MAURÍCIO MARSON LOPES

Expressão da quinase de adesão focal e correlação com fibrose no miocárdio humano exposto a sobrecarga volumétrica por insuficiência da válvula mitral

CAMPINAS

2006

i

MAURÍCIO MARSON LOPES

Expressão da quinase de adesão focal e correlação com fibrose no miocárdio humano exposto a sobrecarga volumétrica por insuficiência da válvula mitral

Tese de Doutorado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Medicina Experimental.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2006

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

Lopes, Maurício Marson

 Expressão da quinase de adesão focal e correlação com fibrose no miocárdio humano exposto a sobrecarga volumétrica por insuficiência da válvula mitral / Maurício Marson Lopes. Campinas, SP : [s.n.], 2006.
 Orientador : Kleber Gomes Franchini
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

 Insuficiência da valva mitral. 2. Insuficiência cardíaca. 3.

 Remodelação ventricular. 4. Valva mitral. 5. Miocárdio – Ultraestrutura. 6. Disfunção ventricular. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles : "Expression of focal adhesion kinase is increased and correlates with fibrosis in failing human myocardium"

Keywords: • Mitral valve insuficiency

- Heart failure
- Ventricular remodeling
- · Valve mitral
- Myocardium ultrastructure
- Ventricular dysfunction

Área de concentração : Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Prof Dr Kleber Gomes Franchini Prof Dr José Antonio Franchini Ramires Prof Dr Luis Alberto Oliveira Dallan Prof Dr Otávio Rizzi Coelho

Prof Dr José Francisco Kerr Saraiva

Data da defesa: 24-02-2006

Orientador(a): Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

- 1- Prof. Dr. José Antonio Franchini Ramires
- 2- Prof. Dr. Luis Alberto Oliveira Dallan
- 3- Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho
- 4- Prof. Dr. José Francisco Kerr Saraiva
- 5- Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 24/02/2006

Eu te nomeei rainha. Existem mais altas que tu, mais altas. Mais puras do que tu, mais puras. Mais belas do que tu, mais belas.

Mas tu és a rainha.

Quando vais pelas ruas ninguém te reconhece. Ninguém vê a coroa de cristal, ninguém vê o tapete de ouro vermelho que pisas por onde passas, o tapete que não existe.

E apenas apareces cantam todos os rios em meu corpo, as campanas estremecem o céu, e um hino enche o mundo.

Somente tu e eu, somente tu e eu, amor meu, o escutamos.

> Pablo Neruda De "Los versos del Capitán"

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, mulher e companheira, Rejane, presente em minha vida nos momentos decisivos: a firmeza e correção de que precisamos na vida. "Pensei, então, que plantar uma árvore é um anúncio de esperança. Especialmente se for uma árvore de crescimento lento. E isso porque, sendo lento o seu crescimento, eu a plantarei sabendo que nem vou comer dos seus frutos, nem vou me assentar à sua sombra.... Eu a plantarei pensando naqueles que comerão dos seus frutos e se assentarão à sua sombra. E isso bastará para me trazer felicidade!"

Rubem Alves

em "Por uma educação romântica"

Aos meus três filhos, trigêmeos, Beatriz, João Pedro e Henrique.

Obrigado por existirem.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e José Maurício, que me proporcionaram o milagre de viver.

À minha irmã Cristiane, por compartilharmos os momentos em que nos preparávamos para a "vida".

Ao meu avô Romualdo (in memoriam), pelo amor sincero e ensinamentos.

Aos tios Zé e Lena, que me acolheram como filho quando distante de casa.

Ao meu sogro, Toninho, e minha sogra, Janete, pelo apoio incondicional sempre presente.

Aos professores de minha graduação, em especial das disciplinas de fisiologia e cardiologia, Prof. Ronaldo Mourão Gontijo, Prof. Gabriel Junqueira e Prof. Carlos Henrique Vianna de Andrade, pela inestimável competência e carinho.

Aos meus colegas de faculdade, pela amizade e alegria que compartilhamos até hoje.

Aos meus mestres e amigos, Dr. José Pedro da Silva e Dr.José Henrique Andrade Vila, pelo papel decisivo na formação profissional que recebi, e pelas oportunidades concedidas.

Aos meus colegas de trabalho, Gustavo, Eloy, Fernando, Ana Paula, Gabriela, Rejane, Gisele, Luciano, por enfrentarem conjuntamente os desafios do dia a dia, e tornarem esse trabalho possível pela participação direta nas cirurgias realizadas.

A todos os colegas cardiologistas, que confiando em nosso trabalho, nos encaminham seus pacientes para as cirurgias.

xi

Ao Prof. Dr. Vicente P A Teixeira e Dra. Ana Carolina G Faleiros, pela imensa contribuição na avaliação anátomo-patológica.

Ao Dr. Aniel Chaves, pela realização dos exames ecocardiográficos com envolvimento científico e correção técnica.

Aos Hospitais Samaritano de Campinas e Irmãos Penteado, por permitirem que o trabalho diário se tornasse pesquisa.

Às secretárias Carla, Márcia e Teresa, pela dedicação, responsabilidade e paciência.

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de cursar esta pós- graduação.

Às Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes e Dra Sara Teresinha Olalla Saad, e ao Dr. Wilson Nadruz Jr., pela contribuição prestada na banca de qualificação.

À Dra. Maéve de Barros, pela ajuda na árdua tarefa de expressar o português de forma correta.

À minha mãe, Maria de Lourdes, professora de português de todas as horas, pelos ensinamentos da língua e correção do texto.

Aos técnicos, biólogos e químicos do laboratório de fisiologia cardiovascular, pelo empenho, dedicação e estrema qualificação profissional.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela orientação, no sentido mais amplo que possa ser entendida. Compartilhar conhecimentos de maneira simples e amiga é obra de grande mestre.

xiii

"Vale mais a pena ver uma coisa sempre pela primeira vez que conhecê-la. Porque conhecer é como nunca ter visto pela primeira vez..." As crianças nos fazem ver "a eterna novidade do mundo..."

Fernando Pessoa

PÁG.

| RESUMO | xxix |
|---|------|
| ABSTRACT | xxxv |
| 1-INTRODUÇÃO | 41 |
| 1.1- Insuficiência mitral | 45 |
| 1.2- Resposta à sobrecarga e transição para disfunção cardíaca | 50 |
| 1.3- Mecanutransdução em cardiomiócitos | 53 |
| 2- OBJETIVOS | 57 |
| 3- CASUÍSTICA E MÉTODOS | 61 |
| 3.1- Casuística | 63 |
| 3.2- Protocolo do estudo | 63 |
| 3.2.1- Avaliação clínica | 64 |
| 3.2.2- Avaliação ecocardiográfica | 64 |
| 3.2.3- Procedimento cirúrgico | 65 |
| 3.2.4- Biópsia endocárdica | 66 |
| 3.3- Reagentes | 67 |
| 3.4- Análise de proteínas pelo Immunoblotting | 67 |
| 3.5- Microscopia eletrônica de transmissão | 68 |
| 3.6- Análise de proteínas em imuno-histoquímica | 69 |
| 3.7- Quantificação do colágeno fibrilar e tecido imunologicamente | |
| marcado | 71 |
| 3.8- Análise estatística | 71 |

| 4- RESULTADOS | 73 |
|---|-----|
| 4.1- Dados clínicos e ecocardiográficos | 75 |
| 4.1.1- Evolução clínica | 75 |
| 4.1.2- Evolução dosparâmetros doppler-ecocardiográficos | 78 |
| Átrio esquerdo | 78 |
| Diâmetros diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo | 79 |
| Fração de ejeção do ventrículo esquerdo | 82 |
| Índice de massa do ventrículo esquerdo | 84 |
| Espessura relativa do ventrículo esquerdo | 86 |
| Pressão sistólica da artéria pulmonar | 87 |
| 4.2- Análise estrutural do miocárdio | 90 |
| 4.2.1- Alterações histológicas | 90 |
| 4.2.2- Expressão da quinase de adesão focal no miocárdio de pacientes | |
| com insuficiência mitral | 93 |
| 4.2.3- Análise imuno-histoquímica do miocárdio | 94 |
| 5- DISCUSSÃO | 97 |
| 6- CONCLUSÕES | 111 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 115 |
| 8- ANEXOS | 131 |

| [¹²⁵ I] | Isótopo de iodo 125 |
|---------------------|---|
| AE | átrio esquerdo |
| AKT | tirosina AKT |
| CF | classe funcional de insuficiência cardíaca pela New York Heart Association |
| DDVE | diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo |
| DSVE | diâmetro sistólico final do vetrículo esquerdo |
| EM | estenose mitral |
| ER | espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo |
| FAK | quinase de adesão focal |
| FEVE | fração de ejeção do ventrículo esquerdo |
| GPCR | receptores acoplados à proteína G |
| HP | hipertensão arterial pulmonar |
| IC | insuficiência cardíaca |
| IM | insuficiência mitral |
| p-FAK | quinase de adesão focal fosforilada |
| PSAP | pressão sistólica da artéria pulmonar |
| Src | proteína originalmente definida como produto do sarcoma de Roux |
| Tyr397 | resíduo tirosina 397 da quinase de adesão focal |
| TNFβ | fator de necrose tumoral β |
| VD | ventrículo direito |
| VE | ventrículo esquerdo |

| D A | $\mathbf{\Lambda}$ |
|-----|--------------------|
| PA | 1- |
| IA | · /. |
| | |

| Tabela 1- | População estudada e características do ato cirúrgico | 66 |
|------------|--|----|
| Tabela 2- | Distribuição dos pacientes por classe funcional ao longo do seguimento | 75 |
| Tabela 3- | Persistência pós-operatória dos sintomas de insuficiência cardíaca conforme a classe funcional (<i>NYHA</i>) pré-peratória | 76 |
| Tabela 4- | Evolução dos diâmetros do átrio esquerdo | 78 |
| Tabela 5- | Evolução do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo | 80 |
| Tabela 6- | Evolução do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo | 81 |
| Tabela 7- | Evolução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo | 83 |
| Tabela 8- | Persistência da fração de ejeção do ventrículo esquerdo abaixo de 60% em comparação à do pré-peratório | 83 |
| Tabela 9- | Evolução do índice de massa do ventrículo esquerdo | 85 |
| Tabela 10- | Evolução da espessura relativa do ventrículo esquerdo | 86 |
| Tabela 11- | Evolução da pressão sistólica da artéria pulmonar | 89 |
| Tabela 12- | Persistência da PSAP > 30mmHg em comparação aos níveis pré-operatórios | 90 |

PÁG.

| Figura 1- | Esquema representativo da estrutura linear da FAK, mostrando | |
|------------|--|----|
| | seus domínios, sítios de fosforilação em tirosina e seqüência | |
| | ricas em prolina (PR1 e PR2) | 54 |
| Figura 2- | Abordagem da valva mitral e acesso ao ventrículo esquerdo para | |
| | biópsia subendocárdica | 67 |
| Figura 3- | Evolução da classe funcional ao longo do tempo de seguimento. | 77 |
| Figura 4- | Curva de sobrevivência livre de eventos (Kaplan-Meier) | 77 |
| Figura 5- | Evolução do diâmetro do átrio esquerdo | 79 |
| Figura 6- | Evolução do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo | 81 |
| Figura 7- | Evolução do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo | 82 |
| Figura 8- | Evolução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo | 84 |
| Figura 9- | Evolução do índice de massa do ventrículo esquerdo | 85 |
| Figura 10- | Evolução da espessura relativa do ventrículo esquerdo | 87 |
| Figura 11- | Correlação da pressão sistólica da artéria pulmonar com | |
| | diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo | 88 |
| Figura 12- | Evolução da pressão sistólica da artéria pulmonar | 89 |
| Figura 13- | Histologia do miocárdio de pacientes com insuficiência mitral | 91 |
| Figura 14- | Densidade do colágeno no miocárdio dos pacientes | 92 |
| Figura 15- | Microscopia eletrônica do miocárdio de pacientes com | |
| | insuficiência mitral | 93 |

| Figura 16- | Expressão da FAK e pFAK no miocárdio de pacientes com | |
|------------|---|----|
| | insuficiência mitral e estenose mitral | 94 |
| Figura 17- | Imuno-histoquímica do miocárdio de pacientes com estenose mitral e com insuficiência mitral | 95 |
| Figura 18- | A- Correlação entre a área ocupada por colágeno e a marcação com anticorpos anti-FAK B- Correlação entre a marcação com anticorpos anti-FAK e a marcação com anticorpos | |
| | anti-Vimentina | 96 |

RESUMO

A insuficiência cardíaca é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Esforços têm sido feitos para a obtenção do entendimento dos mecanismos que resultam no comprometimento funcional e estrutural do miocárdio, responsáveis, em última instância, pela síndrome clínica.

Doenças das válvulas constituem importante contingente dentre as causas de disfunção miocárdica que resulta insuficiência cardíaca. Tipicamente, as doenças das válvulas resultam em sobrecargas mecânicas das câmaras ventriculares que têm papel central no estabelecimento e evolução das alterações estruturais que acompanham a deterioração funcional do miocárdio e, por conseguinte, a da função global das câmaras cardíacas. É fato bem estabelecido na prática clínica a estreita relação entre a presença e a intensidade de comprometimento da função das câmaras ventriculares e o prognóstico clínico ou cirúrgico dos pacientes. Portanto, o esclarecimento dos mecanismos moleculares e celulares que resultam em alterações estruturais irreversíveis, bem como o estabelecimento de indicadores clínico-laboratoriais de alterações precoces é área de grande interesse prático.

No presente estudo foram avaliados pacientes portadores de insuficiência mitral com indicação clínica de tratamento cirúrgico, com o objetivo de avaliar alterações estruturais do miocárdio e sua relação com a função ventricular e a expressão e atividade da quinase de adesão focal, uma tirosino-quinase envolvida em mecanismos de sinalização de estímulos mecânicos.

Pacientes com insuficiência mitral (21) foram avaliados clinica e ecocardiograficamente no período pré-operatório e em seguimento de um ano após a cirurgia. Foram realizadas biópsias intra-operatórias do ventrículo esquerdo para análise histo-morfométrica e bioquímica da expressão e atividade da quinase de adesão focal e quantificação da área ocupada pelo interstício miocárdico.

A maioria dos pacientes apresentava sintomas importantes de insuficiência cardíaca (classe funcional III-IV) no pré-operatório de cirurgia para correção da insuficiência mitral. A média da fração de ejeção e a do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo encontravam-se dentro da faixa de normalidade. Havia sinais de remodelamento excêntrico

do ventrículo esquerdo e aumento dos níveis médios de pressão sistólica da artéria pulmonar.

Esses pacientes foram acompanhados por 12 meses após a cirurgia valvar mitral, com avaliações clínicas e ecocardiográficas a cada três meses.

Foram verificadas reduções significativas no número e intensidade dos sintomas no período de seguimento pós-operatório. Houve também alteração das características ecocardiográficas indicativas de redução da intensidade do remodelamento no período de seguimento pós-operatório. Foi detectada correlação negativa entre a pressão da artéria pulmonar e o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo no período pré-operatório. Constatou-se redução significativa da pressão da artéria pulmonar no seguimento pós-operatório.

A análise histo-morfométrica das amostras de biópsias subendocárdicas dos pacientes com insuficiência mitral revelou intensa degeneração do miocárdio, com sinais de degeneração e fibrose intersticial. Houve correlação negativa entre a intensidade da fibrose e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo no pré-operatório.

Detectou-se aumento na expressão da quinase de adesão focal (FAK) em amostras de biópsias de ventrículo esquerdo de pacientes com insuficiência mitral, em comparação com a expressão no miocárdio de pacientes com estenose mitral (grupo de seis pacientes submetidos a biópsia intra-operatória). Além de aumento na expressão, também verificamos aumento na fosforilação em tirosina da FAK com anticorpo fosfo-específico para a tirosina 397, indicativo de aumento da atividade da enzima. Na análise quantitativa de amostras preparadas através de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-FAK e anti-vimentina (marcador de fibroblasto) verificamos aumento da marcação com anticorpo anti-FAK nas células intersticiais e também nos cardiomiócitos de amostras de pacientes com insuficiência mitral.

Os novos achados do presente estudo são: 1) correlação negativa entre o nível da pressão da artéria pulmonar e do diâmetro do ventrículo esquerdo; 2) correlação entre a intensidade da fibrose e a disfunção ventricular esquerda e 3) aumento da atividade da quinase de adesão

focal, correlacionado à intensidade da fibrose intersticial em pacientes com insuficiência mitral com indicação cirúrgica. Estes achados permitem-nos concluir que a elevação precoce da pressão na artéria pulmonar pode constituir-se em marcador clínico de valor para indicação precoce de cirurgia em portadores de insuficiência mitral na ausência de intenso remodelamento excêntrico do ventrículo esquerdo. Por outro lado, a correlação estreita entre a área do interstício subendocárdico e a disfunção ventricular sugere que a avaliação da intensidade da fibrose no ato operatório pode ser um bom marcador de prognóstico. Finalmente, o aumento da atividade da FAK, principalmente no interstício, sugere que esta enzima e suas vias de sinalização intracelular podem contribuir para a gênese da fibrose intersticial. Este resultado aponta para a possibilidade de que modalidades terapêuticas específicas para FAK possam ter papel no tratamento pós-operatório de pacientes com insuficiência mitral e cardíaca.

ABSTRACT

Heart failure is one of the biggest problems faced by public health. Efforts have been made in order to achieve full understanding of the mechanisms that result in the myocardium structural and functional deterioration, which is responsible for advanced symptoms.

Valvular diseases are important causes of myocardium dysfunction, which result in heart failure. Typically, valvular diseases result in mechanic overload of the ventricular chambers, which play a central role in the setting up and evolution of the structural alterations that follow myocardium functional deterioration and, consequently, the global dysfunction of the cardiac chambers.

The close relation between the ventricular dysfunction and the clinical or surgical prognosis of the patient is well documented in clinical practice. Therefore, the understanding of the cellular and molecular mechanisms that result in the irreversible structural alterations, as well as the setting up of clinical-laboratorial indicators of early alterations is an area of great practical interest.

In the present study patients presenting mitral valve disease with clinic indication for surgical treatment, aiming at evaluating structural alterations of the myocardium and their relations to the ventricular function, and the expression and activity of focal adhesion kinase, a tyrosine-kinase involved in mechanisms of mechanic stimulus signalization.

Patients suffering from mitral regurgitation (21) were evaluated by clinical exams and echocardiography in the pre-operative period and underwent clinical and echocardiograph exams for a period of one year after surgery. Intra-operative biopsies of the left ventricle were performed in order to carry out histomorphometric and biochemical analyses of the expression and activity of focal adhesion kinase and quantification of the area occupied by the myocardium interstice.

The majority of the patients presented advanced symptoms of heart failure (CF III-IV) in the pre-operative for the for mitral failure correction. The average ejection fraction and the left ventricle end systolic volume were found within normality range. There were signs of eccentric remodeling of the left ventricle and increase in the mean levels of systolic pressure of the pulmonary artery. There was a follow up of these patients during three months after mitral valve surgery with clinical and echocardiograph assessments every three months.

Significant reductions of symptoms in number and intensity in the post-operative outcome were verified. There was negative correlation between the pressure of the pulmonary artery and the left ventricle final diastolic diameter the pre-operative period. There was significant decrease in the pressure of the pulmonary artery in the post-operative period.

The histomorphometric analysis of subendocardial biopsy samples originated from patients with mitral disease showed intense myocardium degeneration, with signs of degeneration and interstitial scar tissue. There was negative correlation between the intensity of the scar tissue and the ejection fraction of the left ventricle in pre-operative.

There was increase in the expression of focal adhesion kinase (FAK) in samples of left ventricle biopsies coming from patients with mitral regurgitation in comparison to myocardium expression of patients presenting mitral stenosis (group of six patients submitted to intra-operative biopsy). Besides the increase in expression, there was also increase in tyrosine phosphorylation from FAK with phosphor-specific antibody for tyrosine 397, which indicates increase in the enzymatic activity. The quantitative analysis of samples through imunohistochemistry with anti-FAK antibodies and anti-vimentine (fibroblast marker) showed increase in the marking of interstitial cells with anti-FAK antibody and also in the samples of cardiomyocytes from patients with mitral regurgitation.

The new findings of this study are: 1) negative correlation between the level of the pulmonary artery and the left ventricle diameter; 2) correlation between the scar tissue intensity and the left ventricle dysfunction and 3) increase of the focal adhesion kinase (FAK) activity correlated to the interstitial scar tissue intensity in patients with mitral regurgitation having surgical indication. These findings lead to the conclusion that the early increase of pressure in the pulmonary artery may be a valuable clinical marker to indicate precocious surgery in carriers of mitral disease when there is lack of intense eccentric remodeling of the left ventricle. On the other hand, the close correlation between the subendocardial interstitial area and the ventricular dysfunction suggest that the assessment of the scar tissue intensity during the open heart surgery act may be a good

prognostic marker. Finally, the increase in the FAK activity, mainly interstitial, suggests that this enzyme and its intracellular signalizing pathway may contribute to interstitial scar tissue genesis. This result points at the possibility that specific therapeutics conditions for FAK can play a role in the post-operative treatment of patients presenting mitral disease and heart failure.

1- INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca passou historicamente por várias definições conforme o enfoque fisiopatológico e conhecimento científico prevalente.

Atualmente, os conhecimentos dos mecanismos fisiopatológicos, ativação neuro-humoral, e do processo de remodelamento cardíaco ampliaram os conceitos envolvidos na definição dessa síndrome. Poderíamos defini-la, até para fins do que exporemos no decorrer desse trabalho, como uma "síndrome clínica complexa de evolução progressiva causada por doenças primárias ou secundárias do coração, responsáveis por alterações funcionais e estruturais das câmaras que resultam em redução absoluta ou relativa do débito cardíaco e aumento da pressão venosa sistêmica ou pulmonar durante o esforço físico ou repouso" (Cohn J).

A insuficiência cardíaca tornou-se uma pandemia, requerendo enormes esforços científicos e somas significativas de recursos financeiros com intuito de melhor compreender sua fisiopatogenia, assim como progredir em termos terapêuticos. O resultado desse empenho deve refletir em melhora da qualidade e expectativa de vida dos pacientes.

Estimam-se 23 milhões de pessoas, em todo o mundo, vivendo com insuficiência cardíaca (CLELAND JG et al, 2001), aproximadamente cinco milhões nos EUA, com aparecimento de 550.000 casos novos diagnosticados ao ano (*American Heart Association: 2001 Heart and Stroke Statistical Update, 2001*). Nota-se um aumento progressivo na incidência da insuficiência cardíaca com a idade, aproximadamente dobrando a cada década de vida (COWIE MR et al, 1997; HO KK et al, 1993; WILHELMSEN L et al, 2001).. A maior expectativa de vida atual torna estes números extremamente preocupantes para o sistema de saúde pública (HOES AW et al, 1998).

Os fatores etiológicos envolvidos no aparecimento de disfunção miocárdica e, conseqüentemente, insuficiência cardíaca, são inúmeros. A doença cardíaca isquêmica assim como sua associação à hipertensão arterial sistêmica são responsáveis pela grande maioria dos casos de disfunção ventricular esquerda, coexistindo em aproximadamente 40% dos pacientes portadores de insuficiência cardíaca (HO KK et al, 1993; WILHELMSEN L et al, 2001). Nos estudos clínicos randomizados envolvendo terapêutica para insuficiência cardíaca, a maior parte dos pacientes selecionados são portadores de

doença cardíaca isquêmica, representando aproximadamente 68% dos casos (GHEORGUIADE & BONOW, 1998).

A terapêutica envolvida no controle clínico e a abordagem de fatores de risco como hipertensão arterial sistêmica e doença cardíaca isquêmica sofreram enormes avanços nas últimas décadas, onde inúmeros estudos clínicos demonstraram resultados favoráveis na sobrevivência e melhora sintomatológica, apesar de ainda se observarem níveis elevados de mortalidade (GARG R et al, 1995).

A abordagem terapêutica de fatores relacionados à insuficiência cardíaca, como hipertensão arterial sistêmica, dislipdemia, diabetes mellitus, pode promover redução no aparecimento de novos casos de insuficiência cardíaca e tem sido enfatizada nas últimas diretrizes sobre o assunto (HUNT AS et al, 2005). Para este enfoque é necessário um melhor entendimento do processo adaptativo do miocárdio, assim como sua transição para a desadaptação, com o objetivo de intervir com a precocidade necessária, interrompendo a progressão para disfunções avançadas e irreversíveis.

As doenças das válvulas cardíacas, neste entendimento, ganham enfoque especial, uma vez que acarretam sobrecarga pressora e ou volumétrica das câmaras, podendo levar à disfunção ventricular, causando, aproximadamente, 7 a 8% dos casos de insuficiência cardíaca (HO KK et al, 1993). A estenose aórtica calcificada desponta como fator etiológico importante de insuficiência cardíaca na população idosa (RAHIMTOOLA SH et al, 1987). Da mesma forma, a degeneração mixomatosa com prolapso da válvula mitral representa mais de 85% dos casos de insuficiência mitral pura (LING, H et al., 1996)

O momento adequado para indicar terapêutica cirúrgica, com vistas à interrupção do processo de desadaptação ventricular e hemodinâmica é motivo de discussão, principalmente no que concerne à identificação de preditores precisos de evolução desfavorável ou deterioração incipiente da função miocárdica.

1.1- Insuficiência mitral

A doença da válvula mitral é diagnosticada em aproximadamente 500.000 pacientes anualmente nos Estados Unidos da América do Norte, com a realização de 18.000 cirurgias para sua abordagem ao ano (OWINGS MF et al., 1999).

Analisando séries cirúrgicas, pode-se observar que a etiologia mais freqüente de insuficiência mitral é o prolapso da válvula com degeneração mixomatosa, seguida da arterial coronária endocardite infecciosa doença reumática. doença e (OLSON LJ et al., 1987).

O presente estudo releva os aspectos envolvidos na fisiopatologia da insuficiência mitral orgânica, desconsiderando, portanto, a de etiologia isquêmica ou secundária ao remodelamento ventricular na cardiomiopatia dilatada.

Fisiopatologia da insuficiência mitral

As doenças das válvulas causam sobrecarga das câmaras cardíacas: de pressão, como na estenose aórtica; de volume, como na insuficiência mitral e mesmo mista, como se observa na insuficiência aórtica.

Com a sobrecarga, haverá alterações de tamanho e geometria das câmaras, assim como da espessura das paredes ventriculares, visando à adaptação.

A insuficiência mitral caracteriza-se por promover sobrecarga de volume do ventrículo esquerdo em consequência do refluxo de sangue através da válvula durante a sístole ventricular para o interior do átrio esquerdo.

A pressão intra-atrial esquerda, inicialmente, eleva-se em decorrência do refluxo valvular. Esta cavidade passará por alterações, ocasionando aumento de sua dimensão e complacência, acomodando maior volume, sem grandes modificações da pressão em seu interior. A maior complacência da cavidade atrial esquerda relaciona-se a

uma menor transmissão da pressão para o território pulmonar e menos dispnéia (BRAUNWALD & AVE, 1963).

A magnitude do refluxo mitral depende da área do orifício regurgitante e da velocidade de fluxo que, por sua vez, é dependente do gradiente de pressão sistólico entre o ventrículo e átrio esquerdos.

O refluxo ocorre preferencialmente no período ejetivo da sístole ventricular, porém a elevação da pressão intra-ventricular durante o início da contração isovolumétrica promoverá refluxo através do orifício mitral, já alterando o volume no interior do ventrículo esquerdo.

Presente a insuficiência mitral, o ventrículo esquerdo sofrerá alterações estruturais. Os sarcômeros aumentarão em série caracterizando a hipertrofia excêntrica que, em última análise, permitirá acomodar um maior volume no final da diástole, preservando o volume sistólico e, conseqüentemente, o débito cardíaco (revisado por CARABELLO BA, 2003).

O processo adaptativo estará sob influência da alteração de carga presente pela ejeção de parte do volume sistólico para o interior do átrio esquerdo. A baixa impedância à ejeção dessa câmara promove redução da pós-carga do ventrículo esquerdo, resultando em aparente melhora do seu desempenho sistólico. (CORIN WJ et al., 1987).

O estresse sistólico da parede do ventrículo esquerdo permanecerá normal como conseqüência dessa menor pós-carga. Na progressão da doença, ocorrerá dilatação da cavidade ventricular, podendo estabelecer-se disfunção miocárdica. Nesta fase, a exacerbação da atividade neuro-humoral promoverá aumento da resistência vascular periférica que, em conjunto à dilatação da cavidade, elevará o estresse sistólico da parede do ventrículo esquerdo (CORIN WJ et al., 1987).

Como visto, a redução da pós-carga manterá os índices de função sistólica do ventrículo esquerdo preservados até o aparecimento de graus mais avançados de disfunção contrátil. A fração de ejeção, portanto, poder-se-á manter dentro da variação de normalidade, mesmo na presença de algum grau de comprometimento da contratilidade.

Isto refletirá diretamente no prognóstico pós-operatório, no qual se evidencia evolução desfavorável dos pacientes com níveis ainda razoáveis, 50 a 60%, de fração de ejeção. (CARABELLO BA et al., 1986; CARABELLO BA et al, 1981; SCHULER G et al., 1979).

Estabelecida a disfunção ventricular, observar-se-á progressão dos sintomas de insuficiência cardíaca tornando o prognóstico desfavorável para esses pacientes (ENRIQUEZ-SARANO et al., 1995).

Evidencia-se nesta fase, um declínio da fração de ejeção, diminuição do volume sistólico e aumento dos diâmetros diastólicos e sistólicos finais.

A resposta hipertrófica nesta fase não ocorrerá de forma adequada a compensar a elevação do estresse da parede ventricular, devido à incapacidade funcional do miócito. Não ocorrendo a compensação do aumento do estresse pela maior espessura da parede ventricular como proposto por GROSSMAN e colaboradores (1975), teremos uma cavidade ventricular dilatada, com espessura da parede diminuída e estresse sistólico aumentado.

Concomitante à exacerbação da atividade neuro-humoral (SUTTON TM et al., 2003; MEHTA RH et al., 2003) ocorrerá aumento dos níveis de citoquinas inflamatórias (ORAL H et al., 2003), que influenciarão na progressão do dano miocárdico.

Modelos experimentais foram criados em animais com o objetivo de extrair informações a respeito dos mecanismos adaptativos, celulares e hemodinâmicos, envolvidos na insuficiência mitral (CARABELLO et al.,1989; ISHIHARA et al.,1992; SPINALE et al.,1993; HENNEIN HA et al., 1993). Muito do conhecimento atual deriva desses estudos. Porém, o aparecimento, via de regra, agudo do refluxo mitral limita a sobrevivência dos animais e, por conseguinte, não reproduz exatamente a história natural da adaptação ventricular à sobrecarga de volume na insuficiência mitral.

A idéia de extrair informações mais próximas da realidade motivou esta pesquisa em humanos, afim de entender alguns aspectos adaptativos e suas conseqüências.

Fatores prognósticos na insuficiência mitral - impacto na decisão terapêutica.

A insuficiência mitral é uma doença progressiva (ENRIQUEZ-SARANO M et al., 1999), observando-se em seguimento prospectivo doppler- ecocardiográfico um aumento no volume regurgitante de 7,5 ml e do orifício regurgitante efetivo de 5,9 mm² anualmente. Essa progressão se deve ás alterações anatômicas, observando-se progressão mais rápida nos pacientes com prolapso da válvula mitral e degeneração mixomatosa, e também em conseqüência da progressiva dilatação do anel mitral (ENRIQUEZ-SARANO M et al., 1999).

Os pacientes portadores de insuficiência mitral apresentam uma maior mortalidade e morbidade quando comparados com a sobrevivência esperada da população geral. Em estudo evolutivo de pacientes portadores de insuficiência mitral grave, observou-se, em 10 anos de seguimento, alta incidência de fibrilação atrial (30%) e de IC (63%). Neste mesmo período, 90% dos pacientes morreram ou foram encaminhados para tratamento cirúrgico. Pacientes com sintomas de insuficiência cardíaca em classe funcional III-IV e rebaixamento de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (<60%) tiveram maior mortalidade (LING H et al., 1996).

A abordagem terapêutica dos pacientes com insuficiência mitral, em especial daqueles onde já existe grave disfunção ventricular esquerda, requer maior atenção que a dos pacientes com comprometimento de outras válvulas, como a insuficiência aórtica (WISENBAUGH T et al., 1984). As alterações de carga geradas pelo refluxo sistólico para o interior do átrio esquerdo dificultam a caracterização exata do estado funcional do ventrículo. Assim, corrigido o refluxo, evidencia-se no pós-operatório redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo em aproximadamente 10% (ENRIQUEZ-SARANO M et al., 1994).

Portanto, todas as medidas de função ventricular sistólica na presença de insuficiência mitral superestimam a verdadeira performance ventricular (STARLING MR, 1993).

Contudo, a despeito das limitações, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo é o parâmetro mais estudado e um dos principais determinantes da sobrevivência tardia após

a correção cirúrgica da insuficiência mitral (MICHAEL PL et al., 1995; PHILLIPS HR et al., 1981., ENRIQUEZ-SARANO M et al., 1994).

A presença de disfunção ventricular esquerda evidenciada por rebaixamento da fração de ejeção inferior a 60%, assim como a presença de diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo superior a 45 mm, eleva o risco de mortalidade e insuficiência cardíaca após a cirurgia da válvula mitral, quando se compara aos pacientes com esses parâmetros preservados (ENRIQUEZ-SARANO M et al., 1994; ENRIQUEZ-SARANO M et al., 1995).

Portanto, a presença de classe funcional III-IV (TRIBOUILLOY C et al., 1999) e sinais de disfunção ventricular, representados por rebaixamento da fração de ejeção, acarretam prognóstico desfavorável para os pacientes portadores de insuficiência mitral.

O risco de morte súbita também é maior nos pacientes com insuficiência mitral quando comparados à população geral (1,8 vs 0,8% ao ano). Embora a disfunção ventricular seja o principal preditor desses eventos, a morte súbita também ocorre em pacientes pouco sintomáticos com função ventricular preservada (GRIGIONI F et al., 1999).

A presença de hipertensão pulmonar é outro fator que se relaciona a prognóstico desfavorável (CRAWFORD MH et al., 1990). A associação de hipertensão pulmonar e disfunção ventricular deve ser considerada atentamente devido aos piores desfechos observados nessa população (HOCHREITER C et al., 1986).

Contudo, a intervenção cirúrgica precoce no curso da doença e aparecimento da hipertensão pulmonar pode produzir redução significativa dos níveis da pressão arterial pulmonar por diminuição da transmissão retrógrada da pressão intra-atrial elevada e da reatividade vascular pulmonar (DE GATANO G et al., 1993).

A necessidade, portanto, de indicar terapêutica cirúrgica mais precoce, motivou entender os mecanismos envolvidos na deterioração da função ventricular após a cirurgia mitral e alternativas visando a minimizar esse efeito. Aspecto que merece atenção, é a importância da preservação do aparelho subvalvar. LILLEHEI CW e colaboradores (1964) foram os primeiros a reconhecer a importância do aparelho subvalvular. Na seqüência, outros estudos demonstraram, em animais, que a preservação do aparelho subvalvular relaciona-se com melhor desempenho sistólico após a troca da válvula mitral. (YUN KL et al., 1990., YUN KL et al., 1991).

Vários estudos clínicos demonstraram melhor desempenho ventricular e prognóstico clínico quando se preserva o aparelho subvalvular, seja na troca, seja através das técnicas de plastia mitral (ROZICH JD et al., 1992; HENNEIN HA et al., 1980; DAVID TE et al., 1983; GOLDMAN ME et al., 1987; YACOUB M et al., 1981; ENRIQUEZ-SARANO M et al., 1995).

A importância dessa evolução cirúrgica na abordagem dos pacientes com insuficiência mitral permite tratar cirurgicamente pacientes com disfunção ventricular mais avançada, assim como indicar cirurgia precocemente nos pacientes com função ventricular normal e poucos sintomas, quando as chances de plastia da válvula forem muito grandes, visto que a mortalidade cirúrgica nesses casos tem se evidenciado muito baixa e a evolução tardia muito favorável (LING L et al., 1997., ENRIQUEZ-SARANO et al., 1995).

Diante das alterações fisiopatológicas, relacionadas à adaptação do ventrículo esquerdo e o impacto de sua disfunção na morbidade e mortalidade dos pacientes com insuficiência mitral, torna-se mister ampliar o entendimento dos mecanismos envolvidos na deterioração da função miocárdica, visando a obter parâmetros cada vez mais precisos que possam direcionar a terapêutica.

1.2- Resposta à sobrecarga e transição para disfunção cardíaca

O estresse mecânico é o principal fator envolvido no processo de adaptação e desadaptação às sobrecargas impostas ao miocárdio nas diversas formas de cardiopatias, em especial nas valvopatias, sejam elas sobrecargas de pressão, como a estenose aórtica, sobrecarga de pressão e volume como a insuficiência aórtica, ou na sobrecarga de volume, cujo exemplo é a insuficiência mitral.

A presença de diferenciação final dos cardiomiócitos em fase precoce do desenvolvimento acarretam na incapacidade de hiperplasia, isto é, na divisão celular que, embora gerem controvérsias, não ocorre de maneira representativa. (revisado por LORELL et al, 2000).

O mecanismo adaptativo, inicial à sobrecarga é, portanto, a hipertrofia miocárdica. Austin Flint sugeriu, em meados do século XIX, o papel benéfico da hipertrofia no processo adaptativo, aumentando a força de contração e prevenindo a dilatação cardíaca, em particular, nas doenças das válvulas. Notam-se, em sua observação, semelhanças entre a hipertrofia após treinamento atlético e a decorrente de sobrecarga circulatória.

No final do mesmo século, Willian Osler observou que a desadaptação, após um período de hipertrofia adaptativa, poderia ocorrer. Osler postulou que o curso da hipertrofia cardíaca estaria dividido em 3 estágios, iniciado por um período de desenvolvimento adaptativo, seguido por um período de compensação e, posteriormente, desadaptação, onde a dilatação cardíaca acarretaria insuficiência cardíaca (revisado por KATZ, 1994).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos da transição da fase adaptada para a fase desadaptada não estão totalmente elucidados, nos quais múltiplos processos biológicos estão envolvidos e nem sempre coerentes entre si em um primeiro momento (revisado por CHIEN KR, 1999).

Após o aparecimento de sobrecarga aguda do miocárdio, um grande número de alterações celulares e moleculares aparecem em horas e dias. Ocorrem uma série de alterações qualitativas na expressão de genes específicos e aumento quantitativo da expressão de proteínas estruturais envolvidas no metabolismo celular. (revisado por COOPER, 1987; VAN BILSEN & CHIEN, 1993). O primeiro grupo de genes ativados seguindo-se a sobrecarga hemodinâmica são os genes de resposta imediata, c-fos, c-jun, c-myc e ergr-1. A seguir observa-se a indução de genes fetais, entre eles a β -miosina de cadeia pesada (β -MHC), fator natriurético atrial (ANF), a α -actina esquelética e, por fim ocorre ativação dos genes de expressão constitutiva, incluindo a miosina de cadeia leve

(MLC) e a actina cardíaca (KOMURO I et al.,1988; IZUMO S et al., 1988; KOMURO & YAZAKI., 1993; NADRUZ WJr et al., 2003).

Essas alterações no padrão da expressão gênica possibilitam ao cardiomiócito desenvolver seu crescimento hipertrófico. O aumento da síntese de componentes do aparato contrátil e conseqüentemente deposição sarcomérica permitem ao cardiomiócito adaptar-se às novas demandas impostas pela sobrecarga, elevando sua capacidade contrátil (revisado por SUGDEN PH, 2001).

A hipertrofia ocorre de maneira distinta nas sobrecargas de pressão e de volume. A sobrecarga pressora induz hipertrofia concêntrica, na qual a deposição dos sarcômeros se dá preferencialmente em paralelo ao eixo maior do cardiomiócito, já a sobrecarga de volume induz hipertrofia excêntrica com deposição em série dos sarcômeros.

A sobrecarga hemodinâmica leva a um aumento da tensão nas paredes das câmaras , conforme definida pela relação de Laplace (T=PXR/2ε). A hipertrofia tende a reduzir esse aumento da tensão, seja sistólico ou diastólico, devido ao aumento da espessura das câmaras cardíacas (CARO CG et al, 1978). Este dado fisiopatológico indica que o aumento da tensão relaciona-se ao estímulo que sinaliza a necessidade de hipertrofia miocárdica (GUNTHER & GROSSMAN, 1979). Ocorrendo aumento da espessura da parede de modo a normalizar a tensão, diz-se que a hipertrofia é compensatória. Porém, freqüentemente, esse processo adaptativo evolui para o estado descompensado, decorrente da perpetuação da própria sobrecarga, alterações do metabolismo energético, alterações neuro-humorais, estímulos parácrinos e autócrinos, desorganização sarcomérica e perda de cardiomiócitos, seja por necrose ou apoptose, resultando em disfunção cardíaca (KATZ AM, 1994).

O aumento anormal do tecido intersticial também contribui para a deterioração da função cardíaca e está presente durante a progressão da hipertrofia, ocorrendo fibrose com acúmulo de colágeno tipo I, III, IV e fibronectina (CHAPMAN D et al.,1990; SAMUEL JL et al., 1991; WEBER & BRILLA, 1991; BURGESS ML et al., 1996). Além da influência dos fatores neuro-humorais, em especial angiotensina II e aldosterona na fisiologia dos fibroblastos (revisado por WEBER & BRILLA, 1991), o estresse mecânico altera sua forma e ativa vias de sinalização celular (SAI X et al., 1999).

Esse conjunto de alterações genéticas, moleculares, neuro-humorais, celulares e intersticiais que decorrem da resposta à injúria e/ou sobrecarga ao miocárdio, é denominado remodelamento cardíaco, traduzindo-se na clínica em alterações de tamanho, massa, geometria e função (PFEFFER & BRAUNWALD, 1990; COHN JN et al., 2000).

Observa-se, no entanto, que, independentemente do estímulo desencadeador, a resposta fenotípica do cardiomiócito é homogênea sugerindo um mecanismo comum, esteriotipado, com rotas moleculares e bioquímicas comparáveis (CHIEN KR, 1999; revisado por WAGNER et al., 1999), responsável pelo remodelamento.

1.3- Mecanutransdução em cardiomiócitos.

O entendimento de como o aumento do estresse no cardiomiócito desencadeia os mecanismos de sinalização celular é importante para identificar as rotas existentes nesse processo.

O estímulo mecânico é sentido pelo cardiomiócito através da deformação da membrana e alterações no citoesqueleto. Estudos sugerem ser o citoesqueleto dos cardiomiócitos um importante elemento na transdução de sinais, desencadeando a resposta hipertrófica. Vários estudos realizados em outras áreas de conhecimento demonstraram a participação do citoesqueleto na transdução dos sinais em outros tipos celulares (revisado por GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; ALENGHAT & INGBER, 2002). Neste contexto, as integrinas desempenham destacado papel na mecanutransdução de sinais, em especial das tirosinas quinases.

As integrinas são receptores transmembrana compostos de subunidades $\alpha \in \beta$ (HYNES RO, 1987; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999), localizadas nas adesões focais, acoplando a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. Estudos desenvolvidos nos últimos anos têm demonstrado que além de atuarem como moléculas adesivas, são também receptores capazes de transmitir sinais em ambas direções através da membrana celular (CLARK & BRUGGE, 1995; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; ROSS & BORG, 2001).

A quinase de adesão focal (FAK) é tida como a principal proteína sinalizadora na mediação da sinalização celular via integrinas (GUAN JL et al, 1991), embora também seja ativada por receptores tirosina quinase e por receptores acoplados à proteína G (GPCR) sob estímulos de fatores parácrinos como endotelina-1 e angiotensina II (EBLE et al., 2000; SALAZAR & ROZENGURT, 2001; TORSONI AS et al., 2003), representando, portanto, um efetor comum a várias vias de sinalização.

A FAK é uma tirosina quinase citoplasmática com estrutura única dentre as famílias de tirosina quinase, sendo dividida em três domínios: o domínio N-terminal, o domínio quinase e o domínio C-terminal (Figura 1) (SCHALLE MD et AL., 1992; HANKS SK et al., 1992).

A ativação da FAK por estímulo mecânico ou através de fatores de crescimento depende da autofosforilação no resíduo tirosina 397 (Tyr397). Uma vez fosforilada, o Tyr397 recruta quinases da família das proteínas originalmente definidas como produto do sarcoma de Roux (Src), as quais promovem fosforilação adicional de outros resíduos da FAK.



Figura 1- Esquema representativo da estrutura linerar da FAK, mostrando seus domínios, sítios de fosforilação em tirosina e seqüência ricas em prolina (PR1 e PR2).
A FAK fosforilada (p-FAK) promove a agregação de diversos complexos individuais envolvidos na sinalização, os quais mediam respostas celulares aos estímulos externos controlando a atividade de múltiplas vias de sinalização (CALALB MB et al., 1995; SCHLAEPFER DD et al., 1994; POLTE TR et al., 1997).

A FAK está envolvida em várias funções celulares como adesão, migração, crescimento e sobrevivência, analisaram-se culturas de células (PARSONS JT, 2003).

Demonstramos em cardiomiócitos que a FAK é rapidamente ativada e coordena a ativação inicial do programa gênico relacionado à hipertrofia cardíaca em resposta ao estresse (TORSONI AS et al., 2003; FRANCHINI KG et al., 2000; TORSONI AS et al., 2005; NADRUZ W Jr et al., 2005). Estes estudos corroboram a idéia do papel central desenvolvido pela FAK na promoção da expressão do programa gênico da hipertrofia através do estresse mecânico em cardiomiócitos. Contudo, não há informações disponíveis do papel desempenhado pela FAK nas alterações estruturais que acompanham o remodelamento ventricular na insuficiência cardíaca em humanos.

No presente estudo, analisamos a expressão e distribuição da FAK no miocárdio de pacientes portadores de insuficiência mitral através de biópsia endocárdica realizada no intra-operatório desses pacientes. Analisamos outras alterações estruturais nos cardiomiócitos e realizamos seguimento clínico e ecocardiográfico evolutivo.

2- OBJETIVOS

Objetivo primário

1- Analisar a expressão e distribuição da Quinase de Adesão Focal (FAK) no miocárdio, caracterizar as alterações estruturais deste e avaliar correlações entre parâmetros clínicos, ecocardiográficos.

Objetivo secundário

2- Caracterizar clínica e ecocardiograficamente os pacientes portadores de insuficiência mitral orgânica no pré e pós-operatório de cirurgia valvular.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

Os Comitês de Ética das instituições envolvidas, Hospital Samaritano de Campinas, Hospital Irmãos Penteado e Universidade Estadual de Campinas, aprovaram previamente este estudo.

Todos os pacientes receberam as informações sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e informado.

3.1- Casuística

Vinte e um pacientes, consecutivos, com insuficiência mitral orgânica, e seis pacientes portadores de estenose mitral foram incluídos no estudo, estes últimos como grupo controle para a análise estrutural e imuno-histológica. Nenhum apresentava evidência de hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou doença arterial coronariana, esta última excluída através de coronariografia.

Os pacientes com insuficiência mitral tinham média de idade de $55\pm3,7$, variando de 21 a 80 anos. Os portadores de estenose mitral tinham média de idade $57\pm4,2$ anos. Do gênero feminino, 11 eram do grupo de insuficiência mitral e quatro do de estenose mitral.

A degeneração mixomatosa com prolapso da valva mitral foi responsável pela maioria dos casos de insuficiência (n=15), seguida da doença reumática (n=7). A doença reumática, entretanto, foi responsável por todos os casos do grupo estenose mitral (Tabela 1).

3.2- Protocolo de estudo

Os pacientes eleitos para este estudo foram avaliados clínica e ecocardiograficamente no pré e no pós-operatório, antes da alta hospitalar e aos 3° , 6° , 9° , e 12° meses de seguimento.

Todos pacientes se submeteram a cirurgia cardíaca para tratamento da doença da válvula mitral, momento no qual foi coletado material de biópsia endocárdica do ventrículo esquerdo.

3.2.1- Avaliação clínica

Os pacientes foram avaliados clinicamente por um único observador e essa avaliação constou de exame clínico geral tendo como foco a análise dos sintomas de insuficiência cardíaca segundo a classificação da *New York Heart Association*.

3.2.2- Avaliação ecocardiográfica

O exame ecocardiográfico com color-doppler foi realizado em todos os pacientes, obedecendo ao protocolo de seguimento acima descrito. Um único observador foi o responsável pela realização de todos os exames, utilizando, para tal, um equipamento comercial (GE-Vivid 3) equipado com transdutores 2,5 a 3,5 Mhz.

As dimensões da cavidade ventricular esquerda (diâmetro diastólico final; diâmetro sistólico final) e atrial esquerda foram analisadas pelas imagens obtidas em modo-M guiado pelo ecocardiograma bi-dimensional.

A fração de ejeção foi calculada através do método de Theicholz.

A espessura relativa do ventrículo esquerdo foi calculada considerando-se a espessura da parede posterior da cavidade e o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, através da fórmula:

ER= 2x espessura da parede posterior do VE em diástole Diâmetro diastólico final do VE A pressão sistólica da artéria pulmonar (PSAP) foi estimada pela velocidade do jato regurgitante tricúspide acrescida da pressão média intra-atrial direita. Usou-se a seguinte fórmula (FEIGENBAUM H, 1994):

PSAP= 4(velocidade de pico do jato tricuspídeo)²+pressão média no átrio direito

3.2.3- Procedimento cirúrgico

A cirurgia cardíaca para tratamento da valvulopatia mitral desses pacientes empregou sistema de circulação extracorpórea com fluxo contínuo, oxigenador de membrana (Braile Biomédica, São José do Rio Preto-Brasil) em normotermia e cardioplegia sangüínea anterógrada e retrógrada.

A troca ou plastia da válvula foi realizada conforme indicada em cada caso, sendo preservado o aparelho subvalvular nos casos em que este não estava intensamente acometimentos.

No grupo de insuficiência mitral, em 13 pacientes efetuou-se plastia, e, em oito, substituição dessa válvula. Destes, dois receberam prótese metálica (Mira – Edwards, Califórnia-EUA) e seis biológica de pericárdio bovino (Braile Biomédica, São José do Rio Preto-Brasil).

Todos os portadores de estenose mitral foram submetidos a substituição valvular: quatro receberam próteses biológica de pericárdio bovino (Braile Biomédica, São José do Rio Preto-Brasil) e dois próteses metálica (Mira – Edwards, Califórnia-EUA).

O procedimento de Maze, para tratamento da fibrilação atrial, foi realizado concomitantemente à abordagem valvar em três pacientes com insuficiência mitral e em um com estenose mitral.

Plastia da válvula tricúspide, para tratar seu refluxo, foi efetuada em um paciente com insuficiência mitral e em dois com estenose mitral.

O tempo de pinçamento da aorta foi de 78±19 e 75±15 min, e o tempo de circulação extracorpórea foi e 90±18 min nos pacientes com insuficiência e com estenose mitral, respectivamente (Tabela 1).

| | Insuficiência mitral | Estenose Mitral |
|--|----------------------|-----------------|
| | N=21 | N=06 |
| Idade (anos) | 55±3,7 | 57±4,2 |
| Gênero feminino | 11 | 4 |
| Etiologia reumática | 6 | 7 |
| Etiologia por PVM/Degeneração Mixomatosa | 0 | 15 |
| Troca | 8 | 6 |
| Plastia | 13 | 0 |
| CEC (min) | 94±24 | 90±18 |
| Pinçamento aórtico (min) | 78±19 | 75±15 |
| Procedimento de Maze | 3 | 1 |
| Plastia tricúspide | 1 | 2 |

Tabela 1- População estudada e características do ato cirúrgico.

PVM= prolapso da válvula mitral; CEC= circulação extracorpórea; min= minutos.

3.2.4- Biópsia endocárdica

Durante a cirurgia, imediatamente depois de instalada a circulação extracorpórea e de aberto o átrio esquerdo, obteve-se biópsia do subendocárdio do ventrículo esquerdo nas regiões do septo interventricular e da parede livre, distantes dos músculos papilares (Figura 2). Este material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior utilização em *wester blots* e imuno-histoquímica.



Figura 2- Abordagem da válvula mitral e acesso ao ventrículo esquerdo para biópsia subendocárdica.

3.3- Reagentes

Utilizou-se [¹²⁵I] proteína A da Du Pont – *New England Nuclear Co.* Anticorpos policionais ani-FAK e anti-Vimentina originários da Santa Cruz Biotechnology e anticorpos de policionais de coelho anti-pFAK-Tyr397 originários da Biosource Internacional.

3.4- Análise de proteínas por Immunoblotting

Os extratos totais e as proteínas precipitadas foram tratados com tampão de Laemmli (azul de bromofeno 0,1%, fosfato de sódio 1 M pH7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotreitol 100 mM, aquecidos em água fervente por cinco minutos e centrifugados por um minuto. Após este procedimento, foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8%, 10% e 12%, em aparelho de eletroforese miniaturado da Bio-Rad (*Mini-Protean, Bio-rad Laboratories, Richmond, Ca, EUA*), a 35 mÅ em corrente constante. A eletrotransferência da proteínas de gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 min a 120 V (constante) em aparelho miniaturado Bio-Rad.

Em seguida, as membranas foram incubadas em solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0,02% Tween 20), acrescida de 5% de leite em pó magro, por uma hora a temperatura ambiente, de modo a reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos primários às proteínas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com 10 μ g de anticorpos primários específicos, diluídos em solução basal contendo 3% de leite em pó magro, por doze horas a 4°C. Após lavagem por 30 min em solução basal, as membranas foram incubadas com 2 μ Ci de [¹²⁵I] proteína A (30 μ Ci/ μ g) em 10 ml de solução basal, contendo 1% de leite em pó magro, por duas horas em temperatura ambiente e, então, lavadas novamente como descrito anteriormente.

A [¹²⁵I] proteína A ligada aos anticorpos específicos foi detectada por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (*Eastman kodak, Rochester, NY, EUA*), com intensificadores Cronex Lightening Plus (*Du Pont, Wilmington, DE, EUA*) a -80°C por 48-72 h. Em se tratando de anticorpos primários monoclonais, as membranas foram lavadas conforme descrito acima e fez-se a incubação com anticorpos anti-imunoglobulina de camundongos obtidos em coelho, seguida por nova lavagem e incubação com [¹²⁵I] proteína A.

3.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras de ventrículo esquerdo foram processadas para a embebição em resina epóxi Epon 812 (*Electron Microscopy Science, Washington, PA, EUA*), de acordo com as seguintes etapas:

- Lavagem em tampão fosfato-salina (PBS) 0,05 M, pH 7,4, durante 15 min;
- Pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão-fosfato de sódio

0,1 M, pH 7,4, durante duas horas, a 4°C;

Lavagem em solução salina glicosada, sacarose 7,3% e NaCl 0,6% em água destilada), durante 20 min;

- Contrastação com solução de acetato de uranila 0,5% e sacarose 13,3% (em água destilada) durante aproximadamente quatro horas
- Lavagem em solução salina glicosada (sacarose 7,3% e NaCl 0,6% em água destilada), durante 20 min;
- Desidratação em gradiente crescente de acetona (30, 50, 70, 80, 95 e 100%) durante 15 min cada;
- Embebição em mistura de acetona e resina epóxi nas proporções 2:1, 1:1 e
 1:2 durante uma hora em cada, e embebição em resina pura durante doze horas;
- Embebição final em moldes de silicone
- Polimerização a 60°C durante setenta e duas horas.

Secções semifinas, de 500 nm de espessura, foram obtidas no ultramicrótomo *(Leica,* modelo *Ultracut UCT)* e coradas com Azul de Toluidina a 0,5% para análise prévia em microscópio de luz.

Posteriormente, secções ultrafinas de 70 nm foram obtidas no ultramicrótomo, com navalha de diamante, sendo coletadas em telas de cobre e contrastadas em acetato de uranila a 2%, por 15 min, e em citrato de chumbo a 0,5%, por 5 min. As secções foram, então, analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (*LEO Schott Zeiss EM 906*). Fotomicrografias foram obtidas em chapas de filmes (*Kodak Electron Microscope Film*), os quais foram ampliados em papel fotográfico KodaK (*Kodak Professional*).

3.6- Análise de proteínas em imuno-histoquímica

Fragmentos de biópsia endocárdica foram heparinizados, hidratados e submetidos a imunocitoquímica, para avaliar a distribuição da FAK e Vimentina no miocárdio desse paientes. Para tal, foram realizadas as seguintes etapas:

- lavagem em PBS 0,1 M, pH7,4 3 x 5 min.
- Bloqueio de peroxidase endógena em H₂O₂ 1% em PBS 0,1 M por 30 min.
- Lavagem em PBS 0,1 M, pH7,4 3 x 5 min.
- Bloqueio de ligação inespecífica em BSA 3%/PBS 0,1 M 45 min.
- Incubação com anticorpo primário anti-FAK (1/100) ou anti-Vimentina em BSA 1%/PBS 0,1 M – overnight a 4°C.
- Lavagem em PBS 0,1 M, pH7,4 3 x 5 min.
- Incubar com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com biotina, diluído 1/300 em BSA 1% - 2 horas à temperatura ambiente.
- Lavagem em PBS 0,1 M, pH7,4 3 x 5 min.
- Incubação com complexo streptoavidina-peroxidade (Amersham/Pharmacia) diluído 1:300 em PBS 0,1 M – 45 min.
- Lavagem em PBS 0,1 M, pH7,4 3 x 5 min.
- Incubação com solução reveladora diamino-benzidina (DAB) por 20 min.
- Bloqueio da reação em H₂O destilada.
- Contracoloração com hematoxilina de Harris 30 seg.
- Lavagem rápida em H₂O destilada
- Tratamento com solução saturada de carbonato de lítio 30 seg.
- Lavagem rápida em H₂O destilada
- Desidratação
- Diafanizar (Xilol)
- Montagem de lâminas

As lâminas histológicas foram observadas ao microscópio de luz *Leica*, tendo sido avaliadas as distribuições celulares da FAK e Vimentina. Fotomicrografias foram obtidas das regiões representativas da distribuição dessas proteínas, utilizando-se uma câmara fotográfica acoplada ao microscópio de luz.

3.7- Quantificação do colágeno fibrilar e tecido imunologicamente marcado

A densidade do colágeno foi estimada através da análise de imagens digitais da marcação com picro-sirius a cada campo (>30 campos) do percentual da superfície total ocupada por colágeno fibrilar, identificado em luz polarizada. Estimou-se a área ocupada por anticorpos anti-FAK e anti-Vimentina à microscopia óptica.

3.8- Análise estatística

As dados estão apresentados em média e desvio padrão.

O dados clínicos e ecocardiográficos foram comparados entre o pré e o pós-operatório pelo teste de análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), para valores normais e repetidos, com realização de pós teste de Bonferroni para correção do erro α .

Utilizou-se o coeficiente de Spearman para estabelecer correlação entre o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e a pressão sistólica da artéria pulmonar, e o teste de Mc Nemar para análise antes e após o tratamento nos mesmos indivíduos, quando divididos em dois grupos (dados nominais emparelhados).

A análise da sobrevivência pós-operatória livre de eventos foi feita através da curva de Kaplan-Meier.

Os dados do *immunoblotting* estão mostrados como percentagens modificadas em relação ao controle.

A análise estatística foi realizada com os valores reais da leitura densitométrica.

Diferenças entre os valores médios da leitura densitométrica das amostras de estenose mitral e de insuficiência mitral foram testadas com o teste t de Student.

Foi usada regressão linear para avaliar as relações entre a área de colágeno e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, ou a marcação anti-FAK, assim como as marcações anti-Fak e anti-Vimentina e teste t padrão para diferenças entre grupos.

4- RESULTADOS

4.1- Dados clínicos e ecocardiográficos

4.1.1- Evolução clínica

O grupo de pacientes selecionados para o presente estudo constituiu-se de 21 indivíduos com insuficiência mitral orgânica e seis com estenose mitral, todos com indicação de tratamento cirúrgico. O grupo com estenose mitral não teve seguimento clínico nem ecocardiográfico, servindo apenas de controle para a análise estrutural e imuno-histoquímica do miocárdio. A classe funcional dos pacientes com insuficiência mitral estudados, conforme os critérios estabelecidos pela *New York Heart Association* foi, em média, 2,8±0,8. Quatro pacientes encontravam-se em classe funcional IV; 10, em classe III; seis, em classe II, e apenas um em classe I. Este último paciente apresentava, como dado objetivo ao ecocardigrama, grande aumento do átrio esquerdo e anatomia extremamente favorável à plastia valvular.

Após a correção cirúrgica da insuficiência mitral, observou-se melhora significativa dos sintomas de insuficiência cardíaca já no 3° mês de seguimento, estendendo-se esse benefício até o 12° mês de pós-operatório (Figura 3). Terminado o seguimento de 12 meses, 16 pacientes estavam em classe funcional I, e cinco pacientes em classe II (Tabela 2).

| | PRÉ-OP | PO 3M | PO 6M | PO 9M | PO 12M |
|--------|--------|-------|-------|-------|--------|
| CF I | 01 | 14 | 13 | 13 | 16 |
| CF II | 06 | 05 | 07 | 06 | 05 |
| CF III | 10 | 02 | 01 | 01 | 0 |
| CF IV | 04 | 0 | 0 | 01 | 0 |
| TOTAL | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |

Tabela 2- Distribuição dos pacientes por classe funcional ao longo do seguimento.

CF=classe funcional. PRÉ-OP=pré-operatório; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° de mês pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório.

A figura 4 mostra a curva de sobrevivência livre de eventos (morte ou piora da insuficiência cardíaca) dos pacientes do presente estudo. Destes, dois pacientes apresentaram piora da insuficiência cardíaca: a paciente com iniciais FPP estava em classe funcional I no 6º mês de pós-operatório e evoluiu para classe III no 9º mês em decorrência de insuficiência mitral residual, melhorando com ajuste terapêutico medicamentoso, que a fez retornar à classe I, o caso não foi considerado cirúrgico. O paciente, com iniciais PRP estava em classe funcional II no 6º mês de pós-operatório e evoluiu para classe IV ao 9º mês. Após ajustes na terapêutica medicamentosa e orientação clínica, retornou à classe II.

A comparação dos dois grupos divididos em classe funcional I-II e III-IV evidenciou que nenhum dos sete pacientes em classe I-II no pré-operatório tinha sintomas de insuficiência cardíaca ao término de 12 meses, enquanto que dos 14 pacientes em classe III-IV pré-operatória, cinco se mantiveram sintomáticos ao final do seguimento (Tabela 3).

| PRE-OP | PO 12M |
|--------|--------------------------|
| N=21 | sintoma de insuficiência |
| | cardíaca persistente |
| 7 | 0 |
| | |
| 14 | 05 * |
| | |
| | N=21 7 14 |

 Tabela 3- Persistência pós-operatória dos sintomas de insuficiência cardíaca conforme a classe funcional (NYHA) pré-operatória.

*p<0,05(Mac Nemar)

CF=classe funcional; PRÉ-OP=pré-operatório; PO 12M=pós-operatório de 12 meses.



Figura 3- Evolução da classe funcional ao longo do tempo de seguimento.

PRÉ-OP=pré-operatório; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. *p<0,05.



Figura 4- Curva de sobrevivência livre de eventos (Kaplan-Meier).

4.1.2- Evolução dos parâmetros Doppler – Ecocardiográficos

Átrio Esquerdo

Na avaliação pré-operatória, o valor médio do diâmetro do átrio esquerdo estava aumentado quando comparado aos parâmetros de normalidade preconizados pela *American Society of Echocardiography* (40 mm). O diâmetro máximo observado foi 72 mm e o mínimo 41 mm, sendo a média 55±9 mm.

O procedimento cirúrgico produziu redução significativa dos diâmetros do átrio esquerdo, como apresentados na tabela 4. Esta redução foi evidente já no ecocardiograma realizado no período pós-operatório imediato antes da alta hospitalar e se manteve ao longo do seguimento clínico de 12 meses (Figura 5).

Na maioria, no entanto, observou-se que os valores médios dos diâmetros de átrio esquerdo não atingiram, ao longo da evolução pós-operatória, o valor de referência de normalidade. Apenas quatro pacientes tiveram o diâmetro normalizado ao final do seguimento.

| | Ν | MÉDIA | p ENTRE |
|-----------|----|--------|---------|
| | | | GRUPOS |
| AE PRÉ-OP | 21 | 55±9 | |
| AE POI | 21 | 47±8,5 | <0,05 |
| AE PO3M | 21 | 46±9 | <0,05 |
| AE PO6M | 21 | 47±11 | <0,05 |
| AE PO9M | 21 | 45±10 | <0,05 |
| AE PO12M | 21 | 46±11 | <0,05 |

Tabela 4- Evolução dos diâmetros do átrio esquerdo.

N=número de pacientes. Valores médios expressos em mm.

AE=átrio esquerdo; PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato;

PO3M=3° mês de pós-operatório; PO6M=6° mês de pós-operatório;

PO9M=9° mês de pós-operatório; PO12M=12° mês de pós-operatório.

Teste: ANOVA



Figura 5- Evolução do diâmetro do átrio esquerdo.

PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. *p<0,05.

Diâmetros diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo

O valor médio do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (57±7 mm) foi apenas discretamente maior que o valor máximo normal de referência estipulado pela *American Society of Echocardiography* (56 mm). Foram observados valores individuais que variaram de 72 até 40 mm.

Após a intervenção cirúrgica, houve redução significativa dos valores médios do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (Tabela 5). Na figura 6, observa-se a evolução ao longo dos 12 meses de seguimento clínico, estando o valor médio, ao final deste período, dentro dos parâmetros de normalidade. A maioria dos pacientes estudados (15) estava com o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo inferior a 56 mm.

No período pré-operatório, o valor médio do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo dos pacientes do presente estudo apresentou índice médio menor que o de referência máxima (39 mm) preconizado pela *American society of Echocardiography*.

O procedimento cirúrgico não modificou significativamente os valores médios do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, que se mantiveram em níveis semelhantes aos do período pré-operatório ao longo do seguimento clínico, com discreta redução após 12 meses de evolução, não gerando diferença estatística (Figura 7; Tabela 6).

Observando-se a variação (média) do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo do início do seguimento até o 12° mês, notou-se redução com tendência à significância (p=0,05).

| | Ν | MÉDIA | p ENTRE |
|-------------|----|--------|---------|
| | | | GRUPOS |
| DDVE PRÉ-OP | 21 | 57±7 | |
| DDVE Poi | 21 | 50±6 | <0,05 |
| DDVE PO3M | 21 | 51±8 | <0,05 |
| DDVE PO6M | 21 | 52±8 | NS |
| DDVE PO9M | 21 | 50±8 | <0,05 |
| DDVE PO12M | 21 | 49±7,5 | <0,05 |

Tabela 5- Evolução do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo.

Nota: N=número de pacientes. Valores médios expressos em mm.

DDVE=diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO3M=3° mês de pós-operatório; PO6M=6° mês de pós-operatório; PO9M=9° mês de pós-operatório; PO12M=12° mês de pós-operatório. NS=não significativo.Teste: ANOVA



Figura 6- Evolução do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo.

PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. *p<0,05.

| | Ν | MÉDIA | p ENTRE GRUPOS |
|-------------|----|--------|----------------|
| DSVE PRÉ-OP | 21 | 35±6 | |
| DSVE POI | 21 | 32±5,5 | NS |
| DSVE PO3M | 21 | 35±7,5 | NS |
| DSVE PO6M | 21 | 33±8 | NS |
| DSVE PO9M | 21 | 32±8 | NS |
| DSVE PO12M | 21 | 32±8,5 | NS |

Tabela 6- Evolução do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

Nota: N=número de pacientes. Valores médios expressos em mm.

DSVE=diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO3M=3° mês de pós-operatório; PO6M=6° mês de pós-operatório; PO9M=9° mês de pós-operatório; PO12M=12° mês de pós-operatório.

NS=não significativo.



Figura 7- Evolução do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. p=NS.

Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

A média da fração de ejeção do ventrículo esquerdo apresentava-se dentro dos parâmetros de normalidade na avaliação ecocardiográfica pré-operatória (66±12%), conforme as diretrizes da *American Society of Echocardiography*. O valor máximo identificado foi 81 e o mínimo 41,5%. Sete pacientes iniciaram o estudo com fração de ejeção inferior a 60%.

Não se observou modificação significativa dos valores médios da fração de ejeção no seguimento clínico pós-operatório (Tabela 7; Figura 8). Entretanto, houve diferença significativa entre as médias do 3° mês em relação ao 6° mês de seguimento (p<0,05). Após 12 meses, sete pacientes apresentavam fração de ejeção abaixo de 60%.

Os pacientes deste estudo foram divididos em dois grupos, quanto à fração de ejeção: valores superiores a 60% e valores inferiores a 60%. Dos 14 pacientes do primeiro grupo, quatro evoluíram com fração de ejeção inferior a 60% ao término de 12 meses. Dos sete do segundo grupo, três evoluíram com melhora da fração de ejeção e quatro mantiveram-se com fração de ejeção inferior a 60% (Tabela 8).

| | N | MÉDIA | P ENTRE GRUPOS |
|-------------|----|---------|----------------|
| FEVE PRÉ-OP | 21 | 66±12 | |
| FEVE POI | 21 | 64±11 | NS |
| FEVE PO3M | 21 | 59±13 | NS |
| FEVE PO6M | 21 | 67±10 | NS |
| FEVE PO9M | 21 | 66±12 | NS |
| FEVE PO12M | 21 | 65±12,5 | NS |
| | | | |

Tabela 7- Evolução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

N=número de pacientes. Valores médios expressos em mm.

FEVE=fração de ejeção do ventrículo esquerdo esquerdo; PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO3M=3° mês de pós-operatório; PO6M=6° mês de pós-operatório; PO9M=9° mês de pós-operatório; PO12M=12° mês de pós-operatório. NS=não significativo. Teste: ANOVA

| | PRÉ-OP | PO 12M |
|-----------|--------|-----------|
| | N=21 | FEVE <60% |
| FEVE >60% | 14 | 04 |

Tabela 8- Persistência da FEVE abaixo de 60% em comparação à do pré-operatório.

* p<0,05(Mac Nemar)

FEVE <60%

FEVE=fração de ejeção do ventrículo esquerdo; PRÉ-OP=pré-operatório; PO12M=pós-operatório de 12 meses.

07

03 *



Figura 8- Evolução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. p=NS.

Índice de massa do ventrículo esquerdo

A valor médio da massa do ventrículo esquerdo estava aumentada no préoperatório quando comparado ao valor normal máximo preconizado pela *American Society of Echocardiography* (150 g/m²).

O tratamento cirúrgico não produziu alteração significativa desse índice após 12 meses de seguimento clínico (Tabela 9; Figura 9), contudo, a análise da variação do índice de massa do ventrículo esquerdo no início do seguimento e aos 12 meses de pós-operatório com redução de 25% mostrou-se significativa (p<0,05).

| | Ν | MÉDIA | p ENTRE GRUPOS |
|-----------|----|--------|----------------|
| IM PRÉ-OP | 21 | 193±67 | |
| IM POI | 21 | 163±56 | NS |
| IM PO3M | 21 | 157±66 | NS |
| IM PO6M | 21 | 167±74 | NS |
| IM PO9M | 21 | 155±55 | NS |
| IM PO12M | 21 | 145±56 | NS |

Tabela 9- Evolução do índice de massa do ventrículo esquerdo.

N=número de pacientes. Valores médios expressos em gramas/superfície corpórea. IM=índice de massa do ventrículo esquerdo; PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO3M=3° mês de pós-operatório; PO6M=6° mês de pós-operatório; PO9M=9° mês de pós-operatório; PO12M=12° mês de pós-operatório. NS=não significativo. Teste: ANOVA



Figura 9- Evolução do índice de massa do ventrículo esquerdo.

PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. p=NS. Índice de Massa em g/m²

Espessura relativa do ventrículo esquerdo

O valor médio da espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo encontrava-se abaixo dos valores normais (0,40 *vs* 0,45), conforme as diretrizes da *American Society of Echocardiography*. Analisando este dado, em conjunto com a massa do ventrículo esquerdo deste grupo de pacientes estudados, nota-se um padrão de hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo, comum em sobrecarga volumétrica, como na insuficiência mitral.

A espessura relativa não se modificou significativamente ao longo do período de seguimento clínico de 12 meses (Tabela 10; Figura 10) quando comparada aos dados pré-operatórios. Contudo, houve normalização do valor médio (0,45) em associação com uma redução da massa ventricular esquerda, indicando ter havido uma reversão, mesmo que parcial, no processo de remodelamento ventricular após a cirurgia. A variação (média) em 0,02 mm foi significativa ao longo dos 12 meses de seguimento (p<0,05).

| | Ν | MÉDIA | p ENTRE GRUPOS |
|-----------|----|-----------|----------------|
| ER PRÉ-OP | 21 | 0,40±0,08 | |
| ER POI | 21 | 0,45±0,08 | NS |
| ER PO3M | 21 | 0,42±0,10 | NS |
| ER PO6M | 21 | 0,39±0,10 | NS |
| ER PO9M | 21 | 0,43±0,08 | NS |
| ER PO12M | 21 | 0,42±0,10 | NS |

Tabela 10- Evolução da espessura relativa do ventrículo esquerdo.

N=número de pacientes. ER=espessura relativa do ventrículo esquerdo; PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO3M=3° mês de pós-operatório; PO6M=6° mês de pós-operatório; PO9M=9° mês de pós-operatório; PO12M=12° mês de pós-operatório. NS=não significativo. Teste: ANOVA.



Figura 10- Evolução da espessura relativa do ventrículo esquerdo.

PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. p=NS.

Pressão sistólica da artéria pulmonar.

O valor médio da pressão sistólica da artéria pulmonar (41±15 mmHg) encontrava-se elevado durante a avaliação pré-operatória comparado com o valor normal máximo de referência preconizado pela *American Society of Echocardiography* (25 mmHg). O valor máximo verificado foi de 81 mmHg e o mínimo de 26 mmHg.

A análise dos dados ecocardiográficos pré-operatórios permitiu observar a presença de correlação inversa (r=0,50; p<0,05) entre o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e a pressão sistólica da artéria pulmonar (Figura 11).

Após a correção da insuficiência mitral, houve redução significativa dos níveis da pressão sistólica da artéria pulmonar, atingindo, aos 12 meses de seguimento, valores médios próximos à normalidade (Tabela 11; Figura 12). Nenhum paciente apresentava pressão sistólica abaixo de 25 mmHg no início do estudo. Entretanto, ao término dos 12 meses de seguimento, três pacientes estavam com valores abaixo desse nível. O maior valor ao término do período de seguimento foi de 39 mmHg.

Os pacientes foram divididos em dois grupos quanto à pressão sistólica da artéria pulmonar no pré-operatório: superior a 30 mmHg e inferior a 30mmHg. Dos 16 pacientes, do primeiro grupo, nove evoluíram com pressão sitólica da artéria pulmonar superior a 30 mmHg ao término de 12 meses. Dos cinco do segundo grupo, quatro apresentaram diminuição e um manteve-se com nível superior a 30mmHg (Tabela 12).



Figura 11- Correlação da pressão sistólica da artéria pulmonar com diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo.

Spearman *rank* (p<0,05).

| | N | MÉDIA | p ENTRE GRUPOS |
|-------------|----|--------|----------------|
| PSAP PRÉ-OP | 21 | 41±15 | |
| PSAP POI | 21 | 37±13 | NS |
| PSAP PO3M | 21 | 30±5,5 | <0,05 |
| PSAP PO6M | 21 | 31±6,5 | <0,05 |
| PSAP PO9M | 19 | 32±10 | <0,05 |
| PSAP Po12M | 19 | 30±5 | <0,05 |
| | | | |

Tabela 11- Evolução da pressão sistólica da artéria pulmonar.

N=número de pacientes. Valores médios em mmHg.

PSAP=pressão sistólica da artéria pulmonar; PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO3M=3° mês de pós-operatório; PO6M=6° mês de pós-operatório; PO9M=9° mês de pós-operatório; PO12M=12° mês de pós-operatório. NS=não significativo. Teste: ANOVA.



Figura 12- Evolução da pressão sistólica da artéria pulmonar.

PRÉ-OP=pré-operatório; POI=pós-operatório imediato; PO 3M=3° mês de pós-operatório; PO 6M=6° mês de pós-operatório; PO 9M=9° mês de pós-operatório; 12M=12° mês de pós-operatório. *p<0,05.

| | PRÉ-OP | PO 12M |
|----------------|--------|---------------|
| | N=21 | PSAP > 30mmHg |
| PSAP > 30 mmHg | 16 | 09 * |
| PSAP < 30 mmHg | 05 | 01 |

Tabela 12- Persistência da PSAP > 30 mmHg em comparação aos níveis pré-operatórios.

* p<0,05(Mac Nemar)

PSAP=pressão sistólica da artéria pulmonar; PRÉ-OP=pré-operatório; PO12M=pós-operatório de 12 meses.

4.2- Análise estrutural do miocárdio

4.2.1- Alterações histológicas

A avaliação histológica das amostras do miocárdio dos pacientes portadores de insuficiência mitral revelou intensa degeneração hidrópica dos cardiomiócitos (Figura 13 A-B). A coloração com tricrômio de Masson revelou a presença de fibrose intersticial pronunciada nas amostras de biópsia dos casos de insuficiência mitral, principalmente quando comparadas aos casos de estenose mitral (Figura 13 C).

As amostras do miocárdio sob influência da insuficiência mitral, coradas com picro-sirius, mostraram birefringência vermelha típica de colágeno nas regiões perivasculares e também em áreas ao redor dos cardiomiócitos, sugerindo fibrose reacional e reparadora (Figura 13 D-E). A figura 14 mostra que a densidade do colágeno, calculada por análise computadorizada da imagem do miocárdio corado com picro-sirius, foi maior em amostras dos casos de insuficiência mitral quando comparadas aos de estenose mitral (18 *vs* 4%; p<0,0001). Notou-se correlação negativa (r=-0,74; p<0,001) entre a área de miocárdio corado por picro-sirius e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos casos de IM (Figura 14 A-B).



Figura 13- Histologia do miocárdio de pacientes com insuficiência mitral.

A-B = Hematoxilina –eosina mostrando intensa degeneração hidrópica e desarranjo das miofibrilas;
 C= Tricômico de Masson realçando coloração do interstício; D-E= Picro-sirius evidenciando presença de grande quantidade de colágeno intersticial (peri-vascular e peri-celular).



Figura 14- A= Densidade de colágeno no miocárdio dos pacientes.

IM= insuficiência mitral; EM= estenose mitral.

B= Correlação entre a densidade de colágeno e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (EF) em pacientes com insuficiência mitral.

O exame da ultra-estrutura do miocárdio dos casos de insuficiência mitral mostrou grave dano na maioria dos cardiomiócitos, com sinais de degeneração e atrofia. Observou-se extensa desorganização miofibrilar, perda parcial ou completa de sarcômeros, retículo sarcoplasmático e túbulos T, assim como inúmeras mini-mitocôndrias (Figura 15 A). A matrix extracelular mostrou extensas áreas de fibrose com fibroblastos cercados de grande quantidade de colágeno fibrilar (Figura 15 B).



Figura 15- Microscopia eletrônica do miocárdio de pacientes com insuficiência mitral. A= degeneração sarcomérica, mini-mitocôndrias (mitocondriose); B= miofibroblastos e colágeno pericelular.

4.2.2- Expressão da quinase de adesão focal (FAK) no miocárdio de pacientes com insuficiência mitral.

Amostras de biópsias do subendocárdio obtidas dos pacientes com insuficiência mitral ou estenose mitral foram homogenizadas, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e incubadas com anticorpo anti-FAK ou anticorpo fosfoespecífico anti-FAK-Tyr397.

A figura 16 mostra que a quantidade de FAK detectada por anticorpos anti-FAK em amostras obtidas dos pacientes com insuficiência mitral estava aumentada 9,3 vezes quando comparada às amostras provenientes dos casos de estenose mitral. Amostras dos portadores de insuficiência mitral também mostraram grande aumento (4,2 vezes) da quantidade de FAK detectada por anticorpos anti-FAKTyr397 quando comparadas aos *immunoblottings* obtidos com amostras de pacientes com estenose mitral. A relação entre a quantidade de FAK fosforilada e FAK total estava aumentada aproximadamente 40% nas amostras provenientes dos casos de insuficiência mitral em comparação aos casos de estenose mitral.





FAK=quinase de adesão focal; pFAK=FaK fosforilada no resíduo Tyr397

EM=estenose mitral; IM=insuficiência mitral; *p<0,05.

4.2.3- Análise imuno-histoquímica do miocárdio

A análise imuno-histoquímica foi realizada para determinar a distribuição da FAK no miocárdio dos pacientes com insuficiência mitral e com estenose. Nas amostras do miocárdio obtidas nos casos de insuficiência mitral observou-se intensa marcação com anticorpos anti-FAK nos cardiomiócitos e interstício ao redor destes e ao redor dos vasos sangüíneos (Figura 17 A-B-C). A marcação com anticorpos anti-Vimentina (miofibroblastos) ficou restrita ao interstício (Figura 17 D). Já nas amostras dos pacientes com estenose mitral a marcação anti-FAK esteve restrita aos cardiomiócitos, com discreta marcação nas áreas intersticiais (Figura 17 E) e não houve expressiva marcação com anticorpos anti-Vimentina (Figura 17 F).



Figura 17- Imuno-histoquímica do miocárdio de pacientes com estenose mitral e com insuficiência mitral.

A-B-C= marcação anti-FAK na insuficiência mitral; D= marcação anti-Vimentina na insuficiência mitral; E= marcação anti-FAK na estenose mitral; F= marcação anti-Vimentina na insuficiência mitral.
Encontrou-se correlação positiva entre a densidade de marcação com anticorpo anti-FAK e a área de colágeno corada por picro-sirius (Figura 18 A). Correlação positiva também foi identificada entre a densidade de anti-FaK e a área marcada com anticorpos anti-Vimentina (Figura 18 B).



Figura 18- A-Correlação entre a área ocupada por colágeno e a marcação com anticorpos anti-FAK; B-Correlação entre a marcação com anticorpos anti-FAK e a marcação com anticorpos anti-Vimentina. FAK= quinase de adesão

5- DISCUSSÃO

Avaliamos, neste estudo, os parâmetros clínicos e ecocardiográficos dos pacientes submetidos à cirurgia da válvula mitral por insuficiência. Também realizamos biópsia endocárdica no ato cirúrgico para análise estrutural do miocárdio e análise da expressão da FAK, uma tirosina-quinase cujas evidências indicam participação em múltiplos processos intracelulares ativados por estímulos mecânicos e neuro-humorais. Um grupo controle foi utilizado, constando de pacientes submetidos a cirurgia por estenose mitral, também submetidos à biópsia endocárdica. Este grupo não teve seguimento clínico ou ecocardiográfico por não ser objeto do estudo, portanto, discutiremos a evolução clínica e ecocardiográfica apenas dos pacientes com insuficiência mitral.

Nossos resultados mostraram que, após a cirurgia corretiva de insuficiência mitral, houve melhora dos sintomas e reversão de alterações ecocardiográficas presentes no pré-operatório. A análise histológica de biópsia subendocárdica mostrou degeneração de miócitos, extensa fibrose intersticial que se correlacionou com a disfunção do ventrículo esquerdo em pacientes portadores de insuficiência mitral. Observou-se aumento da expressão da FAK e p-FAK no miocárdio desses pacientes e sua distribuição preferencial em miócitos cardíacos e em células intersticiais no miocárdio dos pacientes com insuficiência mitral.

Aspectos relacionados à evolução clínica dos pacientes portadores de insuficiência mitral

A evolução clínica de pacientes portadores de insuficiência mitral depende de variáveis bem estabelecidas, como idade, etiologia, disfunção ventricular esquerda, hipertensão arterial pulmonar, disfunção do ventrículo direito, resultado de plastia valvular, presença de prótese, necessidade de anticoagulação prolongada, fenômenos trom-bo-embólicos, alterações do ritmo cardíaco, entre outros (OTTO C, 2004).

Neste estudo, excluímos pacientes portadores de outra doença valvular, doença das artérias coronárias, hipertensão arterial sistêmica, e diabetes mellitus. Obtivemos, assim, uma casuística específica de pacientes portadores de insuficiência mitral orgânica.

Vinte e um pacientes portadores de insuficiência mitral foram estudados, nos quais a etiologia prevalente foi a degeneração mixomatosa com prolapso da válvula mitral (n=15). Não observamos óbito no pós-operatório, nem durante o seguimento tardio de 12 meses.

Alguns estudos prévios mostraram baixa mortalidade operatória e tardia em pacientes com degeneração mixomatosa (DAVID TE et al, 1993), o mesmo não foi evidenciado em presença de etiologia isquêmica (HENDREN et al, 1991; ENRIQUEZ-SARANO M et al, 1995). A doença reumática, responsável pela insuficiência mitral em sete pacientes de nossa casuística, também apresenta maior mortalidade operatória, quando comparada à etiologia mixomatosa (FERNANDEZ J et al, 1993; BERNALJM et al, 1993). Não evidenciamos diferenças nas evoluções dos pacientes quanto à etiologia, idade ou gênero. Isto, provavelmente, deveu-se ao tipo de abordagem utilizada.

Avaliamos a evolução dos sintomas de insuficiência cardíaca e pudemos evidenciar melhora significativa dos sintomas após a correção cirúrgica durante o seguimento de 12 meses. Esta melhora mostrou-se evidente desde o 3º mês pós-operatório, sugerindo ser a presença do refluxo mitral, com conseqüente transmissão retrógrada da pressão para o interior do átrio esquerdo e capilar pulmonar, o fator determinante no aparecimento dos sintomas de dispnéia neste grupo estudado, e não a presença de disfunção ventricular em si, embora mesmo nos casos de disfunção ventricular avançada tenha sido relatado melhora dos sintomas após a correção da insuficiência, independentemente de haver ou não melhora da função ventricular. Alguns autores demonstraram essa melhora dos sintomas após a cirurgia em seguimento de curto a médio prazo (GALLOWAY AC et al, 1988; CHAFFIN JS et al, 1979).

A presença de sintomas em pequenas atividades e repouso (classe funcional III-IV) é forte preditor de evolução clínica tardia desfavorável após a cirurgia, sendo maiores a mortalidade e prevalência de insuficiência cardíaca nos pacientes sintomáticos, quando comparados com os pacientes assintomáticos ou pouco sintomáticos (classe funcional I-II). TRIBOULLY CM e colaboradores (1999); demonstraram, além de maior mortalidade operatória, menor sobrevivência em 10 anos para os pacientes em classe funcional III-IV, ao serem comparados com aqueles em classe I-II (48%±4% vs 76%±5%).

Nossos resultados mostraram que pacientes inicialmente em classe III-IV, apresentaram maior probabilidade de continuar sintomáticos ao final de 12 meses. Corroborando nossos achados, em análise multivariada, ENRIQUEZ-SARANO, M e colaboradores 1995 descreveram que a presença de classe funcional III-IV pré-operatória está associada à maior incidência de insuficiência cardíaca em seguimento tardio.

Aspectos relacionados à função ventricular esquerda

As dificuldades relacionadas com a determinação da função ventricular esquerda na insuficiência mitral decorrem da redução da pós-carga, conseqüente da ejeção de parte do volume sistólico para o interior do átrio esquerdo. Vários parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos foram avaliados visando a identificar precocemente a disfunção contrátil, que evitaria a deterioração irreversível, podendo assim servir de apoio à decisão terapêutica.

Os principais parâmetros de função do ventrículo esquerdo avaliados em vários estudos foram: fração de ejeção, diâmetros e volumes ventriculares, em especial o sistólico final, estresse da parede ventricular, e as relações entre o volume e pressão no final da sístole ventricular , denominada elastância (ENRIQUEZ-SARANO M et al, 1994; ENRIQUEZ-SARANO M et al, 1994; CRAWFORD MH et al, 1990; ZILE MR et al, 1984; BOROW KM et al, 1980; STARLING MR et al, 1993).

Neste estudo, avaliamos o comportamento da fração de ejeção e dos diâmetros ventriculares, como parâmetros da função ventricular esquerda.

A média das frações de ejeção dos pacientes estudados encontrava-se dentro da normalidade ($66\%\pm12\%$), e não se modificou significativamente ao longo do seguimento, contudo, o comportamento da fração de ejeção diferiu entre aqueles que apresentavam valores superiores e valores inferiores a 60%. Os pacientes, que ao término de 12 meses apresentavam fração de ejeção inferior a 60% eram, em sua maioria, provenientes do grupo de pacientes com rebaixamento prévio da fração de ejeção. Estudos realizados, com amostra maior que a estudada por nós, demonstraram prognóstico pior em pacientes com fração de ejeção inferior a 50% ou 60% (PHILLIPS HR et al, 1981; ENRIQUEZ-SARANO M et al, 1994; ENRIQUEZ-SARANO M et al, 1994; BOROW KM et al, 1980), que determinou sua inclusão nas diretrizes da "*American Heart Association / American College of Cardiology*", como parâmetro, abaixo do qual se deva considerar a indicação de correção cirúrgica da insuficiência mitral por comprometimento da função ventricular (BONOW RO et al, 1998).

MATSUMURA T e colaboradores (2003) evidenciaram correlação entre a fração de ejeção do ventrículo esquerdo pré-operatória e a fração de ejeção observada tardiamente após a cirurgia, semelhante à tendência por nós detectada.

Outro aspecto que devemos considerar quando avaliamos nossos resultados, consiste no fato de termos estudado uma população onde a preservação do aparelho sub-valvular mitral ocorreu na grande maioria dos casos, seja por plastia (n=13), seja por troca da válvula com preservação do aparelho sub-valvular (n=4).

Classicamente, é descrita uma redução substancial da fração de ejeção do ventrículo esquerdo após a cirurgia (CRAWFORD MH et al, 1990). Isto se deve, em parte, à alteração de pós-carga que a correção do refluxo mitral impõe ao ventrículo esquerdo. Contudo, sabe-se hoje que o aparelho sub-valvular desempenha papel fundamental na manutenção da geometria ventricular, prevenindo dilatação e conseqüente piora funcional (LILLEHEI CW et al, 1964; CARABELLO BA et al, 1992).

Vários estudos foram realizados com o intuito de demonstrar a importância da preservação do aparelho valvular na função do ventrículo esquerdo. ENRIQUEZ-SARANO M e colaboradores (1995) demonstraram ser a plastia mitral superior à troca quando se avalia a ocorrência de morte ou insuficiência cardíaca em 10 anos. ROZICH JD e colaboradores (1992) demonstraram redução substancial da fração de ejeção quando não se realiza a preservação do aparelho sub-valvular, o que não ocorreu nos pacientes onde esta técnica foi utilizada.

Pudemos notar, neste estudo, uma diminuição do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo após a correção cirúrgica, o que se explica pela correção da sobrecarga volumétrica através da cirurgia.

A média dos diâmetros sistólicos finais do ventrículo esquerdo encontrava-se dentro dos limites de normalidade e abaixo de 45 mm, parâmetro este considerado indicativo de cirurgia pelas diretrizes da "*American Heart Association / American College of Cardiology*" (BONOW RO et al, 1998). Após a cirurgia, não observamos alteração significativa neste parâmetro. Estando estes valores dentro da normalidade no pré-operatório não esperávamos redução significativa após a cirurgia. Valores de diâmetros sistólicos finais muito aumentados estão associados a alta mortalidade no pós-operatório e presença de insuficiência cardíaca (WISENBAUGH T et al, 1994).

Aspectos do remodelamento ventricular ao ecocardiograma

Os casos por nós estudados mostraram presença de remodelamento excêntrico do ventrículo esquerdo, caracterizado por aumento da massa ventricular e diminuição da espessura relativa da parede ventricular (AURIGEMMAGP et al, 1995).

Na evolução pós-operatória dos pacientes notamos diminuição da massa ventricular em 25% após 12 meses de seguimento, apesar da ausência de significância estatística. O mesmo aconteceu com a espessura relativa do ventrículo esquerdo, que se aproximou da faixa de normalidade ao ecocardiograma. Corroborando nossos achados, STARLING e colaboradores (1995) evidenciaram diminuição do volume diastólico final após 12 meses de seguimento. A fração de ejeção e o volume sistólico final não se modificaram significativamente. O referido autor avaliou o comportamento da elastância e, a despeito de melhora após 12 meses, os pacientes com pior remodelamento ventricular pré-operatório foram os que tiveram maior comprometimento da função ventricular tardiamente.

Aspectos relacionados à pressão da artéria pulmonar

A pressão da artéria pulmonar foi estimada em nosso estudo através do jato regurgitante da válvula tricúspide.

Observamos elevação dos níveis de pressão sistólica da artéria pulmonar no pré-operatório dos pacientes portadores de insuficiência mitral com redução significativa após o tratamento cirúrgico.

A hipertensão pulmonar pode surgir durante a evolução clínica da insuficiência mitral indicando prognóstico desfavorável (CRAWFORD MH et al, 1990). No referido estudo, os autores constataram, assim como nós, que, após a cirurgia, ocorreu redução significativa dos níveis de pressão da artéria pulmonar e, além disso, redução do volume sistólico final do ventrículo esquerdo, sendo a pressão média da artéria pulmonar inferior a 20 mmHg um importante preditor de reversão da dilatação ventricular com o tratamento cirúrgico. O nível de pressão média superior a 20 mmHg foi preditor de índices de volume diastólico final superiores a 101ml/m².

Nossos resultados apontaram a presença de correlação negativa entre o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e a pressão sistólica da artéria pulmonar.

Os mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão pulmonar são distintos em cada fase da doença. KIRKILIN & BARRAT-BOYES (1993) discutiram que a hipertensão pulmonar no pré-operatório resulta da associação de dois fatores: da transmissão do aumento da pressão intra-atrial para o território pulmonar e do aumento da resistência vascular pulmonar. O aumento da resistência vascular pulmonar deve-se, por sua vez, à reatividade vascular e às alterações vasculares estruturais. O primeiro fator regride imediatamente após a correção cirúrgica, enquanto o segundo tem caráter persistente.

Entendemos que em nossos pacientes prevaleceu o fator de transmissão de pressão e reatividade vascular, uma vez que observamos rápida redução dos níveis de pressão sistólica da artéria pulmonar após a cirurgia (DE GAETANO G et al, 1993).

Assim, os pacientes por nós estudados com diâmetros diastótico final do ventrículo esquerdo maiores e níveis elevados de pressão sistólica da artéria pulmonar, provavelmente encontravam-se em fase inicial do remodelamento ventricular, sem que houvesse tempo para que ocorresse maior dilatação ventricular e hipertensão pulmonar secundária a remodelamento vascular definitivo.

LEE JD e colaboradores (1985) mostraram em cães que o processo adaptativo do ventrículo esquerdo e conseqüente aumento dos diâmetros coincidia com redução do estresse da parede ventricular, e que este fenômeno não ocorria de imediato após o aparecimento da insuficiência mitral.

Portanto, é possível que a presença de diâmetro diastólico final pequeno e hipertensão pulmonar sejam indicativos de redução da pressão sistólica da artéria pulmonar após a correção da insuficiência mitral.

Alterações estruturais do miocárdio, fibrose miocárdica e disfunção ventricular

A insuficiência mitral é uma doença valvular prevalente, que evolui com progressivo remodelamento ventricular, e, com freqüência, acarreta disfunção ventricular e insuficiência cardíaca.

Os mecanismos envolvidos na disfunção ventricular presente na insuficiência mitral não estão claramente elucidados até o momento.

O impacto contínuo da sobrecarga imposta pelo refluxo valvular desempenha papel importante na deterioração da arquitetura e função miocárdica nesses pacientes (SPINALE FG et al, 1993). A perda de proteínas e elementos contráteis demonstrada em modelos animais (URABE Y et al, 1992), assim como uma maior adaptação às custas de redução na degradação e não aumento na síntese protéica (MATSUO T et al, 1998) podem estar envolvidos nos mecanismos que levam à disfunção ventricular na insuficiência mitral. Além disso, alterações relacionadas ao metabolismo do cálcio e suas consequentes sido relatadas implicações na relação força-freqüência também têm (MULIERI LA et al, 1993).

Demonstramos no presente estudo, em pacientes com insuficiência mitral, a presença de degeneração dos cardiomiócitos, com acúmulo de água citoplasmática, desarranjo das miofibrilas, perda da integridade dos sarcômeros e mitocondriose. Associado a isso, ficou evidente a presença de intensa fibrose intersticial identificando acúmulo de colágeno, grande número de miofibroblastos de morfologia normal à microscopia eletrônica circundados de fibras colágenas. Este acúmulo de colágeno no interstício dos pacientes com insuficiência mitral foi significativamente maior que o observado nos pacientes do grupo controle com estenose mitral, e também superior à área ocupada por colágeno no ventrículo esquerdo do adulto normal, que representa de 2-4% da área total (revisado por WEBER & BRILLA, 1991).

O resultado mais relevante por nós obtido mostrou que a área ocupada por fibrose correlacionou-se negativamente com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, colocando, de forma evidente, a presença da fibrose como fator envolvido na deterioração da função ventricular em pacientes com insuficiência mitral. Alguns estudos previamente realizados, com metodologias diferentes da nossa, demonstraram a vinculação entre a fibrose miocárdica e a piora funcional (ZILE MR et al,2002; MATSUO T et al,1998; FUSTER V et al, 1977). BROWER GJ & JANICKI JS (2001) demonstraram em modelo animal (rato) de sobrecarga volumétrica, um aumento da atividade das metaloproteinases, estando, esse, associado a alterações no remodelamento ventricular. Além disso, diversas linhas de evidências indicam que o estresse mecânico, agonistas de GPCR, como a angiotensina II e a endotelina, e também, citoquinas inflamatórias, como TNF-B, estejam envolvidos na patogênese das mudanças estruturais e funcionais que acompanham o remodelamento ventricular em pacientes com insuficiência mitral (SPINALE FG et al, 1993; ORAL H et al, 2003; DELLI'ITALIA LJ et al, 1995; SEKIGUCHIK K et al, 2004).

Expressão da Quinase de Adesão Focal, resposta adaptativa e fibrose miocárdica

A FAK é ativada pelo estiramento e estresse de cisalhamento (*shear stress*) assim como pelos agonistas de fatores de crescimento, citoquinas e receptores acoplados da proteína G, em vários tipos celulares do miocárdio (SEKO Y et al,1999; AIKAWA R et al,

2002; TORSONI AS et al, 2003; FRANCHINI KG et al, 2000; LI S et al,1997; LI S et al, 2002; YANO Y et al, 1996; LI C et al,2003; LEHOUX S et al, 2005; SAI X et al, 1999; PARSONS JT et al,2003; THANNICKAL VJ et al, 2003).

Nosso estudo evidenciou que a expressão da FAK, assim como sua fosforilação no resíduo Tyr397 estão aumentadas no miocárdio dos pacientes portadores de insuficiência mitral e sintomas de insuficiência cardíaca quando comparados com os pacientes portadores de estenose mitral que apresentam o ventrículo esquerdo protegidos de sobrecarga hemodinâmica. Os achados de correlação positiva entre as áreas marcadas com anticorpos anti-FAK com áreas ocupadas por colágeno, assim como a correlação negativa entre as áreas ocupadas por colágeno e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo sugerem que a FAK pode desempenhar papel na fibrose e, presumivelmente, na deterioração da função cardíaca em pacientes com insuficiência mitral.

Demonstramos no presente estudo que, em amostras provenientes do miocárdio de pacientes com insuficiência mitral, a área ocupada pela marcação anti-FAK foi paralela às áreas de fibrose intersticial, indicando que o aumento na expressão e fosforilação da FAK, observadas em *immunoblottings* podem estar relacionadas à maior expressão e atividade dessa quinase em células intersticiais. A demonstração de que a marcação com anticorpos anti-FAK correlaciona-se com a marcação com anticorpos anti-Vimentina indica que as células intersticiais marcadas com anticorpos anti-FAK são possivelmente miofibroblastos (GUMA FCR et al, 2001). Conseqüentemente, a maior expressão e atividade da FAK em células intersticiais podem indicar um aumento na atividade biológica de miofibroblastos.

De acordo com o exposto, a microscopia eletrônica do miocárdio de pacientes com insuficiência mitral mostrou, como já citado, grande número de miofibroblastos circundados de fibras colágenas. Este dado em conjunto com a demonstração de deterioração funcional avaliada pela redução da fração de ejeção, que se relacionou com a área do miocárdio ocupada por colágeno, são compatíveis com a idéia de envolvimento de mecanismos de sinalização via FAK nas células intersticiais. Assim, é possível que a FAK desempenhe papel na patogênese da fibrose intersticial e deterioração funcional que acompanha o remodelamento cardíaco em pacientes com insuficiência mitral. Este raciocínio tem o suporte de evidências indicativas de que a sinalização celular via FAK influencia vários aspectos da biologia do fibroblasto incluindo adesão celular, migração, proliferação e diferenciação, que estão envolvidos no recrutamento e ativação de fibroblastos como parte da resposta reparadora à injúria tecidual (ILIC D et al, 2004; VITTAL R et al, 2005).

Demonstramos previamente que a FAK está localizada nos cardiomiócitos em miocárdio de ratos (DOMINGOS PP et al, 2002; FONSECA PM et al, 2005).

No presente estudo, notamos em amostras do miocárdio de pacientes portadores de estenose mitral e insuficiência mitral a marcação com anticorpos anti-FAK nos cardiomiócitos, apesar de notarmos que em pacientes com insuficiência mitral a marcação anti-FAK tenha sido mais evidente no interstício cardíaco. A abundância da expressão da FAK é consistente com o papel desempenhado por essa quinase na sinalização nos cardiomiócitos. Neste sentido, várias evidências indicam envolvimento da sinalização via FAK no crescimento hipertrófico e sobrevivência em miócitos cardíacos submetidos a estresse mecânico. Em estudos utilizando cardiomiócitos isolados, assim como no miocárdio de ratos, demonstramos que a FAK não é apenas rapidamente ativada, como também está envolvida na expressão do programa genético relacionado à hipertrofia por estiramento celular (TORSONI AS et al, 2003; TORSONI AS et al, 2005; NADRUZ W et al, 2005).

Recentemente, foi demonstrada a importância crítica da FAK na adição em série de cardiomiócitos submetidos novos sarcômeros nos а estresse (MASOUR H et al, 2004). Isto, possivelmente, aumenta o comprimento dos sarcômeros em repouso, contribuindo para o remodelamento e a restauração da tensão em repouso nos cardiomiócitos submetidos a estiramento em condições de sobrecarga volumétrica mantida, como se observa na insuficiência mitral. Além disso, a ativação da FAK no miocárdio de ratos expostos à sobrecarga pressora ocorreu paralelamente à ativação da AKT (FRANCHINI KG et al, 2000). A AKT participa de vias de sinalização que regulam múltiplos processos celulares, incluindo metabolismo de glicose, sobrevivência, expressão gênica e proliferação celular (CHAN TO et al, 1999). Estudos demonstraram que a AKT medeia efeitos anti-apoptóticos da FAK (CHEN HC et al, 1996). Assim, a FAK por influência de múltiplas funções regulatórias envolvidas no remodelamento hipertrófico e sobrevivência do cardiomiócito, contribui para mudanças na arquitetura cardíaca e função nos corações de pacientes com insuficiência cardíaca.

Portanto, investigamos a expressão, fosforilação e distribuição da FAK no miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca por insuficiência mitral. Um importante e novo achado do nosso estudo é a correlação entre a expressão aumentada da FAK e a maior presença de fibrose intersticial nesses pacientes. Considerando que as vias de sinalização da FAK regulam a expressão de genes induzidas por sobrecarga em cardiomiócitos, é possível pressupor que esta quinase pode ter papel crítico na patogênese do remodelamento ventricular das câmaras cardíacas. Neste contexto, a FAK deve ser considerada como alvo para novas abordagens terapêuticas do remodelamento cardíaca.

6- CONCLUSÕES

- O tratamento cirúrgico da insuficiência mitral proporcionou melhora clínica, assim como reversão das alterações ecocardiográficas.
- 2- A classe funcional avançada, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo rebaixada e a pressão sistólica da artéria pulmonar elevada, no pré-operatório, mostraram-se importantes na determinação de suas alterações no pós-operatório.
- 3- A fibrose intersticial, em pacientes com insuficiência mitral, mostrou-se intensa e relacionada à disfunção do ventrículo esquerdo, sugerindo seu papel deletério na função miocárdica desses pacientes.
- 4- O aumento da expressão da quinase de adesão focal e sua distribuição preferencial no interstício, possivelmente em fibroblastos, sugere que essa proteína contribui para a gênese da fibrose intersticial em pacientes com insuficiência mitral e insuficiência cardíaca.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, R.; NAGAI T.; KUDOH S.; ZOU, Y.; TANAKA, M.; TAMURA, M. et al. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. **Hypertension**. 39: 233–238, 2002.

ALENGHAT, F.J.; INGBER, D.E. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. **Sci STKE**. (119): PE6, 2002.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. 2005 Heart and Stroke Statistical Update. Texas, USA, 2005.

AURIGEMMA, G.P.; GAASCH, W.H.; VILLEGAS, B.; MEYER, T.E. Noninvasive assessment of left ventricular mass, chamber volume, and contractile function. **Curr Probl Cardiol**. 20(6): 361-440, 1995.

BERNAL, J. M.; RABASA, J.M.; VILCHEZ, F.G.; CAGIGAS, J.C.; REVUELTA J.M. et al. Mitral valve repair in rheumatic disease. The flexible solution. **Circulation**. 88(4 Pt 1): 1746-1753, 1993.

BONOW, R.O.; CARABELLO, B.; DE LEON, A.C.Jr.; EDMUNDS, L.H.; FEDDERLY, B.J.; FREED, M.D. et al. Guidelines for the management of patients with valvular heart disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients with Valvular Heart Disease). **Circulation**. 98(18): 1949-1984, 1998.

BOROW, K.M.; GREEN, L.H.; MANN, T.; SLOSS, L.J.; BRAUNWALD, E.; COLLINS, J.J.; COHN, L.; GROSSMAN, W. End-systolic volume as a predictor of postoperative left ventricular performance in volume overload from valvular regurgitation. **Am J Med**. 68(5): 655-663, 1980.

BRAUNWALD, E.; AVE, W.C. The syndrome of severe mitral regurgitation with normal left atrial pressure. **Circulation**. 27: 29-35, 1963.

BROWER, G.L.; JANICKI, J.S. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 280(2): H674-683, 2001.

BURGESS, M.L.; BUGGY, J.; PRICE, R.L.; ABEL, F.L.; TERRACIO, L.; SAMAREL, A.M. et al. Exercise- and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts. **Am J Physiol**. 270(1 Pt 2): H151-159, 1996.

CALALB, M.B.; POLTE, T.R.; HANKS, S.K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. **Mol Cell Biol**. 15(2): 954-963, 1995.

CARABELLO, B.A,; NAKANO, K.; CORIN, W.; BIEDERMAN, R.; SPANN, J.F.JR. Left ventricular function in experimental volume overload hypertrophy. **Am J Physiol**. 256(4 Pt 2): H974-981, 1989.

CARABELLO, B.A.; NOLAN, S.P.; MCGUIRE, L.B. Assessment of preoperative left ventricular function in patients with mitral regurgitation: Value of the end-systolic wall stress-end-systolic volume ratio. **Circulation**. 64: 1212-1217, 1981.

CARABELLO, B.A. Progress in mitral and aortic regurgitation. **Curr Probl Cardiol**. 28: 553, 2003.

CARABELLO, B.A. The changing unnatural history of valvular regurgitation. **Ann Thorac Surg**. 53(2):191-199, 1992.

CARABELLO, B.A.; WILLIANS, H.; GASH, A.K.; KENT, R.; BELBER, D.; MAURER A. et al. Hemodynamiv predictors of outcome in patients undergoing valve-replacement. **Circulation**. 74: 1309-1316, 1986.

CARO, C.G.; PEDLEY, T.J.; SHROTER, R.C.; SEED, W.A. The mechanics of the circulation. **Oxford University Press**, 1978.

CHAN, T.O.; RITTENHOUSE, S.E.; TSICHLIS, P.N. Akt/PKB and other D3 phosphoinositides-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. **Annu Rev Biochem**. 68: 965–1014, 1999

CHAFFIN, J.S.; DAGGETT, W.M. Mitral valve replacement: a nine-year follow-up of risks and survivals. **Ann Thorac Surg**. 27(4): 312-9, 1979.

CHAPMAN, D.; WEBER, K.T.; EGHBALI, M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. **Circ Res**. 67(4): 787-94, 1990.

CHEN, H.C.; APPEDDU, P.A.; ISODA, H.; GUAN, J.L. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem**. 271: 26329-26334, 1996.

CHIEN, K.R. Stress pathways and heart failure. Cell. 98:555–558, 1999.

CLARK, E.A.; BRUGGE, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science**. 268: 233-239, 1995.

CLELAND, J.G.; KHAND, A.; CLARK, A. The heart failure epidemic: Exactly how big is it? **Eur Heart J**. 22: 623-626, 2001.

COHN, J.N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol. 35(3): 569-582, 2000.

COOPER, G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. **Annu Rev Physiol**. 49: 501-518, 1987.

CORIN, W.J.; MONRAD, E.S.; MURAKANI, T.; NONOGI H.; HESS O.M.; KRAYENBUEHL, H.P. The relationship of afterload to ejection performance in chronic mitral regurgitation. **Circulation**. 76(1): 59-67, 1987.

COWIE, M.R.; MOSTERD, A.; WOOD, D.A.; DECKERS, J.W.; POOLE-WILSON. P.A.; SUTTON, G.C. et al. The epidemiology of heart failure. **Eur Heart J**. 18: 208-225, 1997.

CRAWFORD, M.H.; SOUCHEK, J.; OPRIAN, C.A.; MILLER, D.C.; RAHIMTOOLA, S.; GIACOMINI, J.C.; et al. Determinants of survival and left ventricular performance after mitral valve replacement. Department of Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease. **Circulation**. 81(4): 1173-1181, 1990.

DAVID, T.E.; ARMSTRONG, S.; SUN, Z.; DANIEL, L. Late results of mitral valve repair for mitral regurgitation due to degenerative disease. **Ann Thorac Surg**. 56(1): 7-12, 1993.

DAVID, T.E.; UDEN, D.E.; STRAUSS, H.D. The importance of the mitral apparatus in left ventricular function after correction of mitral regurgitation. **Circulation**. 68(3 Pt 2): II76-82, 1983.

DE GAETANO, G.; BARBERIS, L.; DOTTORI, V.; PARODI E.; PICASSO, F., LIJOI, A. et al. Serial Doppler echocardiography follow-up studies in the postoperative evaluation of severe pulmonary hypertension following surgery for mitral and mitral-aortic defects. **Minerva Cardioangiol**. 41(7-8): 313-7, 1993.

DELL'ITALIA, L.J.; MENG, Q.C.; BALCELLS, E.; STRAETER-KNOWLEN, I.M.; HANKES, G.H.; DILLON, R. et al. Increased ACE and chymase-like activity in cardiac tissue of dogs with chronic mitral regurgitation. **Am J Physiol**. 269: H2065–H2073, 1995.

EBLE, D.M.; STRAIT, J.B.; GOVINDARAJAN, G.; LOU, J.; BRYRON, K.L.; SAMAREL, A.M. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 278(5): H1695-707, 2000.

ENRIQUEZ-SARANO, M.; FREEMAN, W.K.; TRIBOUILLOY, C.M.; ORSZULAK, T.A.; KHANDHERIA, B.K.; SEWARD, J.B. Progression of mitral regurgitation: a prospective Doppler echocardiographic study. **J Am Coll Cardiol**. 34(4): 1137-1144, 1999.

ENRIQUEZ-SARANO, M.; SCHAFF, H.V.; ORSZULAK, T.A.; BAILEY, K.R.; TAJIK, A.J.; FRYE, R.L. Congestive heart failure after surgical correction of mitral regurgitation. A long-term study. **Circulation**. 92(9): 2496-2503, 1995.

ENRIQUEZ-SARANO, M.; SCHAFF, H.V.; ORSZULAK, T.A.; TAJIK, A.J.; BAILEY, K.R.; FRYE, R.L. Valve repair improves the outcome of surgery for mitral regurgitation. A multivariate analysis. **Circulation**. 91(4): 1022-1028, 1995.

ENRIQUEZ-SARANO, M.; TAJIK, A.J.; SCHAFF, HV.; ORSZAULAK, T.A.; BAILEY, K.R.; FRYE, R.L. Echocardiographic prediction of survival after surgical correction of organic mitral regurgitation. **Circulation**. 90(2): 830-837, 1994.

ENRIQUEZ-SARANO, M.; TAJIK, A.J.; SCHAFF, H.V.; ORSZULAK, T.A.; MCGOON, M.D.; BAILEY, K.R. et al. Echocardiographic prediction of left ventricular function after correction of mitral regurgitation: results and clinical implications. **J Am Coll Cardiol**. 24(6): 1536-1543, 1994.

FEIGENBAUM, H. Hemodynamic Information Derived from Ecchocardiography. In: FEIGENBAUM, H. Echocardiography. Malvern, Pennsylvania: Lea & Febiger, 1994. p. 181-215.

FERNANDEZ, J.; JOYCE, D.H.; HIRSCHFELD, K.J.; CHEN, C.; YANG, S.S.; LAUB, G.W. Valve-related events and valve-related mortality in 340 mitral valve repairs. A late phase follow-up study. **Eur J Cardiothorac Surg**. 7(5): 263-270, 1993.

FONSECA, P.M.; INOUE, R.Y.; KOBARG, C.B.; CROSARA-ALBERTO, D.P.; KOBARG, J.; FRANCHINI, K.G. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. **Circ Res.** 96: 73-81, 2005

FRANCHINI, K.G.; TORSONI, A.S.; SOARES, P.H.A.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.

FUSTER, V.; DANIELSON, M.A.; ROBB, R.A.; BROADBENT, J.C.; BROWN, A.L.Jr.; ELVEBACK, L.R. Quantitation of left ventricular myocardial fiber hypertrophy and interstitial tissue in human hearts with chronically increased volume and pressure overload. **Circulation**. 55(3): 504-508, 1977.

GALLOWAY, A.C.; COLVIN, S.B.; BAUMANN, F.G.; ESPOSITO, R.; VOHRA, R.; HARTY, S. Long-term results of mitral valve reconstruction with Carpentier techniques in 148 patients with mitral insufficiency. **Circulation**. 78(3 Pt 2): 197-105, 1988.

GARG, R.; YUSUF, S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. **JAMA**. 273(18): 1450-1456, 1995.

GHEORGUIADE, M.; BONOW, R.O. Chronic Heart Failure in the United States. A Manifestation of Coronary Artery Disease. **Circulation**. 97: 282-289,1998.

GIANCONTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. Science. 285: 1028-1032, 1999.

GOLDMAN, M.E.; MORA, F.; GUARINO, T.; FUSTER, V.; MINDICH, B.P. Mitral valvuloplasty is superior to valve replacement for preservation of left ventricular function: an intraoperative two-dimensional echocardiographic study. **J Am Coll Cardiol**. 10(3): 568-575, 1987.

GRIGIONI, F.; ENRIQUEZ-SARANO, M.; LING, L.H.; BAILEY, K.R.; SEWARD, J.B.; TAJIK, A.J et al. Sudden death in mitral regurgitation due to flail leaflet. **J Am Coll Cardiol**. 34(7): 2078-85, 1999.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest**. 56(1): 56-64, 1975.

GUAN, J.L.; TREVITHICK, J.E.; HYNES, R.O. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. **Cell Regul**. 2(11): 951-64. 1991.

GUMA, F.C.R.; MELLO, T.G.; MERMELSTEIN, C.S.; FORTUNA, V.A.; WOFCHUK S.T.; GOTTFRIED, C. et al. Intermediate filament modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. **Biochemistry and Cell Biology**. 79: 409-417, 2001.

GUNTHER, S.; GROSSMAN, W. Determinants of ventricular function in pressureoverload hypertrophy in man. **Circulation**. 59(4): 679-88, 1979.

HANKS, S.K.; CALALB, M.B.; HARPER, M.C.; PATEL, S.K. Focal adhesion proteintyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 89(18): 8487-8491, 1992.

HENDREN, W.G.; NEMEC, J.J.; LYTLE, B.W.; LOOP, F.D.; TAYLOR, P.C.; STEWART, R.W. et al. Mitral valve repair for ischemic mitral insufficiency. **Ann Thorac Surg**. 52(6): 1246-1251, 1991.

HENNEIN, H.A.; JONES, M.; STONE, C.D; CLARK R.E. Left ventricular function in experimental mitral regurgitation with intact chordae tendineae. J Thorac Cardiovasc Surg. 105(4): 624-32, 1993.

HENNEIN, H.A.; SWAIN, J.A; MCINTOSH, C.J; BONOW, R.O.; STONE, C.D.; CLARK R.E. Comparative assessment of chordal preservation versus chordal resection during mitral valve replacement. **J. Thorac. Cardiovasc**. Surg. 99: 828-936, 1990.

HO, K.K.; PINSKY, J.L.; KANNEL, W.B.; LEVY, D. The epidemiology of heart failure: The famingham Study. **J Am Coll Cardiol**. 22: 6A-13A, 1993. HOCHREITER, C.; NILES, N.; DEVEREUX, R.B.; KLIGFIELD, P.; BORER, J.S. Mitral regurgitation: relationship of noninvasive descriptors of right and left ventricular performance to clinical and hemodynamic findings and to prognosis in medically and surgically treated patients. **Circulation**. 73(5): 900-12, 1986.

HOES, A.W.; MOSTERD, A.; GROBBEE, D.E. et al. An epidemic of heart failure? Recent evidence from Europe. **Eur Heart J**. 19 Suppl L: L2-9, 1998.

HUNT, A.S.; ABRAHAM, W.T.; CHIN, M.H.; FELDMAN, A.M.; FRANCIS, G.S.; GANIATS, T.G. et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult. **Circulation**. 112: 154-235, 2005.

HYNES, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell. 48: 549-554, 1987.

ILIC, D.; KOVACIC, B.; JOHKURA, K.; SCHLAEPFER, D.D.; TOMASEVIC, N.;HAN, Q. et al. FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. **J Cell Sci**. 117: 177-187, 2004.

ISHIHARA, K.; ZILE, M.R.; TOMITA, M.; TANAKA, R.; KANAZAWA, S. CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy in a canine model of reversible pressure overload. Cardiovasc Res. 26(6): 580-585, 1992.

IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 85(2): 339-343, 1988.

KATZ, A.M. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. **Ann Intern Med**. 121(5): 363-371, 1994.

KIRKILIN, J.K.; BARRAT-BOYES, B.G. Mitral valve disease with or without Tricuspid Valve Disease. In: KIRKILING, J.K; BARRAT-BOYES, B.G. Cardiac Surgery, New York, NY: Churchill Livingstone, p.425-489, 2003

KOMURO, I.; KURABAYASHI, M.; TAKAKU, F.; YAZAKI, Y. Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. **Circ Res**. 62(6): 1075-1079,1988.

KOMURO, I.; YAZAKI, Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. Annu Rev Physiol. 55: 55-75, 1993.

LEE, J.D.; SASAYAMA, S.; KIHARA, Y.; OHYAGI, A.; FUJISAWA, A.; YUI, Y. et al. Adaptations of the left ventricle to chronic volume overload induced by mitral regurgitation in conscious dogs. **Heart Vessels**. 1(1): 9-15, 1985.

LEHOUX S.; ESPOSITO, B.; MERVAL, R.; TEDGUI, A. Differential regulation of vascular focal adhesion kinase by steady stretch and pulsatility. **Circulation**. 111: 643–649, 2005.

LI, S.; BUTLER, P.; WANG, Y.; HU Y.; HAN, D.C.; USAMI, S. et al. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. **Proc Natl** Acad Sci. 99: 3546-3551, 2002.

LI, S.; KIM, M.; HU, Y.L.; JALALI, S.; SCHLAEPFER, D.D.; HUNTER, T. et al. Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. **J Biol Chem**. 1997; 272:30455-62.

LI, C.; WERNIG, F.; LEITGES, M.; HU, Y.; XU, Q. Mechanical stress–activated PKCå regulates smooth muscle cell migration. **FASEB J**. 17: 2106–2108, 2003.

LILLEHEI, C.W.; LEVY, M.J.; BONNABEAU, R.C. Mitral valve replacement with preservation of papillary muscles and chordae tendineae. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 47: 532-543, 1964.

LING, L.H.; ENRIQUEZ-SARANO, M.; SEWARD, J.B.; ORSZULAK, T.A.; SCHAFF, H.V.; BAILEY, K.R. et al. Early surgery in patients with mitral regurgitation due to flail leaflets: a long-term outcome study. **Circulation**. 96(6): 1819-1825, 1997.

LING, L.H.; ENRIQUEZ-SARANO, M.; SEWARD, J.B.; TAJIK, A.J.; SCHAFF, H.V. et al. Clinical outcome of mitral regurgitation due to flail leaflet. **N Engl J Med.** 35(19): 1417-1423, 1996.

LORELL, B.H.; CARABELLO, B.A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**. 102(4): 470-9, 2000.

MANSOUR, H.; DE TOMBE, P.P.; SAMAREL, A.M.; RUSSELL, B. Restoration of resting sarcomere length after uniaxial static strain is regulated by protein kinase Cepsilon and focal adhesion kinase. **Circ Res**. 94: 642-649, 2004.

MATSUMURA, T.; OHTAKI, E.; TANAKA, K.; MISU, K.; TOBARU, T.; ASANO, R. et al. Echocardiographic prediction of left ventricular dysfunction after mitral valve repair for mitral regurgitation as an indicator to decide the optimal timing of repair. **J Am Coll Cardiol**. 42(3): 458-63, 2003.

MATSUO, T.; CARABELLO, B.A.; NAGATOMO, Y.; KOIDE, M.; HAMAWAKI, M; ZILE, M.R. et al. Mechanisms of cardiac hypertrophy in canine volume overload. **Am J Physiol**. 275(1 Pt 2): H65-74, 1998.

MEHTA, RH.; SUPIANO, M.A.; ORAL, H.; GROSSMAN, P.M.; MONTGOMERY, D.S.; SMITH, M.J.; et al. Compared with control subjects, the systemic sympathetic nervous system is activated in patients with mitral regurgitation. **Am Heart J**. 145(6): 1078-1085, 2003.

MICHEL, P.L.; IUNG, B.; ABOU JAOUDE, S.; CORMIER, B.; PORTE, J.M.; VAHANIAN, A. et al. The effect of left ventricular systolic function on long term survival in mitral and aortic regurgitation. **J Heart Valve Dis**. 4 Suppl 2: S160-169, 1995.

MULIERI, L.A.; LEAVITT, B.J., MARTIN, B.J.; HAEBERLE, J.R.; ALPERT, N.R. Myocardial force-frequency defect in mitral regurgitation heart failure is reversed by forskolin. **Circulation**. 88(6): 2700-2704, 1993.

NADRUZ, W.Jr.; CORAT, M.A.; MARIN, T.M.; GUIMARÃES PEREIRA, G.A.A.; FRANCHINI, K.G. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. **Cardiovasc Res**. 68(1): 87-97, 2005.

NADRUZ, W.Jr..; KOBARG, C.B., CONSTANCIO, S.S.; CORAT, P.D.C.; FRANCHINI, K.G. Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium regulation by myocyte enhancer factor 2. **Circ Res**. 92: 243-251, 2003.

OLSON, L.J.; SUBRAMANIAN, R.; ACKERMANN, D. M.; ORSZULAK, T.A.; EDWARDS, W.D. Surgical pathology of the mitral valve: a study of 712 cases spanning 21 years. **Mayo Clin Proc**. 62(1): 22-34, 1987.

ORAL, H.; SIVASUBRAMANIAN, N.; DYKE, D.B.; MEHTA, R.H.; GROSSMAN, P.M.; BRIESMIESTER, K.; et al. Myocardial proinflammatory cytokine expression and left ventricular remodeling in patients with chronic mitral regurgitation. **Circulation**. 107(6): 831-7, 2003.

OTTO, C. M. Surgical Intervention for Mitral Regurgitation. In: OTTO, C. M. Valvular Heart Disease. Philadelphia, Pennsylvania: Sauders, 2004. p. 388-414.

OWINGS, M.F.; LAWRENCE, L. Detailed diagnosis and procedures: National Hospital Discharge Survey, 1997. Vital and health statistics. Series 13. No. 145. Washington, DC.: Government Printing Office, 1999.

PARSONS, J.T. Focal adhesion kinase: the first ten years. J Cell Sci.116: 1409-1416, 2003.

PFEFFER, M.A.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation**. 81(4): 1161-1172, 1990.

PHILLIPS, H.R.; LEVINE, F.H.; CARTER, J.E.; BOUCHER, C.A.; OSBAKKEN, M.D.; OKADA, R.D. et al. Mitral valve replacement for isolated mitral regurgitation: analysis of clinical course and late postoperative left ventricular ejection fraction. **Am J Cardiol**. 48(4): 647-654, 1981.

POLTE, T.R.; HANKS, S.K. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crkassociated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK prolinerich motifs. **J Biol Chem**. 272(9):5501-5509, 1997.

RAHIMTOOLA, S.H.; CHEITILIN, M.D.; HUTTER A.M. JR. Cardiovascular disease in the elderly. Valvular and congenital heart disease. **J Am Coll Cardiol**. 10(2 Suppl A): 60A-62A, 1987.

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

ROZICH, J.D.; CARABELLO, B.A.; USHER, B.W.; KRATZ, J.M.; BELL, A.E.; ZILE, M.R. Mitral valve replacement with and without chordal preservation in patients with chronic mitral regurgitation. Mechanisms for differences in postoperative ejection performance. **Circulation**. 86(6): 1718-1726, 1992.

SAI, X.; <u>NARUSE K.</u>; SOKABE, M. Activation of pp60(src) is critical for stretch-induced orienting response in fibroblasts. **J Cell Sci**. 112: 1365-1373, 1999.

SALAZAR, E.P.; ROZENGURT, E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. **J Biol Chem**. 276(21): 17788-17795, 2001.

SAMUEL, J.L.; BARRIEUX, A.; DUFOUR, S.; DUBUS, I.; CONTARD, F.; KOTELIANSKY, V. et al. Accumulation of fetal fibronectin mRNAs during the development of rat cardiac hypertrophy induced by pressure overload. **J Clin Invest**. 88(5): 1737-1746, 1991.

SCHALLER, M.D.; BORGMAN, J.T.; COBB, B.S.; VINES, R.R.; REYNOLDS, A.B.; PARSONS, J.T. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine quinase associated with focal adhesions. **Proc Nat Acad Sci USA**. 89: 5192-5196, 1992.

SCHLAEPFER, D.D.; HANKS, S.K.; HUNTER, T.; VAN DER GEER, P. Integrinmediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. **Nature**. 372(6508): 786-791, 1994.

SCHULER, G.; PETERSON, K.L.; JOHNSON, A.; FRANCIS, G.; DENNISH, G.; UTLEY, J.; DAILY, P.O.; ASHBURN, W.; ROSS J.JR. Temporal response of left ventricular performance to mitral valve surgery. **Circulation**. 59: 1218-1231, 1979.

SEKIGUCHI, K.; LI, X.; COKER, M.; FLESCH, M.; BARGER, P.M.; SIVASUBRAMANIAN, N.; MANN, D.L. Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovasc Res**. 63: 433-442, 2004.

SEKO, Y.; TAKAHASHI, N.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; YAZAKI, Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase [p125(FAK)] in cultured rat cardiac myocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 259: 8–14, 1999.

SPINALE F.G.; ISHIHRA, K.; ZILE, M.; DeFRYTE, G.; CRAWFORD, F.A.; CARABELLO, B.A. Structural basis for changes in left ventricular function and geometry because of chronic mitral regurgitation and after correction of volume overload. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 106(6): 1147-1157, 1993.

STARLING, M.R. Effects of valve surgery on left ventricular contractile function in patients with long-term mitral regurgitation. **Circulation**. 92(4): 811-818, 1995.

STARLING, M.R.; KIRSH, M.M.; MONTGOMERY, D.G.; GROSS, M.D. Impaired left ventricular contractile function in patients with long-term mitral regurgitation and normal ejection fraction. **J Am Coll Cardiol**. 22(1): 239-250, 1993.

SUGDEN, P.H. Mechanotransduction in cardiomyocyte hypertrophy. Circulation. 103(10): 1375-1377, 2001.

SUTTON, T.M.; STEWART, R.A.; GERBER, I.L., WEST, T.M.; RICHARDS, A.M.; YANDLE, T.G. et al. Plasma natriuretic peptide levels increase with symptoms and severity of mitral regurgitation. **J Am Coll Cardiol**. 41(12): 2280-2287, 2003.

THANNICKAL, V.J.; LEE, D.Y.; WHITE, E.S.; CUI, Z.; LARIOS, J.M.; CHACON, R. et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. **J Biol Chem**. 278(14): 12384-12389, 2003.

TORSONI, A.S.; CONSTANCIO, S.S.; NADRUZ, W.Jr.; HANKS S.K.; FRANCHINI, K.G. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. **Circ Res**. 93: 140–147, 2003.

TORSONI, A.S.; MARIN, T.M.; VELLOSO, L.A.; FRANCHINI, K.G. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**.; 289: H1488-496, 2005.

TRIBOUILLOY, C.M.; ENRIQUEZ-SARANO, M.; SCHAFF, H.V.; ORSZULAK, T.A.; BAILEY, K.R.; TAJIK, A.J. et al. Impact of preoperative symptoms on survival after surgical correction of organic mitral regurgitation: rationale for optimizing surgical indications. **Circulation**. 99(3): 400-405, 1999.

URABE, Y.; MANN, D.L.; KENT, R.L.; NAKANO, K.; TOMANEK, R.J.; CARABELLO, B.A. et al. Cellular and ventricular contractile dysfunction in experimental canine mitral regurgitation. **Circ Res**. 70(1): 131-147, 1992.

VAN BILSEN, M.; CHIEN, K.R. Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. **Cardiovasc Res**. 27(7): 1140-1149, 1993.

VITTAL, R.; HOROWITZ, J.C.; MOORE, B.B.; ZHANG, H.; MARTINEZ, F.J.; TOEWS, G.B. et al. Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. **Am J Pathol**. 166: 367-375, 2005.

WAGNER, M.; MASCARENO, E.; SIDDIQUI, M.A.Q. Cardiac hypertrophy: Signal transduction, transcriptional adaptation, and altered grwth control. **Ann N Y Acad Sci**. 874: 1-10, 1999.

WEBER, K.T.; BRILLA, C.G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. **Circulation**. 83(6): 1849-1865, 1991.

WILHELMSEN, L.; ROSENGREN, A.; ERIKSSON, H.; LAPPAS, G. Heart failure in the general population of men-morbidity, risk factors and prognosis. **J Intern Med**. 249: 253-261, 2001.

WISENBAUGH, T.; SKUDICKY, D.; SARELI, P. Prediction of outcome after valve replacement for rheumatic mitral regurgitation in the era of chordal preservation. **Circulation**. 89(1): 191-197, 1994.

WISENBAUGH, J.; SPANN, J.F.; CARABELLO, B.A. Differences in myocardial performance and load between patients with similar amounts of chronic aortic versus chronic mitral regurgitation. **J Am Coll Cardiol**. 3(4): 916-923, 1984.

YACOUB, M.; HALIM, M.; RADLEY-SMITH, R.; MCKAY, R.; NIJVELD, A.; TOWERS, M. Surgical treatment of mitral regurgitation caused by floppy valves: repair versus replacement. **Circulation**. 64(2 Pt 2): II210-216, 1981.

YANO, Y.; GEIBEL, J.; SUMPIO, B.E. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. **Am J Physiol**. 271: C635–C649, 1996.

YUN, K.L.; FANN, J.I.; RAYHILL, S.C.; NASSERBAKHT, F.; DERBY, G.C.; HANDEN, C.F. et al. Importance of the mitral subvalvular apparatus for left ventricular segmental systolic mechanics. **Circulation**. 82(5 Suppl): IV89-104, 1990.

YUN, K.L.; NICZYPORUK, M.A.; SARRIS, G.E.; FANN, J.I.; MILLER, D.C. Importance of mitral subvalvular apparatus in terms of cardiac energetics and systolic mechanics in the ejecting canine heart. **J Clin Invest**. 87(1): 247-254, 1991.

ZILE, M.R.; BRUTSAERT, D.L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. **Circulation**. 105(12): 1503-1508, 2002.

ZILE, M.R.; GAASCH, W.H.; CARROLL, J.D.; LEVINE, H.J. Chronic mitral regurgitation: predictive value of preoperative echocardiographic indexes of left ventricular function and wall stress. **J Am Coll Cardiol**. 3(2 Pt 1): 235-242, 1984.

8-ANEXOS

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO:

RIBEIRO, G.A.; COSTA, C.E.; **LOPES, M.M.** et al. Efficacy of endoventricular patch plasty in large postinfarction akinetic scar and severe left ventricular dysfunction. **Braz. j.** cardiovasc. Surg.17(1): p.13-18, 2002.

RIBEIRO,_G.A.; NUNES, A; ANTONIALI, F.; LOPES, M.M. et al. The beneficial effect of revascularization on patients with severe left ventricular dysfunction and viable myocardium: reverse remodeling and prognosis. **Braz. j. cardiovasc. surg**. 20(2): p.117-122, 2005.

RIBEIRO, G.A.; DA COSTA, C.E.; LOPES, M.M.; ALBUQUERQUE, A.N.; ANTONIALI, F.; REINERT, G.A.; FRANCHINI, K.G. Left ventricular reconstruction benefits patients with ischemic cardiomyopathy and non-viable myocardium. Eur J Cardiothorac Surg. 29(2):196-201, 2006.

RIBEIRO, G.A.; DA COSTA, C.E.; **LOPES, M.M.**; ALBUQUERQUE, A.N.; ANTONIALI, F.; REINERT, G.A.; FRANCHINI, K.G. Left ventricular reconstruction benefits patients with ischemic cardiomyopathy. **J Cardiol Fail.** *in press.*

LOPES, M.M; RIBEIRO, G.A.; TORNATORE, T.F.; FALEIROS, A.C.; CHAVES, A.; TEIXEIRA, V.P.A.; FRANCHINI, K.G. FAK expression is increased and correlates with fibrosis in failing human myocardium. *Submetido*.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Cardiac Failure

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EXPRESSION OF FOCAL ADHESION KINASE IS INCREASED AND CORRELATES WITH FIBROSIS IN FAILING HUMAN MYOCARDIUM.

Article Type: Basic Science and Experimental Studies

Section/Category:

Keywords: Fibrosis, hemodynamics, mitral valve, remodeling.

Corresponding Author: Dr KLEBER G FRANCHINI, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: State University of Campinas

First Author: MAURÍCIO M LOPES, MD

Order of Authors: MAURÍCIO M LOPES, MD; GUSTAVO RIBEIRO, MD; THAIS F TORNATORE; ANA CAROLINA G FALEIROS, MSc; ANIEL CHAVES, MD; ROBERTA C. R. COLOMBO, NS, PhD; VICENTE P. A. TEIXEIRA, MD, PhD; KLEBER G FRANCHINI, MD, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Background - This study examined whether the myocardial expression of focal adhesion kinase (FAK), a tyrosine kinase implicated in the cellular responses to mechanical stress, growth factors and cytokines, is related to left ventricle (LV) remodeling and dysfunction in patients with chronic mitral regurgitation (MR).

Methods and Results - Twenty one MR and six mitral stenosis (MS) patients underwent clinical and echocardiographic examination before mitral valve surgery. Myocardial FAK expression and phosphorylation at tyr397 (a marker of the enzyme activity) were increased (9.3 and 4.2-fold, respectively) in samples from MR as compared to MS patients. The area of picro-sirius staining (collagen) was increased in MR as

compared with MS patients (18 vs 4%, respectively). In samples from MR patients collagen area correlated negatively with the LV ejection fraction (R=-0.74; p<0.001) and positively (R=0.76; p<0.001) with the area of myocardium interstitium stained with anti-FAK antibody. There was a positive correlation (R=0.87; p<0.0001) between anti-FAK and anti-Vimentin staining, indicating that interstitial cells expressing FAK are likely fibroblasts.

Conclusions—There is a relationship between FAK staining, collagen area and LV functional deterioration, suggesting that FAK may play a role in the pathogenesis of interstitial fibrosis as well as in cardiac remodeling in MR patients.

To: **Dr. Barry M. Massie, MD** Editor-in-Chief Journal of Cardiac Failure

Dear Dr Massie:

We are submitting the manuscript entitled "Expression of Focal Adhesion Kinases is Increased and Correlates with Fibrosis in Failing Human Myocardium" by Lopes *et al* for publication in *Journal of Cardiac Failure*.

1) "This manuscript, or part of it, neither has been published nor is currently under consideration for publication by any other journal."

2) "The co-authors have read the manuscript and approved its submission to *Journal of Cardiac Failure*."

3) "There are no financial or other relations that could lead to a conflict of interest."

4) "The authors agree to pay for the cost of printing of colour figures."

We thank you in advance and hope this manuscript may have a good review and be considered for publication in *Journal of Cardiac Failure*.

Sincerely yours,

Kleber Franchini

EXPRESSION OF FOCAL ADHESION KINASE IS INCREASED AND CORRELATES WITH FIBROSIS IN FAILING HUMAN MYOCARDIUM.

Maurício M. Lopes¹, Gustavo Ribeiro¹, Thais F. Tornatore¹, Ana Carolina G Faleiros³,

Aniel Chaves¹, Roberta C.R. Colombo², Vicente P. A. Teixeira³, Kleber G. Franchini¹

Departments of ¹Internal Medicine and ²Nursing, School of Medicine, State University of Campinas, 13081-970 Campinas, São Paulo; and ³ Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Triângulo Mineiro, 38025-440 Uberaba, Minas Gerais, Brazil

Address for correspondence:

Kleber G. Franchini, MD, Ph.D. Departamento de Clínica Médica Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas Cidade Universitária "Zefferino Vaz" 13081-970 Campinas, SP. Brasil. Phone: (55) (19) 3788 8023 FAX: (55) (19) 3788 8023 E.Mail: franchin@unicamp.br

Running head: FAK and failing human heart

This study was sponsored by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 00/05137-4, 01/11698-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. 521098/97-1).
ABSTRACT

Background – This study examined whether the myocardial expression of focal adhesion kinase (FAK), a tyrosine kinase implicated in the cellular responses to mechanical stress, growth factors and cytokines, is related to left ventricle (LV) remodeling and dysfunction in patients with chronic mitral regurgitation (MR).

Methods and Results – Twenty one MR and six mitral stenosis (MS) patients underwent clinical and echocardiographic examination before mitral valve surgery. Myocardial FAK expression and phosphorylation at tyr397 (a marker of the enzyme activity) were increased (9.3 and 4.2-fold, respectively) in samples from MR as compared to MS patients. The area of picro-sirius staining (collagen) was increased in MR as compared with MS patients (18 vs 4%, respectively). In samples from MR patients collagen area correlated negatively with the LV ejection fraction (R=-0.74; p<0.001) and positively (R=0.76; p<0.001) with the area of myocardium interstitium stained with anti-FAK antibody. There was a positive correlation (R=0.87; p<0.0001) between anti-FAK and anti-Vimentin staining, indicating that interstitial cells expressing FAK are likely fibroblasts.

Conclusions—There is a relationship between FAK staining, collagen area and LV functional deterioration, suggesting that FAK may play a role in the pathogenesis of interstitial fibrosis as well as in cardiac remodeling in MR patients.

Key Words. Fibrosis, hemodynamics, mitral valve, remodeling.

INTRODUCTION

Cardiac diseases often results in adverse remodeling of left ventricle and progression to dilated cardiomyopathy and heart failure. Alterations of the myocardium architecture that include hypertrophy and loss of cardiac myocytes as well as interstitial fibrosis are thought to play a prominent role in the systolic and diastolic dysfunctions underlying the pump failure of remodeled left ventricle (1). These changes are generally triggered by a complex interplay between biomechanical stress and neurohumoral factors which engage distinct signaling systems in promoting cellular abnormalities that accompany heart failure (2).

Mechanical stress is a major factor involved in the development of myocardial adaptive and maladaptive changes in heart diseases. Local mechanical forces activate signaling mechanisms in cardiac myocytes inducing the expression of specific genetic programs linked to myocardial structural and functional remodeling (3). Although mechanical forces may directly trigger signaling cascades in cardiac myocytes, the mechanism by which they are sensed and converted to biochemical signals are still unclear. In recent years, evidence has been accumulated indicating Focal Adhesion Kinase (FAK) as a key mediator of mechanochemical signal transduction in cardiac myocytes, as well as in fibroblasts, endothelial and vascular smooth muscles cells (4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13). In addition, FAK may also be activated and mediate signaling by growth factors, agonists of G-protein coupled receptors and cytokines (6, 14, 15). FAK activation either by mechanical stimuli or growth factors has been shown to be dependent on the autophosphorylation at Tyr397. Phosphorylated Tyr397 recruits Src family kinases, which lead to phosphorylation of additional FAK tyrosine residues. Phosphorylated FAK promotes the assembly of

distinct higher-order individual signaling complexes, which mediate the cellular responses to external stimuli by controlling the activity of multiple signaling pathways (16, 17, 18).

In cultured cells, FAK has been shown to be involved in cellular functions such as adhesion, migration, growth and survival (14). In cardiac myocytes, we have shown that FAK is rapidly activated and coordinate the initial activation of genetic program linked to cardiac myocyte hypertrophy in response to mechanical stress (6, 7, 19, 20). This is consistent with the idea that FAK signaling plays a central role in promoting the expression of the hypertrophic genetic program by mechanical stress in cardiac myocytes. Currently, however, no information is available on whether FAK plays a role in the structural alterations that accompany the left ventricular remodeling in the human failing heart.

In the present study, we conducted a comprehensive analysis of FAK expression and distribution in myocardium samples samples obtained with intra-operative biopsis from patients with heart failure caused by mitral regurgitation (MR). We found that FAK expression and phosphorylation at Tyr-397, which is a hallmark of FAK active state, are increased in the myocardium of patients with MR, as compared with those of mitral stenosis (MS). Quantitative analysis of myocardial samples from MR patients stained with picro-sirius or anti-FAK antibody indicated that the area occupied by collagen correlated with the reduction in ejection fraction and with the area occupied by anti-FAK staining. These data support the potential role of FAK in the pathogenesis of fibrosis and functional deterioration of failing heart.

METHODS

The Institutional Ethics Committee approved the study, and all patients gave informed consent.

Reagents. Protein A conjugated with ¹²⁵I was purchased from Du Pont –New England Nuclear Co. Rabbit polyclonal anti-FAK and anti-Vimentin antibodies were from Santa Cruz Biotechnology and rabbit polyclonal anti-pFAK-Tyr397 antibody was from Biosource International.

Patients. Twenty one patients with isolated MR and six patients with isolated MS underwent pre-operative clinical examination. The patients had no evidence of coronary artery disease, hypertension or diabetes. Degenerative etiology (floppy and flail valve) was more prevalent (n=15) followed by rheumatic valve disease (n=7) in MR patients. Rheumatic fever was the cause of MS in all six patients of this study. The echocardiographic examination was performed by a skilled physician using echocardiograph equipped with 2.5 to 3.5 MHz transducers. Dimensions of left ventricle (end-systolic diameter – LVDD; end-diastolic diameter - LVSD) were assessed from 2D guided M-mode tracings. Left ventricle ejection fraction (EF) was calculated with the use of Theicholz method. Left atrial diameter (LAD) was assessed by 2-dimensional measurements. Pulmonary artery systolic pressure (PASP) was estimated through the velocity of the tricuspid regurgitant jet and estimated right atrial pressure by using the formula: PASP=4(peak TRV)²+mean right atrial pressure.

Tissue Sampling. During open heart surgery, biopsy samples were taken from the septum of left ventricle, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for later use in western blotting or immunofluorescence.

Immunoblotting. Tissue samples were homogenized with buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton, 10mM sodium pyrophosphate, 100mM NaF, 10 μ g/mL aprotinin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.25mM sodium

orthovanadate). The samples were centrifuged for 20 min at 11,000g and the soluble fraction was ressuspended in 50µL of Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04mg/mL bromophenol blue, 0.12M Tris-HCl, pH 6.8, 0.28M β -mercaptoethanol) before separation on 8% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred from the gels to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 2 hours at room temperature with 5% skim milk/TBST buffer (10mM Tris-HCl, pH 8; 150mM NaCl, 0.05% Tween 20). Membranes were exposed to primary antibodies overnight at 4°C, washed in TBST and exposed to [¹²⁵I]Protein A.

Histology. Histological studies consisted of Masson's trichrome and picro-sirius stain. Serial 5 μ m-thick sections of myocardium samples were placed on poly-L-lysine precoated slides.

Immunohistochemistry. Biopsy samples were fixed by overnight immersion with 4% paraformaldehyde in 0.1 Mol/L phosphate buffer, pH 7.4, and processed to inclusion in Histotec (Merck). Sections (5 μ m) were transferred to poly-L-lysine–coated glass slides. The endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.03% H₂O₂ in 0.1 Mol/L PBS at room temperature for 30 minutes. The sections were preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk on 0.1 mol/L PBS) for 45 minutes at 37°C, followed by overnight incubation with the primary antibodies anti-FAK or anti-Vimentin (1:100) at 4°C. The sections were extensively rinsed in 0.05 Mol/L PBS and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:100) for 2 hours at 25°C. After washing as above, sections were subjected for 5 minutes to freshly prepared diaminobenzidine that contained H₂O₂ (0.8%). Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and

negative control measurements. In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

Quantification of fibrillar collagen and immunostained samples. Collagen density was estimated through digital image analysis from picro-sirius stained sections by measuring in each field (>30 fields) the percent of total surface area pertaining to fibrillar collagen, identified by polarized light. We also estimated the areas occupied by anti-FAK and anti-Vimentin stainings examined by light microscopy.

Electron Microscopy. The samples were embedded in Epon, following a standard protocol. Ultrathin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate before examination in a transmission electron microscope (LEO 906).

Statistical Analysis. Immunoblotting data are presented as percent changes compared to controls. Statistical analysis was performed with the actual values of densitometric readings. Differences between the mean values of the densitometric readings of samples from MS and MR patients were tested by Student's t-test. Linear regression analysis and standard *t* test were used to evaluate the relationships between collagen area and ejection fraction or anti-FAK staining, as well as anti-FAK and anti-Vimentin staining. *P*<0.05 indicated statistical significance. Data were summarized as mean and standard error.

RESULTS

Clinical status

Twenty one MR patients underwent pre-operative clinical evaluation (Table I). All patients were symptomatic with average NYHA class of 2.8 ± 0.8 and underwent surgical mitral valve repair (n=13) or valve replacement (n=8). No death occurred in a follow up of 6

months after surgery and the NYHA class improved to 1.5 ± 0.5 (P<0.001, compared to NYHA class before surgery). Six MS patients and normal EF served as control subjects. Doppler-Echocardiographic examination was performed in all patients as part of the pre-operative clinical evaluation. Patients with MR had LVEDD, left ventricle mass index and LAD increased, as compared with normal reference as well as with the values of MS patients. The average EF of patients with MR, determined at the time of admission was 0.66±0.12, but 10 patients had EF below 0.60. Echocardiographic estimated PASP was increased in MR and in MS patients.

Myocardium from MR patients shows altered morphology

Histological evaluation of myocardial samples from MR patients revealed extensive hydropic degeneration of cardiac myocytes (Fig 1A-B). Myocardium interstitial fibrosis as visualized by Masson's trichrome staining was pronounced in all biopsy samples from MR patients (Fig. 1C) as compared with those of MS patients. Myocardial samples from MR patients stained with picro-sirius showed typical red birefringence of the collagen in the perivascular as well as in the areas surrounding cardiac myocytes, suggesting reactive and replacement fibrosis (Fig 1D-E). As shown in Figure 1F, collagen density, calculated by computerized image analysis of picro-sirius stained myocardium, was greater in samples from MR than in those of MS patients (18% vs 4%; P<0.0001). There was a negative correlation (r=-0.74, P<0.001) between the area of myocardial picro-sirius staining and the EF in MR patients (Fig. 1G).

Ultrastructural examination of myocardial samples from MR patients showed the majority of cardiac myocytes of the samples severely damaged, with signs of degeneration and atrophy. There was extensive myofibril disorganization, a partial to complete loss of sarcomers, sarcoplasmic reticulum and T-tubules as well as lots of mini-mitochondria (Fig 2A). Extracellular matrix showed extensive areas of fibrosis with fibroblasts that were surrounded by massive collagen fibrils (Fig 2B).

Myocardium from MR patients overexpresses FAK

Samples of sub-endocardial biopsies taken from patients with MR or MS were homogenized, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-FAK or phosphospecific anti-FAK-Tyr397 antibodies. As illustrated in Figure 3, the amount of FAK detected by anti-FAK antibody in the samples from MR patients was increased by 9.3-fold in samples from MR as compared with MS patients. Samples from MR patients also showed greater amount (4.2-fold) of FAK detected with phosphospecific anti-FAK Tyr397 antibody as compared with immunoblottings performed with samples from MS patients. The ratio between the amount of phosphorylated and total FAK was increased by ~40% in samples from MR patients as compared with those from MS patients.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed to determine FAK distribution in the myocardium from MR and MS patients. In samples from MR patients, anti-FAK antibody consistently stained cardiac myocytes and the interstitium surrounding the myocytes and blood vessels (Figure 4 A-C). On the other hand, in samples from patients with MS, the anti-FAK staining was restricted to cardiac myocytes with only a faint staining of the interstitial areas (Figure 4E). In myocardial samples from MR patients anti-Vimentin antibody stained the interstitial areas but not the areas occupied by cardiac myocytes (Fig. 4D). Samples from MS patients showed no expressive staining with anti-Vimentin antibody (Fig 4F). A positive correlation was found between the densities of anti-FAK and the picro-

sirius collagen staining (Fig 4E). A positive correlation was also found between the densities of anti-FAK and anti-Vimentin staining (Fig. 4H).

DISCUSSION

Mitral valve regurgitation is a prevalent valvular disease that evolves with progressive remodeling of left ventricle which eventually causes heart failure. Continuous impact of abnormal hemodynamic burden caused by the regurgitant flow is thought to play a major role in the deterioration of myocardial architecture and function in MR patients (21). The data of the present study provide evidence that the FAK expression as well as phosphorylation at Tyr397 are increased in the myocardium of MR patients with heart failure as compared with patients with MS which have the left ventricle spared from the hemodynamic burden. The findings of a positive correlation between the areas of anti-FAK with collagen staining, as well as a negative correlation between collagen area and left ventricle EF suggest that FAK might play a role in the fibrosis and, presumably, in the deterioration of cardiac function in MR patients.

FAK has been shown to be activated by stretch and shear stress as well as by agonists of growth factor, cytokine and G-protein coupled receptors in the various cell types of the myocardium (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). On the other hand, several lines of evidence indicate that mechanical stress, as well as agonists of GPCR, such as angiotensin II and endothelin, or cytokines such as TGF β and TNF are involved in the pathogenesis of myocardium structural and functional changes that accompany cardiac chambers remodeling and failure in MR patients (21, 22, 23, 24). We have shown here that in the myocardium samples from MR patients the area occupied by anti-FAK staining

parallels that of interstitial fibrosis, indicating that the increased expression and phosphorylation of FAK seen in the immunoblottings might be related to increases in the expression and activity of this kinase in cells from the myocardium interstitium. The demonstration that anti-FAK correlated with anti-Vimentin staining, indicate that the interstitial cells stained by anti-FAK antibody are possibly fibroblasts or myofibroblasts (25). Conversely, the increased expression and activity of FAK in interstitial cells might indicate the increased biological activity of cardiac fibroblasts/myofibroblasts. Accordingly, the electron microscopy analysis of myocardium samples from MR patients showed a great number fibroblasts/myofibroblasts with normal morphology surrounded by collagen fibers. These data, together with the demonstration here that functional deterioration, as assessed by reductions in the left ventricle EF, parallels the area of the myocardium occupied by collagen are compatible with the notion that FAK signaling is enhanced in the interstitial cells and may play a role in the pathogenesis of the interstitial fibrosis and functional deterioration that accompany cardiac remodeling in patients with MR. These assumptions are supported by evidences indicating that FAK signaling influences several aspects of fibroblast biology, including cell adhesion, migration, proliferation and differentiation, which are all known to be involved in the recruitment and activation of fibroblast/myofibroblasts as part of repair responses to tissue injury (26, 27). Although in the present study the samples were taken from sub-endocardial biopsies, our data generally agree with previous observations that severity of interstitial fibrosis is related to functional impairment in MR patients (28, 29).

We have previously shown that in rat myocardium FAK is most localized in cardiac myocytes (30, 31). Accordingly, in samples from MR and MS patients consistent anti-FAK staining was found in cardiac myocytes, although in samples from MR patients, anti-FAK

staining was prominent in the myocardium interstitium. The abundance of FAK expression is consistent with a role of this kinase in signaling in cardiac myocytes. Indeed, several lines of evidence indicate that FAK signaling is involved in the hypertrophic growth and survival of cardiac myocytes subjected to mechanical stress. In studies, performed in isolated cardiac myocytes, as well as in the rat myocardium we have shown that FAK is not only rapidly activated but it also coordinates the expression of hypertrophic genetic program induced by cell stretch (6, 19, 20). More recently, FAK was demonstrated to be critically important to the in series addition of new sarcomeres in isolated cardiac myocytes subjected to stretch (32). This, presumably, increases the resting sarcomere length, thus contributing to cardiac myocytes remodeling and to the restoration of resting tension in stretched cardiac myocytes in conditions of sustained volume overload such as the one in MR. In addition, in rat myocardium, FAK activation by pressure overload has been shown to parallel AKT activation (7). AKT mediates signals that regulate multiple biological processes, including glucose metabolism, survival, gene expression, and cell proliferation (33). Studies have shown that AKT mediates the anti-apoptosis effects of FAK (34). Thus, by influencing multiple regulatory functions involved in the hypertrophic remodeling and survival of cardiac myocytes, FAK might contribute to changes of cardiac architecture and function in failing hearts.

We investigated the expression, tyrosine phosphorylation and distribution of FAK in the failing myocardium of patients with MR. An important and novel finding of our study is the correlation between the increased FAK expression and the increased myocardial interstitial fibrosis. In addition, considering that FAK signaling regulates load-induced gene expression program in cardiac myocytes, it is presumed that this kinase may be critical to the pathogenesis of load-induced structural remodeling of cardiac chambers. Thus FAK may have important implications to the settlement of myocardial structural and functional changes related to cardiac failure in patients with MR. In this context, FAK may be considered a target for potential new approaches to the therapy of cardiac remodeling and failure.

REFERENCES

- 1. Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. Ann Intern Med 1994; 121: 363–71.
- 2. Chien KR. Stress pathways and heart failure. Cell 1999; 98: 555–8.
- **3.** Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev Physiol 1997; 59: 551–71.
- 4. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase [p125(FAK)] in cultured rat cardiac myocytes. Biochem Biophys Res Commun 1999; 259: 8–14.
- Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. Hypertension 2002; 39: 233–8.
- **6.** Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz, Jr W, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. Circ Res 2003; 93: 140–7.
- Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. Circ Res 2000; 87: 558–65.

- Li S, Kim M, Hu YL, Jalali S, Schlaepfer DD, Hunter T, et al. Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 1997; 272:30455-62.
- Li S, Butler P, Wang Y, Hu Y, Han DC, Usami S, et al. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99:3546-51.
- 10. Yano Y, Geibel J, Sumpio BE. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. Am J Physiol 1996; 271: C635–C649.
- **11.** Li C, Wernig F, Leitges M, Hu Y, Xu Q. Mechanical stress–activated PKC[®] regulates smooth muscle cell migration. FASEB J 2003; 17: 2106–8.
- **12.** Lehoux S, Esposito B, Merval R, Tedgui A. Differential regulation of vascular focal adhesion kinase by steady stretch and pulsatility. Circulation 2005; 111: 643–9.
- **13.** Sai X, Naruse K, Sokabe M. Activation of pp60(src) is critical for stretch-induced orienting response in fibroblasts. J Cell Sci 1999; 112:1365-73.
- 14. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years.J Cell Sci 2003;116:1409-16.
- 15. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-betal is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. J Biol Chem 2003; 278:12384-9.
- 16. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. Mol Cell Biol 1995; 15: 954–63.

- 17. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. Nature 1994; 372: 786–91.
- 18. Polte TR, Hanks SK. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crkassociated substrate (p130^{Cas}) are elevated in cytoskeletal-associated fractions following adhesion and Src transformation: requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. J Biol Chem 1997; 272: 5501–9.
- Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, Franchini KG. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. Am J Physiol 2005; 289:H1488-496.
- 20. Nadruz W, Jr, Corat MAF, Marin TM, Guimarães Pereira GA, Franchini KG. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: Role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. Cardiovasc Res 2005; 68:87-97.
- 21. Spinale FG, Ishihra K, Zile M, DeFryte G, Crawford FA, Carabello BA. The structural basis for changes in left ventricular function, and geometry due to chronic mitral regurgitation and following correction of the volume overload. J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 106: 1147-57.
- 22. Oral H, Sivasubramanian N, Dyke DB, Mehta RH, Grossman PM, Briesmiester K, et al. Myocardial proinflammatory cytokine expression and left ventricular remodeling in patients with chronic mitral regurgitation. Circulation 2003;107:831-7.

- 23. Dell'Italia LJ, Meng QC, Balcells E, Straeter-Knowlen IM, Hankes GH, Dillon R, et al. Increased ACE and chymase-like activity in cardiac tissue of dogs with chronic mitral regurgitation. Am J Physiol 1995; 269: H2065–H2073.
- 24. Sekiguchi K, Li X, Coker M, Flesch M, Barger PM, Sivasubramanian N, et al. Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. Cardiovasc Res 2004; 63:433-42.
- 25. Guma FCR, Mello TG, Mermelstein CS, Fortuna VA, Wofchuk ST, Gottfried C, et al. Intermediate filament modulation in an *in vitro* model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. Biochem and Cell Biol 2001; 79: 409-17.
- 26. Ilic D, Kovacic B, Johkura K, Schlaepfer DD, Tomasevic N, Han Q, et al. FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. J Cell Sci 2004; 117:177-87.
- 27. Vittal R, Horowitz JC, Moore BB, Zhang H, Martinez FJ, Toews GB, et al. Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. Am J Pathol 2005; 166:367-75.
- 28. Zile MR, Brutsaert DL. New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part II: Causal Mechanisms and Treatment. Circulation 2002; 105: 1503-8.
- 29. Matsuo T, Carabello BA, Nagatomo Y, Koide M, Hamawaki M, Zile MR, et al. Mechanisms of cardiac hypertrophy in canine volume overload. Am J Physiol 1998; 275: H65-H74.
- **30.** Domingos PP, Fonseca PM, Nadruz W Jr, Franchini KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. Am J Physiol 2002; 282:H556-564.

- 31. Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J, Franchini KG. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. Circ Res 2005; 96:73-81.
- **32.** Mansour H, de Tombe PP, Samarel AM, Russell B. Restoration of resting sarcomere length after uniaxial static strain is regulated by protein kinase Cepsilon and focal adhesion kinase. Circ Res 2004; 94:642-9.
- 33. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. Akt/PKB and other D3 phosphoinositidesregulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu Rev Biochem 1999;68:965–1014.
- 34. Chen HC, Appeddu PA, Isoda H, Guan JL. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 1996, 271:26329-34.

LEGENDS

Figure 1. Cardiac myocytes degeneration and myocardial fibrosis in MR patients. A-B, Cardiac myocytes from MR patients show degeneration characterized by swollen vacuolated sarcoplasm (5000X); C. severe interstitial fibrosis stained with Masson's trichrome (400X); D. perivascular collagen staining with picro-sirius (600X); E. pericardiac myocytes collagen staining with picro-sirius (1000X); F. comparisons of the area occupied by collagen fibers in myocardium from MR and MS patients; G. significant negative correlation exists between collagen stained area and ejection fraction.

Figure 2. Electron microscopy of cardiac myocyte degeneration and fibrosis in MR patients. A, degeneration of cardiac myocyte with partial loss of sarcomeres and mitochondriosis (23,560X); B, fibroblast close to cardiac myocyte and surrounded by collagen fibers (31,620X).

Figure 3. FAK expression and phosphorylation at tyr397 in the myocardium of MR patients. A, samples of myocardium from MR and MS patients blotted with anti-FAK antibody. Graph shows average values of densitometric readings; B, samples of myocardium from MR and MS patients blotted with anti-phosphospecific antibody directed against the autophosphorylation site of FAK (anti-FAK-Tyr397). Graph shows average values of densitometric readings. *P<0.05 compared with the average values of MS patients.

Figure 4. Anti-FAK and anti-Vimentin staining of myocardium samples from MR patients. A-C anti-FAK staining of samples from MR patients (A, 400X; B, 600X; C,

400X); D, anti-Vimentin staining of a sample from MR patient (400X); E, anti-FAK staining of a sample from MS patient (400X); F, anti-Vimentin staining of a sample from MS patient; G. significant positive correlation exists between collagen stained area and anti-FAK staining; H. significant positive correlation exists between anti-FAK and anti-Vimentin stained areas.



FIGURE 1

Figure 2 Click here to download high resolution image



FIGURE 2

Figure 3 Click here to download high resolution image







FIGURE 4

Table I- Clinical Preoperative Data

| | MS | MR |
|-----------------------|-----------------|----------------|
| | (n=6) | (n=21) |
| Age, y | 57 ± 4.2 | 55 ± 3.7 |
| Gender, female | 4 | 11 |
| NYHA class | 2.1 ± 0.6 | 2.8 ± 0.8 |
| Symptoms Duration, mo | 21 ± 3 | 18 ± 2 |
| EF, % | 62 ± 2.3 | 66 ± 2.7 |
| LVEDD, mm | 49 ± 1.5 | 57 ± 1.6 |
| LVESD, mm | 33 ± 1.35 | 35 ± 1.4 |
| PWT, mm | 9.7 ± 0.3 | 10.2 ± 0.4 |
| LV relative WT | 0.37 ± 0.02 | 0.4 ± 0.02 |
| $LV mass/m^2$ | 150 ± 13 | 192 ±15 |
| LAD, mm | 48 ± 3 | 55 ± 2 |
| PAP mean, mmHg | 58 ± 8 | 41 ± 4 |

EF, ejection fraction; LVEDD, left ventricle end diastolic diameter; LVESD, left ventricle end systolic diameter; LVWT, left ventricle wall thickness; LAD, left atrium diameter; PAP, pulmonary arterial pressure.