva da cavidade ventricular esquerda (~2 vezes após 25 dias de coarctação da aorta). Na espessura relativa do septo interventricular os camundongos Swiss apresentaram aumento de 3 vezes, caracterizando hipertrofia concêntrica, enquanto que os

camundongos MDX apresentaram redução da espessura relativa do septo (17%), caracterizando hipertrofia excêntrica (figura 5 C).

Os valores médios dos parâmetros obtidos da análise estrutural do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito de camundongos Swiss e MDX nos vários períodos de estudo são apresentados nas tabelas 3 e 4.

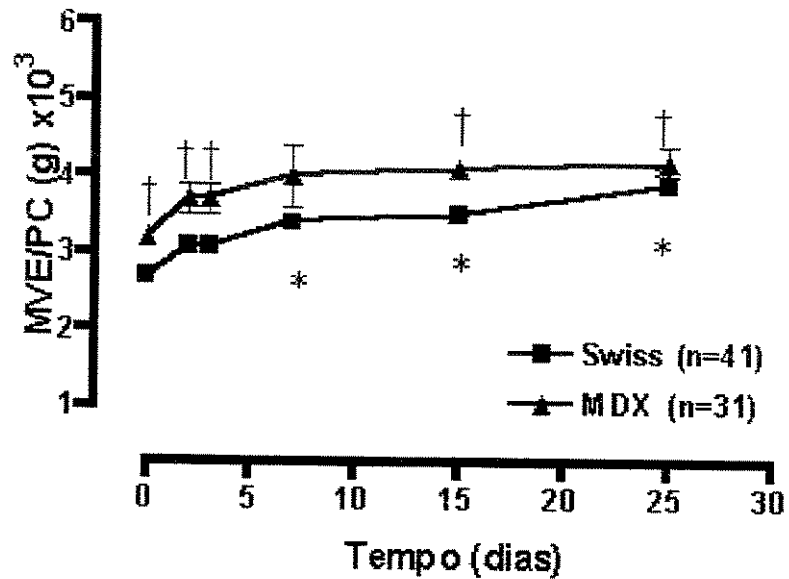


Figura 4. Efeito da CoAo na massa do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX nos experimentos crônicos. Relação da massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal dos camundongos Swiss e MDX após CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX em relação ao crescimento da massa do ventrículo esquerdo. MVE/PC= Relação da massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal dos camundongos; g= gramas; $\times 10^3$ = Multiplicado por mil. Estão apresentados os valores médios \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ versus CT; † $p < 0,05$ versus Swiss.

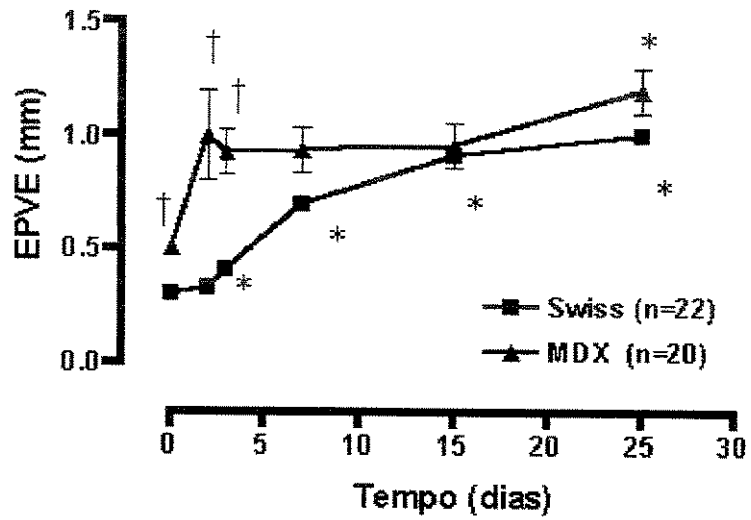
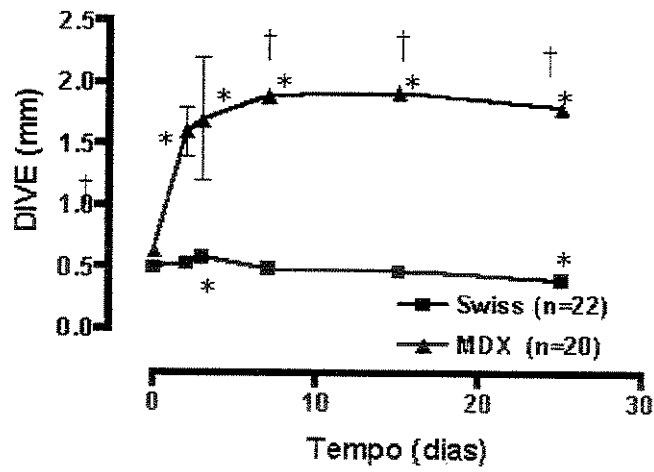
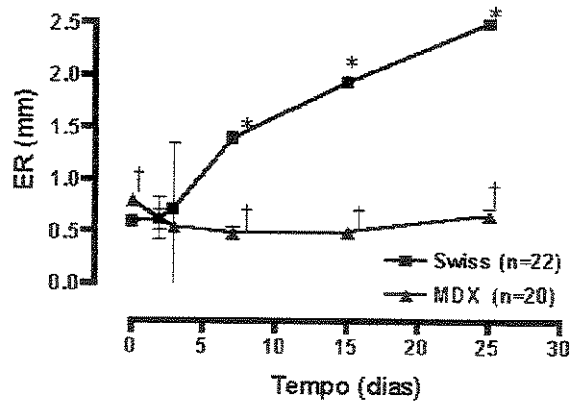
A**B****C**

Figura 5. Efeito da CoAo na geometria do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX nos experimentos crônicos. **A=** Análise da espessura do septo interventricular dos corações de camundongos Swiss e MDX CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX em relação ao crescimento do septo interventricular. **B=** Análise do diâmetro da cavidade ventricular dos corações de camundongos Swiss e MDX CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX em relação ao diâmetro da câmara cardíaca. **C=** Análise da espessura relativa do septo dos corações de camundongos Swiss e MDX CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX em relação a espessura relativa. **EPVE=** Espessura da parede do ventrículo esquerdo; **DIVE=** diâmetro da cavidade ventricular; Espessura da parede do ventrículo esquerdo; **ER=** Espessura relativa do septo interventricular; Estão apresentados os valores médios \pm erro padrão da média. *p < 0,05 versus CT; † p < 0,05 versus Swiss.

Tabela 3: Pesos e geometria dos corações de camundongos Swiss nos diferentes tempos de coarctação da aorta (CoAo).

	Ct -sw n=12	1d-Sw n=8	2d-Sw n=9	3d-Sw n=9	7d-Sw n=9	15d-Sw n=10	25d-Sw n=16
Mc*10³ (g)	133±0,009	158±0,007	141±0,01	150±0,01	140±0,006	146±0,006	211±0,007
MVE*10³ (g)	104±0,008	122±0,006	110±0,01	115±0,01	114±0,006	118±0,006	169±0,007
MVD*10³ (g)	29 ± 0,002	36 ± 0,001	31±0,003	35±0,003	27 ± 0,001	28 ± 0,003	42 ± 0,001
PC (g)	38 ± 2,9	40 ± 2,8	35 ± 2,6	37 ± 2,9	34 ± 1,3	34 ± 0,8	44 ± 0,2
Mc/PC (g)	3,6±0,07	4,0 ± 0,2	4,0±0,2	4,1±0,1	4,2±0,03	4,3±0,1*	4,9±0,2*
MVE/PC (g)	2,8± 0,05	3,1±0,01	3,1±0,02*	3,1±0,01	3,4±0,001*	3,5±0,00*	3,9±0,02*
MVD/PC (g)	0,8± 0,002	0,9±0,00	0,9± 0,002	0,9±0,00	0,8±0,001	0,8±0,001	0,9±0,001
EPVE (mm)	0,3±0,002	0,32± 0,02	0,33± 0,2	0,41± 0,01	0,70±0,01	0,91±0,02	1,0±0,002
DIVE (mm)	0,5±0,001	0,55± 0,01	0,53±0,01	0,58±0,02	0,49±0,02	0,47±0,02	0,40±0,02
ER (mm)	0,6 ± 0,002	0,6 ± 0,02	0,62 ± 0,1	0,71 ± 0,02	1,4±0,02 *	1,9±0,02 *	2,5±0,01 *

Valores médio ± erro padrão da média. *p < 0,05 versus Ct.; n: número de animais; **Ct**: Controle (sem CoAo); **Mc**: massa cardíaca; **MVE**: massa do ventrículo esquerdo; **MVD**: massa do ventrículo direito; **PC** : peso corporal; **EPVE**: espessura da parede do ventrículo esquerdo; **DIVE**: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; **ER**: espessura relativa do septo; **MC/PC**: relação da massa cardíaca pelo peso corporal ; **MVE/PC**: relação da massa ventricular esquerda pelo peso corporal; **g**: gramas; **mm**: milímetros; *10³: multiplicado por mil.

Tabela 4: Pesos e geometria dos corações de camundongos MDX nos diferentes tempos de coarctação da aorta (CoAo).

	Ct-mdx n=15	2d-mdx n=8	3d-mdx n=8	7d-mdx n=8	15d-mdx n=8	25d-mdx n=8
Mc*10³ (g)	115±0,007	115±0,005	112±0,006	128±0,005	128±0,005	143±0,003
MVE*10³ (g)	90 ± 0,006	90 ± 0,004	100 ± 0,002	100 ± 0,003	100 ± 0,003	124 ± 0,005
MVD*10³ (g)	30 ± 0,001	30 ± 0,001	20 ± 0,005	30 ± 0,003	30 ± 0,002	20 ± 0,004
PC (g)	28 ± 2,4	23 ± 0,9	26 ± 0,9	26 ± 2,5	25 ± 1,5	30 ± 1,0
Mc/Pc (g)	4,2±0,2 †	4,9±0,3†	4,4±0,2	5,1±0,5	5,1±0,2†	4,8±0,07
MVE/PC (g)	3,2±0,1†	3,7±0,2†	3,7±0,2†	3,9±0,4	4,0±0,1†	4,2±0,2*†
MVD/PC (g)	1,0±0,00	1,3±0,00	0,7±0,02	1,2±0,02	1,1±0,00	0,6±0,01
EPVE (mm)	0,51±0,01	1,0±0,2	0,93±0,1	0,94±0,1	0,96±0,01	1,2±0,1
DIVE (mm)	0,64±0,01	1,6±0,2	1,7±0,5	1,9±0,01	1,92±0,01	1,8±0,01
ER (mm)	0,80 ± 0,01†	0,63 ± 0,2	0,55 ± 0,8	0,49 ± 0,06†	0,5 ± 0,01†	0,67 ± 0,06†

Valores médio ± erro padrão da média. *p < 0,05 versus Ct; † p < 0,05 versus Swiss. n: número de animais; **Ct**: Controle (sem CoAo); **Mc (g)**: massa cardíaca; **MVE**: massa do ventrículo esquerdo; **MVD (g)**: massa do ventrículo direito; **PC** : peso corporal; **EPVE**: espessura da parede do ventrículo esquerdo; **DIVE**: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; **ER**: espessura relativa do septo; **MC/PC**: relação da massa cardíaca pelo peso corporal ; **MVE/PC**: relação da massa ventricular esquerda pelo peso corporal; **g**: gramas; **mm**: milímetros; *10³: multiplicado por mil.

Em seguida, foram analisadas os parâmetros a espessura dos cardiomiócitos e a porcentagem de tecido intersticial no miocárdio do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX.

Na fig.6 A estão representados os valores médios da espessura dos miócitos cardíacos dos camundongos Swiss e MDX. A média da espessura do miócito cardíaco foi maior (28%) nos camundongos MDX que nos camundongos Swiss controle. A constricção da aorta provocou aumento progressivo da espessura dos cardiomiócitos dos camundongos Swiss, atingindo um valor de 76% maior nestes camundongos em relação aos camundongos controle. Os camundongos MDX também apresentaram aumento progressivo da espessura dos cardiomiócitos, no entanto, o aumento máximo observado foi de cerca de 52%.

Quanto à porcentagem de tecido intersticial, os camundongos MDX controle apresentaram valores cerca de 1,6 vezes maior do que os camundongos Swiss. A constricção da aorta provocou aumento da porcentagem de tecido intersticial de cerca de 2 vezes nos camundongos Swiss após 25 dias de constricção da aorta, enquanto nos camundongos MDX este aumento foi de 6 vezes após 25 dias de constricção da aorta (Fig.6 B).

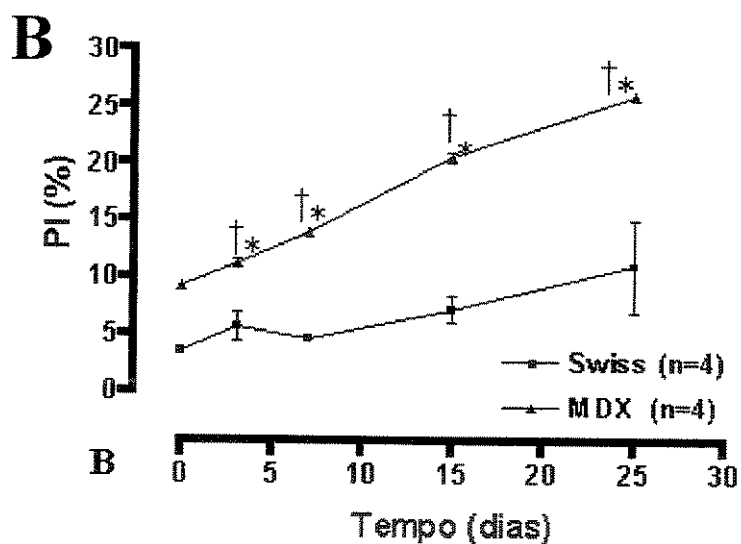
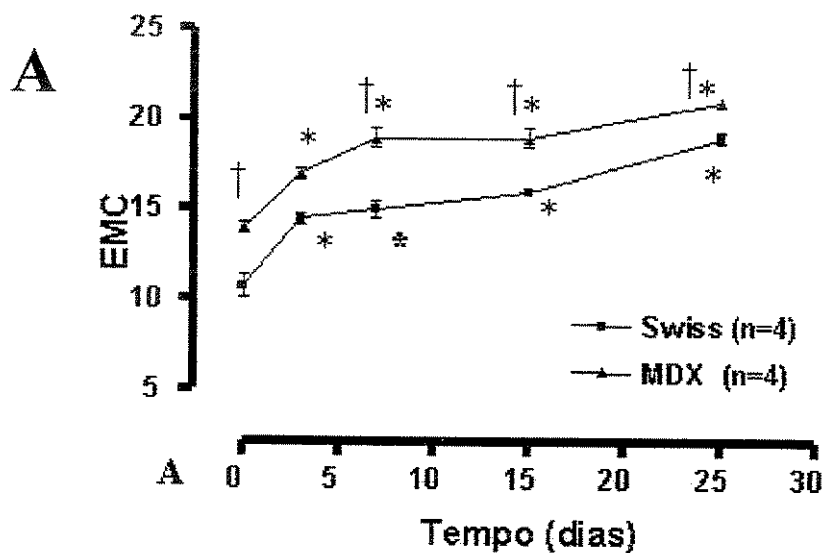


Figura 6. A= Efeito da CoAo na espessura do miócito cardíaco do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX em relação ao aumento da espessura da fibra cardíaca. B= Efeito da CoAo na porcentagem intersticial do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss e MDX CoAo nos períodos de 1 a 25 dias e comparação entre os dois grupos de camundongos Swiss e MDX em relação ao aumento da fibrose no coração desses camundongos. CoAo: constrição da aorta; EMC: espessura do miócito cardíaco; PI: porcentagem intersticial. Estão apresentados os valores médios \pm erro padrão da média. *p < 0,05 versus CT; † p < 0,05 versus Swiss.

Tabela 5: Espessura dos miócitos cardíacos e a porcentagem intersticial dos cortes de corações dos grupos de camundongos Swiss nos diferentes tempos de coarctação da aorta (do 1° ao 25° dia).

	Ct-Sw n=4	1d-Sw n=4	2d-Sw n=4	3d-Sw n=4	7d-Sw n=4	15d-Sw n=4	25-Sw n=4
EMC (µm)	10,8±0,7	10,6±0,2	11,8±0,5	14,5±0,3	15± 0,5	16± 0,2	19± 0,3
PI (%)	3,6± 0,1	2,4± 0,6	3,3± 0,8	5,7± 1,2	4,7± 0,2	7,2± 1,2	11± 4,1

Valores médio ± erro padrão da média; **n**: número de animais; **Ct**: Controle (sem CoAo); **EMC (µm)**: espessura do miócito cardíaco; **PI**: porcentagem intersticial; **µm**: micrômetro; *p < 0,05 versus CT.

Tabela 6: : Espessura dos miócitos cardíacos e a porcentagem intersticial dos cortes de corações dos grupos de camundongos MDX nos diferentes tempos de coarctação da aorta (do 1° ao 25° dia).

	Ct-mdx n=4	3d-mdx n=4	7d-mdx n=4	15d-mdx n=4	25d-mdx n=4
EMC (µm)	13,8±0,3†	17,5±0,3*	18,6±0,5*†	19±0,5*†	21± 0,2*†
PI (%)	9,3±0,2†	11,3±0,4*†	14±0,3*†	20,5±0,4*†	26±0,2*†

Valores médio ± erro padrão da média; **n**: número de animais; **Ct**: Controle (sem CoAo); **EMC (µm)**: espessura do miócito cardíaco; **PI**: porcentagem intersticial; **µm**: micrômetro; *p < 0,05 versus CT; † p < 0,05 versus Swiss.

4.3-Expressão e fosforilação da quinase de adesão focal no ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX submetidos à sobrecarga pressora aguda.

A expressão e fosforilação da Fak no resíduo de tirosina 397 foram avaliadas através da técnica de Western Blot com anticorpos específicos para a Fak não fosforilada e para a Fak fosforilada no resíduo 397 em extratos de ventrículo esquerdo de camundongos MDX e SWISS controle e submetidos a sobrecarga pressora aguda por constrição da aorta mantida por períodos 10 até 60 minutos.

Como demonstrado na Figura 7, camundongos MDX e SWISS controle apresentaram quantidades semelhantes de Fak no ventrículo esquerdo. A constrição da aorta por 60 minutos não modificou a quantidade de Fak expressa no miocárdio em ambas as cepas de camundongos. Por outro lado, camundongos MDX controle apresentaram quantidade de Fak fosforilada na Tyr397, cerca de 3 vezes aquela dos camundongos SWISS. A constrição da aorta provocou aumento da fosforilação da Fak em camundongos SWISS, observado já aos 10 minutos, com aumento máximo de ~ 3 vezes aos 60 min de constrição da aorta. Da mesma forma, os ventrículos esquerdos dos camundongos MDX apresentaram aumento da quantidade de Fak fosforilada na Tyr397 após a constrição da aorta. No entanto, este aumento foi de apenas 20% após 60 min de constrição da aorta.

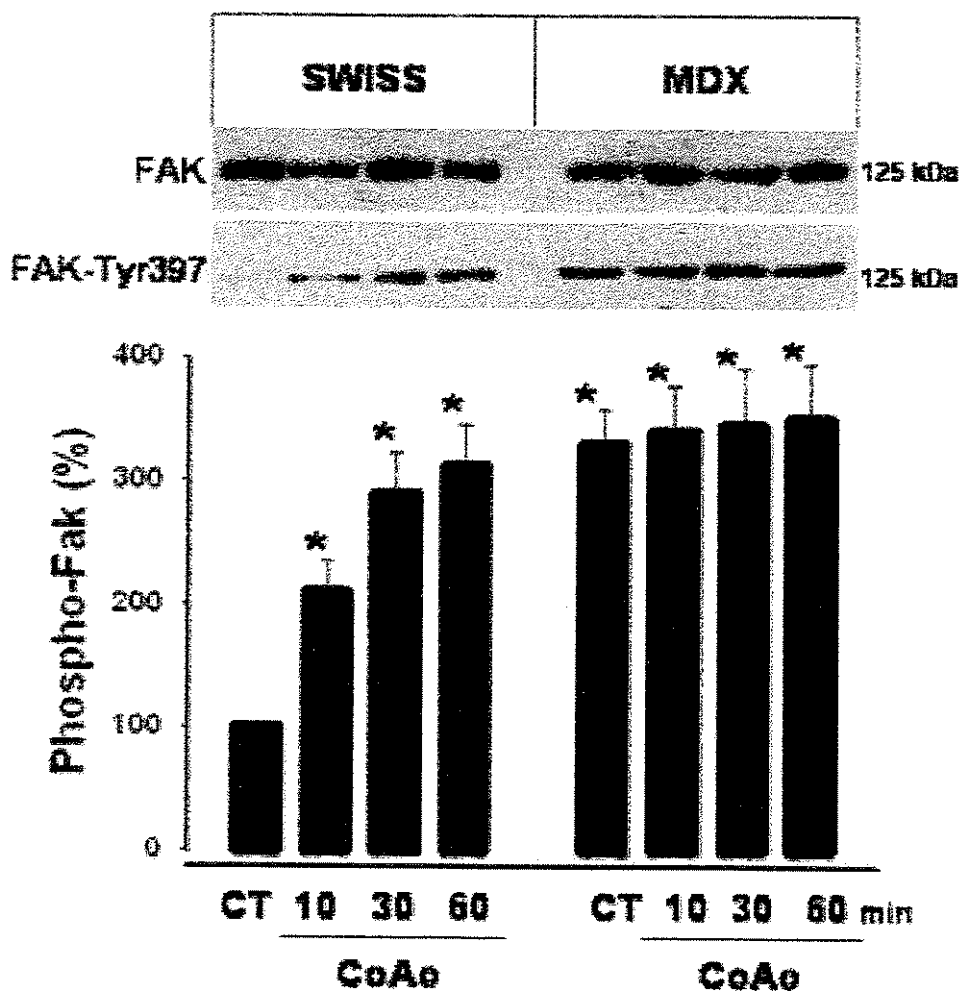


Fig. 7- Blots representivos de extratos totais com anticorpos anti-Fak e anti-Fak-Tyr397, obtidos do ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX. O gráfico da figura representa valores médios das variações percentuais da quantidade de Fak fosforilada no resíduo de tirosina 397, comparadas com aquela de camundongos SWISS controle. * $p < 0.05$ comparado com valores de camundongos controle SWISS. As comparações foram realizadas com os valores absolutos das medidas densitométricas das bandas individuais dos blots.

A análise da expressão de Fak no miocárdio de camundongos SWISS e MDX foi também realizada através de imunohistoquímica e microscopia confocal. Como mostrado nos exemplos representativos da Figura 8, a distribuição de Fak nos cardiomiócitos apresenta diferenças nos camundongos MDX em relação aos SWISS. Nos camundongos SWISS, a Fak apresenta distribuição que obedece padrão regular dos sarcômeros, sem no entanto, se sobrepor à marcação de actina. Esta distribuição indica localização na região da banda A sarcomérica. Por outro lado, a marcação com anticorpo anti-Fak de miocárdio de camundongos MDX apresentou distribuição irregular ao longo dos cardiomiócitos, sendo mais freqüente na periferia das células, onde, também com freqüência, a marcação se dá em forma de agregados de grande diâmetro.

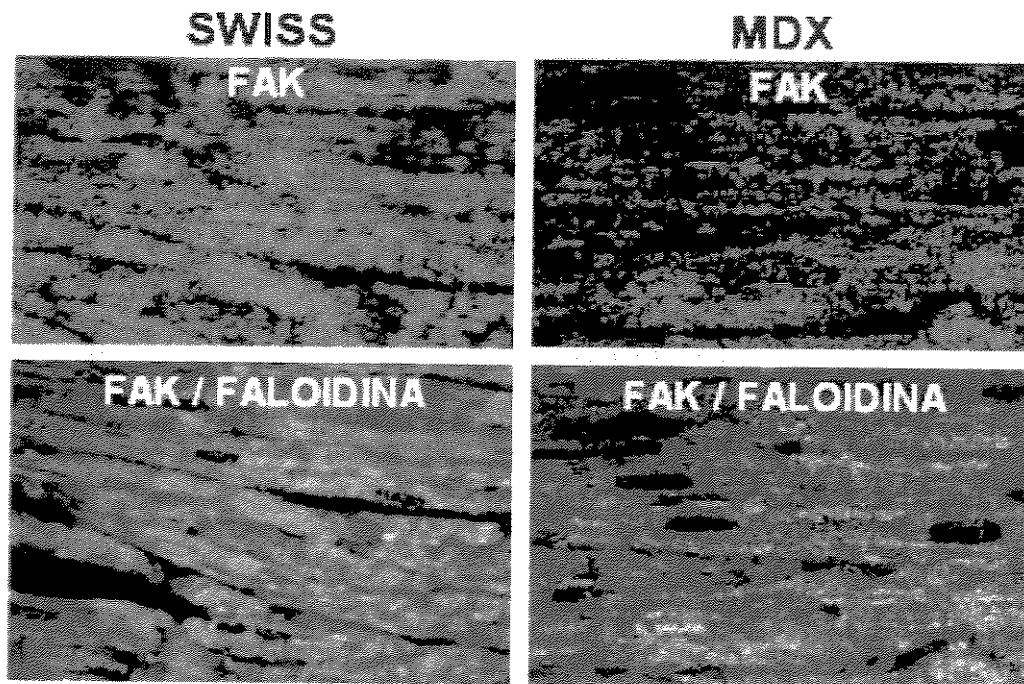


Fig. 8- Exemplos representativos de seções de miocárdio do ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX controle com dupla marcação com anticorpo anti-Fak (verde) e faloidina (vermelha).

4.4- Expressão e atividade da SHP2 no ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX submetidos à sobrecarga pressora aguda.

Devido ao fato de termos encontrado aumento na quantidade de Fak fosforilada em camundongos MDX, levantamos a hipótese de que este aumento na fosforilação em tirosina da Fak e, presumivelmente, sua atividade decorre de uma menor atividade tirosinofosfatase nestes animais. Com base em dados de estudos anteriores realizados por Manes (1999) que indicaram ser a fosforilação da Fak regulada pela atividade da SHP2, realizamos experimentos para verificar se a Fak está associada com a SHP2 no ventrículo esquerdo de

camundongos SWISS e comparamos estes resultados com aqueles obtidos de camundongos MDX. Como indicado na Figura 9, a SHP2 expressa-se em quantidades semelhantes em camundongos MDX e Swiss. Experimentos de co-imunoprecipitação indicaram que existe associação da Fak com a SHP2 no miocárdio de camundongos SWISS e MDX. No entanto, a associação no miocárdio dos camundongos MDX é cerca de 30% daquela observada nos camundongos SWISS.

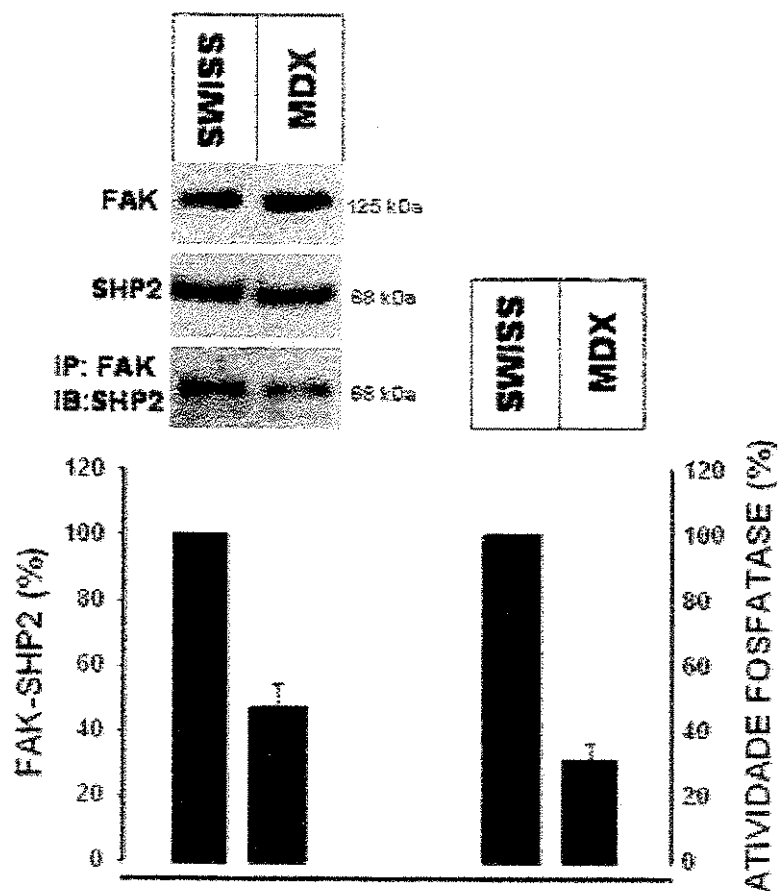


Fig. 9- Exemplos representativos de imunoblottings de extratos miocárdicos de camundongos SWISS e MDX controle. Os exemplos se referem às quantidades de Fak e SHP2, obtidas de extratos totais e precipitados com anticorpo anti-Fak, marcados com anticorpo anti-SHP2. Os valores médios da quantidade de SHP2 associada com a Fak são apresentados no gráfico abaixo dos blottings. No gráfico da direita são apresentados valores médios da atividade de fosfatase associada aos imunoprecipitados de extratos miocárdicos de camundongos SWISS e MDX. * $P < 0.05$ comparado com valores de camundongos SWISS.

Finalmente avaliamos a atividade específica de fosfatase associada a imunoprecipitados de Fak e de SHP2 obtidos de extratos de ventrículo esquerdo de camundongos SWISS e MDX. Como indicado na Figura 9, a atividade de fosfatase associada ao imunoprecipitado de SHP2 foi significativamente menor nos imunoprecipitados de camundongos MDX que naqueles de camundongos SWISS.

5. DISCUSSÃO

Estímulos mecânicos provocam alterações fenotípicas e funcionais nos miócitos cardíacos que resultam, em curto-prazo em vantagens adaptativas do coração frente à sobrecarga mecânica, no entanto, em longo-prazo estas vantagens desaparecem, dando lugar a um processo degenerativo auto-progressivo do miocárdio, determinante principal da falência cardíaca nas condições de sobrecargas mecânicas crônicas. São ainda pouco conhecidos os mecanismos responsáveis pela transdução dos estímulos mecânicos em sinais bioquímicos no músculo cardíaco. Evidências acumuladas em anos recentes apontam para a participação crítica de elementos do citoesqueleto sarcomérico e extra-sarcomérico na transdução dos sinais mecânicos em bioquímicos nos miócitos cardíacos (SUSSMAN *et al.*, 2002; EPSTEIN & DAVIS, 2003; CLARK *et al.*, 2002; GERULL *et al.*, 2002; ARBER *et al.*, 1997; FAULKNER *et al.*, 2001; KNOLL *et al.*, 2002; VATTA *et al.*, 2003; PYLE & SOLARO, 2004). Presume-se que a participação destas estruturas na transdução mecano-bioquímica se faça através de moléculas sensíveis à tensão ou estiramento provocados pelo estímulo mecânico nas proteínas do citoesqueleto. Evidências experimentais obtidas em células em cultura, bem como em miócitos cardíacos indicam que a Fak apresenta diversas características de moléculas sinalizadoras de estímulos mecânicos (HANKS *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2001). Nos miócitos cardíacos, trabalhos anteriores de nosso laboratório (FRANCHINI *et al.*, 2000; DOMINGOS *et al.*, 2002; TORSONI *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2004 *in press*) indicaram que a Fak encontra-se associada com a região C-terminal da miosina de cadeia pesada, sendo rapidamente ativada por estímulos mecânicos e formando, simultaneamente à sua ativação, agregados nos miofilamentos. Além disso, verificamos que a ativação da Fak tem papel crítico na expressão de genes fetais induzida por estímulos mecânicos (TORSONI *et al.*, 2003). De acordo com estes

dados, a ativação da Fak dependeria de sua ligação com proteínas do citoesqueleto sarcomérico (i.e. miosina de cadeia pesada) que, por sua vez, seriam responsáveis, uma vez submetidas à tensão mecânica, pela modificação conformacional desencadeadora da ativação da Fak.

Aumento da Fosforilação basal da Fak em camundongos MDX

No presente estudo, examinamos a distribuição da Fak e seu estado de fosforilação no miocárdio de camundongos MDX, portadores de mutação na distrofina, uma proteína do citoesqueleto extra-sarcomérico com importância crítica no processo de sinalização mecânica no miocárdio. Contrário à expectativa inicial, verificamos que camundongos MDX, apresentaram aumento da fosforilação e, presumivelmente da atividade basal da Fak no miocárdio, fato este demonstrado através de *immunoblotting* com anticorpo específico contra a forma fosforilada da Fak no resíduo de tirosina 397. Não foram observadas, no entanto, diferenças na quantidade de Fak miocárdica nos camundongos MDX, comparados com camundongos SWISS. Por outro lado, frente ao estímulo mecânico induzido por constrição da aorta ascendente, foram verificados aumentos da fosforilação da Fak no ventrículo esquerdo de camundongos SWISS que atingiram cerca de 3 vezes aquela da situação controle. No entanto, nos camundongos MDX, não ocorreu aumento significativo da fosforilação da Fak em resposta ao estímulo mecânico. A avaliação, por imunohistoquímica associada com microscopia confocal do tecido miocárdico, mostrou diferenças importantes entre camundongos MDX e SWISS na distribuição celular de Fak. Nos cardiomiócitos de camundongos SWISS a Fak apresentou distribuição regular, acompanhando o padrão sarcomérico de estriação, provavelmente por causa de localização preferencial na região das bandas A. Este achado foi semelhante àquele observado

anteriormente por nosso laboratório em cardiomiócitos isolados de ratos (FONSECA *et al.*, 2004 *in press*). No entanto, nos cardiomiócitos de camundongos MDX, não se observou padrão sarcomérico de distribuição da marcação com anticorpo anti-Fak, havendo sim, distribuição irregular, preferencialmente na periferia das células com aparência de agregados. Estes resultados sugerem que o aumento da fosforilação da basal da Fak se acompanham mudança de localização da Fak nos cardiomiócitos. Verificamos também que camundongos MDX apresentam menor associação da SHP2 com a Fak e menor atividade da tirosina fosfatase SHP2 que camundongos SWISS, apesar de as quantidades de SHP2 no miocárdio do ventrículo esquerdo serem semelhantes em ambas as cepas. Estes resultados sugerem que a maior fosforilação basal da Fak no miocárdio de camundongos MDX comparados com camundongos SWISS deve-se à menor atividade de tirosina fosfatase da SHP2.

Os mecanismos responsáveis pela menor atividade da SHP2 e sua associação da com a Fak no miocárdio de camundongos MDX não foram explorados no presente estudo. É plausível, no entanto, que este fenômeno se deva a anormalidades na localização celular do complexo Fak-SHP2, causadas pela deficiência estrutural e funcional do citoesqueleto ocasionada pela ausência de distrofina nos camundongos MDX. Está bem estabelecido que a ausência de distrofina produz desarranjo na sua estrutura dos costâmeros, microfilamentos de actina e perda da integridade do sarcolema em células musculares (BLAKE *et al.*, 2002), o que pode determinar as alterações de distribuição da Fak nos cardiomiócitos de camundongos MDX observadas no presente estudo. Em estudos anteriores (FRANCHINI *et al.*, 2000; TORSONI *et al.*, 2003) demonstramos que após o estímulo mecânico a Fak se associa com miofilamentos sarcoméricos e de F-actina em miócitos cardíacos, indicando

que a ativação da Fak no miócitos cardíaco pode depender de sua localização em sítios sub-celulares específicos. Por outro lado, em outros estudos do nosso laboratório demonstramos que a integridade dos microfilamentos de actina é fundamental para a ativação da Fak por estiramento em cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura (TORSONI *et al.*, submetido). Da mesma forma, estudos recentes em fibroblastos em cultura indicaram que quando fosforilada a Fak se desloca dos sítios de adesão focal onde é normalmente encontrada (KATZ *et al.*, 2003). Portanto, apesar de não ser claro mecanismo, não há dúvida de que a integridade dos microfilamentos de actina tem papel importante na ativação da Fak por estímulos mecânicos.

Neste contexto, é interessante notar que, apesar de termos realizado análise da localização sub-celular da SHP2, nossos resultados com a técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-Fak indicaram que a distribuição sub-celular da Fak encontra-se alterada nos camundongos MDX, assumindo distribuição sem as características do padrão sarcomérico regular observado nos camundongos SWISS. Desta forma, será importante verificar, em estudos futuros, a localização sub-celular da SHP2 em cardiomiócitos de camundongos SWISS e MDX. É interessante notar ainda que a distrofina é responsável não apenas pela integridade do costâmero, mas também da linha M, que conecta os vários filamentos de miosina entre si e com o sarcolema (WILLIAMS & BLOCH, 1999), região que demonstramos recentemente ser o principal sítio de localização da Fak em cardiomiócitos não submetidos a sobrecarga mecânica (FONSECA *et al.*, 2004 *in press*). Em conjunto, os resultados daqueles e do presente estudo sugerem que a integridade do citoesqueleto é responsável pela manutenção da Fak em estado de baixa fosforilação e

atividade, bem como de sua localização em sítios sarcoméricos relacionados à banda A. Será importante verificar a consistência desta hipótese.

Os resultados do presente estudo permitem o debate sobre novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos de ativação da Fak pelo estímulo mecânico em miócitos cardíacos. A principal implicação destes resultados é a noção de que o nível de fosforilação basal e, presumivelmente da atividade basal da Fak, é dependente de sua interação com a SHP2. Presume-se, portanto, que SHP2 mantém-se em estado ativo basal ou que a interação Fak e SHP2 de alguma forma interfere na capacidade da Fak de se autoativar ou ser ativada por mecanismos de sinalização presentes nas células miocárdicas. No entanto, apesar de não existirem informações anteriores sobre a atividade basal da SHP2 em células miocárdicas, dados disponíveis indicam que a SHP2 mantém-se em estado inativo em células não estimuladas, sendo este estado inativo produzido pela conformação da cauda C-terminal da proteína que impede a atividade do sítio de fosfatase (NEEL *et al.*, 2003). O modelo aceito atualmente indica que para ser ativada, a SHP2 precisa ligar-se com proteína fosforilada em resíduos de tirosina através de sítios -SH2 da SHP2 (BARFORD & NEEL, 1998). Por outro lado, o desconhecimento sobre a maneira como Fak e SHP2 estão associadas, se direta ou indiretamente, sobre a possível participação de outras moléculas de sinalização nesta interação ou mesmo a localização subcelular do complexo Fak e SHP2 em cardiomiócitos impedem o entendimento de como esta interação exerce efeito inibitório sobre o estado de fosforilação basal da Fak.

Outro aspecto interessante do presente estudo foi a demonstração de que a menor associação da SHP2 com a Fak está associada a uma menor atividade de fosfatase associada nos imunoprecipitados de anticorpo anti-SHP2. Este fenômeno pode ser decorrente do

possível desarranjo na localização da SHP2 ou de seus ativadores. Esta hipótese é apoiada pela demonstração, no presente estudo, de que a quantidade de SHP2 expressa no miocárdio não é diferente no miocárdio de camundongos SWISS e MDX. Estudos futuros de localização da SHP2 nos cardiomiócitos e a importância da integridade do citoesqueleto para sua atividade deverão contribuir para o esclarecimento deste fenômeno.

Intolerância do miocárdio de camundongos MDX à sobrecarga pressora

No presente estudo também verificamos que camundongos MDX submetidos a sobrecarga pressora apresentaram dilatação ventricular precoce, sugestiva de insuficiência cardíaca. A comparação da resposta dos camundongos MDX com aquela dos camundongos SWISS, que desenvolveram a esperada hipertrofia concêntrica em resposta à sobrecarga pressora, indica a intolerância do miocárdio dos camundongos MDX frente ao estímulo mecânico. Estes resultados, confirmaram dados anteriores da literatura (KAMOGAWA *et al.*, 2001) e são condizentes com a importância crítica da integridade da distrofina e do citoesqueleto para a resposta adaptativa dos cardiomiócitos ao estímulo mecânico. Apesar de ser concebível que a intolerância ao estímulo mecânico dos camundongos MDX seja relacionada às alterações na sinalização pela Fak, não realizamos, no presente estudo, experimentos para testar esta hipótese. Neste contexto, é importante salientar que o desarranjo da integridade do citoesqueleto pode provocar alterações em múltiplas vias de sinalização (BLAKE *et al.*, 2002), que, neste caso, poderiam também contribuir para a intolerância dos cardiomiócitos de camundongos MDX à sobrecarga mecânica.

A intolerância de músculos esqueléticos de indivíduos com distrofia muscular e camundongos MDX à sobrecarga mecânica tem sido atribuída tanto à incapacidade de converter sinais mecânicos em sinais bioquímicos, como à fragilidade da membrana celular (BLAKE *et al.*, 2002). É interessante notar que independente da presença de estímulo mecânico identificável, portadores de distrofia muscular apresentam degeneração muscular progressiva. Esta degeneração progressiva pode se dever aos efeitos de sobrecargas mecânicas de pequena monta ou transitórias ou mesmo à perda do trofismo desencadeado pela alteração molecular primária. No presente estudo verificamos que camundongos MDX apresentam maior massa do ventrículo esquerdo que os camundongos SWISS. Paralelamente a isto, estes animais apresentaram maior espessura dos cardiomiócitos e maior quantidade de tecido intersticial. Como visto aqui, estes fenômenos ocorrem na ausência de hipertensão arterial ou qualquer outra causa de sobrecarga hemodinâmica identificável. Os mecanismos que levam à hipertrofia dos cardiomiócitos, mesmo na condição basal não são conhecidos. É concebível, no entanto, baseado nos nossos resultados, que a ativação permanente da Fak pode contribuir para o crescimento hipertrófico basal dos cardiomiócitos de camundongos MDX. Da mesma forma, a hiperatividade permanente dos mecanismos de sinalização coordenados pela Fak poderia contribuir para a lesão dos cardiomiócitos. No entanto, estas hipóteses necessitam ser avaliadas através de experimentos informativos.

A perda progressiva de cardiomiócitos nos camundongos MDX poderia explicar a maior quantidade de tecido intersticial no miocárdio destes camundongos que no dos SWISS. Neste caso, a fibrose miocárdica poderia ter como mecanismo principal a substituição passiva dos miócitos cardíacos pelo tecido intersticial. Por outro lado, é

também possível que a fibrose tenha um componente reativo causado tanto por fenômenos inflamatórios, como por desarranjo na matriz extracelular, como por isquemia miocárdica. Neste contexto, existem demonstrações inequívocas de que músculos de animais distróficos apresentam déficit na liberação de óxido nítrico em resposta a aumentos da demanda metabólica (LOUFRANI *et al.*, 2002; LOUFRANI *et al.*, 2004). Por outro lado, há também evidências que indicam superprodução de NO pela NOS induzível e de radicais superóxido, caracterizando stress oxidativo (KANAI *et al.*, 2004). Neste caso, o stress oxidativo poderia também contribuir para as lesões dos cardiomiócitos, bem como para proliferação do interstício.

É importante salientar que a intolerância ao estímulo mecânico, como observada nos resultados do presente estudo pode ter como causa além da alteração da capacidade de mecano-transdução, também o stress oxidativo discutido anteriormente.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, avaliamos, pela primeira vez, o estado de fosforilação da Fak nos cardiomiócitos de camundongos MDX. Constatamos que a Fak encontra-se em estado de hiperfosforilação basal no miocárdio de camundongos MDX, provavelmente, em decorrência de uma menor interação entre Fak e SHP2 e menor atividade de tirosina fosfatase da SHP2. Além disso, avaliamos as alterações estruturais do ventrículo esquerdo de camundongos MDX tanto no estado basal como em resposta à sobrecarga pressora ao longo de 25 dias. Concluimos que o ventrículo esquerdo de camundongos MDX apresenta aumento de massa e fibrose quando comparado com camundongos SWISS e também intolerância à sobrecarga pressora, indicada pela dilatação rápida e progressiva do ventrículo esquerdo após a coarctação da aorta. Estudos futuros deverão esclarecer a participação das alterações na sinalização pela Fak-SHP2 na determinação da hipertrofia basal e da intolerância do ventrículo esquerdo de camundongos MDX à sobrecarga pressora.

7. SUMMARY

Mechanisms involved in the transduction of mechanical stimuli into biochemical signals in the myocardium are not fully understood. Experimental evidences suggested an important role of the sarcomeric cytoskeleton and extra-sarcomeric in transduction of mechanical stimuli into biochemical signals in the cardiomyocytes. Presumably, these structures participate in the mechano-biochemical signal transduction through proteins located in the cytoskeleton responsive to tension, induced by mechanical stimuli. Recent data have been suggested that Focal adhesion molecule (Fak) could be a molecule involved in the transduction of the mechanical stimuli.

The aim of the present study is to investigate the activation and expression of Fak in the myocardium of dystrophin-deficient mdx mice (MDX). Western blot studies demonstrated an increase in the Fak basal phosphorylation (approximately 3 times) in the MDX mice submitted to transversal aortic constriction (TAC), when compared to swiss mice not submitted to TAC. On the other hand, it was not observed an increase in the Fak activity in the MDX mice submitted to TAC, but, as expected there were an increase in the Fak activation in the swiss mice after TAC. Immunofluorescence reactions observed in confocal laser microscope studies showed a regular distribution, following a sarcomeric organization. Differently, the immunofluorescence studies revealed that myocardium of the MDX mice submitted to TAC did not followed a sarcomeric organization, but we observed a glustered and periferic Fak distribution. Immunoprecipitated studies with Fak and SHP-2 showed a decreased association with Fak and SHP-2 and a decreased SHP-2 activity in the MDX mice, when compared to swiss mice. It is important to note that the SHP-2 quantities in the MDX or swiss are similar. These results suggested that the increased Fak activity

observed in the myocardium of MDX mice, compared to swiss mice, could be attributed to the decreased SHP-2 activity. According to these data we suggested that the cytoskeleton integrity is important to the maintenance of the decreased Fak activation and sarcomeric distribution. Finally, morphometric studies demonstrated that MDX mice submitted to TAC presented an earlier ventricular dilatation, suggesting cardiac failure. The comparison with cardiac hypertrophy developed in the swiss mice and the precocious ventricular dilatation observed in the MDX mice, suggest the MDX mice inability to respond to mechanical tension.

As a conclusion, we firstly demonstrated the Fak hiperphosphorilation in the MDX myocardium. To this, we attributed the decreased interaction with Fak and SHP-2 and a decreased SHP-2 tyrosine phophatase activity. In addition, we studied the structural alteration in the left ventricle of the MDX mice submitted and not submitted to TAC during 25 days. We demonstrated that MDX left ventricle had more fibroses and mass, when compared to swiss mice, and intolerance to pressure overload, indicated to rapid and progressive dilatation of the left ventricle submitted to TAC. Future studies would demonstrate the role of Fak/SHP-2 signaling in the basal hypertrophy and MDX left ventricle intolerability when submitted to pressure overload.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVERSA P.; RICCI R.; OLIVETTI G. – Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy. *A review. J. Am. Coll. Cardiol.* 7:1140-1149, 1986.

ARBER S.; HUNTER J. J.; ROSS J. JR.; HONGO M.; SANSIG G.; BORG J.; PERRIARD J. C.; CHIEN K. R.; CARONI P. – MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarquitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell.* 88:393-403, 1997.

BACHELOT C.; RAMEH L.; PASSONS T.; CANTLEY L. C. – Association of phosphatidylinositol 3-kinase, via SH2 domains of p85, with focal adhesion kinase in polyoma middle t-transformed fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1311:45-52, 1996.

BARFORD D.; NEEL B. G. – Revealing mechanisms for SH2 domain-mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure.* 6:249-254, 1998.

BLAKE D. J.; WEIR A.; NEWHEY S. E.; DAVIES K. E. *Physiol Rev.* 82:291-329, 2002.

BOGOYEVITCH M. A.; GLENNION P. E.; ANDERSSON M. B.; CLARK A.; LAZON A.; MARSHAL C. J.; DARKER P. J.; SUGDEN P. H. – Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocyte. The potential role of the cascade in the integration of two

signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 269:1110-1119, 1994.

BRUCKSCHLEGEL G.; HOLMER S. R.; JANDELEIT K.; GRIMAL D.; MUDERS F.; KROMER E. P.; RIEGGER G. A.; SCHUNTER H. – Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension.* 25:250-9, 1995.

BURKIN D. Y.; WALLACE G. Q.; NICOL K. J.; KAUFMAN D. J.; KAUFMAN S. J. – Enhanced expression of the $\alpha7\beta1$ -integrins reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *The Journal of Cell Biology.* 152:1207-1218, 2001.

BURRIDGE K.; TURNER C. E.; ROMER L. H. – tyrosine phosphorylation of paxillin and p125-fak accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell. Biol.* 119:893-903, 1992.

BURRIDGE K.; CHRZANOWSKA – Wdnicka M. – Focal adhesions, contractility, and signaling. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 463-519, 1996.

CARY L. A.; HAN D. C.; POLTE T. R.; HANKS S. K.; GUAN J. L. – Identification of p130CAS as mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Cell. Biol.* 140:211-221, 1998.

CHICUREL M. E.; CHEN C. S.; INGBER D. E – Cellular control lies in the balance of forces. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:232-9, 1998.

CHRZANOWSKA-WODNICKA M.; BURRIDGE K. – Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133:1403-15, 1996.

CLARK E. A.; BRUGGE J. S. – Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268:233-39, 1995.

CLARK K. A.; MC ELHINNY A. S.; BECKERLE M. C.; GREGORIO C. C. – Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18:637-706, 2002.

COOPER IV G.; KENT R. L.; UBOH C. E.; THOMPSON E. W.; MARINO T. A. – Hemodynamic versus adrenergic control of cat right ventricular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 75:1403-1414, 1985..

COOPER IV, G. – Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Ann. Rev. Physiol.* 49:501-518, 1987.

CRAIG S. W.; PARDO J. V. – Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at to costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell. Motil. Cell.* 3:449-62, 1992.

DAMSKY C. H.; WERB Z. – Signal transduction by integrin receptor extracellular matrix. Cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4:772-81, 1992.

DANOWSKI B. A.; IMANAKA - YOSHIDA K.; SANGER J. M.; SANGER J, W. – Costameres are sites of force transmission to the substructure in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell. Biol.* 118:1411-1420, 1992.

DECONINCK N.; RAGOT T.; MARECHAL G.; PERRICAUDET M.; GILLER J. M. – Functional protection of dystrophic mouse (MDX) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Medical Sciences*. Vol. 23, pp; 3570-3574, 1996.

DOMINGOS P. P.; FONSECA P. M.; NADRUZ. W. JR.; FRANCHINI K. G. - Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*. 282: H556–H564, 2002.

EBIHARA S.; GIUBINGA G. H.; GILBERT R.; NALBANTOGLU J.; MASSIE B.; KARPATI G.; PETROF B. J. – Differential effects of dystrophin and utrophin gene

transfer in immunocompetent muscular dystrophy (MDX) mice. *Physiological Genomics*. 3:133-144, 2000.

ERVASTI J. M. – Costameres: The Achilles ‘ Hell of Herculan muscle. *J. Biol. Chem.* 278-13591-13594, 2003.

EPSTEIN N. D.; DAVIS J. S. – Sensing stretch is fundamental. *Cell*. 112:147-150, 2003.

FASSATI A.; WELLS D. J.; SERPENTE P. A. S.; WALSH F. S.; BROWN S. C.; STRONG P. N.; DICKSON G. – Genetic correction of dystrophin deficiency and skeletal muscle remodeling in adult MDX mouse via transplantation of retroviral produces cells. *J. Clin. Invest.* VI 100, ni3, 620-628, 1997.

FAULKNER G.; LANFRANCHI G.; VALLE G. – Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle . *IUBMB Life*. 51:275-282, 2001.

FINK C.; ERGÜN S.; KRALISCH D.; REMMERS U.; WEIL J.; ESCHENHAGEN T. – Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *Fareb J.* 14:669-679, 2000.

FONG P. Y.; TURNER P. R.; DENETCLAW W. F.; STEINHARDT R. A. – Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and MDX mouse origin. *Sciences*. 250:673-676, 1990.

FONSECA PM, INOUE RY, KOBARG CB, KOBARGJ, FRANCHINI KG. - Targeting to myosin Heavy Chain C-Terminal May Explain Mechano-Transduction Involving Focal Adhesion Kinase in Cardiac Myocytes. (*Circ res.*) (*submitted*).

FRANCHINI K. G.; TORSONI A. S.; SOARES P. H. A.; SAAD M. J. A. - Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res*. 87: 558-565, 2000.

FRANCHINI K. G.; TORSONI A. S.; SOARES P. H.; SAAD M. J. ^a - Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ. Res*. 87, 558-565, 2000.

FREY N.; OLSON E. N. – Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Ann. Rev. Physiol*. 65: 45-79, 2003.

GERULL B.; GRAMLICH M.; ATHERTON J.; MC NABB M.; TROMBITAS K.; SASSE-KLAASSEN S.; SEIDMAN J. G.; SEIDMAN C.; GRANZIER H.; LABELIT S.; FRENNEAUX M.; THIERFELDER L. - Mutations of TTN. Encoding the giant

muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat. Genet.* 30:201-204, 2002.

GROSSMAN W.; JONES D.; MC LAURIN L. P. – Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* 56:56-64, 1975.

HAGIWARA N.; MSUDA H.; SHODA M.; IRISAWA H. – Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J Physiol.* 456:285-302, 1992.

HALL A. – A Rho GTPase and the actin cytoskeleton. *Sciences.* 279:509-514, 1998.

HANKS S. K.; CALALB M. B.; HARPER M. C.; PATEL S. K. – Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8487-8491, 1992.

HARADA K.; KOMURO I.; SHIOJIMA I.; HAYASHI D.; KUDOH S.; MIZUNO T.; KOJIMA K.; MATSUBARA H.; SUGAYA T.; MURAKAMI K.; YAZAKI Y. – Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensinII type 1^A receptor knockout mice. *Circulation*, 1998.

HILDEBRAND J. D.; SCHALLER M. D.; PARSONS J. T. – Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125 FAK, to cellular focal adhesion. *J. Cell. Biol.* 423:993-1005, 2004.

HEFTI M. A.; HARDER B. A.; EPPENBERGER H. M.; SCHAUB M. C. – Signaling pathways in cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:2873-2892, 1997.

HOSHIJIMA M.; CHIEN K. R. – Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J. Clin. Invest.* 109:849-855, 2002.

HUNTER J. J.; CHIEN K. R. – Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* 341: 1276-1283, 1999.

INGBER D. E. – Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual review of Physiology.* 59:1-575, 1997.

INGBER D. E. – Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science.* 116: 1397-1408, 2003.

IZUMO S.; SADOSHIMA J. – The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 59:551-571, 1997.

JANMEY P. A. – The cytoskeleton and cell signaling component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78:763-781, 1998.

JULIANO R. L.; HASKILL S. – Signal transduction from the extracellular matrix. *J. cell. Biol.* 120:577-85, 1993.

KAMOGAWA Y.; BIRO S.; MAEDA M.; SETOGUCHI M.; HIRAKAWA T.; YOSHIDA H.; TEI C. – Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload *in vivo*. *Cardiovascular Research.* 50509-515, 2001.

KANAI A.; EPPERLY M.; PEARCE L.; BIRDER L.; ZEIDEL M.; MEYERS S.; GREENBERGER J.; GROAT W.; APODACA G.; PETERSON J. – Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286:H13-21, 2004.

KAYE D.; PIMENTAL D.; PRASAD S.; MAKI T.; BERGER H. J.; MC NEIL P. L.; SMITH T. W.; KELLY R. A. – Role of transiently altered sarcolemal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocyte to increased mechanical activity *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 97:281-291, 1996.

KATZ A. M. - The cardiomyopathy of overload: A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 322:100-110, 1990.

KNOLL R.; HOSHIJIMA M.; HOFFMAN H. M.; PERSON V.; LORENZEN_SCHIMIDT I.; BANG M. L.; HAYASHI T.; SHIGA N.; YASUKAWA H.; SCHAPER W.; MC KENNA W.; YOKOYAMA M.; SCHORK N. J.; OMENS J. H.; MC CULLOCH^a D.; KIMURA^a; GREGORIO C. C.; POLLER W.; SCHSPER J.; SCHULTHEISS H. P.; CHIEN K. R. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*. 111:943-955.

KOJIMA M.; SHIOJIMA I.; YAMAZAKI T.; KOMURO I.; ZOU Z.; WANG Y.; MIZUNO T.; UEKI K.; TOBE K.; KADOWAKI T. - AngiotensinII receptor antagonist TCV-116 induces regression of hipertensive left ventricular hypertrophy *in vivo* and inhibits the intracellular signaling pathways of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*. *Circulation*. 89:2204-11, 1994.

LAPIDOS K. A.; KAKKAR R.; MC NELLY E. M. – The dystrophin glycoprotein complex. *Circulation Research*. 94:1023, 2004.

LEVY D.; GARRISON R. J.; SAVAGE D. D.; KANNEL W. B.; CASTELLI W. P. - Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 322:1561-6, 1990.

LORELL B. H.; CARABELLO B. A. – Left ventricular hypertrophy. Patogénesis, detection and prognosis. *Circulation*. 102:470-479, 2000.

LOUFRANI L.; DUBROCA C.; YOU D.; LI Z.; LEVY B.; PAULIN D.; HENRION D.
– Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ. Res.* 91:1183-1189, 2002.

LOUFRANI L.; DUBROCA C.; YOU D.; LI Z.; LEVY B.; PAULIN D.; HENRION D.
Absence of dystrophin in mice reduces NO-dependent vascular function and vascular density total recovery after a treatment with the aminoglycoside gentamicin. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 24:671-676, 2004.

MACHESKY L. M.; HALL A. – Rho: a connection between membrane receptor signaling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 6:304-310, 1996.

MANIOTIS A. J.; CHEN C. S.; INGHER D. E. – Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:849-854, 1997.

MARCHAND E.; CONSTANTIN B.; BALGHI H.; CLAUDEPIENE M-C.;
CANTEREAU A.; MAGAUD C.; MOUZOU A.; RAYMOND G.; BRAUN S.;
COGNARD C. – Improvement of calcium handling and changes in calcium-release

properties after mini-or full-length dystrophin forced expression in cultured skeletal myotubes. *Sciences Direct*. 363-379, 2004.

MARTINS A.J. – Brotamento axonais em camundongos MDX e implicação na terapia gênica da distrofia muscular de Duchenne. 2002.

MATSUDA N.; HAGIWARA N.; SHADA M.; KASAMUKI H.; HOSODA S. – Enhancement of the L-type Ca^{+2} current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocytes. *Circ. Res.* 78:650-9, 1996.

MEGENEY L. A.; KABLAR B.; PERRY R. L. S.; YING C.; MAY L.; RUDNICKI M. A. – Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. *Medical Science*. Vol.96-220-225, 1999.

NEEL B. G.; GU H.; PAO L. – The ‘Shp’ ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends in Biochem Sci.* 28:284-293, 2003.

PARDO J. V.; SICILIANO J. D.; CRAIG S. W. – Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *J. Cell. Biol.* 97:1081-1088, 1983.

PASTORET C.; SEBILLE A. – MDX mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J. Neural. Sci.* 129:97-105, 1995.

PYLE W. G.; SOLARO R. J. – At the crossroads of myocardial signaling. The role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ. Res.* 94:296-305, 2004.

PONS F.; ROBERT A.; FABBRIZIO E. – Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart. *Circulation.* 90:369-374, 1994.

RANDO T. A.; DIRATNIK M. H.; ZHOU L. Z. H. – Rescue of dystrophin expression in MDX mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Genetics.* Vol. 97, 5363-53-68, 2000.

ROSS R. S.; BORG T. K. – Integrins and the myocardium. *Circ. Res.* 88:1112-1119, 2001.

RUWHOF C.; VAN DER LAARCE A. – Mechanical stress – induced cardiac hypertrophy: Mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular Research.* 47:23-37, 2000.

SADOSHIMA J.; TAKAHASHI T.; JOHN L.; IZUMO S. – Roles of mechanosensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate early

gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:9905-9, 1992.

SASAKI N.; MITSUIYE T.; NOMA A. – Effects of mechanical stretch on membrane currents of single ventricular myocytes of guinea-pig heart. *Jpn. J. Physiol.* 42:957-70, 1992.

SASAKI N.; MITSUIYE T.; WANG Z.; NOMA A. – Increase of the delayed rectifies KC and Na(C)- KC pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. *Circ. Res.* 75:887-95, 1994.

SCHAUB M. C.; HEFTI M. A.; HARDER B. A.; EPPENBERGER H. M. – Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J. Mol. Med.* 75:901-920, 1997.

SCHLAEPFER D. D.; HANKS S.; HUNTER T.; VAN DER GEER P. – Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 372:786-791, 1994.

SCHALLER M. D.; BORGMAN C. A.; COBB B. S.; VINES R. R.; REYNOLDS A B.; PARSONS J. T. – pp125 FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:5192-5196, 1992.

SCHALLER M. D.; HILDEBRAND J. D.; SHANNON J. D.; FOX J. W.; VINES R. R.; PARSONS J. T. – Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, p-125-Fak, directs SH2-dependent binding of pp60-Src. *Mol. Cell. Biol.* 14:1688-1688, 1994.

SCHALLER M. D.; OTEY C. A.; HILDEBRAND J. D.; PARSONS J. T. – Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains. *J. Cell. Biol.* 130:1181-1187, 1995.

SCHAPER J.; FROEDE R.; HEIN S.; BUCK A.; HASHISUME H.; SPEISER B.; FRIELDL A.; BLEESE N. – Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 83:504-514, 1991.

SCOPACASA B. S.; TEIXEIRA O. P.; FRANCHINI K. G. – Colchicine attenuates left ventricular hypertrophy but preserves cardiac function of aortic-constricted rats. *J. Appl. Physiol.* 94:1627-1633, 2003.

SIMPSON P. C.; LONG C. S.; WASPE L. E.; HENRICH C. J.; ORDAHL C. P. – Transcription of early developmental isogenes in cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21:179-89, 1989.

STREET S. F. – Lateral transmission of tension in frog myofibers: a myofibrillar network and transverse cytoskeleton connections are possible transmitters. *J. Cell. Physiol.* 114:346-64, 1983.

STUPKA N.; GREGOREVIC P.; PLANT D. R.; LYNCH G. S. – The calcineurin signal transduction pathway is essential for successful muscle regeneration in MDX dystrophic mice. *Acta neuropathologica*. 299-310, 2004.

SUSSMAN M. A.; MC CULLOCH A.; BORG T. K. – Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 91:888-898, 2002.

TEIGER E.; THAN V. D.; RICHARD L *et al.* – Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin. Invest.* 97:2891-2897, 1996.

TERRACIO L.; RUBIN K.; GULLBERG D.; BALOG E.; CARNER W.; JYRING R.; BORG T. K. – Expression of collagen-binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ. Res.* 68:734-744, 1991.

TIDBALL J. G.; ALBRECHT D. E.; LOKENSGARD B. E.; SPENCER M. J. – Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J. Cell. Sci.* 108:2197-2204, 1995.

TORSONI A. S.; FONSECA P. M.; CROSARA-ALBERTO D. P.; FRANCHINI. K. G. – EARLY ACTIVATION OF P160 ROCK BY PRESSURE OVERLOAD IN RAT HEART. *AM. J. PHYSIOL. CELL. PHYSIOL.* 284:C1411-C1419, 2003.

VAN WAGONER D. R. – MECHANOSENSITIVE GATING OF ATUAL ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS. *CIRC. RES.* 72:973-83, 1993.

VATTA M.; MOHAPATRA B.; JIMENEZ S.; SÁNCHEZ X.; FAULKNER G.; OERLES Z.; CÍNGARA G.; LIN J. H.; VU T. M.; ZHOU Q.; BOWLES K. R.; DI LENARDA A.; SCHIMMENTI L.; FOX M.; CHRISCO M. A.; MURPHY R. T.; MCKENNA W.; ELLIOTT P.; BOWLES N. E.; CHEN J.; VALLE G.; TOWBIN J. A. – MUTATIONS IN CYPHER/ZASP IN PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY AND LEFT VENTRICULAR NON-COMPACTION. *J. AM. COLL. CARDIOL.* 42:2014-2027, 2003.

VILQUIN J. T.; BRUSSEC V.; ASSELIN I.; KINOSHITA I, GINGRAS M.; TREMBLAY J. P. – Evidence of MDX mouse skeletal muscle fragility *in vivo* by eccentric running exercise. *Muscle Nerve.* 21:567-576, 1998.

XENOPHONTOS X. P.; GORDON E. E.; MORGAN H. E. – Effect of intraventricular pressure on protein synthesis in anesthetized rat hearts. *Am. J. Physiol.* 251:C95-C98, 1986.

WANG H-B.; DEMBO M.; HANKS S. K.; WANG Y-L. – Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc. Natl. Sci. USA.* 98:11295-11300, 2001.

WILLIAMS M. W.; BLOCH R. J. – Differential distribution of dystrophin and β -spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 20:383-393, 1999.