

GRACIELA ARAUJO MACHADO

2005 05398

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DISTRIBUIÇÃO DO
COMPLEXO DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADO COM A
FAK EM MIOCÁRDIO E CARDIOMIÓCITOS DE
RATOS INFARTADOS**

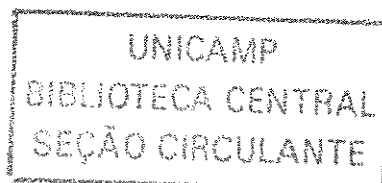
*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da
Bióloga - Graciela Araujo Machado.*

Campinas, 18 de setembro de 2004.

Kleber Franchini
Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
- Orientador -

CAMPINAS

2004



GRACIELA ARAUJO MACHADO

***AValiação da Atividade e Distribuição do
Complexo de Sinalização Associado com a
FAK em Miocárdio e Cardiomiócitos de
Ratos Infartados***

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

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2004

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

M18a Machado, Graciela Araujo
Avaliação da cavidade e distribuição do complexo de
sinalização associado com a FAK em miocárdio e cardiomiócitos
de ratos infartados / Graciela Araujo Machado. Campinas, SP :
[s.n.], 2004.

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

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

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	M18a
V	EX
TOMBO BC/	62225
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	28/02/05
Nº CPD	

Bibid: 341536



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

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

Data: 15 /09/2004

DEDICATÓRIA

A minha amada mãe e noivo,
pelo carinho, incentivo e paciência
dedicados nestes anos de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela orientação segura e valiosa, pela oportunidade concedida e confiança depositada em meu trabalho.

Às amigas Thaís Holtz Theizen e Daniella Pereira Crosara Alberto pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

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

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

“O Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos e escudo é para os que caminham na sinceridade”. (*Salmos 2.6-7*)

RESUMO.....	xxx
1. INTRODUÇÃO.....	31
Remodelamento do Ventrículo Esquerdo após Infarto do Miocárdio.....	37
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1- Animais.....	44
3.2- Procedimentos Cirúrgicos.....	44
3.2.1- Infarto do Miocárdio (IM).....	44
3.2.2- Cateterização para Registros Hemodinâmicos.....	45
3.3- Registros Hemodinâmicos.....	46
3.4- Processamento do Miocárdio para análises Histo-Morfométricas.....	48
3.4.1-Processamento de miocárdio em parafina e obtenção de lâminas.....	48
3.4.2- Imunomarcção de miocárdio.....	49
3.5- Isolamento de Cardiomiócitos Ventriculares.....	50
3.6- Colorações.....	52
3.6.1- Tricômico de Masson.....	52
3.6.2- Hematoxilina-Eosina.....	53

3.7- Immunoblotting.....	53
3.7.1- Coleta e homogeneização do miocárdio.....	53
3.7.2- Análise de proteína por immunoblotting.....	54
3.8- Análise Estatística.....	56
3.9- Protocolos Experimentais.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1- Análise Morfométrica do Ventrículo Esquerdo.....	59
4.2- Análises de Pressões do Ventrículo Esquerdo.....	69
4.3- Expressão e Atividade da Quinase de Adesão Focal.....	71
5. DISCUSSÃO.....	84
6. CONCLUSÕES.....	85
7. SUMMARY.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

[¹²⁵I]- Isótopo de iodo 125

±dP/dt- derivadas de pressões positiva e negativa

ANF- Fator Atrial Natriurético

Anti- Erk- Anticorpo contra a proteína Erk

Anti- Fak- Anticorpo contra a proteína Fak

Anti-p-Erk- Anticorpo contra a forma fosforilada da proteína Erk

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

BSA-bovine serum albumine

CEMIB- Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas

CT- Animais controles não infartados

C15/45- Aninais controles não infartados com pesos corporais semelhantes aqueles infartados de 15 e 45 dias de evolução do infarto.

D- Diâmetro da cavidade ventricular esquerda

DAB-diaminobenzidina

DMEM- Meio de Cultura Eagle modificado

EGTA- acido NNNNtetracético etileno glicol bis (2 aminoetiléter)

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

FAK- Quinase de Adesão Focal (Focal Adhesion Kinase)

FC-Freqüência Cardíaca

g- gramas

HE- Coloração de Hematoxilina-Eosina

HEPES-Ácido (hidroxi-piperazina) etanosulfônico

IM- Infarto do Miocárdio

M- Molaridade

mg/Kg- miligramas por quilo

ml- mililitros

mmHg- milímetros de mercúrio

P- Perímetro interno

PBS-Tampão fosfato

PDVE- Pressão Diastólica Esquerda

PSVE- Pressão Sistólica Esquerda

PSMF- Fluoreto de fenilmetilsulfonila

S- Espessura do septo interventricular

S/D- Razão entre a espessura do septo interventricular e diâmetro da cavidade esquerda

SDS- Dodecil sulfato de sódio

Src- Tirosina Quinase relacionada ao sarcoma ROUX

TG β 1- Citocina

TIMPs- Inibidores teciduais das metaloproteinases

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

Try 576-577- Resíduos de tirosina da Fak

Try 925- Residuo de tirosina da Fak

μ m- micrometro

LISTA DE TABELAS

Pág

<i>Tabela 1.</i> Análise morfométrica de corações de ratos controle e com infarto do miocárdio.....	61
<i>Tabela 2.</i> Tabela representativa dos parâmetros hemodinâmicos obtidos de corações de ratos controle e com infarto do miocárdio.....	71

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
Figura 1. Figura representativa da técnica de infarto do miocárdio.....	45
Figura 2. Figura representativa do sistema de registros hemodinâmicos utilizado nos experimentos <i>in vivo</i>	47
Figura 3. Figura representativa da técnica do imunohistoquímica.....	50
Figura 4. Figura representativa da técnica para obtenção das medidas morfométricas.....	51
Figura 5. Figura representativa do modelo de extração do miocárdio e immunoblotting.....	56
Figura 6. Esquema representativo dos protocolos experimentais.....	57
Figura 7. Esquema representativo dos parâmetros utilizados para análise morfométrica do ventrículo esquerdo.....	59
Figura 8. Figura de cortes histológicos transversais de corações de ratos controle e infartados.....	60
Figura 9. Gráficos representativos dos parâmetros morfométricos obtidos de corações de ratos controle e infartados.....	63
Figura 10. Imagens histológicas da área de infarto e do miocárdio remoto ao longo do período de 45 dias de infarto do miocárdio.....	65
Figura 11. Exemplos de cardiomiócitos isolados obtidos de corações controle e do miocárdio remoto do ventrículo esquerdo de ratos infartados.....	66

Figura 12. Gráficos representativos dos valores morfométricos obtidos de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais controle e infartados.....	68
Figura 13. Gráficos representativos dos parâmetros hemodinâmicos obtidos de animais controles e infartados.....	70
Figura 14. Western blot realizado com anticorpos anti-Fak, anti-p(397)Fak, anti-Erk1/2 e anti-pErk1/2 em material obtido da área de infarto do ventrículo esquerdo no período de 1 a 45 dias de evolução do infarto.....	72
Figura 15. Western blot realizado com anticorpos anti-Fak, anti-p(397)-Fak, anti-Erk1/2 e anti-pErk1/2 em material obtido do miocárdio remoto do ventrículo esquerdo no período de 1 a 45 dias de evolução do infarto.....	73
Figura 16. Exemplos representativos de imagens de imunohistoquímica obtidas em corações de ratos controle na região de cicatriz nos períodos de 1 a 45 dias após o infarto do miocárdio.....	75

RESUMO

Estímulos mecânicos provocam ativação precoce da quinase de adesão focal (Fak) no miocárdio. Esta ativação é acompanhada pelo recrutamento de vias de sinalização intracelulares envolvidas no crescimento hipertrófico, bem como de outras vias envolvidas na sobrevivência celular. Dados anteriores obtidos em nosso laboratório demonstraram que o estímulo mecânico ativa a Fak e desempenha papel crítico na regulação da re-expressão de genes fetais, sugerindo a participação deste sinalizador intracelular no estabelecimento da hipertrofia e remodelamento cardíacos.

No presente estudo, investigamos: 1- a expressão, fosforilação e distribuição da Fak no resíduo de tirosina 397 e 2 - a expressão e fosforilação nos resíduos Ser/Thr da Erk1/2, ambos na área de infarto e no miocárdio remoto, durante o processo de remodelamento do ventrículo esquerdo, em modelo experimental de infarto do miocárdio em ratos.

Dados obtidos no presente trabalho demonstraram que a ligadura da artéria coronária descendente anterior provocou infartos classificados como infartos de extensão moderada a grande. As análises morfométricas e das pressões do ventrículo esquerdo, obtidas 1, 3, 7, 15 e 45 dias após o infarto, demonstraram dilatação da câmara, acompanhada de aumentos do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos e aumentos da pressão diastólica final, eventos característicos do remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio. Estes dados confirmam dados da literatura que demonstram que em infartos de grandes extensões, a tensão na parede do ventrículo esquerdo dificilmente se normaliza, o que ocasiona dilatação, tanto pelo estiramento da área remota, quanto por expansão da área de infarto, seguida de deterioração funcional progressiva do ventrículo. Além disto, experimentos com as técnicas de western blot e imunohistoquímica demonstraram que após o infarto do miocárdio ocorre ativação da Fak no miocárdio remoto, detectada com anticorpo específico para a Fak fosforilada no resíduo de tirosina 397, presente já no

primeiro dia e mantida até 45 de evolução do infarto do miocárdio. Por outro lado, na área do infarto, houve desaparecimento da expressão da Fak, seguida de aumento progressivo de sua expressão e atividade, ao longo da evolução do processo de cicatrização. Importante observar, que o aumento da expressão e atividade da Fak na região do infarto foi acompanhada pela infiltração de células inflamatórias naquela região. Semelhante ao que foi observado com a Fak demonstramos a ativação e expressão da Erk1/2, tanto na área remota, quanto na área de infarto.

Diante dos resultados obtidos nesta investigação e ainda com base nos estudos anteriores de nosso laboratório, podemos inferir que a atividade aumentada da Fak no miocárdio remoto possa contribuir para o estabelecimento do crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos. No entanto, também é possível que a ativação excessiva e prolongada da Fak, tanto nos cardiomiócitos, quanto nas células intersticiais e inflamatórias ative mecanismos de sinalização que contribuem para a deterioração funcional e estrutural do miocárdio, de tal forma, que a modulação de sua atividade no infarto do miocárdio pode trazer benefícios terapêuticos.

1. INTRODUÇÃO

Sobrecargas hemodinâmicas prolongadas são causa e também consequência da maior parte das doenças que acometem o coração (KATZ A. M., 1990). Estímulos mecânicos induzem o crescimento hipertrófico e contribuem para a degeneração e morte dos miócitos cardíacos e estabelecimento da fibrose miocárdica, que resultam em remodelamento e falência cardíacas (KATZ A. M., 1990; CHIEN K. R., 1999). Ressalte-se, que a presença de hipertrofia isolada ou associada ao remodelamento do ventrículo esquerdo, independente da doença primária que os tenha originado, são fatores de grande impacto na evolução clínica e prognóstico de pacientes cardiopatas (LEVY D., 1990; ST. JOHN SUTTON M.; PFEFFER M. A; PLAPPERT T. et al., 1994).

Tensões miocárdicas geradas durante o ciclo cardíaco podem ativar mecanismos de crescimento celular em miócitos cardíacos (SADOSHIMA J.; IZUMO S., 1998; OMENS J. H., 1998). No entanto, os mecanismos responsáveis pela transdução de forças mecânicas locais em eventos bioquímicos nos miócitos cardíacos não estão ainda totalmente esclarecidos.

Evidências obtidas em modelos experimentais e em formas específicas de miocardiopatia de origem genética indicam que o citoesqueleto dos miócitos cardíacos tem função importante na transdução de eventos mecânicos em eventos bioquímicos (SUSSMAN M.; McCULLOCH A; BORG T. K., 2002; EPSTEIN N. D.; DAVIS J. S., 2003). O citoesqueleto dos miócitos cardíacos inclui estruturas sarcoméricas e extra-sarcoméricas (EPSTEIN N. D.; DAVIS J. S., 2003; SCHAPER J.; FROEDE R.; HEIN S.; BUCK A.; HASHIZUME H.; SPEISER B.; FRIEDL A. AND BLEESE N., 1991; CLARK K. A.; McELHINNY A. S.; BECKERLE M. C.; GREGORIO C. C., 2002). Dentre as estruturas sarcoméricas citam-se proteínas responsáveis por ligações entre os filamentos contráteis à linha Z e a própria linha Z, responsável pela sustentação e ancoragem das proteínas contráteis. O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui

filamentos de actina e filamentos intermediários que conectam sarcomeros paralelo entre si, com o sarcolema e com membranas de organelas intracelulares. O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui os microtúbulos, que estabelecem conexões longitudinais entre as estruturas sub-celulares dos miócitos cardíacos (SCOPACASA B. S.; TEIXEIRA V. P.; FRANCHINI K. G., 2003). Como sustentam e ancoram as estruturas sub-celulares, as proteínas do citoesqueleto sofrem tensão e se deformam podendo servir como transdutores de força nos miócitos cardíacos (SUSSMAN M.; MCCULLOCH A; BORG T. K., 2002; EPSTEIN N. D.; DAVIS J. S., 2003). Também importante, no contexto da mecano-transdução, é a capacidade do citoesqueleto de ancorar e controlar a atividade de moléculas sinalizadoras que, uma vez ativadas, podem coordenar a expressão gênica e as respostas fenotípicas a estímulos mecânicos (BURRIDGE K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA M., 1996; JANMEY P. A., 1998).

Evidências clínicas e experimentais indicam que o estímulo mecânico, representado pelo aumento de tensão na parede do ventrículo esquerdo pode contribuir para as alterações na estrutura miocárdica durante o processo de remodelamento. No entanto, os mecanismos pelos quais o estímulo mecânico provoca ou contribui para as alterações celulares e teciduais observadas durante o remodelamento miocárdico permanecem pouco explorados.

O estímulo mecânico pode ativar canais iônicos, provocar a liberação de fatores locais de crescimento celular, bem como ativar mecanismos de sinalização celular através do citoesqueleto, via acoplamento com a membrana celular, organelas ou o núcleo (CHICUREL ME, CHEN CS, INGBER DE., 1998; JANMEY P. A., 1998; MANIOTIS AJ, CHEN CS, INGBER DE., 1997).

Grande variedade de canais iônicos e correntes, dentre os quais canais K^+ ATP (VAN WAGONER DR., 1993), canal de K^+ retificador de corrente (SASAKI N.; MITSUYE T.; NOMA A., 1992), canais de Cl^- (HAGIWARA N.; MASUDA H.; SHODA M.; IRISAWA H., 1992), canais de Ca^{++} tipo L (MATSUDA N., HAGIWARA N., SHODA M., KASANUKI H., HOSODA S., 1996) e corrente gerada pela bomba Na/K (SASAKI N.; MITSUYE T.; NOMA A., 1994), podem ser modulados pelo estímulo mecânico. Apesar de poderem influenciar o potencial de membrana e a função miocárdica, não existem demonstrações consistentes de que a ativação de canais sensíveis a estiramento podem contribuir para as alterações estruturais das células miocárdicas em condições de sobrecarga mecânica.

Demonstramos anteriormente, (FRANCHINI K. G.; TORSONI A. S.; SOARES P. H. A.; SAAD M. J. A., 2000) que a quinase de adesão focal (FAK – Focal Adhesion Kinase), expressa-se em abundância, sendo rapidamente ativada, quando o miocárdio é submetido a estímulos mecânicos. Esta molécula sinalizadora foi originalmente descrita (WANG H-B.; DEMBO M.; HANKS S. K.; WANG Y-L., 2001) em células em cultura como uma proteína tirosina quinase localizada nos sítios de adesão ao substrato, o que despertou o interesse de caracterizá-la como um sinalizador envolvido na mecano-transdução entre o ambiente e as células. Em nossos estudos iniciais, também demonstramos que a Fak está associada à fração dos filamentos de actina não-sarcomérica dos miócitos cardíacos e que sua ativação acompanha-se de ativação de vias de sinalização celular envolvidas no crescimento hipertrófico e de outras vias envolvidas na sobrevivência celular. Em corações isolados (DOMINGOS P. P.; FONSECA P. M.; NADRUZ. W. JR.; FRANCHINI K. G., 2002), verificamos que a ativação da Fak é determinada pelo estiramento passivo do miocárdio, mais do que por tensões ativas.

A ativação da Fak depende da auto-fosforilação do resíduo de tirosina 397 (Tyr397) no domínio N-terminal da molécula (SUSSMAN M.; MCCULLOCH A.; BORG T. K., 2003; FRANCHINI K. G.; TORSONI A. S.; SOARES P. H .A.; SAAD M. J. A., 2000; POLTE T. R.; HANKS S. K., 1997; TORSONI A. S.; CONSTANCIO S. S.; NADRUZ. JR. W.; HANKS S. K.; FRANCHINI K. G., 2003). A Tyr397 fosforilada recruta outra tirosina quinase conhecida como Src, que, uma vez ativada, fosforila os resíduos Tyr576-577 da Fak incrementando sua atividade. A ativação local da Fak também promove recrutamento e agregação (“clusters”) de outras moléculas de Fak, amplificando o sinal do complexo protéico. A Src ativada também promove a fosforilação de resíduos adicionais da Fak como a Tyr 925, responsável por ativar vias de sinalização envolvidas no crescimento celular. Esta seqüência de ativação Fak, bem como a estreita cooperação entre Fak e Src para a ativação, inicialmente demonstradas em outros tipos celulares foi confirmada em cardiomiócitos em resposta a estímulos mecânicos em nossos estudos anteriores (FRANCHINI K. G.; TORSONI A. S.; SOARES P. H .A.; SAAD M. J. A., 2000; DOMINGOS P. P.; FONSECA P. M.; NADRUZ. W. JR.; FRANCHINI K. G., 2002; TORSONI A. S.; CONSTANCIO S. S.; NADRUZ. JR. W.; HANKS S. K.; FRANCHINI K. G., 2003).

Em cardiomiócitos isolados de ratos neonatos, demonstramos que o estiramento aplicado diretamente em miócitos isolados provoca a ativação da Fak (TORSONI A. S.; CONSTANCIO S. S.; NADRUZ. JR. W.; HANKS S. K.; FRANCHINI K. G., 2003). Neste estudo também demonstramos que a ativação da Fak por estiramento não depende da ativação de fatores parácrinos, o que indica que a ativação da Fak pelo estiramento depende de mecanismo intrínseco do miócito ligado diretamente ao estímulo mecânico. Esta idéia foi confirmada em estudo recente do nosso laboratório que demonstrou, através de sondagens

com sistema de duplo-híbrido, ensaios de “pull-down” e imunohistoquímica, a associação direta entre a Fak com a região C-terminal da cadeia pesada de miosina, bem como a dependência desta associação para a ativação da Fak pelo estímulo mecânico em cardiomiócitos (FONSECA PM, IONUE RY, KOBARG CB, KOBARG J, FRANCHINI KG.-submitted).

Também demonstramos (TORSONI A. S.; CONSTANCIO S. S.; NADRUZ. JR. W.; HANKS S. K.; FRANCHINI K. G., 2003), que a ativação da Fak por estiramento em miócitos cardíacos tem papel crítico na regulação da re-expressão de genes do programa fetal induzida por estímulo mecânico. Existe ampla constatação experimental (SCHAUB M. C.; HEFTI M. A.; HARDER B. A.; EPPENBERGER, H. M., 1997; HOSHJIMA M.; CHIEN K. R., 2002) de que a re-expressão do programa gênico fetal é parte essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos. Desta forma, a demonstração da importância da Fak para a expressão de ANF em resposta ao estiramento indica o potencial desta enzima como elemento de controle das alterações fenotípicas dos cardiomiócitos induzidas por estímulos mecânicos.

Remodelamento do Ventrículo Esquerdo após Infarto do Miocárdio

A perda aguda de células miocárdicas resulta em estabelecimento de sobrecarga mecânica súbita, que produz aumento de tensão nas paredes do ventrículo esquerdo. Conseqüentemente inicia-se um processo de dilatação da cavidade ventricular seguido de substituição do tecido necrótico por fibrose reparativa e hipertrofia do miocárdio remoto, um processo que pode continuar por semanas ou meses até que as forças de distensão sejam contrabalançadas pela tensão gerada pela cicatriz colágena e pela hipertrofia do miocárdio remoto. Este processo culmina com modificação da forma, volume e função do ventrículo, conhecidas como remodelamento ventricular. Dentre os vários fatores que influenciam a extensão e velocidade com que este processo ocorre, citam-se o tamanho, a localização e a transmuralidade do infarto, além da extensão de miocárdio atordado, a patência da artéria relacionada ao infarto e a intensidade com que são liberados fatores tróficos locais e sistêmicos (PFEFFER MA, BRAUNWALD E., 1990; WARREN SE, ROYAL HD, MARKIS JE, et al., 1993). A incapacidade de normalizar a tensão na parede resulta em dilatação progressiva, recrutamento da zona da borda do infarto para a cicatriz, expansão da área de infarto e deterioração da função contrátil (PFEFFER MA, BRAUNWALD E., 1990; WHITE HD, NORRIS RM, BROWN MA, et al., 1987).

O remodelamento pós-infarto tem sido arbitrariamente dividido em uma fase precoce (primeiras 72 horas) e uma fase tardia (após as primeiras 72 horas). A fase precoce envolve a expansão da zona de infarto (ERLEBACHER JA, WEISS JL, WEISFELDT ML, et al., 1984), que pode resultar em ruptura ventricular ou formação de aneurisma. A fase tardia envolve o ventrículo esquerdo globalmente e está associada com a dilatação tempo-dependente e distorção da forma do ventrículo esquerdo e hipertrofia do miocárdio remoto.

Na fase aguda ocorre migração de macrófagos, monócitos e neutrófilos para a área de infarto, tendo início o processo de reparação da área de infarto. A secreção de serina proteases pelas células inflamatórias, a ativação de metaloproteinases e o aumento de tensão na parede da matriz levam à degradação do arcabouço de fibras colágenas responsáveis pelo alinhamento dos miócitos (ERLEBACHER JA, WEISS JL, WEISFELDT ML, et al., 1984), resultando em expansão da área de infarto. A expansão do infarto ocorre dentro de horas após a morte celular (WARREN SE, ROYAL HD, MARKIS JE, et al., 1993), resultando em adelgaçamento da parede e dilatação da cavidade ventricular esquerda, o que contribui para aumento adicional na tensão da parede ventricular esquerda.

A estrutura em tripla-hélice do colágeno o torna resistente à degradação proteolítica, exceção feita às metaloproteinases, que são enzimas secretadas na matriz extracelular em forma inativa, como pró-enzima (MANN DL, SPINALE FG., 1998). A ativação de metaloproteinases requer a clivagem proteolítica de uma sequência peptídica. A metaloproteinase 1 (colagenase) cliva o colágeno em fragmentos de $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$, que são desdobrados e degradados subsequentemente por metaloproteinases 2 e 9 (gelatinase) e 3 (estromelisina) (MANN DL, SPINALE FG., 1998). A regulação das metaloproteinases ocorre em três níveis: transcrição, ativação e inibição (MANN DL, SPINALE FG., 1998). No infarto do miocárdio a quebra do colágeno inicia-se após as primeiras 3 horas e é induzida por serina proteases como a plasmina e pela metaloproteinase 8 de neutrófilos (CLEUTJENS JP, KANDALA JC, GUARDA E, et al., 1995). A digestão inicial das fibras intercelulares de colágeno é responsável pelo deslizamento dos miofilamentos necróticos, causando a expansão da área de infarto (ERLEBACHER JA, WEISS JL, WEISFELDT ML, et al., 1984; OLIVETTI G, CAPASSO JM, SONNEENBLICK EH, et al., 1990). A atividade das

metaloproteinases atinge seu pico no 7º dia pós-infarto do miocárdio (SIGUSCH HH, CAMPBELL SE, WEBER KT., 1996). A atividade colagenolítica fica confinada à região de necrose por inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Estes inibidores são proteínas de baixo peso molecular que formam complexos de alta afinidade com as metaloproteinases e neutralizam sua atividade e a degradação do colágeno (DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI E, et al., 1993). As TIMPs são induzidas na área de infarto dentro de 6 horas, atingindo um pico por volta de 2 dias e retornando ao normal após 14 dias do infarto. A síntese de TIMPs é modulada pelos níveis de metaloproteinases ativadas, de tal forma que a degradação de colágeno reflete o desequilíbrio entre metaloproteinases e TIMPs.

O reparo da região de infarto é ativado por citocinas liberadas pelos miócitos em sofrimento isquêmico. A citocina TGF- β 1 aumenta precocemente na zona de infarto e estimula a quimiotaxia de macrófagos e fibroblastos, bem como a proliferação de fibroblastos (DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI E, et al., 1993). A presença de TGF- β 1 é importante para a habilitação das células inflamatórias para a execução da tarefa de reparar o tecido. Da mesma forma, a liberação precoce de TGF- β 1 dos miócitos necróticos e macrófagos é também importante na transformação fenotípica de fibroblastos intersticiais em miofibroblastos (DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI E, et al., 1993, GUARDA E, KATWA LC, MYERS PR, et al., 1993). Os miofibroblastos expressam genes que codificam os procolágenos tipo 1 e 3 e também produzem Angiotensina I e II e receptores de Angiotensina II, TGF- β 1 e Endotelina 1, o que capacita a autoregulação do *turnover* de colágeno (DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI E, et al., 1993, WEBER KT., 1997). Além dos fatores humorais envolvidos, o estiramento provocado pelo aumento de tensão

mecânica também determina o grau de maturação do colágeno e da resistência da escara fibrosa (MCCORMICK RJ, MUSCH TI, BERGMAN BC, et al., 1994). Após a formação da fibrose na zona de infarto, ocorre o equilíbrio entre as forças de distensão e de restrição, levando a uma redução da formação de colágeno, sendo que alguns miofibroblastos sofrem apoptose.

A deposição das fibras colágenas Tipo I e III ocorre predominantemente na zona de infarto, contudo, também ocorre na zona remota quando a sinalização intercelular é potenciada por necrose miocitária extensa. O aumento precoce da tensão na parede ventricular é um potente estímulo para o aumento da síntese de unidades contráteis (CLEUTJENS JP, KANDALA JC, GUARDA E, et al., 1995), da mesma forma que é um dos principais determinantes do desempenho funcional do ventrículo esquerdo.

A hipertrofia dos cardiomiócitos da área remota pode atingir até 70% de aumento do volume celular (ANVERSA P, BEGHI C, KIKKAWA Y, et al., 1985) e ocorre por aumento do número de sarcômeros em série, sem modificação significativa do comprimento do sarcômero. A hipertrofia do miocárdio remoto é uma resposta que tende a neutralizar sobrecarga, atenuando a dilatação progressiva e estabilizando a função contrátil (PFEFFER MA, BRAUNWALD E., 1990).

Como não são conhecidos os papéis desempenhados pelo sistema de sinalização associado com a FAK durante o remodelamento do miocárdio após o infarto do miocárdio foi nossa intenção neste trabalho avaliar a atividade e distribuição, nos tipos celulares miocárdicos, das proteínas que compõem este sistema no miocárdio remanescente remodelado e cicatriz miocárdica.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

Avaliar a expressão, localização e atividade da quinase de adesão focal (Fak) e da quinase responsiva á estímulos extracelulares (Erk1/2) em corações e cardiomiócitos de ratos na evolução precoce e tardia após o infarto do miocárdio na área remota do miocárdio e cicatriz miocárdica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, com pesos corporais entre 180-250g, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas (CEMIB). Os animais foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*, e manipulados diariamente para acompanhamento de possíveis alterações pós-cirúrgicas.

3.2- PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.2.1- Infarto do Miocárdio (IM)

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de 20 mg de cloridrato de cetamina (Ketelar®, Cristália, Brasil) e 0,2 mg de diazepam (Diazepam, União Química Farmacêutica Nacional S/A). Após tricotomia e assepsia da região torácica, os animais foram colocados em mesa cirúrgica com temperatura controlada a 37° C. A traquéia foi canulada com tubo de gelco e a ventilação controlada com respirador para animais de pequeno porte (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). Em seguida foi realizada incisão cutânea transversal do terceiro espaço intercostal esquerdo, para acesso à cavidade torácica, o coração foi exposto, o pericárdio foi aberto e a artéria coronária descendente anterior foi ligada por fio cirúrgico 5-0 (Polycot 5-0 Ethicon, Jonhson & Jonhson, Brasil). Após o procedimento cirúrgico a cavidade torácica foi fechada mediante sutura em planos da musculatura do espaço intercostal e da pele com fio de algodão 3-0 (Polycot * 3-0 Ethicon, Jonhson & Jonhson, Brasil). Todos os animais foram tratados com antibiótico profilático intramuscular (Pentabiótico Veterinário de Pequeno Porte – Fort Dodge®, Brasil – 4,5 mg/10g de peso corporal) e se recuperaram por 24h em gaiolas individuais (Figura 1).

Animais controles com pesos semelhantes aos utilizados na cirurgia foram utilizados em alguns dos protocolos descritos.

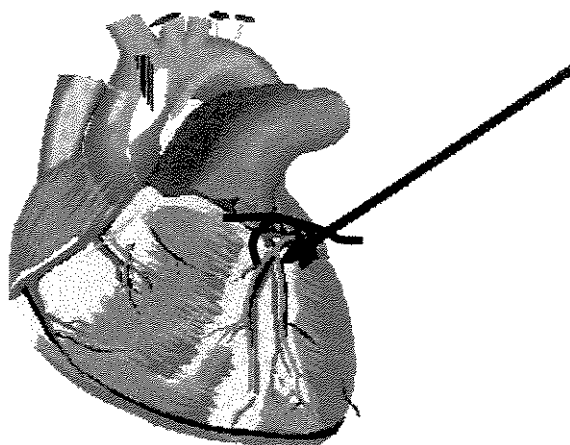


Figura 1. Figura representativa da técnica de infarto do miocárdio (IM).

3.2.2- Cateterização para Registros Hemodinâmicos

Os registros hemodinâmicos foram realizados em ratos controles e no 1°, 3°, 7°, 15° e 45° dias após o infarto do miocárdio - IM. Os ratos foram anestesiados com pentabarbital sódico (Cristália, Brasil – 50mg/Kg) e colocados em mesa cirúrgica com temperatura controlada a 37° C. A artéria carótida comum foi cateterizada com catéter de polietileno PE50 mantidos patentes com solução de heparina [0,1ml de heparina sódica 5.000U.I/ml (Cristália, Brasil) em 0,9 ml de solução isotônica do cloreto de sódio 0,9 % - soro fisiológico], que era avançado até a cavidade ventricular esquerda para registros das pressões ventriculares. Para a construção deste catéter, tubos de polietileno PE50 (Clay Adams; USA) de 5cm de comprimento foram aquecidos em fogo e estirados, de forma a reduzir os efeitos sobre o fluxo aórtico e os artefatos no registro da pressão ventricular.

3.3- REGISTROS HEMODINÂMICOS

Para o registro da pressão ventricular esquerda, o catéter foi conectado em um transdutor de pressão tipo “strain-gauge” (BLPR – World Precision Performance Plastics CO; EUA), previamente calibrado, preenchido com soro fisiológico desgaseificado e com comprimento adequado para que os artefatos de transmissão da onda de pressão fossem eliminados ou minimizados. O transdutor foi conectado a um amplificador de sinais (GP4A – General Purpose Amplifier – ©Stoelting Co.; USA) e conectado a uma placa analógico-digital para transformação do sinal mecânico em sinal analógico. Esta placa estava conectada a um computador tipo PC carregado com o sistema Windaq (Windaq-Dataq Instruments Inc., Akron, OH, EUA), para monitorização hemodinâmica e pós processamento.

Os registros foram analisados pelo programa Windaq (Dataq Instruments Windaq, Version 1.78, Akron, OH; EUA) e Advanced Codas (Dataq Instruments, Calc. Package, Version 3.19, EUA). A análise foi realizada com a detecção de picos sistólicos e diastólicos das ondas de pressão para obtenção das médias aritméticas, das pressões arteriais sistólicas e diastólicas durante cada etapa dos protocolos experimentais (Figura 2). A frequência cardíaca foi obtida da análise dos intervalos entre picos sistólicos máximos normalizados para 1 minuto. Os valores do pico máximo, pico mínimo, pressão arterial média (obtida da integral da área de cada pulso) e frequência cardíaca foram obtidos de planilhas de Excel geradas com valores do pós-processamento com o programa Advanced-Codas.

Com as médias da frequência cardíaca (FC), pressões sistólicas ventriculares esquerdas (PSVE), pressões diastólicas finais ventriculares esquerdas (PDVE), derivadas de

pressões positiva e negativa ($\pm dP/dt$) a hemodinâmica de cada grupo de ratos estudados foram avaliadas para eventual comparação.

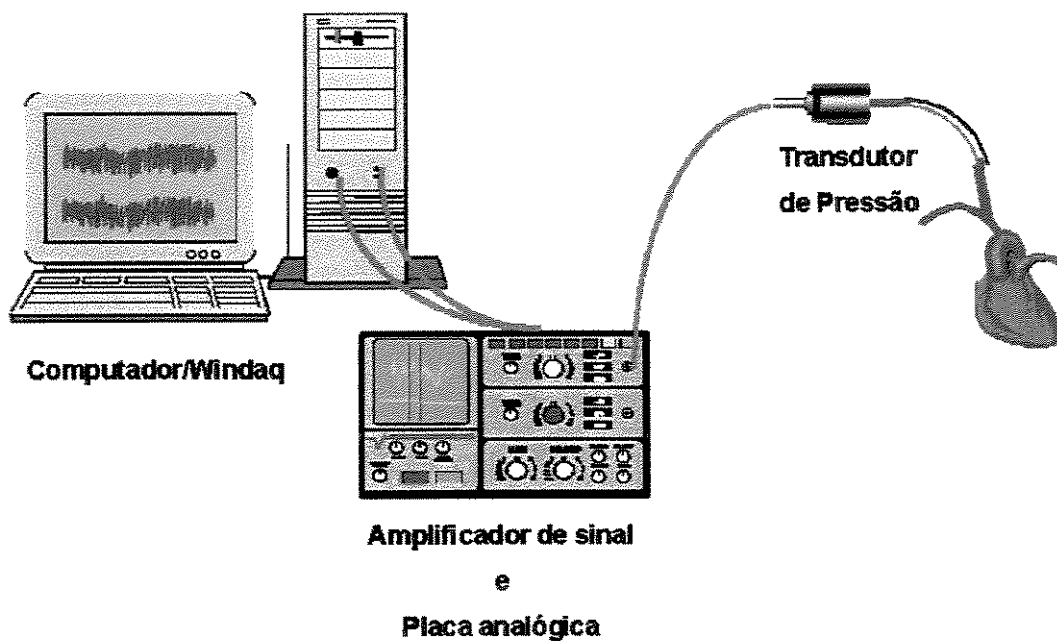


Figura 2. Figura representativa do sistema de registros hemodinâmicos utilizado nos experimentos *in vivo*.

3.4- PROCESSAMENTO DO MIOCÁRDIO PARA ANÁLISES HISTO-MORFOMÉTRICAS

3.4.1- Processamento de miocárdio em parafina e obtenção de lâminas

Anteriormente ao procedimento de fixação do coração, os animais foram submetidos a medição da pressão sistólica e diastólica. Os animais, em que a pressão diastólica final ventricular esquerda estava em média 25 mmHg, foram utilizados para avaliação histomorfométrica.

As análises morfométricas foram realizadas no 1º, 3º, 7º, 15º e 45º dia após o infarto do miocárdio - IM. Os ratos foram anestesiados com pentabarbital sódico (Cristália, Brasil – 50mg/Kg) e colocados em mesa cirúrgica com temperatura controlada a 37º C. O animal foi sacrificado com injeção de xilocaína 2% sem vasocronstritor pela artéria carótida comum direita para que o coração parasse em diástole. Ainda pela artéria carótida comum direita foram injetados 20ml de solução isotônica do cloreto de sódio 0,9 % (soro fisiológico) e 20 ml de fixador. Foi utilizado solução de Formalina 10%, se o coração fosse utilizado para análise dos parâmetros morfométricos, ou ainda paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4 naqueles corações destinados a realização de imunohistoquímica. Após este procedimento, o coração foi removido e colocado no mesmo fixador o qual foi perfundido. Após 24 horas de fixação, os corações foram seccionados em cortes transversais ao eixo longo do ventrículo esquerdo na altura do corpo dos músculos papilares.

Após a lavagem em tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, por 30 minutos, estes fragmentos foram desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados e incluídos

em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram coletados em lâminas pré-tratadas com solução de poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, Inc.; USA) e então corados em Tricômico de Masson para análise histo-morfométrica ou submetidos à imunohistoquímica.

3.4.2- Imunomarcacão de miocárdio

As secções obtidas após o processamento do tecido em parafina, àquelas obtidas de tecido fixado com paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salina 0,1M, pH 7,4, foram fixadas em acetona por 5 minutos lavadas em PBS 0,1M, de pH 7,4 por 15 minutos. Em seguida foram submetidas ao bloqueio de ligações inespecíficas com emprego de leite desnatado (Molico) 3% em PBS 0,1M, pH 7,4, durante 1 hora e incubadas com o anticorpo primário anti-Fak, diluído em solução de leite desnatado 1% em PBS 0,1M, pH 7,4, na proporção de 1:100, por 12 horas, a 4°C. Após este período, as secções foram lavadas em PBS 0,1M, pH 7,4, por 20 minutos e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase e coradas com DAB (Figura 3). A análise dos resultados foi realizada mediante observação das secções de coração ao microscópio de luz (aumento de 1000X). As imagens foram capturadas por câmera digital (Sony DSC-S75) e transferidas para o computador.

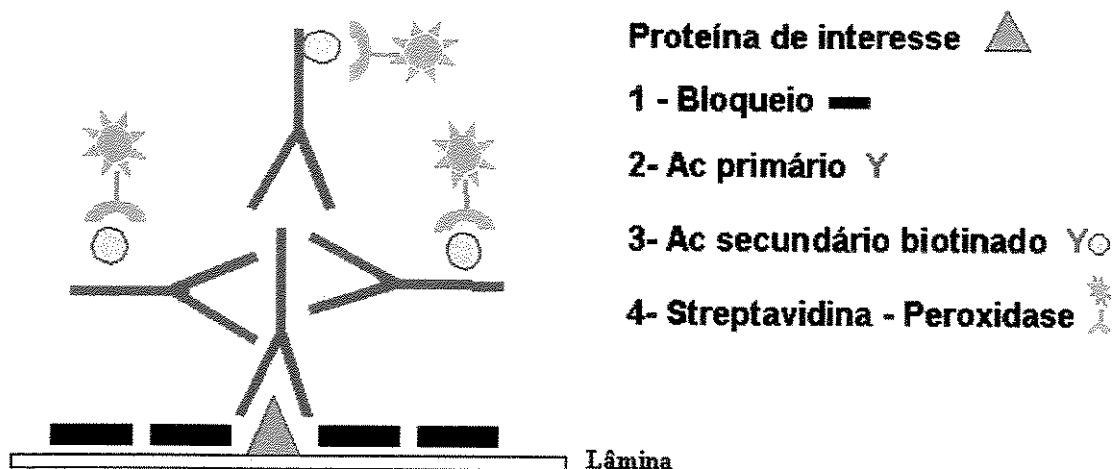


Figura 3. Figura representativa da técnica de imunohistoquímica.

3.5- ISOLAMENTO DE CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES

Foram utilizados ratos adultos entre 180-250g. Estes animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Cristália, Brasil – 50mg/Kg) e solução de heparina [0,2 ml de heparina sódica 5.000U.I/ml (Cristália, Brasil) foi injetado no animal e a cavidade torácica foi aberta. O coração foi excisado o mais rápido possível e a aorta canulada em sistema de perfusão de Langendorf, estabelecendo, portanto, perfusão retrógrada. O coração foi perfundido (8ml/min) com tampão Henseleit Modificado, por aproximadamente 5 minutos [(10mM HEPES, 118mM NaCl, 5mM KCl, 1.2 mM MgSO₄ .7H₂O, 25mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 6mM glicose, 1ml de heparina sódica 5.000U.I/ml (Cristália, Brasil), 1ml de cloridrato de lidocaína 2% - sem vasoconstritor (Xylestesin[®], Cristália, Brasil)], (pH 7,4). Após este período, foi adicionado EGTA (4mM) ao tampão Henseleit por um período de 15 minutos. Iniciou-se então a perfusão com tampão de digestão (tampão Henseleit, 0,1% BSA e 300µg/ml de collagenase tipo IA –Sigma) por 30 minutos. Completada a perfusão, os átrios e o ventrículo direito foram

retirados e o ventrículo esquerdo colocado em placa de Petri com tampão Henseleit adicionado de BSA 0.1% e cortados em pedaços pequenos. A suspensão celular foi filtrada em gaze e o cálcio repostado na solução em concentração final de 1,2mM. É importante lembrar que todo o processo e tampão utilizado foram mantidos sob constante oxigenação.

A suspensão celular foi centrifugada, colocada em meio de cultura DMEM e deixada aderir por 30 minutos sobre lamínulas de vidro tratadas previamente com Poli-L-lisina.

As lamínulas foram coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para que as medidas morfométricas fossem realizadas. Foram utilizadas apenas as células integras e capturados 60 cardiomiócitos de cada grupo experimental por câmera digital (Sony DSC-S75), transferidas para o computador e as medidas foram obtidas através do programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, MA, EUA) (Figura 4).

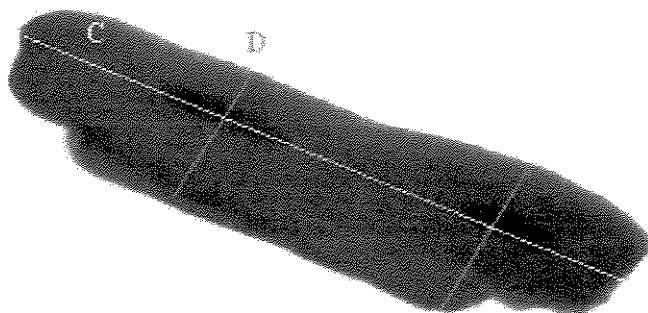


Figura 4. Figura representativa da técnica para obtenção das medidas morfométricas.

3.6- COLORAÇÕES

3.6.1- Tricômico de Masson

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

Protocolo:

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

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

3.6.2- Hematoxilina- Eosina

As lâminulas contendo os cardiomiócitos isolados ventriculares esquerdos foram hidratadas, coradas com solução de Hematoxilina de Harris (45 a 90 segundos), lavadas por 10 minutos água corrente, coradas pela solução de Eosina (10 a 60 segundos), passadas em água destilada rapidamente; logo em seguida desidratadas, diafanizadas e montadas.

3.7- IMMUNOBLOTTING

3.7.1- Coleta e homogeneização do miocárdio

Nos experimentos em que a expressão e fosforilação de proteínas foram o objeto de estudo, o ventrículo esquerdo foi coletado ao final do período de infarto do

miocárdio, separadas a área remota da área infartada as quais foram cortadas em fragmentos menores e homogenizadas rapidamente em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização (1% Triton-X 100, 100 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4], 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L ortovanadato de sódio, 2 mmol/L PMSF, e 0.1 mg de aprotinina/ml) a 4 °C em homogenizador tipo Polytron PTA 20S (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos, cada grupo experimental realizado um *pool* de 3 ventrículos.

Os extratos foram centrifugados a 11.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi então utilizado para o ensaio. A determinação da concentração proteica foi realizada pelo método de BRADFORD et al. (1976) utilizando-se reagentes BIO-RAD e solução de albumina bovina como padrão.

3.7.2. Análise de proteína por immunoblotting

Os extratos totais foram tratados com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100mM e aquecidos em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Após este procedimento, ambos foram submetidos a gel de SDS poliacrilamida a 10% e 12%, em aparelho de eletroforese da Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories), a 35 miliampères em corrente constante. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 min a 120 V (constante) em aparelho da Bio-Rad.

Em seguida, as membranas foram incubadas em solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20), acrescida de 5% leite em pó magro, por 1 hora a temperatura ambiente, de modo a reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos primários às proteínas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com 10µg de anticorpos primários específicos (anti-Fak, anti-Erk1/2, anti-p-Fak 397 e anti-p-Erk1/2), diluídos em solução basal, contendo 3% de leite em pó magro, por 12 horas a 4°C. Após lavagem por 30 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas com 2 µCi de [¹²⁵I] proteína A (30 µCi/µg) em 10 ml de solução basal, contendo 1% de leite em pó magro, por 2 horas em temperatura ambiente e então lavadas novamente como descrito anteriormente. A [¹²⁵I]Protein A ligada aos anticorpos específicos foi detectada por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY), com intensificadores Cronex Lightening Plus, a -80°C por 12-48 horas. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria óptica, utilizando um *scanner* (HP3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, MA, EUA) (Figura 5).

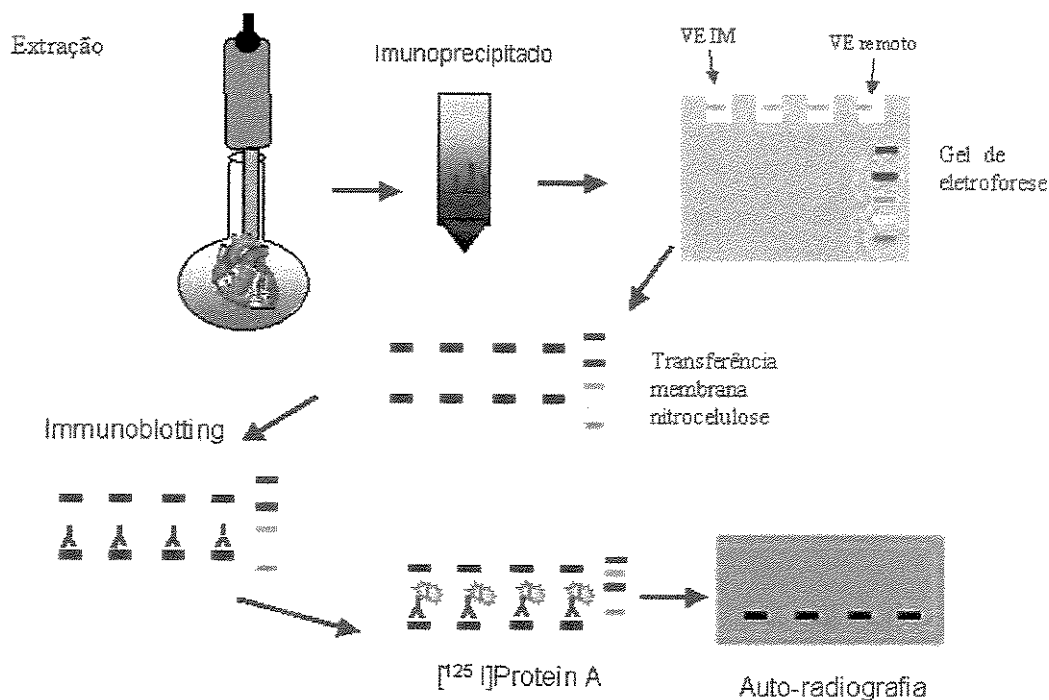


Figura 5. Figura representativa do modelo de extração do miocárdio e imunoblotting.

3.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

3.9- PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

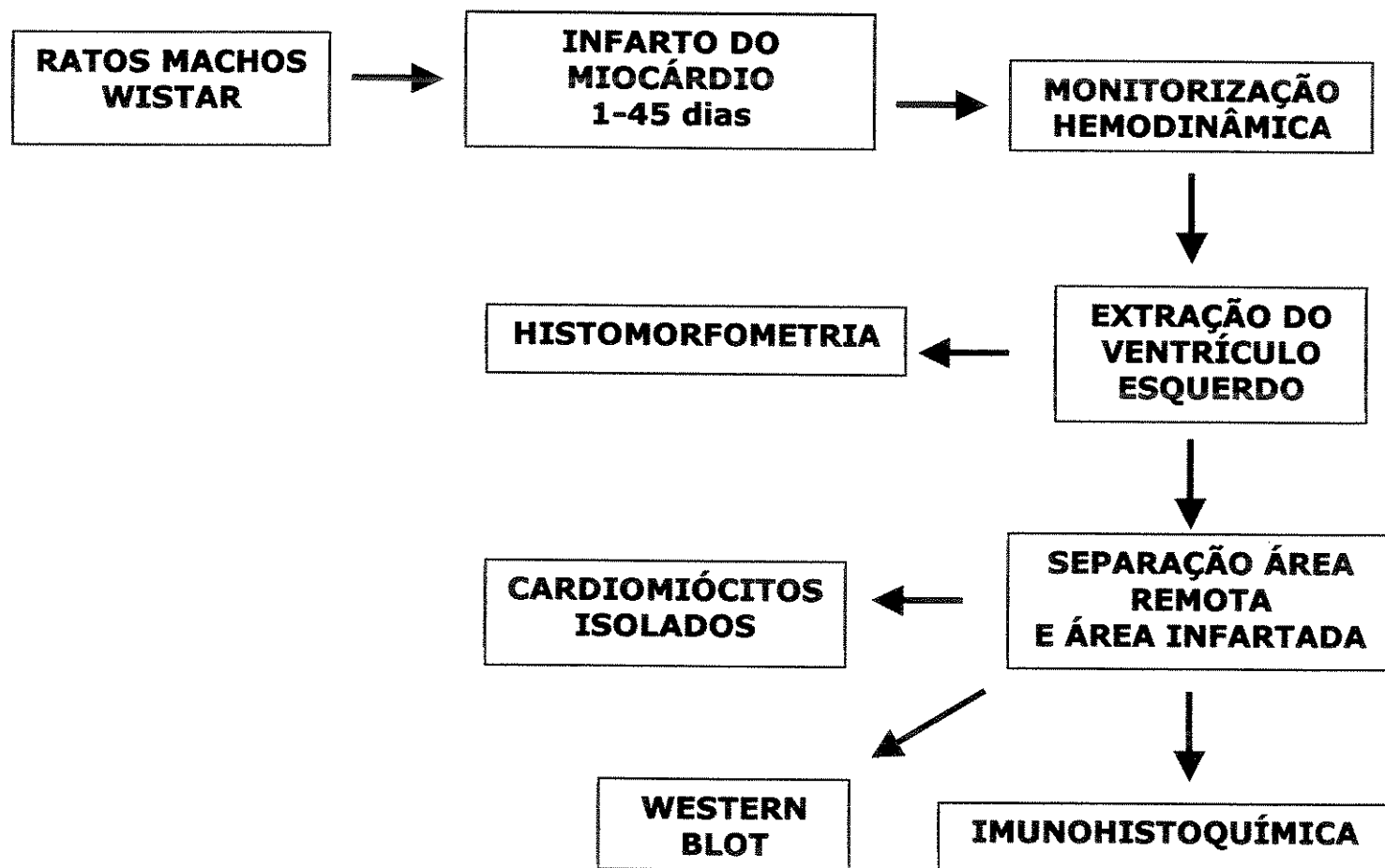


Figura 6. Esquema representativo dos protocolos experimentais utilizados.

4. RESULTADOS

4.1- Análise Morfométrica do Ventrículo Esquerdo

A avaliação da extensão do infarto do miocárdio e do remodelamento do ventrículo esquerdo foi realizada através de análise morfométrica de cortes transversais, realizados na altura dos músculos papilares do ventrículo esquerdo. A extensão do infarto foi avaliada através da relação entre o comprimento do segmento de arco correspondente à área infartada e o perímetro interno da cavidade ventricular esquerda, como indicado no desenho representativo da Figura 7.

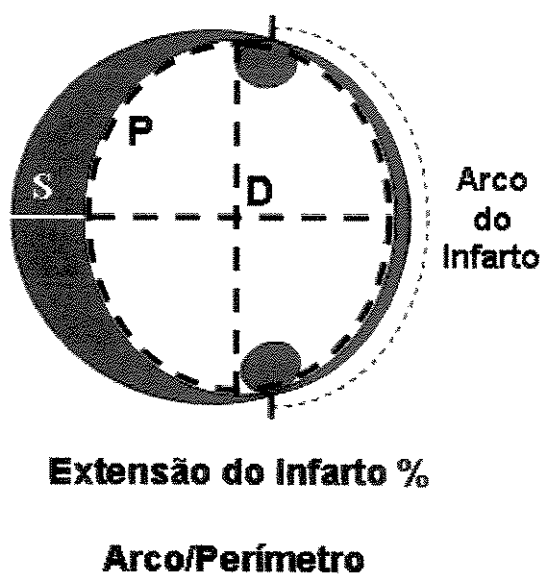


Figura 7. Esquema representativo dos parâmetros utilizados para análise morfométrica do ventrículo esquerdo.

S: Espessura do septo interventricular; D: Diâmetro da cavidade ventricular esquerda; P: Perímetro interno.

A intensidade do remodelamento do ventrículo esquerdo foi avaliada através dos parâmetros: diâmetro da cavidade ventricular esquerda, espessura do septo interventricular e razão entre a espessura do septo e diâmetro do ventrículo esquerdo (S/D).

Na Figura 8 são apresentados exemplos representativos de cortes histológicos utilizados para o estudo de corações controle e com infarto do miocárdio com evolução de 1 a 45 dias.

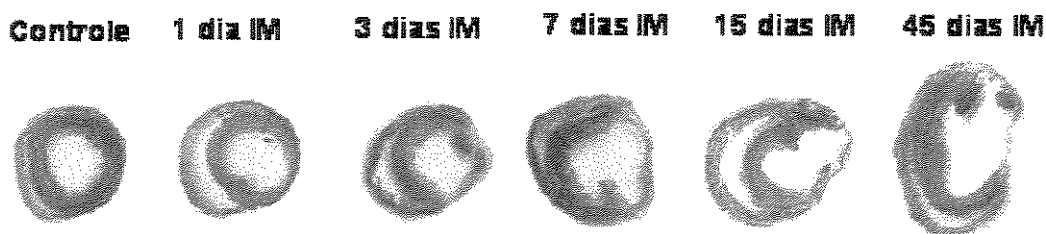


Figura 8. Figura de cortes histológicos transversais de corações de ratos controle e infartados. Os corações foram obtidos de animais controle ou infartados de 1 a 45 dias de evolução de infarto e processados para coloração com Tricômico de Masson.

São nítidas as modificações nas dimensões da cavidade e da espessura do septo que caracterizam o processo de remodelamento. Também é nítido, o aparecimento de tecido fibroso na área infartada, visível já no 3º dia de evolução do infarto.

Os valores médios dos parâmetros morfométricos obtidos em ratos controle e com infarto de até 45 dias são mostrados na Tabela 1. Como nos períodos mais prolongados (15 e 45 dias) os ratos apresentaram ganho de peso e crescimento corporal, as medidas morfométricas dos corações destes ratos foram comparadas com aquelas de corações obtidos de grupo controle constituído de ratos com pesos corporais semelhantes (C15/45).

Tabela 1. Média morfométrica de corações de ratos controle e com infarto do miocárdio.

	% do Infarto	Espessura do septo interventricular (mm)	Diâmetro da cavidade ventricular (mm)	S/D	Peso Rato (g)
Controle (n=23)		1.39 ± 0.04	5.04 ± 0.11	0.27 ± 0.01	212 ± 7.6
C 15/45 (n=11)		1.41 ± 0.03	5.22 ± 0.25	0.27 ± 0.01	309 ± 4.3
IM – 1 dia (n=10)		1.34 ± 0.05	5.58 ± 0.24	0.24 ± 0.01	242 ± 8.3
IM – 3 dias (n=11)	31 ± 2.5	1.18 ± 0.07*	5.74 ± 0.2*	0.20 ± 0.01*	201 ± 7.0
IM – 7 dias (n=12)	39 ± 1.8	1.14 ± 0.08*	6.56 ± 0.25*	0.17 ± 0.01*	240 ± 9.8
IM –15 dias (n=11)	41 ± 3.2	1.55 ± 0.09*	7.51 ± 0.25*	0.20 ± 0.01*	273 ± 9.5
MI –45 dias (n=13)	50 ± 2.9	1.67 ± 0.04*	7.92 ± 0.23*	0.21 ± 0.01*	302 ± 8.3

Os animais foram submetidos ao infarto do miocárdio (IM), seus corações submetidos a métodos histológicos e medidos. Os parâmetros avaliados foram espessura do septo interventricular (mm); diâmetro da cavidade ventricular (mm) e razão entre a espessura de septo interventricular pelo diâmetro da cavidade ventricular (S/D). Os animais controles são aqueles que possuem pesos semelhantes aos animais utilizados para cirurgia e submetidos somente a análises hemodinâmicas. **% do Infarto:** razão entre o comprimento da região de infarto e perímetro interno. *p<0,05, comparado com os valores dos corações de ratos controle.

Não houve diferença significativa nos parâmetros morfométricos entre os dois grupos de ratos controle utilizados para comparação com ratos infartados.

A média da porcentagem da área de infarto variou de 31% no 3º dia a 50% no 45º dia nos corações avaliados. Com base em estudos anteriores (PFEFFER MA, BRAUNWALD E., 1993) foram considerados infarto pequeno aqueles com extensão da zona de fibrose relativa ao perímetro interno $< 25\%$, infarto moderado aqueles $\geq 25\%$ e $\leq 35\%$, e infartos grandes aqueles $> 35\%$. Não foram obtidos os valores da extensão da área de infarto nos corações avaliados no 1º dia pós-infarto, por não ser possível, nesta fase, a delimitação da área de infarto pelo método adotado neste estudo.

Como mostrado na Figura 9A e na Tabela 1 foram observadas reduções significativas da espessura do septo interventricular no 3º e 7º dia, seguida de um aumento crescente até o 45º dia de evolução após o infarto. Por outro lado, houve aumento progressivo no diâmetro da cavidade ventricular esquerda, sendo este aumento significativo já no 3º dia de evolução pós-infarto (Figura 9B). Como consequência, ocorreu redução progressiva da razão espessura do septo/diâmetro (S/D) da cavidade ventricular esquerda até o 7º dia, após o qual este parâmetro morfométrico se estabilizou (Tabela 1).

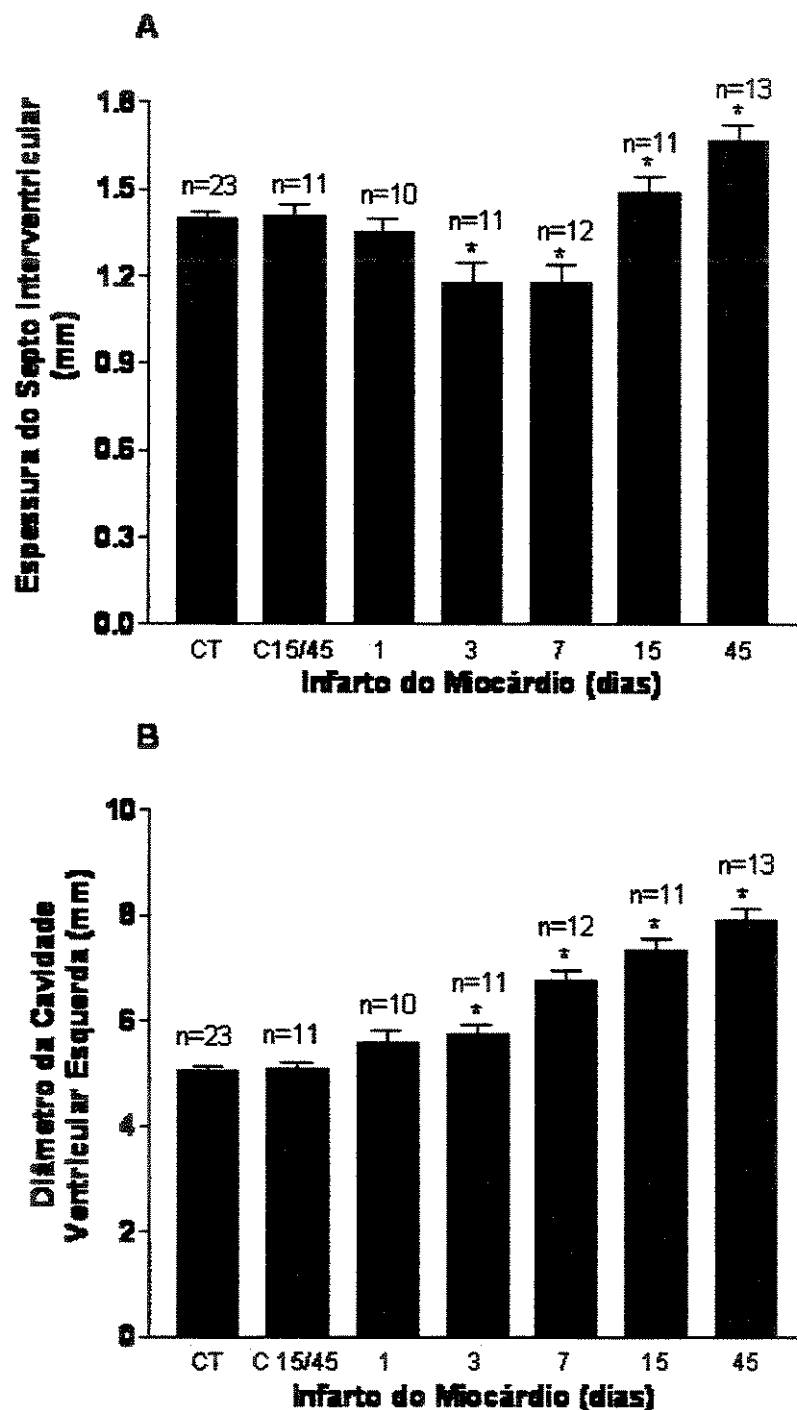
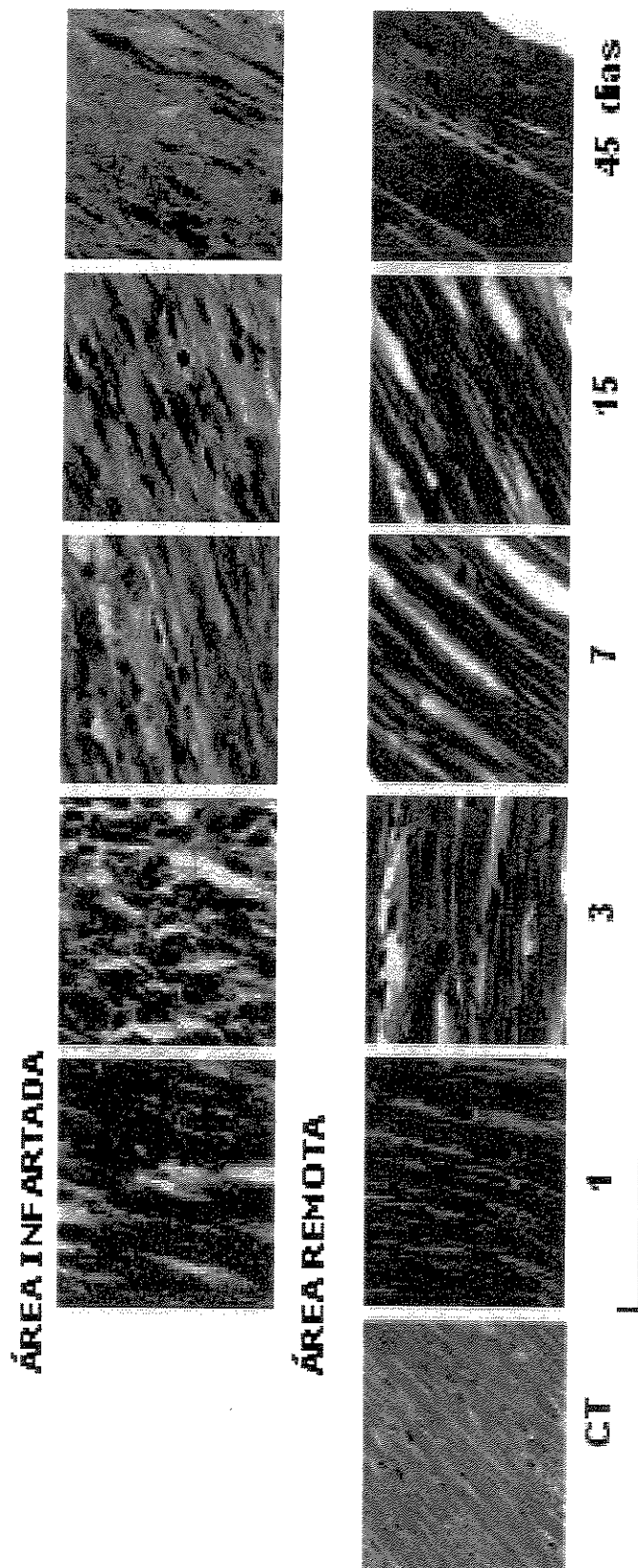


Figura 9. Gráficos representativos dos parâmetros morfométricos obtidos de corações de ratos controle e infartados. A-Média do septo interventricular, expressos em mm, de corações de ratos controle e infartados; B-Média do diâmetro da cavidade ventricular, expressos em mm, de corações de ratos controle e ratos infartados. * $p < 0,05$, comparado com os valores dos corações de ratos controle.

Na Figura 10 estão representados exemplos de imagens histológicas da área de infarto e do miocárdio remoto ao longo do período de 45 dias após o infarto do miocárdio. Na área infartada observam-se cardiomiócitos necróticos no primeiro dia após o infarto do miocárdio, caracterizados por coloração eosinofílica intensa e perda da imagem do núcleo. No 3º dia de evolução observa-se celularidade intensa representada por células inflamatórias e fragmentos de cardiomiócitos, enquanto à partir do 7º dia são observadas células inflamatórias, focos de miócitos em degeneração e traves de tecido intersticial evidenciadas pela cor azul na coloração pelo Tricrômio de Masson. Imagens semelhantes foram observadas após 15 dias do infarto do miocárdio, sendo que podem ser observados focos de tecido de granulação tanto no 7º como no 15º dia. Após 45 dias, observam-se algumas células inflamatórias e escassos miócitos, principalmente na zona de transição entre o miocárdio remoto e a área de infarto. Nesta fase predomina o tecido fibroso intersticial como mostrado no exemplo representativo da Figura 10.



INFARTO DO MIOCÁRDIO

Figura 10. Imagens histológicas da área de infarto e do miocárdio remoto ao longo do período de 45 dias após o infarto do miocárdio. Coração de animais controle e infartados processados em parafina, corados com Tricômico de Masson e avaliados em microscópio óptico. Foram avaliadas áreas remotas e infartadas nos períodos de 1 a 45 dias de evolução do infarto.

No miocárdio remoto observam-se cardiomiócitos hipertróficos, com bifurcações freqüentes e aumento discreto do tecido intersticial, evidentes no 15º e 45º dias de infarto do miocárdio.

Em seguida, cardiomiócitos do miocárdio remoto do ventrículo esquerdo foram extraídos para avaliação de alterações morfológicas provocadas pelo infarto do miocárdio.

Na Figura 11 estão demonstrados exemplos representativos de cardiomiócitos isolados de corações de ratos controle e infartados (1, 3, 7, 15 e 45 dias de infarto do miocárdio). Após 15 dias de evolução, os cardiomiócitos apresentaram nítido aumento em seu comprimento.

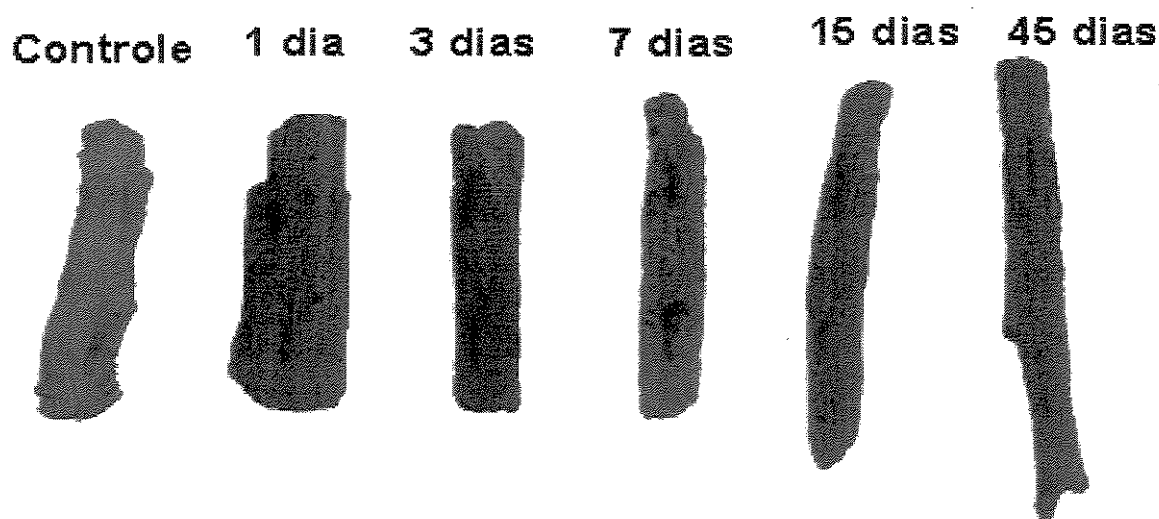


Figura 11. Exemplos de cardiomiócitos isolados obtidos de corações controle e do miocárdio remoto do ventrículo esquerdo de ratos infartados. Cardiomiócitos de ratos controle e infartados (1, 3, 7, 15 e 45 dias de evolução de infarto) foram isolados, corados com HE e observados em microscópio óptico, com aumento de 1000x.

Os valores médios de diâmetro e comprimento dos cardiomiócitos isolados são apresentados na Figura 12A,B. Houve, redução significativa e progressiva no diâmetro dos cardiomiócitos isolados de corações estudados após o 3º dia de infarto do miocárdio (Figura 12A). Por outro lado, aumentos significativos no comprimento dos cardiomiócitos foram observados à partir do 15º dia de evolução do infarto do miocárdio (Figura 12B). Os resultados de comprimento e diâmetro obtidos de corações controle e infartados do presente estudo são compatíveis com aqueles da literatura (GERDES AM., 2002; GERDES AM, KELLERMAM SE, SCHOCKEN DD., 1995).

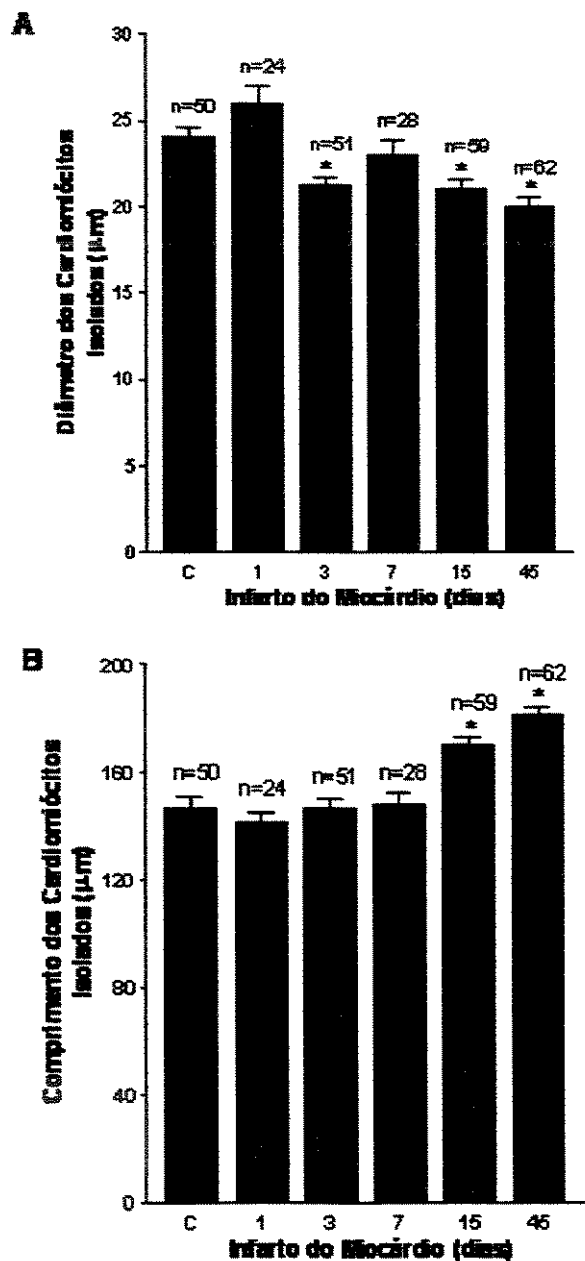


Figura 12. Gráficos representativos das médias dos valores morfométricos obtidos de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais controle e infartados. Células do ventrículo esquerdo de ratos infartados e controle foram isoladas e submetidas a coloração com HE. Foram avaliados em microscópio óptico, utilizando-se aumento de 1000X. A-Média do diâmetro de cardiomiócitos isolados, expressos em μm ; B-Média do comprimento dos cardiomiócitos isolados, expressos em μm . * $p < 0,05$, comparado com os valores obtidos de corações de ratos controle.

4.2-Análises de Pressões do Ventrículo Esquerdo

Parâmetros como frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDVE), primeiras derivadas positiva e negativa da pressão sistólica do ventrículo esquerdo em relação ao tempo ($\pm dP/dt$) foram obtidos em ratos controle e infartados (1 a 45 dias após o infarto do miocárdio - IM).

Os grupos de ratos analisados no 3º e 7º dias após o infarto do miocárdio apresentaram redução significativa da pressão sistólica do ventrículo esquerdo, quando comparados com ratos controle não-infartados (Figura 13A, Tabela 2). Nos demais grupos os valores médios da pressão sistólica foram semelhantes àqueles dos ratos controle.

Na Figura 13B estão representados os valores da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo dos ratos controle e infartados. Houve aumento da pressão diastólica em todos os grupos de ratos infartados (~25 mmHg) quando comparados com os ratos controle (~10 mmHg).

Na Figura 13C (Tabela 2) estão representados os valores das primeiras derivadas (positiva e negativa) da pressão sistólica do ventrículo esquerdo dos ratos deste estudo. Como esperado, os animais infartados apresentaram redução expressiva dos valores da primeira derivada positiva e negativa, indicando redução do desempenho contrátil do ventrículo esquerdo.

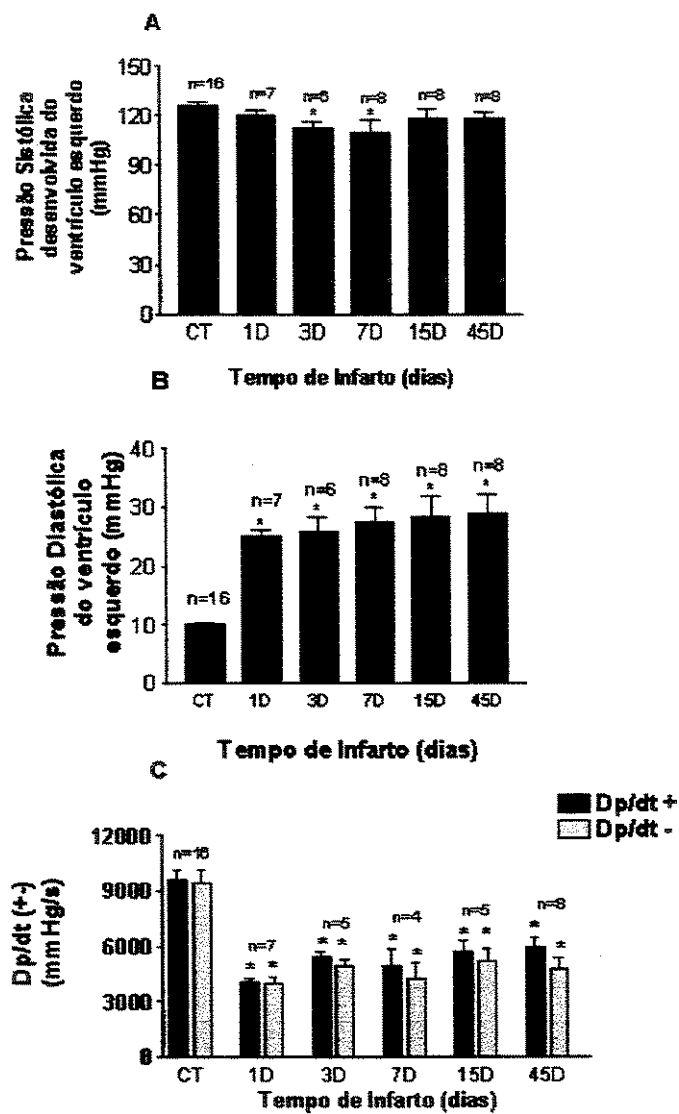


Figura 13. Gráficos representativos das médias dos parâmetros hemodinâmicos obtidos de animais controles e infartados. Animais foram submetidos ao infarto do miocárdio e parâmetros hemodinâmicos foram avaliados após 1, 3, 7, 15 e 45 dias de evolução do infarto. Os animais controles (CT) são aqueles que possuem pesos semelhantes aos animais utilizados para cirurgia e submetidos somente a análises hemodinâmicas. A- Análise comparativa das pressões sistólicas do ventrículo esquerdo, expressas em mmHg, obtidas de ratos controles e infartados nos diferentes períodos estudados. B - Análise comparativa das pressões diastólicas finais do ventrículo esquerdo, expressas em mmHg obtidos de corações de ratos controle e infartados nos diferentes períodos estudados. C - Análise comparativa das primeiras derivadas negativa e positiva da pressão sistólica do ventrículo esquerdo, expressas em mmHg/s em relação ao tempo (dP/dt) obtidas de ratos controles e infartados nos diferentes períodos estudados. (*) $p < 0,05$, comparado com os valores dos corações de ratos controle.

Tabela 2. Tabela representativa das médias dos parâmetros hemodinâmicos obtidos corações de animais controle e infartados.

	PSVE	PDVE	FC	+dP/dt	-dP/dt
Controle (n=16)	127 ± 1.9	10.3±0.5	403±9	9585±564	9455±650
IM – 1 dia (n=7)	120 ± 3	25 ± 1.3*	433 ± 4.6	4100 ± 179*	3961 ± 338*
IM – 3 dias (n=5)	111 ± 4*	23 ± 3*	410 ± 17	5412 ± 332*	4940 ± 322*
IM – 7 dias (n=5)	102 ± 6*	27 ± 3*	436 ± 19	5038 ± 803*	4624 ± 732*
IM – 15 dias (n=4)	120 ± 5.2	26 ± 4.3*	431 ± 29	5715 ± 590*	5230 ± 669*
IM – 45 dias (n=8)	117 ± 3.8	27 ± 3.2*	409 ± 12	5958 ± 576*	4727 ± 645*

Os animais foram submetidos ao infarto do miocárdio (IM) e parâmetros hemodinâmicos foram avaliados após 1, 3, 7, 15 e 45 dias de evolução do infarto. Os animais controles (CT) são aqueles que possuem pesos semelhantes aos animais utilizados para cirurgia e submetidos somente a análises hemodinâmicas. (*) $p < 0,05$, comparado com os valores dos ratos controle.

PSVE: Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo; **PDVE:** Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo; **FC:** Frequência Cardíaca; **+dP/dt:** primeira derivada positiva da pressão sistólica do ventrículo esquerdo em relação ao tempo (mmHg/s); **-dP/dt:** primeira derivada negativa da pressão sistólica do ventrículo esquerdo em relação ao tempo (mmHg/s).

4.3-Expressão e Atividade da Quinase de Adesão Focal

A expressão e atividade da Fak, bem como da Erk1/2, foram inicialmente avaliadas com a técnica de western blot realizada com anticorpos anti-Fak e anti-Erk1/2, e anticorpos fosfoespecíficos para a Tyr397 da Fak e para os resíduos de Ser/Thr da Erk1/2, respectivamente.

ÁREA INFARTADA

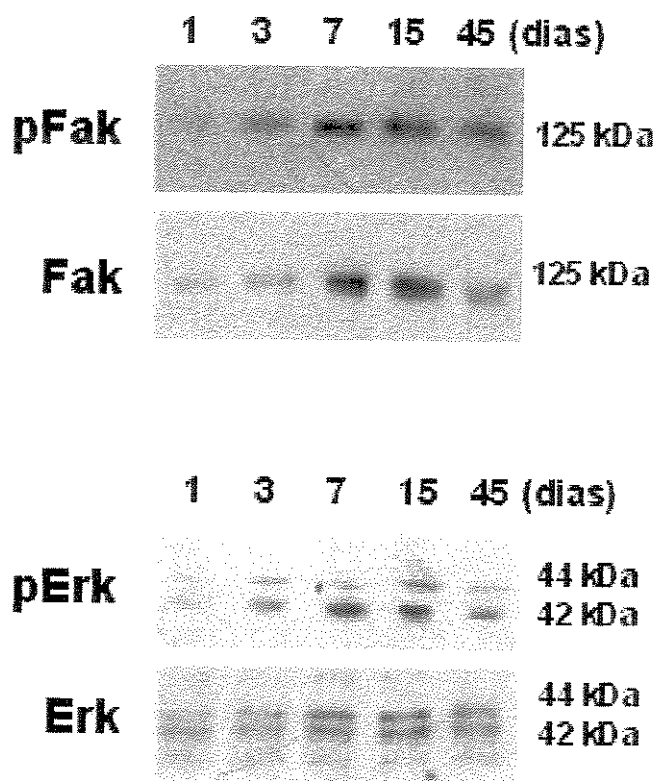


Figura 14. Western blot realizado com anticorpos anti-Fak, anti-p(397)Fak, anti-Erk1/2 e anti-pErk1/2 em material obtido da área de infarto do ventrículo esquerdo no período de 1 a 45 dias de evolução do infarto.

Observa-se a quase ausência de Fak e de Erk1/2 na área de infarto no 1º dia de evolução pós-infarto, ocorrendo aumento gradativo no período até 15 dias e redução para níveis intermediários após 45 dias de evolução do infarto do miocárdio. A atividade da Fak, avaliada através da marcação com anticorpo fosfoespecífico para o resíduo de tirosina 397 aumentou em paralelo com o aumento da expressão da Fak. O mesmo padrão de comportamento foi observado para a Erk1/2 (Figura 14).

Na Figura 15 estão representados os resultados de western blot obtidos com

anticorpos anti-Fak, anti-pFak, anti-Erk e anti-pErk em extratos de miocárdio remoto. Aqui foram observados aumentos na quantidade de Fak fosforilada desde o 1º dia, mantendo-se a mesma elevada até o 45º dia de evolução do infarto do miocárdio. Não foram observadas alterações na quantidade de Fak expressa pelo miocárdio nos primeiros dias de evolução do infarto, sendo que no 15º e 45º dias foram observados pequenos aumentos na expressão da Fak. Padrão semelhante de ativação e de expressão foi observado para a Erk1/2.

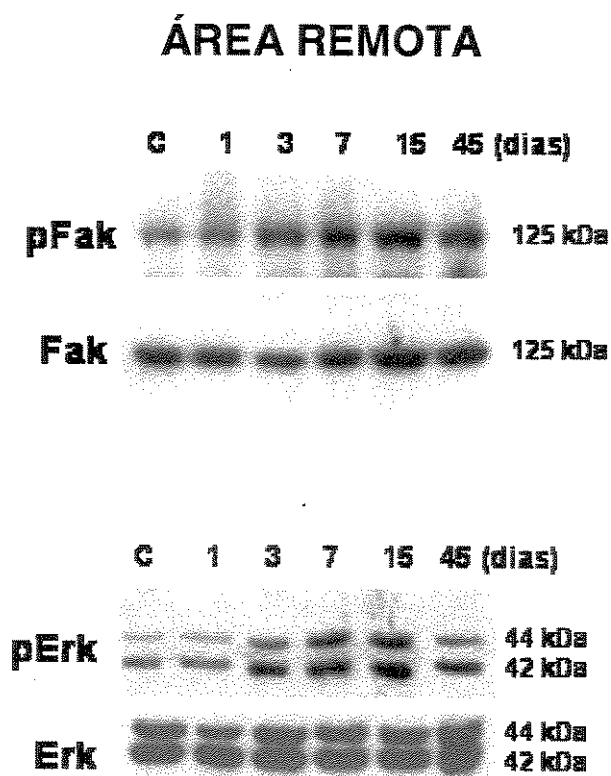


Figura 15. Western blot realizado com anticorpos anti-Fak, anti-p(397)-Fak, anti-Erk1/2 e anti-pErk1/2 em material obtido do miocárdio remoto do ventrículo esquerdo no período de 1 a 45 dias de evolução do infarto.

A expressão da Fak na área de infarto e no miocárdio remoto também foi avaliada através de imunohistoquímica. Na Figura 16, são apresentados exemplos representativos de marcação com anticorpo anti-Fak no miocárdio do ventrículo esquerdo de rato controle e na área de infarto no período entre o 1º e o 45º dia após o infarto do miocárdio. No miocárdio controle a marcação com anticorpo anti-Fak apresenta padrão estriado seguindo aquele das estriações sarcoméricas (Figura 16A). Não foram observadas diferenças significativas no padrão de marcação com o anticorpo anti-Fak nos cardiomiócitos da região remota do ventrículo esquerdo de ratos submetidos a infarto do miocárdio (dados não mostrados) quando comparados com aquele de ratos controle.

Na área de infarto observou-se ausência de marcação significativa com o anticorpo anti-Fak no primeiro dia pós-infarto (Figura 16B). Já no terceiro dia foram observadas células de origem inflamatória com intensa marcação com anticorpo anti-Fak, sendo nítida a presença destas células próximas a miócitos necróticos, indicando processo de fagocitose (Figura 16C). No 7º e 15º dias de evolução foram observadas grandes quantidades de células na região do infarto com marcação intensa com anticorpo anti-Fak (Figuras 16D, E). Nesta fase foram freqüentes os achados de tecido de granulação com marcação intensa das células presumidamente inflamatórias e dos vasos da microcirculação. Após 45 dias houve redução da quantidade de células na região fibrose, permanecendo as células inflamatórias quase que restritas à região de transição na borda do infarto (Figura 16F).

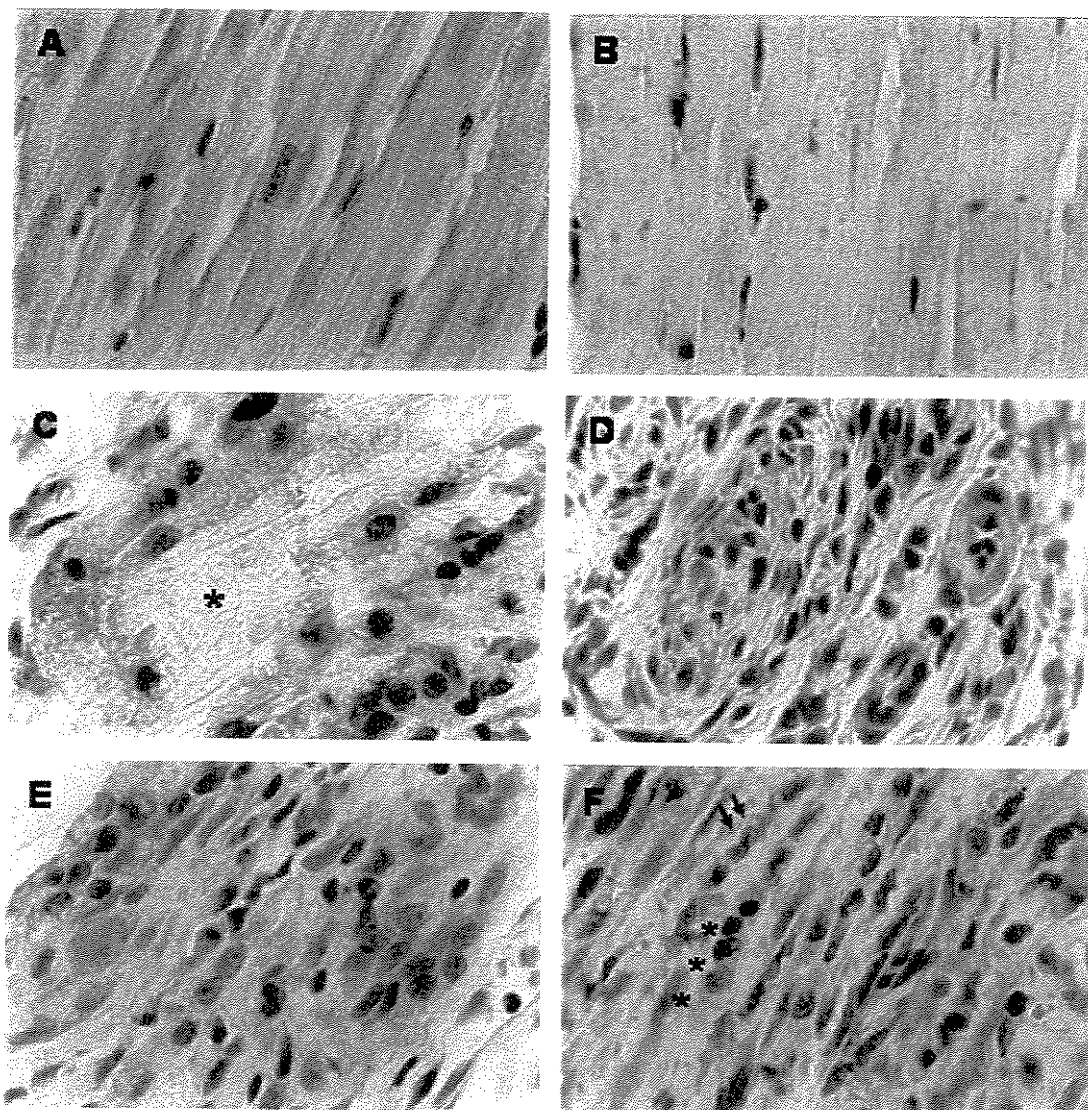


Figura 16. Exemplos representativos de imagens de imunohistoquímica obtidas em corações de ratos controle na região de cicatriz nos períodos de 1 a 45 dias após o infarto do miocárdio.

- A- Miocárdio de rato controle marcado com anticorpo anti-Fak;
- B- Miocárdio de rato após 1 dia de infarto do miocárdio marcado com anticorpo anti-Fak;
- C- Miocárdio de rato após 3 dias de infarto do miocárdio marcado com anticorpo anti-Fak;
- D- Miocárdio de rato após 7 dias de infarto do miocárdio marcado com anticorpo anti-Fak;
- E- Miocárdio de rato após 15 dias de infarto do miocárdio marcado com anticorpo anti-Fak;
- F- Miocárdio de rato após 45 dias de infarto do miocárdio marcado com anticorpo anti-Fak;

5. DISCUSSÃO

O processo de remodelamento do ventrículo esquerdo após o infarto do miocárdio envolve mecanismos complexos e interativos de sinalização celular que abrangem cardiomiócitos, fibroblastos e células inflamatórias tanto na área de infarto como no miocárdio remanescente. No presente estudo foram realizados experimentos para avaliar a expressão, ativação e distribuição da quinase de adesão focal (FAK) na área de infarto e no miocárdio remoto de ratos submetidos a infarto do miocárdio. Demonstrou-se que em infartos de grande extensão do ventrículo esquerdo de ratos ocorre: 1) ativação da Fak no miocárdio remoto, detectada com anticorpo específico para a Fak fosforilada no resíduo de tirosina 397, presente já no primeiro dia e mantida até 45 de evolução do infarto do miocárdio; 2) desaparecimento da expressão, seguido de aumento progressivo da expressão e atividade da Fak ao longo da evolução do processo de cicatrização, em paralelo com o aparecimento de células inflamatórias na área de infarto; 3) ativação e expressão da Erk1/2 paralela àquela da Fak tanto na área remota como na área de infarto. Estes resultados são compatíveis com a idéia de que a sinalização através da quinase de adesão focal pode contribuir em diversos processos celulares envolvidos no remodelamento do ventrículo esquerdo e na cicatrização da área de infarto.

O modelo experimental de infarto do miocárdio em ratos, obtido pela ligadura da artéria coronária descendente anterior, é amplamente utilizado e reproduz fielmente as alterações funcionais e estruturais características do processo de remodelamento do ventrículo esquerdo (PFEFFER MA, BRAUNWALD E., 1990; OLIVETTI G, CAPASSO JM, SONNEENBLICK EH, et al., 1990; MCCORMICK RJ, MUSCH TI, BERGMAN BC, et al., 1994). No presente estudo, a ligadura da artéria coronária descendente anterior produziu infartos que comprometeram mais do que 30% da parede livre do ventrículo esquerdo, o que os

classifica como infartos de extensão moderada a grande. De notável importância, neste caso, é o fato de que em infartos desta magnitude a tensão na parede do ventrículo esquerdo dificilmente se normaliza, o que determina dilatação e deterioração funcional progressivas do ventrículo esquerdo na evolução tardia após o infarto do miocárdio (PFEFFER MA, BRAUNWALD E., 1990). Os resultados da análise morfométrica e das medidas das pressões do ventrículo esquerdo dos corações infartados utilizados no presente estudo são compatíveis com esta idéia. Apesar de o método morfométrico não ter permitido a avaliação longitudinal dos corações dos ratos, verificamos dilatação crescente, acompanhada de aumentos do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, e aumentos da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, característicos do remodelamento cardíaco nos ratos avaliados nos vários períodos que se seguiram ao infarto do miocárdio. Da mesma forma, a ausência de avaliação longitudinal dificulta a interpretação da ocorrência de aumento crescente da área de infarto nos ratos do presente estudo. No entanto, é possível que a tensão permanentemente aumentada no ventrículo esquerdo provoque dilatação tanto pelo estiramento da área remota como por expansão da área de infarto.

A análise da expressão da Fak na área de infarto por western blot e por imunohistoquímica mostrou que no 1º dia após o infarto do miocárdio ocorre redução da atividade e expressão da Fak e da Erk1/2 para níveis quase indetectáveis. Este resultado era esperado, já que a supressão abrupta do fluxo de sangue para a área irrigada pela artéria coronária descendente anterior acompanha-se de necrose maciça dos cardiomiócitos de extensão transmural.

O aparecimento progressivo da expressão da Fak, bem como de sua atividade na área de infarto após o primeiro dia de infarto coincide com o aparecimento de células com

características de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) intensamente marcadas com anticorpo anti-Fak na região, detectada através de imunohistoquímica, indicando que a atividade da Fak pode ter papel importante na função destas células durante o reparo do tecido infartado.

É digno de nota o fato de que no 3º dia de evolução do infarto do miocárdio, boa parte das células que expressam Fak foram encontradas próximas às estruturas dos cardiomiócitos necróticos, em imagens bastante sugestivas de fagocitose, sugerindo que a sinalização pela Fak pode modular o processo de migração, reconhecimento e fagocitose do tecido necrótico pelas células inflamatórias.

Neste contexto, existem amplas demonstrações de que a Fak tem importante papel na regulação de vários dos processos básicos da função de macrófagos e células inflamatórias. A Fak participa do processo de adesão a sítios específicos da matriz extracelular ricos em fibronectina e colágeno mediado por integrinas (PARSONS JT, MARTIN KH, SLACK JK, TAYLOR JM, WEED SA., 2000), da mesma forma que é importante para a migração e fagocitose de células inflamatórias, processos estes também mediados por integrinas (MAY RC, MACHESKY LN., 2001; REYES-REYES M, MORA N, GONZALEZ G, ROSALES C., 2002).

Outro achado relevante da análise por imunohistoquímica da área de infarto foi a presença de marcação intensa com o anticorpo anti-Fak do tecido de granulação evidente no 7º dia pós-infarto. A reação granulomatosa ocorre no processo de cicatrização do infarto e é constituída de miofibroblastos, macrófagos e vasos da microcirculação (HAYAKAWA K; TAKEMURA G; KANO H; LI Y; KODA M; KAWASE Y; MARUYAMA R; OKADA H; MINATOOGUCHI S; FUJIWARA T; FUJIWARA H., 2003). Da mesma forma, o achado de que

nesta fase a atividade da Fak na área de cicatrização avaliada por western blot encontra-se aumentada indica que a Fak tem papel importante no processo de formação dos granulomas. A importância da presença de granulomas para o processo de cicatrização da área de infarto e para o processo de remodelamento tem sido postulada em trabalhos recentes. Admite-se que células inflamatórias que se agregam nos granulomas da região de cicatrização criem ambiente pró-apoptótico que induz à apoptose de miofibroblastos (TAKEMURA G, OHNO M, HAYAKAWA Y, et al., 1998; ENGLER RL., 1989).

Neste caso, cicatrizes com alto teor de células inflamatórias podem retardar o aparecimento da fibrose e predispor a uma expansão da área de infarto e maiores alterações estruturais do ventrículo esquerdo em seu todo. É possível, que o excesso de Fak observado nos granulomas represente a expressão desta proteína por células inflamatórias, mais do que por miofibroblastos. Como a ativação da Fak leva as células a serem resistentes à apoptose (HANKS SK, RYZHOVA L, SHIN NY, BRABEK J., 2003), a presença de hiperatividade da Fak nos granulomas poderia representar o mecanismo pelo qual as células inflamatórias são relativamente resistentes à apoptose quando comparadas com os miofibroblastos.

Após 45 dias de evolução do infarto do miocárdio, ocorre diminuição da expressão e atividade da Fak na área de cicatrização. Esta redução coincide com a diminuição do número de células, característico desta fase da evolução do infarto. No entanto, observamos que células com características de células inflamatórias ainda se encontram presentes na região da cicatriz, principalmente próximo à zona de transição, podendo ser estas células em conjunto com os miofibroblastos remanescentes, os responsáveis pela expressão e atividade da Fak presente no tecido fibroso. O fato de ainda ser encontrada atividade da Fak

nesta região pode estar relacionado ao fato de que no presente estudo foram analisados infartos extensos, acompanhados de aumento de tensão na parede do ventrículo esquerdo e expansão continuada da zona de infarto, como discutido anteriormente. Esta situação poderia contribuir para a presença de células inflamatórias na área de cicatriz devido tanto ao estímulo mecânico bem como para a perda gradual dos miócitos da zona de transição. Neste contexto, é interessante notar que estudos recentes indicam que macrófagos são sensíveis a estímulos mecânicos gerados no ambiente dos tecidos, sendo ativados por mecanismo que envolve o complexo integrina/Fak (SHIRATSUCHI H, BASSON MD., 2004).

Outro aspecto interessante do presente estudo foi o achado de que simultaneamente à expressão e ativação da Fak, ocorre expressão e ativação da Erk1/2 na área de infarto. Isto indica, como já demonstrado anteriormente por estudos de nosso e outros laboratórios (FRANCHINI K. G.; TORSONI A. S.; SOARES P. H. A.; SAAD M. J. A., 2000; DOMINGOS P. P.; FONSECA P. M.; NADRUZ. W. JR.; FRANCHINI K. G., 2002), um acoplamento funcional entre estas duas moléculas de sinalização. O fato de as Erk1/2 serem serina quinases da família das MAP quinases estreitamente envolvidas no processo de crescimento e proliferação celular indica que a ativação da via Fak/Erk1/2 tem papel fundamental na regulação da resposta celular do processo de cicatrização da área de infarto do miocárdio.

De maneira geral, com bases nestes resultados, pode-se especular que a modulação da atividade da Fak, através de inibidores farmacológicos, poderia atenuar a intensidade do processo inflamatório na área de infarto, favorecendo a sobrevivência de miofibroblastos e formação de cicatriz mais adequada ao processo de adaptação ao aumento de tensão e possivelmente impedindo o remodelamento inadequado do ventrículo esquerdo após o infarto do miocárdio.

No presente estudo também verificamos que a atividade da Fak encontra-se aumentada na região do miocárdio remoto. Este aumento de atividade foi observado já no primeiro dia e permaneceu até o 45º dia de evolução do infarto do miocárdio. Diferente do que ocorreu na área de infarto, neste caso não houve variação significativa da quantidade de Fak expressa pelo tecido, indicando tratar-se de aumento da atividade permanente das moléculas de Fak expressas no miocárdio remoto. Como a maior parte da Fak expressa no miocárdio encontra-se nos cardiomiócitos, presume-se que esta ativação tenha ocorrido por conta do aumento da atividade da Fak nos cardiomiócitos. Isto pode também ser inferido à partir da análise por imunohistoquímica do miocárdio remoto, indicando que boa parte da marcação com anticorpo anti-Fak ocorreu nos cardiomiócitos.

O mecanismo pelo qual a Fak aumentou sua atividade na região remota do miocárdio não foi explorado no presente estudo, mas pode ser devido ao aumento permanente da tensão ao qual estas células estão submetidas. Em estudos anteriores do nosso laboratório demonstramos que o estiramento ativa a Fak (TORSONI A. S.; CONSTANCIO S. S.; NADRUZ. JR. W.; HANKS S. K.; FRANCHINI K. G., 2003). No entanto, nestes estudos as análises ficaram restritas a situações agudas, não tendo sido estabelecido se a persistência do estímulo por períodos prolongados como aquele do presente estudo está associada a aumento permanente da atividade da Fak. Em estudos mais recentes do nosso laboratório (FONSECA PM, IONUE RY, KOBARG CB, KOBARG J, FRANCHINI KG.- submetido) verificamos que em corações submetidos a coarctação da aorta e avaliados nos primeiros 15 dias pós-operatórios, ocorreu aumento sustentado da Fak, de forma semelhante àquele observado no presente estudo no miocárdio remoto. Por outro lado, em estudos realizados em camundongo MDX, com distrofia de Duchene, verificamos aumento

da atividade da Fak, sem aumento da expressão no miocárdio quando comparados com camundongos normais. Deve-se salientar que os camundongos MDX apresentam miocardiopatia com fenótipo de dilatação do ventrículo esquerdo, hipertrofia miocárdica e fibrose intersticial. Interessantemente, observamos que a Fak apresenta-se com menor associação com a SHP-2, uma fosfatase específica para tirosina quinases, no miocárdio de camundongos MDX, o que poderia contribuir para a persistência da hiperativação da Fak. Resultados semelhantes foram obtidos em corações submetidos a sobrecarga pressora e cardiomiócitos isolados submetidos a estiramento, indicando que a dissociação entre Fak e SHP-2 induzida por estímulo mecânico pode ser responsáveis pela manutenção da atividade da Fak em situações de sobrecarga mecânica prolongada. Assim, é possível que o mesmo fenômeno seja o responsável pela hiperatividade permanente da Fak no miocárdio remoto na fase tardia do remodelamento miocárdico. Será interessante analisar a existência deste mecanismo e os processos de sinalização que o desencadeiam nas situações de infarto do miocárdio.

Por outro lado, o aumento permanente da atividade da Fak no miocárdio remoto poderia se dever ao excesso de fatores parácrino, autócrinos e de crescimento liberados por causa da persistência da tensão aumentada nas paredes do ventrículo esquerdo. Existem amplas demonstrações de que durante o processo de remodelamento vários mediadores locais e sistêmico (e.g. TGF- β 1, Angiotensina II) encontram-se aumentados e poderiam contribuir para a ativação da Fak (ST. JOHN SUTTON M.; PFEFFER M. A; PLAPPERT T. et al., 1994). No entanto, da mesma forma que para o estímulo mecânico, não existem estudos que tenham explorado os efeitos da estimulação crônica com fatores de crescimento ou parácrinos sobre a atividade da Fak em cardiomiócitos. Portanto, permanece por ser

esclarecido se a hiperatividade da Fak no miocárdio remoto se deve à ativação por fatores parácrinos.

Há ainda a possibilidade de que o aumento da atividade da Fak no miocárdio remoto seja devido ao aumento de células intersticiais e inflamatórias. Esta possibilidade é maior no caso dos corações estudados após 15 e 45 dias de infarto, já que houve aumento discreto da quantidade de Fak nestes corações. De acordo com isto, existem demonstrações amplas de que durante o processo de remodelamento ocorre proliferação do tecido intersticial e, dependendo da intensidade do remodelamento, o processo pode se expandir para o miocárdio remoto (ST. JOHN SUTTON M.; PFEFFER M. A; PLAPPERT T. et al., 1994).

Apesar de não termos realizado estudos de interferência nos mecanismos de sinalização da Fak, é possível supor, com base nos estudos anteriores de nosso laboratório (FRANCHINI K. G.; TORSONI A. S.; SOARES P. H .A.; SAAD M. J. A., 2000; DOMINGOS P. P.; FONSECA P. M.; NADRUZ. W. JR.; FRANCHINI K. G., 2002; TORSONI A. S.; CONSTANCIO S. S.; NADRUZ. JR. W.; HANKS S. K.; FRANCHINI K. G, 2003) que a atividade aumentada da Fak no miocárdio remoto pode contribuir para o estabelecimento do crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos, além de proteger as células contra a apoptose. No entanto, também é possível que a ativação excessiva e prolongada da Fak tanto nos cardiomiócitos como nas células intersticiais e inflamatórias ative mecanismos de sinalização que contribuem para a deterioração funcional e estrutural do miocárdio, de tal forma, que a modulação de sua atividade no infarto do miocárdio pode trazer benefícios terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que a Fak é ativada durante o processo de remodelamento do ventrículo esquerdo após o infarto do miocárdio, tanto no miocárdio remoto como na área de infarto. A ativação da Fak nestas duas regiões ocorre em tipos celulares diferentes, sendo os cardiomiócitos, o principal sítio no miocárdio remoto e, as células inflamatórias, o principal sítio na área de infarto. A ubiquidade de tipos celulares que expressam a Fak indicam ser esta enzima componente de vias de sinalização envolvidas em mecanismos e funções básicas e, portanto, fundamentais, para as funções celulares requeridas nos processos de hipertrofia do miocárdio remoto e cicatrização da área de infarto. Estudos futuros deverão abordar a contribuição relativa da Fak para resposta hipertrófica dos cardiomiócitos e a resposta inflamatória no processo de cicatrização da área de infarto. Os resultados destas abordagens deverão permitir o entendimento sobre a contribuição desta enzima e suas vias de sinalização no processo de remodelamento miocárdio e sua participação no processo de adaptação e desadaptação funcional e estrutural do ventrículo esquerdo após o infarto do miocárdio.

7. SUMMARY

Mechanical stimuli initiate an acute activation of focal adhesion molecule (Fak) in the myocardium. This Fak activation initiates intracellular pathways that culminate in the hypertrophy development. In addition, the activation of Fak can be accompanied by activation of other intracellular signaling pathways involved in the cellular growth. Data obtained in our laboratory demonstrated that mechanical stress activates Fak and it is crucial in the regulation of fetal genes re-expression, demonstrating the important role of Fak in the hypertrophy and cardiac remodeling. In the present study we investigated: 1 - Fak expression and phosphorylation at Tyr-397 residue in the infarcted area and in the remote myocardium; 2 - Erk 1/2 expression and activation at Ser/Thr residue in the infarcted area and in the remote myocardium. These events were observed during left ventricle (LV) myocardial remodeling after myocardial infarction in rats.

In this study the ligation of the left anterior descending artery induced infarcted area of the LV, classified as moderate to large extension. Morphometrical and hemodynamic analysis evaluated 1, 3, 7, 15 e 45 after myocardial infarction demonstrated that the LV diastolic final pressure and diameter was markedly elevated, and that cardiac myocytes became elongated and hypertrophied. These results were confirmed by data obtained in the literature that demonstrated that after a large to moderate myocardial infarction the LV undergoes a series of morphologic changes characterized by progressive increase in LV mass and volume and decrease in global LV systolic performance.

In addition, using western blot and immunohistochemical techniques, we also demonstrated that Fak is phosphorylated at Tyr-397 in the remote myocardium in the first day up to 45 days after LV infarction. On the other hand, the absence of Fak expression in the infarcted area by the 1st day after the myocardial infarction was followed by a

progressive increase of Fak expression and activation, paralleled to scarring processes and inflammatory cell migration at this site. Similarly, we observed Erk 1/2 expression and activation in the infarcted and remote area.

Since Fak was constantly activated in the remote area demonstrated in the present study, and based on the results obtained in our laboratory that demonstrated the important role of the Fak in the myocardial remodeling after pressure overload, we hypothesize that Fak could contribute to hypertrophic growth after myocardial infarction. On the other hand, the increase in the Fak activation in the myocardium and/or inflammatory cells could be deleterious, and could contribute to the dysfunction of the heart. Thus, the Fak would be a new therapeutic target in the future.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVERSA P, BEGHI C, KIKKAWA Y, et al. - Myocardial response to infarction in the Herat: morphometric measurement to infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol.* 118:484-492, 1985.

BURRIDGE K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA M. - Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:463-519, 1986.

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.* 15:954-963, 1995.

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

CHICUREL ME, CHEN CS, INGBER DE. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol.* 10: 232-239, 1998.

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

CLEUTJENS JP, KANDALA JC, GUARDA E, et al. - Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 27:1281-1292, 1995.

DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI E, et al. - Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 122:103-111, 1993.

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

ENGLER RL. - Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol.*;63: 19E–23E, 1989.

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

ERLEBACHER JA, WEISS JL, WEISFELDT ML, et al. - Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarcted expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Cardiol.* 4:201-208, 1984.

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

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

GERDES AM, KELLERMAM SE, SCHOCKEN DD. - Implications of cardiomyocyte remodeling in heart dysfunction. Em: Dhalla NS, Beamish RE, Takeda N. The failing heart. Raven Press, New York, pp 197-205, 1995.

GERDES AM. - Cardiac Myocyte Remodeling in Hypertrophy and Progression to Failure. *Journal of Cardiac Failure.* 8:S264-S269, 2002.

GUARDA E, KATWA LC, MYERS PR, et al. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 27:2130-2134, 1993.

HANKS SK, RYZHOVA L, SHIN NY, BRABEK J. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci.* May 1;8:d982-96, 2003.

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

HAYAKAWA K; TAKEMURA G; KANO H; LI Y; KODA M; KAWASE Y; MARUYAMA R; OKADA H; MINATO GUCHI S; FUJIWARA T; FUJIWARA H. Inhibition of Granulation

Tissue Cell Apoptosis During the Subacute Stage of Myocardial Infarction Improves Cardiac Remodeling and Dysfunction at the Chronic Stage. *Circulation*. 108:104-109, 2003.

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

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

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

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

MANIOTIS AJ, CHEN CS, INGBER DE. - Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 849–854, 1997.

MANN DL, SPINALE FG. - Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation*. 98:1699-1702, 1998.

MAY RC, MACHESKY LN. - Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114: 1061–1077, 2001.

MATSUDA N., HAGIWARA N., SHODA M., KASANUKI H., HOSODA S. - Enhancement of the L-type Ca^{2+} current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 78:650–659, 1996.

MCCORMICK RJ, MUSCH TI, BERGMAN BC, et al. Regional differences in LV collagen accumulation and mature cross-linking after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol*. 1994; 266:H354-H359.

OLIVETTI G, CAPASSO JM, SONNEENBLICK EH, et al. - Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 67:23-24, 1990.

OMENS J. H. - Stress and strain as regulators of myocardial growth. *Prog Bioph and Molec Biol* 69:559-572, 1998.

PARSONS JT, MARTIN KH, SLACK JK, TAYLOR JM, WEED SA. - Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*. 19:5606-5613, 2000.

PFEFFER MA, BRAUNWALD E. - Ventricular remodeling after myocardial infarction observations and clinical implications. *Circulation*. 81:1161-1172, 1990.

POLTE T. R.; HANKS S. K. - Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated 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.* 272:5501-5509, 1997.

REYES-REYES M, MORA N, GONZALEZ G, ROSALES C. - $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins activate different signaling pathways in monocytes. *Biochem J.* 263: 273–280, 2002.

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

SASAKI N.; MITSUIYE T.; NOMA A. - Effects of mechanical stretch on membrane currents of single ventricular myocytes of guinea-pig heart. *Jpn J Physiol.* 42:957–970; 1992.

SASAKI N.; MITSUIYE T.; NOMA A - Increase of the delayed rectifier KC and Na(C)-KC pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. *Circ Res.* 75:887–895, 1994.

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

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

SHIRATSUCHI H, BASSON MD. - Extracellular pressure stimulates macrophage phagocytosis by inhibiting a pathway involving FAK and ERK. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286(6):C1358-66, 2004 .

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

SIGUSCH HH, CAMPBELL SE, WEBER KT. - Angiotensin II-induced myocardial fibrosis in rats: role of nitric oxide, prostaglandins and bradykinin. *Cardiovasc Res.* 31:546-554, 1996;.

ST. JOHN SUTTON M.; PFEFFER M. A; PLAPPERT T. et al. - Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. *Circulation.* 89: 68–75, 1994.

SUSSMAN M.; MCCULLOCH A; BORG T. K. - Dance Band on the Titanic: Biomechanical Signaling in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res.* 91: 888 – 898, 2002.

TAKEMURA G, OHNO M, HAYAKAWA Y, et al. - Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 82: 1130–1138, 1998.

TORSONI A. S.; CONSTANCIO S. S.; NADRUZ. JR. W.; 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.

VAN WAGONER DR. - Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* 72:973–983, 1993.

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

WARREN SE, ROYAL HD, MARKIS JE, et al. - Time course of left ventricular dilation after myocardial infarction: influence of infarct-related artery and success of coronary thrombolysis. *J Am Cardiol.* 22:390-398, 1993.

WEBER KT. - Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation.* 96:4065-4082, 1997.

WHITE HD, NORRIS RM, BROWN MA, et al. - Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction.

Circulation. 76:44-51, 1987.