



LEANDRO CARDOSO

UTILIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM COMPOSTO INÉDITO
DERIVADO DE QUINAZOLINA COMO INIBIDOR POTENCIAL DA
QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) NO PROCESSO DE
HIPERTROFIA CARDÍACA EM CAMUNDONGO

*PHARMACOLOGICAL USE OF A NOVEL COMPOUND
QUINAZOLINE DERIVATIVE AS POTENTIAL INHIBITOR OF THE
FOCAL ADHESION KINASE IN THE PROCESS OF CARDIAC
HYPERTROPHY IN MICE*

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LEANDRO CARDOSO

**UTILIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM COMPOSTO INÉDITO
DERIVADO DE QUINAZOLINA COMO INIBIDOR POTENCIAL
DA QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) NO PROCESSO DE
HIPERTROFIA CARDÍACA EM CAMUNDONGO**

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

***PHARMACOLOGICAL USE OF A NOVEL COMPOUND
QUINAZOLINE DERIVATIVE AS POTENTIAL INHIBITOR OF THE
FOCAL ADHESION KINASE IN THE PROCESS OF CARDIAC
HYPERTROPHY IN MICE***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências

Master Dissertation presented to the Medical Pathophysiology Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the M.D. grade in Medical Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO/ TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
LEANDRO CARDOSO E ORIENTADO PELO PROF. DR.
KLEBER GOMES FRANCHINI

Assinatura do Orientador

.....

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C187u Cardoso, Leandro, 1979 -
 Utilização farmacológica de um composto inédito
 derivado de quinazolina como inibidor potencial da
 quinase de adesão focal no processo de hipertrofia
 cardíaca em camundongo / Leandro Cardoso. --
 Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

 1. Insuficiência cardíaca. 2. Proteínas tirosina
 quinases. 3. Estresse mecânico. 4. Hipertrofia
 ventricular esquerda. 5. Terapêutica. I. Franchini, Kleber
 Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Pharmacological use of a novel compound quinazoline derivative as potential inhibitor of the focal adhesion kinase in the process of cardiac hypertrophy in mice.

Palavras-chave em inglês:

Heart Failure

Protein-tyrosine kinases

Stress, mechanical

Hypertrophy, left ventricular

Therapeutics

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Kleber Gomes Franchini [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Carolina Fernanda Manfredi Zambom Clemente

Data da defesa: 06-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Leandro Cardoso

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



Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal	
	<i>Sisi Marcondes Paschoal</i>
Professor (a) Doutor (a) Carolina Fernanda Manfredi Zambom Clemente	<i>Carolina</i>
Professor (a) Doutor (a) Kleber Gomes Franchini	<i>Kleber Franchini</i>

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

Data: 06/07/2012

DEDICATÓRIA

À minha família Bianca, Heloísa e Rafaela,
aos meus pais Sergio e Silvana e aos
irmãos Eliana e Rafael.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Kleber Gomes Franchini, pela oportunidade, confiança e orientação no desenvolvimento do trabalho.

À minha esposa Bianca e as minhas filhas Heloísa e Rafaela que estiveram sempre ao meu lado durante essa jornada, principalmente a minha esposa Bianca e a minha filha Heloísa que me acompanharam diversas vezes até o Laboratório para o tratamento dos animais.

Aos meus pais Silvana e Sergio e irmãos Eliana e Rafael com quem aprendi valores insubstituíveis.

Aos colegas do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular: Silvana Rocco, Thaís Holtz, Jamilson Conceição, Ana Paula, Ana Helena, Carla Judice, Alisson Campos, Gerson Rodrigues, Heloísa Bisinotto, João Antunes, Michele Bueno, Michel Vaz, Anderson Gonçalves, Sílvio Consonni, Luciléia Tiengo, Aline Mara, Marina Dias, Mônica Siqueira, Márcia Story, Talita Marin, Isabelle Cordeiro, Estela Lima, pelo acolhimento e apoio metodológico.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Sempre faço o que não consigo fazer para aprender o que não sei.

Pablo Picasso

	PÁG.
Lista de Abreviaturas	xvii
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Figuras	xix
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
1 - INTRODUÇÃO	27
1.1 - Doenças cardiovasculares	28
1.1.1 - Epidemiologia da insuficiência cardíaca	28
1.1.2 - Fisiopatologia da insuficiência cardíaca	29
1.1.3 - Definição e classificação da hipertrofia cardíaca	32
1.1.4 - Vias de sinalização da hipertrofia patológica	33
1.1.5 - Drogas convencionais no tratamento de doenças cardiovasculares	35
1.2 - Proteínas quinases	36
1.2.1 - Quinase de adesão focal – FAK	39
1.2.2 - Estrutura e regulação da FAK	39
1.2.3 - Sinalização da FAK na hipertrofia cardíaca	42
1.2.4 - Sinalização da FAK na insuficiência cardíaca	44
1.3 - Proteínas tirosinas quinases como alvos terapêuticos	46
1.3.1 - Inibidores de tirosina kinase	49
1.3.2 - Tipos de inibidores de tirosina quinase	49
1.4 - Quinazolininas	50
1.5 - Hipótese	54

2.0 - OBJETIVO	55
2.1 – Objetivo	56
2.2 – Objetivos específicos	56
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 - Materiais	58
3.2 - Compostos quinazolínicos	58
3.3 - Ensaio <i>in vitro</i> (FAK)	58
3.4 - Determinação dos parâmetros farmacocinéticos do BZLO após a administração oral em ratos	59
3.4.1 - Condições Cromatográficas	60
3.4.2 - Preparação das soluções estoques, padrões e controles de qualidade	62
3.4.3 - Preparação das Amostras	63
3.4.4 - Aplicação do método <i>in vivo</i>	64
3.4.5 - Procedimento cirúrgico e coleta das amostras	65
3.5 - Modelo de coarctação da aorta em camundongo	66
3.5.1 - Grupos experimentais	66
3.5.2 - Ecocardiografia	68
3.5.3 - Avaliação hemodinâmica	69
3.5.4 - Gravimetria	70
3.5.5 - Histologia	70
3.6 - Western Blotting	71
3.6.1 - Extração de proteínas totais	71
3.6.2 - Western Blotting do VE de camundongos	72
3.7 - Estatística	72

4 - RESULTADOS	73
4.1 - Ensaio in vitro (FAK)	75
4.2 - Avaliação da biodisponibilidade oral do composto BZLO em ratos	76
4.3 - Efeito do BZLO no tratamento da hipertrofia do ventrículo esquerdo em camundongos	78
4.4 - Grupos preventivos (15 ou 30 dias)	79
4.4.1 - Hemodinâmica	81
4.4.2 - Ecocardiografia	82
4.4.3 - Gravimetria	85
4.4.4 - Histologia	87
4.4.5 - Western Blotting	90
4.5 - Grupos curativos (15 ou 30 dias)	92
4.5.1 - Hemodinâmica	94
4.5.2 - Ecocardiografia	95
4.5.3 - Gravimetria	98
4.5.4 - Histologia	100
4.5.5 - Western Blotting	103
5 - DISCUSSÃO	105
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

LISTA DE ABREVIATURAS

PK – proteína quinase

FAK – *focal adhesion kinase*

GAPDH – *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

PTK – proteína tirosina quinase

p-FAK – quinase de adesão focal fosforilada

TKIs – *tyrosine kinase inhibitor small*

KDa – quilodalton

Kg – quilograma

DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DSVE – diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

FS – fração de encurtamento

EPVE – espessura da parede do ventrículo esquerdo

Sham – cirurgia fictícia

TAC – *transverse aortic constriction*

Tyr – tirosina

FAT – *focal adhesion target*

CEMIB – biotério central da Unicamp

mg – miligrama

ATP – Adenosina trifosfato

BZLO – composto

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Níveis de concentração sérica do BZLO no plasma de ratos.....	78
Tabela 2- (Grupo Preventivo) Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta.....	80
Tabela 3- (Grupo Curativo) Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta.....	93

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Esquema representativo da estrutura da FAK e suas funções.....	40
Figura 2- Estruturas químicas do BZLO e do composto usado como padrão interno 3-Anis.....	60
Figura 3- Cromatograma representativo da análise de uma amostra de plasma de rato Wistars contendo o BZLO (25 μ M) e o composto 3-Anis (1,10 μ M) como o padrão interno.....	61
Figura 4- Planejamento experimental do estudo.....	68
Figura 5- Resultado do ensaio de inibição <i>in vitro</i> utilizando a FAK e o composto BZLO.....	75
Figura 6- Perfil da concentração sérica do BZLO em plasma de ratos (em μ mol L ⁻¹) <i>versus</i> o tempo (em horas) de coletas, após a administração por gavagem de uma dose única de 100 mg/Kg suspensa em solução aquosa de goma arábica 10%.....	77
Figura 7- Gráficos de barras indicam os valores médios de pressão arterial sistólica aferido na carótida (PAS _{CT}) dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	81
Figura 8 Gráficos de barras indicam os valores médios do gradiente sistólico (GrS) dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	82
Figura 9- Gráficos de barras indicam os valores médios do DDVE (diâmetro diastólico final do VE) dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	83
Figura 10- Gráficos de barras indicam os valores médios do DSVE (diâmetro sistólico final do VE) dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	84

Figura 11-	Gráficos de barras indicam os valores médios da EPVE (espessura da parede posterior do VE) dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	84
Figura 12-	Gráficos de barras indicam os valores médios da FS % (fração de encurtamento) dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	85
Figura 13-	Gráficos de barras indicam os valores médios do peso corporal dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	86
Figura 14-	Gráficos de barras indicam os valores médios do IMVE (índice de massa do VE) dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	86
Figura 15-	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos do grupo preventivo de 15 dias.....	88
Figura 16-	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos do grupo preventivo de 30 dias.....	88
Figura 17-	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios da fibrose intersticial do grupo preventivo de 15 dias.....	89
Figura 18-	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios da fibrose intersticial do grupo preventivo de 30 dias.....	90
Figura 19-	Gráficos de barras indicam a atividade da FAK nos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	91
Figura 20	Gráficos de barras indicam os valores médios de pressão arterial sistólica aferido na carótida (PAS _{CT}) dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	94
Figura 21-	Gráficos de barras indicam os valores médios do gradiente sistólico (GrS) dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	95

Figura 22	Gráficos de barras indicam os valores médios do DDVE (diâmetro diastólico final do VE) dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	96
Figura 23-	Gráficos de barras indicam os valores médios do DSVE (diâmetro sistólico final do VE) do grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	97
Figura 24-	Gráficos de barras indicam os valores médios da EPVE (espessura da parede posterior do VE) dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	97
Figura 25-	Gráficos de barras indicam os valores médios da FS % (fração de encurtamento) dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente	98
Figura 26	Gráficos de barras indicam os valores médios do peso corporal dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	99
Figura 27	Gráficos de barras indicam os valores médios do IMVE (índice de massa do VE) dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente	99
Figura 28	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos do grupo curativo de 15 dias.....	100
Figura 29-	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos do grupo curativo de 30 dias.....	101
Figura 30-	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios da fibrose intersticial do grupo curativo de 15 dias.....	102
Figura 31-	Gráfico de barras e as fotos indicam os valores médios da fibrose intersticial do grupo curativo de 30 dias.....	102
Figura 32-	Gráficos de barras indicam a atividade da FAK nos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente.....	104

Nas doenças do coração ocorre hipertrofia e remodelamento do ventrículo esquerdo com impacto negativo na evolução clínica. Esses fatores influenciam independentemente o risco cardiovascular por elevarem a predisposição a infartos do miocárdio, ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca e ao aparecimento de arritmias ventriculares graves. Estruturalmente ocorrem crescimento e degeneração dos miócitos cardíacos, fibrose e alterações da microcirculação. Estas alterações comprometem irreversivelmente a histoarquitetura do miocárdio, limitando a eficácia dos tratamentos convencionais, principalmente no estágio mais avançado caracterizado pela insuficiência cardíaca.

A rede de sinalização celular envolvida na resposta das células miocárdicas (miócito e não miócitos) a forças mecânicas tem papel crítico na compreensão da patogênese da hipertrofia. A quinase de adesão focal (FAK), uma enzima associada à sinalização por integrinas, é ativada precocemente e exerce influência no desenvolvimento e sustentação da resposta hipertrófica do miocárdio à sobrecarga pressórica.

Nesse estudo foi avaliado o efeito de um composto inédito derivado de quinazolina (BZLO) com potencial ação inibitória da FAK no coração de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica por coarctação da aorta.

In vitro, esse composto inibiu a atividade catalítica da FAK purificada com IC₅₀ de 1nM. *In vivo*, o tratamento dos camundongos submetidos à coarctação da aorta com o composto (BZLO) provocou inibição do resíduo Tyr³⁹⁷ da FAK. Demonstrando que o composto não só preveniu, mas também promoveu regressão da hipertrofia do ventrículo esquerdo típica do modelo, acompanhada de atenuação da hipertrofia dos cardiomiócitos e da fibrose intersticial, e preservação da função ventricular.

Esses resultados indicam que o tratamento com o composto (BZLO), presumivelmente por inibir a FAK, atenua as alterações estruturais e funcionais provenientes da sobrecarga pressórica crônica no ventrículo esquerdo de camundongos, sugerindo seu potencial como alternativa na prevenção e tratamento da insuficiência cardíaca.

Palavras chaves: Insuficiência Cardíaca; Proteínas Tirosina Quinases; Estresse Mecânico; Hipertrofia ventricular; Efeitos de drogas; Terapêutica

Cardiac remodeling and hypertrophy have negative impact in the evolution of heart disease. They raise predisposition to myocardium infarction, heart failure and fatal ventricular arrhythmias, being independent markers of cardiovascular prognosis.

Cardiomyocyte growth followed by degeneration, interstitial fibrosis and alterations in the microcirculation can be detected structurally in hypertrophic hearts. These alterations jeopardize myocardium tissue architecture irreversibly limiting therapeutic efficacy especially in advanced stages of disease with heart failure.

The understanding of signaling network in response to mechanical stimuli is crucial in the study of cardiac hypertrophy. Focal adhesion kinase (FAK) an enzyme linked to signaling by integrins is activated in response to pressure overload and influences the development of myocardial hypertrophic response.

In the present study, a compound based on quinazoline scaffold which is a FAK inhibitor, named BZLO, is examined for its effects on cardiac hypertrophy of mice model of aortic constriction. BZLO strongly inhibits catalytic activity of purified FAK *in vitro* ($IC_{50} = 1nM$). Satisfactory bioavailability of BZLO was observed after oral administration. BZLO treatment decreased FAK phosphorylation at Tyr³⁹⁷ and attenuated cardiomyocyte growth and interstitial fibrosis preserving cardiac function in the mice model of chronic pressure overload induced by aortic constriction.

These findings suggest that BZLO is effective in attenuating the deleterious structural and functional consequences of chronic pressure overload in mice heart, suggesting that it has the potential to be considered as an option for the prevention and treatment of heart failure.

Keywords: Heart Failure; Protein-Tyrosine Kinases; Mechanical Stress Left Ventricular Hypertrophy; Drug effects; Therapeutics

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Doenças cardiovasculares

1.1.1 - Epidemiologia da insuficiência cardíaca

As doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsáveis direta ou indiretamente por cerca de 1/3 de todas as mortes (World Health Organization, 2009). Dentre as doenças cardiovasculares que mais contribuem para essa situação destacam-se a doença isquêmica, a hipertensão arterial e as doenças valvulares. É interessante notar que as doenças cardíacas, independentemente dos mecanismos patogênicos iniciais, resultam naturalmente em um estado de deterioração estrutural e funcional do miocárdio, cuja progressão leva ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca, comprometendo a capacidade do coração em manter o débito cardíaco em níveis adequados à demanda do organismo (Heineke e Molckentin, 2006).

A insuficiência cardíaca afeta cerca de 2% a 3% da população nos países industrializados, com aumento expressivo em adultos com idade acima de 65 anos (McMurray e Pfeffer, 2005; Shafazand et al, 2009; Lloyd-Jones et al, 2010). Embora dados estatísticos não estejam disponíveis em todos os países, a insuficiência cardíaca pode ter alcançado proporções epidêmicas tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (Kelly, 1997; Hodges, 2009; American heart Association, 2009). Estima-se que aproximadamente 15 milhões de europeus e 6 milhões de americanos sofram de insuficiência cardíaca (Dickstein et al, 2008; Lloyd-Jones et al, 2010).

A sobrevivência de pacientes com diagnóstico de insuficiência cardíaca em 5 anos é de apenas 50% e pode ser comparado ao diagnóstico de diversos tipos de câncer (Stewart et al, 2001, Buyandelger et al, 2011). A insuficiência cardíaca é a principal causa de hospitalização e mortalidade, e também é responsável pelo gasto de grande parte do

orçamento investido na área de saúde em todo o mundo. Nos EUA, o custo anual envolvendo a insuficiência cardíaca em 2010 foi de \$39 bilhões, aproximadamente 2% do orçamento total gasto pelo sistema de saúde (Liao et al, 2008; Lloyd-Jones et al, 2010). No Brasil, a insuficiência cardíaca já se tornou a primeira causa de internação hospitalar em pacientes acima de 60 anos de idade e a sexta causa de internação em pacientes entre 15 e 59 anos com gasto estimado acima de 225 milhões de reais no ano de 2004 (Fiorelli et al 2008).

Apesar dos programas dirigidos ao tratamento da insuficiência cardíaca terem evoluído substancialmente nos últimos anos com o desenvolvimento de drogas e outras estratégias terapêuticas, decorrentes dos avanços tecnológicos em diferentes áreas do conhecimento, e embora esse progresso tenha se traduzido na melhora dos índices de sobrevivência em alguns países, a insuficiência cardíaca é ainda uma condição de alta letalidade (MacIntyre et al, 2000; Schaufelberger et al, 2004; Dickstein et al, 2010).

1.1.2. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca

O entendimento dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da disfunção cardíaca nas diversas doenças cardiovasculares é aguardado com a expectativa de que possa resultar em desenvolvimentos que levem a novas e mais efetivas opções terapêuticas para a prevenção e tratamento da insuficiência cardíaca.

Estudos que avaliaram a história natural de doenças que culminam com desenvolvimento de insuficiência cardíaca mostraram sua relação com o remodelamento progressivo das câmaras cardíacas, principalmente do ventrículo esquerdo (Douglas et al, 1989; Cohn, 1995; Vasan et al, 1997).

O processo de remodelamento cardíaco é uma consequência das doenças primárias que afetam o coração, mas também uma causa, dada as desvantagens mecânicas, da deterioração progressiva da estrutura e função do miocárdio (Mudd e Kass, 2007; Braunschweig et al, 2011, Tamargo e López-Sendón, 2011).

Diversas alterações que ocorrem associadas ao processo de remodelamento ventricular podem contribuir para a progressão da disfunção cardíaca. A principal entre estas é o aumento da tensão na parede das câmaras. Como exemplo, consequente ao aumento de tensão, o ventrículo esquerdo assume uma forma mais volumosa e esférica (Linzbach, 1960), que está associada a um aumento da tensão diastólica por razões geométricas. Como a carga volumétrica no final da diástole (pré-carga) contribui importantemente para a pós-carga, a qual o coração tem que vencer no início da sístole, a dilatação por si só aumenta o trabalho do coração e o consumo de oxigênio.

Além disso, com o aumento do volume diastólico a parede ventricular afila, o que, associado com o aumento na pós-carga criado pela dilatação leva um desbalanço entre a capacidade do coração de gerar força e carga no início da sístole, um fenômeno conhecido como *afterload mismatch*, que contribui consideravelmente para a redução do débito cardíaco (Ross, 1983). Ainda, a elevação da tensão diastólica leva a um estado de hipoperfusão do subendocárdio, que contribui para a piora da função contrátil (Vatner, 1988).

O processo de remodelamento cardíaco não apenas resulta, mas também impacta na estrutura e função do miocárdio, por meio de influências na biologia dos miócitos cardíacos, bem como dos componentes não miocitários, como os fibroblastos e os elementos da microcirculação.

Os miócitos cardíacos apresentam várias alterações que contribuem para a perda progressiva da função contrátil, incluindo a diminuição da quantidade da isoforma alfa e o aumento da isoforma beta da cadeia pesada da miosina (Lowe et al, 1997), perda progressiva dos miofilamentos e a alteração das proteínas do citoesqueleto (Schaper et al, 1991), alteração do processo de excitação-contração (Beuckelmann et al, 1992) e dessensibilização da sinalização por receptores beta-adrenérgicos (Bristow et al, 1982). Associadas à perda de miócitos cardíacos, seja por necrose, ou por apoptose, modificações estas que levam à redução no desempenho contrátil do miocárdio (Davies et al, 1995).

As alterações dos miócitos envolvem processos de sinalização que controlam mecanismos complexos que incluem aqueles de controle de processos de expressão gênica, homeostase do cálcio, manutenção do aparato contrátil e outros.

Além das alterações do miócitos cardíacos, as modificações no interstício do miocárdio também contribuem para a disfunção cardíaca (Weber, 1997). Talvez a alteração mais clara do interstício seja o desenvolvimento de fibrose perivascular no entorno dos vasos intramiocárdicos, assim como a fibrose reparativa que ocorre em placas ao longo da estrutura do miocárdio e resulta da proliferação e produção de matriz extracelular por fibroblastos em substituição ao desaparecimento de miócitos por apoptose ou necrose.

O excesso de matriz extracelular leva a uma redução na complacência das câmaras, mas também contribui para o comprometimento da função contrátil do miocárdio, em parte explicado pela ativação de enzimas proteolíticas no miocárdio (Thomas et al, 1998).

Apesar de não serem ainda conhecidos os mecanismos que levam a ativação da atividade proteolítica das metaloproteínases de matriz no remodelamento cardíaco, TNF e outras citocinas e fatores de crescimento que são expressos no miocárdio durante o processo de remodelamento são capazes de ativar as metaloproteínases. Coletivamente, as

enzimas proteolíticas com atividade colagenolítica conhecidas como metaloproteínases de matriz levam a degradação progressiva da matriz extracelular, que resulta em realinhamento dos feixes e/ou de miócitos individuais (*slippage*) do miocárdio, contribuindo para o afinamento do miocárdio e dilatação das câmaras cardíacas.

1.1.3 - Definição e classificação da hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca é o aumento da massa cardíaca, reflexo do remodelamento cardíaco em resposta ao estresse mecânico e a outros estímulos. O processo hipertrófico é um mecanismo pelo qual o coração normaliza o estresse da parede ventricular e o consumo de oxigênio, e pode ser caracterizado como uma resposta fisiológica ou patológica. A hipertrofia cardíaca fisiológica (adaptativa) ocorre em indivíduos saudáveis após atividade física, por exemplo, onde há aumento da complacência cardíaca e não está associada à deterioração cardíaca. Na hipertrofia fisiológica, a função e estrutura cardíaca são preservadas e não estão associadas com insuficiência cardíaca (Dorn et al, 2003; Gupta et al, 2007).

Em contraste, a hipertrofia patológica (mal-adaptativa) é caracterizada por alterações metabólicas, estruturais e funcionais do coração. Estas mudanças podem incluir o metabolismo de glicose, alterações no equilíbrio de cálcio, morte celular e fibrose, disfunção sistólica e diastólica, alteração da condução elétrica, arritmias e risco elevado de morte súbita e insuficiência cardíaca (Lorell e Carabello, 2000; Dorn et al, 2003).

Diferentes formas de estresse hemodinâmico (hipertensão, estenose aórtica, coarctação da aorta, regurgitação mitral, infarto do miocárdio) aumentam a pressão ou volume intraventricular, desencadeando a resposta hipertrófica. De um modo geral, a hipertrofia cardíaca pode ser dividida em dois tipos: a hipertrofia excêntrica, em que o

principal estresse é sobrecarga de volume, cuja hipertrofia é caracterizada por aumento da espessura da parede do coração e dilatação ventricular com adição dos sarcômeros em série; e a hipertrofia concêntrica, na qual o estímulo se dá por sobrecarga de pressão, e é caracterizada por um aumento na espessura da parede com deposição dos sarcômeros em paralelo, sem grandes alterações no tamanho da câmara cardíaca (Dorn et al, 2003). Embora, o processo hipertrófico seja inicialmente benéfico, a hipertrofia prolongada pode ser deletéria, resultando em arritmias, insuficiência cardíaca e morte súbita (Pokrael et al, 2003).

1.1.4 - Vias de sinalização da hipertrofia patológica

O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e a progressão para a insuficiência cardíaca é o resultado de um conjunto de fatores, incluindo alteração da expressão gênica, fatores neuro-humorais, apoptose, déficit do metabolismo energético, arritmias, disfunção vascular, aumento na deposição de colágeno, os quais comprometem a função sistólica e diastólica do coração (Gupta et al, 2007).

As duas principais vias de sinalização celular que modulam a hipertrofia cardíaca incluem a via de sinalização envolvida no estímulo biomecânico e aos fatores neuro-humorais. O estresse mecânico ativa moléculas sensíveis ao estresse no coração, incluindo canais iônicos, integrinas, receptores associados à proteína G (GPCR) e outras proteínas do citoesqueleto, que convertem os sinais mecânicos em sinais bioquímicos e transmitem estes aos sarcômeros, aos segundos mensageiros e ao núcleo (Heineke e Molkenin, 2006; Opie et al, 2006). Entretanto, ainda não está completamente esclarecido como o estresse mecânico, atribuído à sobrecarga de pressão é sentido e transduzido nos cardiomiócitos desencadeando o processo hipertrófico.

Recentemente, tem sido proposto que um receptor de estresse estaria localizado na região sarcomérica do disco-Z (Frank et al, 2006), envolvendo proteínas como a MLP (Knöll et al, 2002) e cal sarcina-1 (Frey et al, 2004). Igualmente, outras proteínas localizadas adjacentes ao sarcômero e ligadas à integrina, como a melusina (Brancaccio et al, 2003) e a quinase de adesão focal (FAK) (Peng et al, 2006), também têm sido associadas à mecanotransdução cardíaca.

Em adição, os fatores neuro-humorais, incluindo sinais adrenérgicos, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) como angiotensina II e sinalização dependente de endotelina-1, os quais são secretados pelos cardiomiócitos e por outras células do coração em resposta ao estímulo mecânico, contribuindo também para o processo da hipertrofia cardíaca, fibrose, apoptose, disfunção contrátil e alterações no metabolismo energético (Heineke e Molkentin, 2006; Opie et al, 2006; Frank et al, 2008).

Os mecanismos pelos quais o coração adapta uma resposta frente ao processo de sobrecarga hemodinâmica, desencadeando fenótipos adaptativo (hipertrofia compensada) e/ou mal-adaptativo (insuficiência cardíaca), têm sido alvo de considerável investigação (Kehat e Molkentin, 2010). Embora a hipertrofia em resposta a uma sinalização patológica seja tradicionalmente considerada uma resposta adaptativa requerida para manter o trabalho cardíaco frente a um estresse, a hipertrofia prolongada está associada ao aumento significativo no risco de morte súbita ou progressão para a insuficiência cardíaca, independente da causa da hipertrofia, sugerindo que o processo hipertrófico não é completamente benéfico (Kannel et al, 1969; Levy et al, 1990; Vakili et al, 2001; Esposito et al, 2002; Frey et al, 2004).

Em outras palavras, a hipertrofia cardíaca é um marco importante na fisiopatologia da insuficiência cardíaca, chegando-se à proposição de que sua supressão pode ser a chave

para impedir a progressão para insuficiência. De outro lado, caso a hipertrofia em resposta ao estresse seja considerada um processo completamente mal-adaptativo, uma metodologia lógica seria então identificar eventos moleculares importantes e eventualmente desenvolver estratégias para prevenir ou reverter o fenótipo hipertrófico, evitando-se dessa forma o desenvolvimento da insuficiência cardíaca ainda em estágio precoce (Frey e Oslon, 2003).

1.1.5 - Drogas convencionais no tratamento de doenças cardiovasculares

O sucesso de terapias com drogas abrangendo o cenário da hipertrofia e insuficiência cardíaca tem-se focado em mecanismos chaves que estão envolvidos na ativação do sistema neuro-humoral como parte do processo da fisiopatologia da doença. Em particular, o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema renina- angiotensina-aldosterona (SRAA) representam alvos neuro-humorais importantes (Sata e Krum, 2010; Belmonte e Blaxall, 2011).

O maior empenho da indústria farmacêutica durante as últimas quatro décadas têm sido direcionado na busca de drogas que atuam em receptores associados à proteína G (GPCRs). Estes receptores são mediadores de mecanismos regulatórios agudos envolvidos no controle da função cardiovascular, como contratilidade. E também em processos crônicos, como a hipertrofia; que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo a insuficiência cardíaca (Penela et al, 2006; Tilley , 2011).

A utilização de β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos receptores de angiotensina e aldosterona representa grande parte dos tratamentos atuais e é ainda a principal terapia para a insuficiência cardíaca objetivando a redução dos sintomas, melhora da função cardíaca, aumento na taxa de sobrevivência e

redução de hospitalização. Apesar de existirem grandes variações em relação à sua eficiência (Hodges, 2009; Sata e Krum, 2010).

Embora, esses medicamentos tenham contribuído com uma melhora na taxa de mortalidade de pacientes com insuficiência cardíaca, a perspectiva de tratamento ainda permanece ruim com mais de 40% dos pacientes diagnosticados, sendo hospitalizados ou morrendo após um ano (Kaye e Krum, 2007).

De fato, a atuação em receptores como estratégia terapêutica, como exemplo GPCRs, com o objetivo de reduzir a mortalidade e melhorar a qualidade de vida de pacientes com doenças cardiovasculares é reconhecido e tem avançado. Por outro lado, se imaginarmos que os receptores representam o início de um evento de uma rede de sinalização, é possível afirmar que existem inúmeros alvos com potencial de inibição específico ao longo da cascata. Dentre estes, destacam-se as proteínas quinases (Anderson et al, 2006).

Assim, a organização e inserção das proteínas quinases como chave fundamental em vias de sinalização celular apontam para um novo desafio terapêutico, já que drogas com alvos específicos para inibição de proteínas quinases em tese teriam a capacidade de agir com maior seletividade e eficiência quando comparadas às drogas que atuam somente nos receptores, possivelmente diminuindo os efeitos biológicos indesejados (Anderson et al, 2006).

1.2 - Proteínas quinases

O genoma humano codifica cerca de 500 proteínas quinases, constituindo aproximadamente 2% dos genes humanos (Rubin et al, 2000; Hanks, 2003). Mais de 30%

do total de proteínas humanas podem ser modificadas por atividade de quinases, as quais são conhecidas por regular a maioria das vias celulares, especialmente aquelas envolvidas na transdução de sinais. Estes números indicam que as proteínas quinases exercem amplo efeito e regulação no controle fisiológico e fisiopatológico em humanos (Cohen, 2001; Eglén e Reisine, 2009).

As proteínas quinases são enzimas que catalisam uma simples reação: a transferência do fosfato terminal (gama) do ATP para o grupo hidroxila de um resíduo de aminoácido de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser) (Johnson, 2009). Elas compõem a maior família de proteínas nos seres eucariontes e, são componentes fundamentais na cascata de sinalização que ocorre no controle intracelular, tanto na regulação como na transdução de sinais, utilizando para isso diferentes mecanismos que vão desde alterações químicas e estruturais das proteínas até mesmo o controle transcricional, mecanismos importantes com alta eficiência no controle da atividade protéica (Engh e Bossemeyer, 2001).

A ativação da cascata de transdução de sinais permite que um estímulo relativamente pequeno seja amplificado e traduzido em uma ampla resposta biológica, como por exemplo, a reprogramação da expressão gênica (Paul e Mukhopadhyay, 2004). Dessa forma, não é surpreendente que alterações na fosforilação das proteínas quinases sejam atribuídas como causa e também consequência de muitas doenças (Cohen, 2002; Melnikova e Golden, 2004; Fabbro et al 2012; Grimminger et al, 2010). Anormalidades na atividade de proteínas tirosina quinases estão associadas a diversas doenças como imunodeficiência, inflamação, artrite reumatóide, psoríase, diabetes, câncer, aterosclerose, doenças neurológicas e cardiovasculares (Eglén e Reisine, 2009).

A maior parte das proteínas quinases possuem no mínimo dois domínios: um domínio catalítico, que serve para ligar e fosforilar proteínas; e uma região regulatória que interage diretamente com proteínas auxiliares modulando alostericamente a atividade do domínio catalítico. Devido aos sítios de reconhecimento dos substratos, as quinases são divididas em duas grandes classes: tirosina quinase (TKs) e serina/treonina quinase (STKs). Das quais muitas são citoplasmáticas, e outras tantas atuam como receptores de membrana celular (Cowan-Jacob, 2006). As proteínas tirosinas quinases são divididas em duas grandes categorias: os receptores de tirosina quinase (RTKs) e não receptores de tirosina quinases (NRTKs), e são estimadas em conter 58 e 32 membros no genoma humano, respectivamente (Manning et al, 2002).

Os receptores de tirosina quinase (RTKs) estão inseridos na membrana plasmática e contêm uma porção extracelular (região de ligação) e uma porção intracelular, que possui atividade catalítica e regulatória. A família dos receptores (RTKs) inclui o receptor de insulina (IGFR) e os receptores de diversos fatores de crescimento como: fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento epidermal (EGF); fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e outros (Ullrich e Schlessinger, 1990).

Em contraste, os não receptores de tirosinas quinases (NRTKs) estão localizados na região intracelular e são desprovidos da porção extracelular ou transmembrana, mas possuem domínios moduladores que são responsáveis por controlar e regular a atividade catalítica (Chen et al, 2008). Por terem esta localização, tirosinas quinases podem mediar a transdução de ambos os sinais intracelulares como extracelulares.

Devido ao papel crítico destas proteínas na comunicação celular e manutenção da homeostase, a atividade de tirosina quinase é rigorosamente controlada (Paul e Mukhopadhyay, 2004). Tais proteínas são normalmente quiescentes até serem ativadas por

estímulos extracelulares ou por ligantes, como por exemplo fatores de crescimento (VEGF e PDGR) ou estímulos intracelulares (tal qual o estresse oxidativo e mecânico). A família dos NRTKs incluem Src, Abl, JAKs, e FAK, entre outros (Superti-Furga e Courtneidge, 1995; Hunter, 1995; Schlessinger 2000).

1.2.1 - Quinase de adesão focal – FAK

A quinase de adesão focal (FAK) é uma proteína da família das proteínas tirosinas quinases citoplasmáticas de 125 KDa que se localiza em sítios de adesão celular enriquecidos de integrina, descrita como um substrato de v-Src em fibroblastos transformados (Schaller et al, 1992). A FAK funciona como potente mediador de sinalização das integrinas, envolvida na regulação de processos biológicos essenciais, tais como adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular (Sieg et al, 2000; Chatzizacharias et al, 2008). Estudos utilizando modelos animais demonstraram a importância da FAK no desenvolvimento embrionário e no sistema cardiovascular. Somado-se a isso, dados recentes suportam o papel da sinalização mediada pela FAK no crescimento hipertrófico de cardiomiócitos diferenciados em resposta ao estresse mecânico, hormônios e fatores de crescimento (Franchini, 2012).

1.2.2 - Estrutura e regulação da FAK

A estrutura primária da FAK é constituída por um domínio central tirosina quinase, localizado entre o domínio N-terminal (FERM) e o domínio C-terminal que inclui uma região proximal rica em prolina e uma região distal FAT (*Focal Adhesion Targeting*) (Parsons, 2003). Estes domínios estão dispostos em uma estrutura globular tripartite, com o

domínio FERM organizado em uma conformação compacta contendo três subdomínios independentes (F1, F2 e F3) conectados por uma sequência desestruturada ao domínio catalítico, que por sua vez, se liga ao domínio FAT (*Focal Adhesion Targeting*) uma região naturalmente rica em prolina (Lietha et al, 2007; Ceccarelli et al, 2006; Nowakowski et al, 2002; Arold et al, 2002; Cooper et al, 2003).

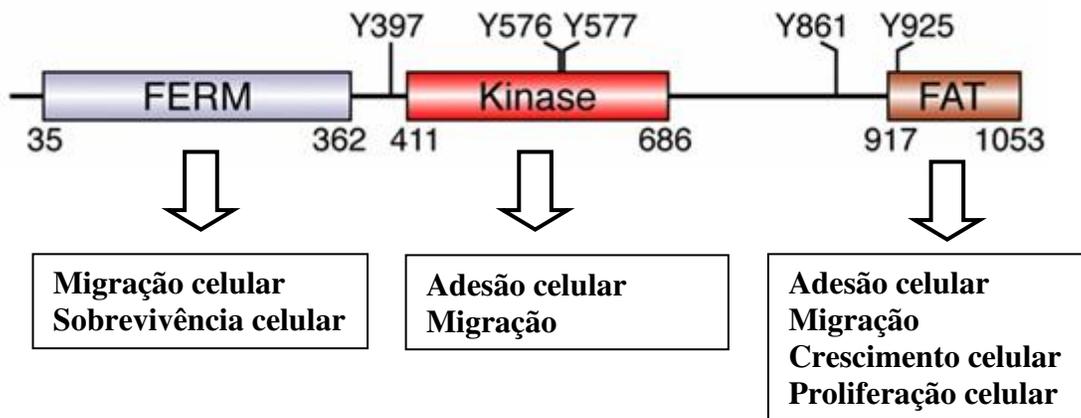


Figura 1- Esquema representativo da estrutura da FAK e suas funções, demonstrando os 3 domínios (FERM, KINASE e FAT). Abaixo do diagrama estão descritas as múltiplas funções celulares mediadas por essa via de sinalização, relatadas em regiões e domínios específicos.

A atividade catalítica da tirosina quinase (FAK) é dirigida por um sítio de autofosforilação (Y397) localizado em uma conexão entre o domínio FERM e o domínio catalítico, cujo mecanismo é crítico para diversas funções celulares. (Parsons, 2003). O controle da atividade da FAK é complexo e normalmente envolve uma regulação dinâmica do estado inativo e ativo e a localização subcelular da enzima. Por exemplo, durante a migração e dispersão celular dependente de integrina, a FAK é recrutada para adesão focal, resultando na sua ativação, pressupondo que haja conversão da FAK do estado inativo para ativo (Calalb et al, 1995; Schaller et al, 1994; Kornberg et al, 1992).

Agora é compreendido que a manutenção da atividade da FAK é em grande parte, determinada por uma complexa interação auto-inibitória intra e inter/moleculares com diferentes associações envolvendo muitas proteínas e lipídeos (Parsons, 2003; Schaller 2011). A auto-inibição da FAK é realizada por interações intra/moleculares entre os domínios FERM e quinase, as quais bloqueiam o acesso do ATP e de proteínas alvo ao sítio catalítico (Cooper et al, 2003; Dunty et al, 2004; Lietha et al, 2007). Esta configuração auto-inibitória da FAK é estabilizada pela interação do subdomínio FERM (F2) com o lobo-C do domínio catalítico. Mas, ligações adicionais do segmento do “linker” estabelecem a ativação do Tyr 397 com o subdomínio FERM (F1), contribuindo no controle da atividade da FAK por manter o resíduo de tirosina no estado não fosforilado (Lietha et al, 2007). Recentemente, um modelo deu suporte à hipótese que a ativação da FAK é provocada pela liberação da conformação auto-inibitória entre o domínio FERM e o domínio catalítico, de forma que haja abertura do sítio catalítico dando assim acesso ao ATP e a proteínas alvo (Lietha et al, 2007).

Uma vez a FAK ativa, o resíduo Tyr 397 é imediatamente autofosforilado. De acordo com este modelo, eventos moleculares responsáveis por induzir o deslocamento do FERM para o domínio catalítico são cruciais para a ativação da FAK. Dessa forma, suspeita-se que a ativação de parceiros poderia dar início ao deslocamento do FERM para o domínio quinase (Lietha et al, 2007). Embora a natureza destas relações não esteja completamente esclarecida, há evidências sugerindo que as integrinas podem ser parte deste processo. Por exemplo, pequenos peptídeos do domínio citoplasmático de integrina-B podem interagir com o domínio FERM da FAK e desencadear sua ativação (Schaller et al, 1994; Cooper et al, 2003).

Em adição, outras proteínas que interagem com o domínio FERM poderiam regular sua atividade interferindo diretamente na conformação auto-inibitória, como o caso dos receptores de tirosina quinase, que intermedeiam à ativação da FAK através dos fatores de crescimento (Frame et al, 2010). Entretanto, os detalhes dos mecanismos moleculares importantes para a ativação da FAK por estes receptores ainda não estão bem esclarecidos.

Uma exceção é a regulação da FAK pela Src, que é crítica para muitas funções da FAK. A fosforilação do resíduo Tyr 397 cria um sítio de ligação homólogo com a Src (SH2), que junto com o sítio de ligação próximo (SH3) rico em prolina pode interagir com a Src (Parsons, 2003; Lietha et al, 2007; Schaller et al, 1994). A ativação da Src no complexo FAK/Src leva posteriormente à fosforilação dos resíduos Tyr576 e Tyr577 dentro do loop de ativação do domínio quinase da FAK, fenômeno conhecido por potencializar a atividade da FAK (Calalb et al, 1995). Por fim, a atividade da Src fosforila o resíduo Tyr861 e Tyr925 na região C-terminal, podendo regular eventos celulares por ligar-se ao domínio SH2 de proteínas de sinalização (Calalb et al, 1996; Schlaepfer e Hunter, 1996).

1.2.3 - Sinalização da FAK na hipertrofia cardíaca

As células cardíacas são irreversivelmente desprovidas de ciclo celular logo após o nascimento. Assim, o crescimento subsequente neste tipo de célula ocorre predominantemente através da hipertrofia ao invés da hiperplasia. Estudos utilizando cardiomiócitos em cultura demonstraram que a super expressão da FAK aumenta a expressão de genes marcadores de hipertrofia (Pham et al, 2000; Torsoni et al, 2003), sugerindo que a FAK pode ser suficiente para induzir a hipertrofia. Outros estudos realizados em cardiomiócitos com diminuição da expressão de FAK confirmaram sua

importância para o crescimento hipertrófico que ocorre em resposta ao estresse biomecânico (Marin et al, 2008).

O papel da FAK na hipertrofia cardíaca também tem sido investigado em camundongos com deleção condicional da FAK cardíaca (DiMichele et al, 2006; Peng et al, 2006). Embora, tais estudos tenham apresentado discrepâncias nos resultados, de maneira geral eles confirmam a hipótese de que a FAK é requerida para adaptar a resposta do coração ao estímulo mecânico. Em um dos estudos os camundongos apresentaram redução dos níveis de proteína FAK no coração duas semanas após o nascimento. Neste modelo, a deleção específica da FAK nos cardiomiócitos não afetou a estrutura e a função cardíaca basal. Entretanto após coarctação da aorta ou infusão de angiotensina II os camundongos apresentaram alteração na dimensão da câmara, na relação do peso corporal/coração e nos níveis de marcadores genéticos de hipertrofia. Além disso, os corações destes camundongos apresentaram aumento da fibrose intersticial, quando comparados aos seus respectivos controles (Peng et al, 2006).

Em contraste, o outro estudo que gerou camundongos com deleção específica da FAK nos miócitos cardíacos, cuja diminuição máxima da FAK no coração ocorreu 3 meses após o nascimento, mostrou que houve atenuação da resposta hipertrófica de média para moderada após constrição da aorta. Da mesma forma que o modelo desenvolvido por Peng e colaboradores, nenhuma alteração foi encontrada na estrutura ou função do coração desses camundongos no estado basal. Com relação à fibrose, verificou-se também que houve aumento da fibrose perivascular nestes camundongos após a constrição da aorta (DiMichele et al 2006).

Em adição, nosso grupo utilizou um modelo de silenciamento da FAK induzido por estratégia de interferência siRNA para avaliar a função da FAK na resposta cardíaca por

sobrecarga de pressão em camundongos. Os dados indicam que a diminuição da FAK (~70%) não apenas atenuou o desenvolvimento, mas também reverteu a hipertrofia ventricular esquerda pré-estabelecida em camundongos coarctados (Clemente et al, 2007). Isso implica que a FAK é necessária para o desenvolvimento e manutenção da hipertrofia ventricular esquerda em resposta à sobrecarga de pressão crônica.

1.2.4 - Sinalização da FAK na insuficiência cardíaca

Evidências recentes implicam a sinalização da FAK no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca mal adaptativa. Aumento nos níveis de expressão e atividade da FAK foi demonstrado no ventrículo de ratos com sobrecarga de pressão crônica (Bayer et al, 2002). Nesse modelo houve uma estreita correlação entre o grau de hipertrofia e a expressão e atividade da FAK durante a transição da hipertrofia compensatória para a insuficiência cardíaca. Notavelmente, embora a FAK fosse detectada no cardiomiócito de ambos os grupos: controle e coarctado, grande parte do aumento da expressão da FAK ocorreu no interstício cardíaco, sugerindo que o aumento da expressão da FAK no interstício foi derivado da proliferação de fibroblastos cardíacos. Além disso, a FAK também se mostrou aumentada em cardiomiócitos adjacentes à área de fibrose, implicando que a ativação da FAK nos miócitos também pode contribuir para a deterioração de corações de ratos com sobrecarga crônica.

Resultados similares foram obtidos em um estudo do nosso laboratório em camundongos submetidos à sobrecarga de pressão (Clemente et al, 2007). Em adição, o aumento da expressão e atividade da FAK também foi encontrado em amostras de corações de pacientes com regurgitação da válvula mitral quando comparados aos corações transplantados de doadores (Lopes et al, 2007). Embora a detecção da FAK nas amostras

cardíacas dos controles doadores tenha sido quase exclusivamente restrita aos miócitos cardíacos, as amostras dos corações dos pacientes com insuficiência cardíaca à FAK também foi localizada no interstício cardíaco. Uma correlação positiva foi encontrada entre o colágeno e a área intersticial marcada com anticorpo anti-FAK. Mais que isso, as áreas coradas com FAK coincidem com os fibroblastos, indicando que grande parte da FAK intersticial foi localizada nestas células. Estes dados estão de acordo com um dos nossos estudos realizado em camundongos coarctados, indicando que os fibroblastos isolados e retirados desses animais após 7 dias de coarctação tiveram aumento da expressão da FAK e que o estresse cíclico por si foi capaz de induzir a transformação de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos (Dalla Costa et al, 2010; Clemente et al, 2007).

Além disso, foi mostrado que o silenciamento da FAK atenuou a fibrose intersticial, reforçando a idéia de que a FAK desempenha papel crítico na fibrogênese do miocárdio induzida por sobrecarga de pressão crônica. De fato, o silenciamento da FAK foi acompanhado da atenuação do colágeno e da atividade de metaloproteinase (MMP-2) cardíaca, que são determinantes para o remodelamento da matriz-extracelular em corações com sobrecarga mecânica (Iwanaga et al , 2002). A análise morfológica e ecocardiográfica indicou que o silenciamento também retardou a progressão da deterioração estrutural e funcional dos ventrículos hipertróficos.

Embora os dados suportem o papel da sinalização da FAK na deterioração de corações com sobrecarga mecânica crônica, eles estão aparentemente em conflito com as observações realizadas nos camundongos com deleção específica da FAK no miócito, aonde a deficiência da FAK predispõe o coração submetido à sobrecarga crônica ao remodelamento mal-adaptativo prematuro. Aparentemente os efeitos contraditórios poderiam ser relatados pelo fato de que o silenciamento da FAK por siRNA, em contraste

com o animal com deleção específica da FAK para o cardiomiócito, pode atenuar o desenvolvimento de fibrose além dos cardiomiócitos, melhorando o resultado no ventrículo esquerdo dos animais com sobrecarga pressórica crônica (Franchini, 2012).

1.3 - Proteínas tirosinas quinases como alvos terapêuticos

A caracterização de processos envolvidos na regulação individual de componentes de vias de transdução de sinais e a integração dessas respostas estão sendo utilizadas para identificar novas rotas e alvos promissores para intervenção terapêutica. Nesse contexto, proteínas quinases têm aparecido como um alvo atrativo para busca de agentes terapêuticos relevantes com aplicação em diversas doenças (García-Echeverría et al, 2000).

O desenvolvimento de agentes farmacológicos com função específica tem papel importante em vários aspectos da pesquisa em biologia, bem como para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para as doenças. A disponibilidade de agentes inibidores específicos para moléculas de sinalização pode favorecer o desenvolvimento do conhecimento sobre a importância das mesmas nas funções celulares e seu envolvimento na patogenia de doenças (Cohen, 2002).

Ao longo dos anos, diferentes proteínas tirosina e serina/treonina quinases estão sendo selecionadas como moléculas candidatas para a descoberta de drogas, baseadas nas suas atividades e no aumento da expressão e/ou disfunção delas em órgãos e tecidos específicos, ou através da associação delas na transdução de sinais e vias do ciclo celular que tem sido implicado em inúmeros processos patológicos. Como consequência destas alterações funcionais, a inibição de proteínas quinases em particular deveria levar à

modificação funcional da resposta celular e, em tese, isso deveria levar à modificação da patologia em questão (García-Echeverría et al, 2000).

Atualmente, as proteínas quinases são considerada o segundo grupo mais importante de alvos para drogas, perdendo apenas para as drogas que atuam nos receptores associados à proteína G. Os inibidores de proteínas quinases respondem por 30% dos programas de desenvolvimento de drogas das indústrias farmacêuticas (Cohen, 2002; Vlahovic e Crawford, 2003).

Vale ressaltar que programas dirigidos ao desenvolvimento de compostos inibidores de proteínas quinases exigem desafios adicionais comparados aos alvos farmacológicos tradicionais, como GPCR e outros ligantes de receptores superficiais, bloqueadores de canais iônicos e inibidores de enzimas circulantes. Os inibidores de proteínas quinases citoplasmáticas devem, por exemplo, penetrar na membrana celular para atingir o alvo de interesse, sendo assim mais complexos (Anderson et al, 2006).

Nesse contexto, um número considerável de trabalhos tem relatado a busca de compostos com atividade inibitória de proteínas tirosina quinases. Algumas classes de substâncias estudadas são os compostos orgânicos heterocíclicos como anilinoquinazolininas (Vansteenkiste, 2004; Tiseo et al, 2004), quinolininas (Wissner et al, 2000), piridopirimidinas (Fry et al, 1998) e pirrolopirimidinas (Mellinghoff et al, 2002; Traxler et al, 2004).

A questão da seletividade, no entanto, costuma ser problemática, uma vez que as tirosinas quinases possuem alto grau de homologia estrutural e sequencial (Fischer, 2004; Bogoyevitch e Fairlie, 2007). Ainda assim, essas proteínas são alvos moleculares terapêuticos importantes visando o desenvolvimento de fármacos. Entretanto, desafios específicos para essa classe estão ainda sendo desvendados e investigados (Cohen, 2002; Anderson et al, 2006).

Apesar dos obstáculos, alguns grupos têm logrado sucesso, e inibidores seletivos de determinadas tirosinas quinases já são comercializados ou se encontram em estudos clínicos avançados (Klutchko et al, 2006). Até o presente momento existem 21 anticorpos monoclonais (mAbs) e 10 inibidores de tirosina quinase (TKIs) que estão aprovados pela *U.S Food and Drug Administration (FDA)* (Johnson, 2009).

No entanto, existem aproximadamente 175 mAbs e 150 TKIs em teste clínico e muito mais em desenvolvimento que estão sendo utilizados em testes pré clínicos (Via, 2007; Norman, 2007). Juntos, existem aproximadamente 600 agentes em algum lugar entre a descoberta e o mercado, com aproximadamente 80% das drogas em desenvolvimento sendo dirigidas para câncer (Force e Kerkelä, 2008; Chen et al, 2008).

Por fim, muitas dessas drogas estão contribuindo de forma importante tanto na sobrevida como também na qualidade de vida de pacientes com câncer. O inibidor de tirosina kinase (TKI) imatinib, por exemplo, tem revolucionado o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica (Druker et al, 1996; Sherbenou e Druker, 2007; Cheng e Force, 2010).

Além disso, a modulação da atividade de proteínas quinases com o propósito terapêutico representa uma oportunidade de mercado multi milionário. Estima-se que o investimento global com terapias dirigidas a inibição de quinases em 2013 gire em torno de \$35 bilhões (Schwartz e Murray, 2011). Apesar do sucesso de alguns inibidores de proteínas quinases (Gleevec, Rapamicina, Fasudil) no tratamento de doenças, desafios importantes na área de desenvolvimento desses fármacos permanecem. Portanto, compreender melhor o universo de proteínas quinases é uma forma de abrir e explorar novas oportunidades na busca de inibidores, levando em consideração maior especificidade e potencial de inibição em seus alvos (Dar e Shokat, 2011).

Nos últimos anos, os estudos com compostos derivados de quinazolininas tiveram grande progresso no combate das doenças proliferativas como o câncer, baseados principalmente na propriedade inibidora de tirosina quinases (Marzaro et al, 2012). Sendo assim, a utilização de quinazolininas é uma estratégia viável para o tratamento de doenças cardiovasculares.

1.3.1 - Inibidores de tirosina kinase (TKIs)

Os inibidores de tirosina quinase (TKIs) são planejados e desenhados para atingir ambas as classes de tirosina quinases: receptores (RTKs) e não receptores (NRTKs). Os inibidores dos receptores de tirosina quinases bloqueiam a atividade do domínio intracelular da quinase. Normalmente o ligante associa-se a um receptor (RTK), dando início à dimerização, propiciando a fosforilação do domínio quinase, dessa forma ativando a quinase. A quinase ativada então fosforila os substratos abaixo na cascata de sinalização que finalmente resulta em mudanças, por exemplo, alteração da expressão gênica e proliferação celular. Os TKIs podem inibir diretamente a fosforilação do domínio quinase e também inibir a fosforilação dos substratos localizados na cascata abaixo, desse modo terminando com a cascata de sinalização. Os TKIs que bloqueiam a sinalização por NRTKs atingem quinases intracelulares e trabalham de forma similar àqueles que atingem RTKs (Chen et al, 2008).

1.3.2 - Tipos de inibidores de tirosina quinase

Os inibidores de tirosina quinases (TKIs) podem impedir a fosforilação do substrato de três formas (Okram et al, 2006).

A fosforilação de um substrato é dependente da ligação de ambos ATP e substrato para que ocorra a ativação da quinase. Os inibidores do tipo I (sunitinib) competem com ATP, ligando-se ao sítio de ATP impedindo a completa ativação da quinase. Até o momento esse é o tipo predominante na clínica. Contudo, estes compostos geralmente são pouco seletivos devido à grande conservação da estrutura do bolso de ATP nas mais de 500 quinases encontradas no genoma humano, sendo assim, estes, normalmente inibem muitas quinases. Os inibidores do tipo II (imatinib e nilotinib) ligam-se a duas regiões diferentes da quinase: na região do ATP e a outra região adjacente que é acessível somente no estado inativo da enzima. Os inibidores do tipo II, desta maneira, ligam-se às quinases e as mantêm no seu estado inativo. Esses inibidores são mais potentes e seletivos que os inibidores do tipo I. Ainda assim, agentes do tipo II normalmente inibem 3 ou mais quinases. Os inibidores do tipo III (PD98059 e U0126) ligam-se a sítios remotos do sítio de ATP, como exemplo a região que reconhece o substrato (bloqueando a ligação do substrato a quinase), ou ainda em outras regiões das quinases que são muito mais divergentes no genoma. Conseqüentemente, inibidores do tipo III prometem ser muito mais seletivos. Apesar do potencial em relação à seletividade, esses inibidores representam hoje a minoria dos TKIs em desenvolvimento, devido à dificuldade no desenho e por não serem tão previsivelmente efetivos como os outros (Chen et al, 2008; Zhang et al, 2009).

1.4 – Quinazolininas

A química dos compostos heterocíclicos compreende pelo menos metade de toda a pesquisa na área de química orgânica e forma a base de muitos produtos farmacêuticos, agroquímicos e veterinários (Connolly et al, 2005). Na última década, por conseqüência de

uma grande variedade de aplicações destes compostos na química farmacêutica e medicinal, a síntese dessas estruturas transformou-se em um alvo importante da química orgânica sintética (Katritzky, 1996; Undheim e Benneche, 1999; Joule e Mills, 2000; Katritzky e Pozharskii, 2003).

A investigação de heterocíclicos como estruturas privilegiadas na descoberta de novas drogas é, sem dúvida, uma das maiores áreas da química medicinal, uma vez que elas representam uma classe de moléculas que atuam como ligantes para os vários receptores biológicos com um alto grau de afinidade (Nicolaou et al, 2000; Arya et al, 2001).

Nos últimos anos, com os grandes avanços na síntese de estruturas heterocíclicas, a literatura tem apresentado mais do que uma classe de compostos biologicamente ativos (Acharya et al, 2002; Kamal et al, 2001; Branowska et al, 2005; Goswami et al, 2005; Landreau et al, 2003).

Entre estes, os heterocíclicos nitrogenados, 4(3*H*)-quinazolinonas (**1**) e quinazolininas (**2**) substituídas representam uma classe de compostos (Connolly et al, 2005; Rewcastle et al, 2000; Mhaske et al, 2006) muito importante do ponto de vista farmacêutico e médico devido a diversas propriedades biológicas, tais como, anticâncer (Rewcastle et al, 2000), diurética (Lyle, 1985), anti-inflamatória (Matsuda et al, 1998; Kenichi et al, 1985), anticonvulsiva (Buchanan e Sable, 1972) e anti-hipertensiva (Hibino e Choshi, 2001).

As quinazolininas compõem uma classe farmacológica muito atrativa de compostos e têm se mostrado importantes em vários assuntos. Por exemplo, estão sendo utilizadas no tratamento de doenças complexas como câncer. Como consequência, esta área está sobre intensa exploração, principalmente no aspecto de desenvolvimento e síntese de novas quinazolininas (Mhaske et al, 2006).

O interesse na química medicinal com derivados de quinazolinonas foi estimulado no início de 1950 com a elucidação da estrutura do alcalóide Febrifugina, que foi efetivo contra malária, posteriormente descontinuado devido à toxicidade (Koepfly et al, 1947). A metaqualona foi sintetizada pela primeira vez em 1951, e é o derivado de quinazolinona mais conhecido, famosa por seu efeito hipnótico-sedativo (Kacker e Zaheer, 1951). A partir destes dados houve um crescente interesse científico nas áreas de isolamento, de síntese e de estudos de propriedades farmacológicas de derivados de quinazolinonas (Mhaske et al, 2006).

O maior sucesso envolvendo essa classe de compostos está reportado na literatura como inibidores potentes e seletivos da atividade de tirosina quinases da família de receptores EGF (Fry et al, 1994; Fry, 1999), enzima chave relacionada ao desenvolvimento e progressão de tumores em humanos. Além disso, o conhecimento do processo de inibição dessas enzimas parece ser o caminho para a terapia de muitas doenças, tais como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares entre outras (Woodburn, 1999; Bridges, 2001; Levitzki e Mishani, 2006; Baselga, 2006).

A etapa de desenvolvimento para descoberta de novos fármacos inclui o planejamento, a síntese de substâncias químicas inéditas e a validação *in vitro* do composto como inibidor da atividade enzimática, bem como estudos de modelagem molecular e ensaios bioquímicos e analíticos. O princípio de que “moléculas semelhantes devem apresentar atividades biológicas semelhantes” é um dos nortes da química medicinal.

De fato, uma estratégia bastante comum no desenvolvimento racional de fármacos é a realização de modificações estruturais com bioisósteros (compostos ou grupos de átomos que possuem formatos e volumes semelhantes, aproximadamente a mesma distribuição de elétrons e que exibam propriedades físicas semelhantes) (Burger, 1991). Segundo He e

colaboradores (Choi et al, 2006), a classe das pirrolopirimidinas apresenta excelente capacidade de inibir a FAK (alguns derivados possuem $IC_{50} < 10$ nM). Assim, com base no conhecimento de bioisómeros é possível propor que análogos estruturais do grupo pirrolopirimidínicos tenham capacidade inibitória semelhante para o mesmo alvo.

O modo de ligação de pirrolopirimidínicos com a FAK envolve interações com o grupo N-H da ligação peptídica da cisteína-502, ligações de hidrogênio e/ou interações iônicas entre o substrato e a lisina-454, bem como outras interações com a arginina-550 e o aspartato-564 (Choi et al, 2006).

Desta forma, acredita-se ser importante estudar derivados com substituintes com e sem átomos de nitrogênio na posição das estruturas inéditas a fim de se verificar a importância de um grupo aceptor de ligação de hidrogênio nessa posição. Ainda, a substituição de arilas por outros grupos tais como OH, OCH_3 , metilpiperidinóxi e benziloxi permitirá verificar a importância dessa região do substrato com o resíduo cisteína-502, uma vez que o aminoácido apresenta um átomo de enxofre bastante polarizável capaz de interagir com anéis aromáticos através de dipolos induzidos.

Neste contexto, compostos inéditos, com substituintes de naturezas diversas, podem fornecer possibilidades qualitativa e quantitativamente diferentes de interação com a enzima, permitindo a produção de substâncias com potência e seletividades maiores. Além disso, compostos com estruturas diferentes, podem, em testes toxicológicos, apresentar diferenças vantajosas que permitam o desenvolvimento dos mesmos para uso clínico. O uso da bioinformática confirmou que os mesmos resíduos citados por He e colaboradores também fazem interações com os novos grupos de compostos sintetizados pelo nosso grupo, e assim permitiu direcionar a síntese dos novos compostos para serem inibidores da FAK, com destaque para o BZLO.

1.5 - Hipótese

A sinalização mediada pela FAK tem papel crítico na resposta hipertrófica de cardiomiócitos e também na ativação de fibroblastos cardíacos a estímulos mecânicos. Inibidores da FAK podem ser alternativas potencialmente promissoras na terapêutica da hipertrofia cardíaca, como também na progressão para a insuficiência cardíaca.

2- OBJETIVO

2.1- OBJETIVO

Avaliar a eficácia da inibição da FAK através de um composto inédito derivado de quinazolina (BZLO) no processo de hipertrofia cardíaca em camundongos submetidos à coarctação da aorta.

2.2- Ojetivos específicos

1- Avaliação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos previamente tratados com o composto BZLO.

2- Avaliação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos posteriormente tratados com o composto BZLO.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materias

Anticorpos: anti-FAK (C-20), anti-pFAK Tyr397 e anti-GAPDH policlonais da Santa Cruz Biotechnology.

Reagentes: FAK recombinante (Invitrogen) e [$g^{32}P$] ATP (Perkin Elmer Inc.)

Anestésicos: xilazina 2% (Syntec), cloridrato de Cetamina 10% (Syntec) e tiopental sódico 1,0 g (Cristália).

Soluções: solução fisiológica 0,9% (Baxter) e goma arábica em pó pura (Synth).

Animais: camundongos machos (Swiss) de 8-10 semanas, pesando entre 20-30g, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp. O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-IB-UNICAMP), sob o protocolo nº2510-1.

Materiais cirúrgicos: fio cirúrgico de nylon 7-0 prolene (Ethicon – Johnson & Johnson), fio cirúrgico de algodão 4-0 (PolySuture), agulha 26G 1/2 (0,45 x 13 mm), tubo de polietileno PE-50 (Clay Adams), agulha de gavagem IC 800R (Insight), pinças e tesouras.

3.2 - Compostos quinazolínicos

Os compostos derivados de quinazolina fazem parte do projeto temático do laboratório cujo objetivo é o desenvolvimento de agentes terapêuticos com potencial utilização no tratamento da hipertrofia e insuficiência cardíaca.

3.3 - Ensaio *in vitro* (FAK)

Para medir a atividade da quinase total, foram preparadas 7 amostras diferentes:

- 1) todas contendo q.s.p 10 μ l da solução de MOPS (20mM MOPS, pH 7.4, EDTA 50mM, MgCl₂ 50mM),

2) todas contendo 0,2 μ M da FAK – full length 125KDa,

3) 1 amostra contendo 3 μ l da solução de ATP (50 μ M ATP diluído em tampão MOPS),

4) todas as amostras contendo [γ 32 P] ATP - 3 μ Ci,

5) uma amostra contendo 3 μ l de DMSO,

6) quatro amostras com concentrações crescentes do inibidor (1nM, 10nM, 100nM, 1000nM). Todos os reagentes foram incubados por 30min a 30° C, exceto [γ 32 P] ATP. Após a adição [γ 32 P] ATP, os reagentes foram novamente incubados por 30min a 30° C. Em seguida foi adicionado tampão da amostra SDS-PAGE 2x. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 10% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Posteriormente, o gel foi submetido a uma desidratação utilizando o aparelho Gel Dryer – Model 583. A proteína FAK e o ATP foram detectados por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). As bandas das imagens foram quantificadas por densitometria óptica através do software Imaje J.

3.4 - Determinação dos parâmetros farmacocinéticos do BZLO após a administração oral em ratos

O composto 4-BZLO [6,7-dimetóxi-4-N-(4'-benzilóxfenil)aminoquinazolina] e o padrão interno 3-Anis [6,7-dimetóxi-4-N-(3'-metóxfenil)aminoquinazolina] foram sintetizados conforme descrito na literatura [35,38,56] e suas estruturas química estão apresentadas na Figura 1. Ambos os compostos apresentaram alto grau de pureza (> 99% por análise elementar, HPLC, massas e RMN de 1 H e 13 C). Todos os solventes e reagentes utilizados neste estudo eram de grau HPLC. A água foi purificada e deionizada em um

sistema Milli-Q-UF (Millipore, Milford, Mass, USA) e usada em seguida em todas as soluções aquosas. A acetonitrila foi obtida da Tedia (São Paulo, SP, Brazil) e o clorofórmio, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o acetato de amônio foram obtidos da VETEC (São Paulo, SP, Brazil). A fase móvel usada no sistema de HPLC foi filtrada a vácuo através de um filtro de 0,45 µm (Millipore, Milford, Mass, USA). O valor do pH do tampão acetato de amônio (0,1 M, pH 7,2) foi ajustado através da adição de hidróxido de amônio (0,01 M).

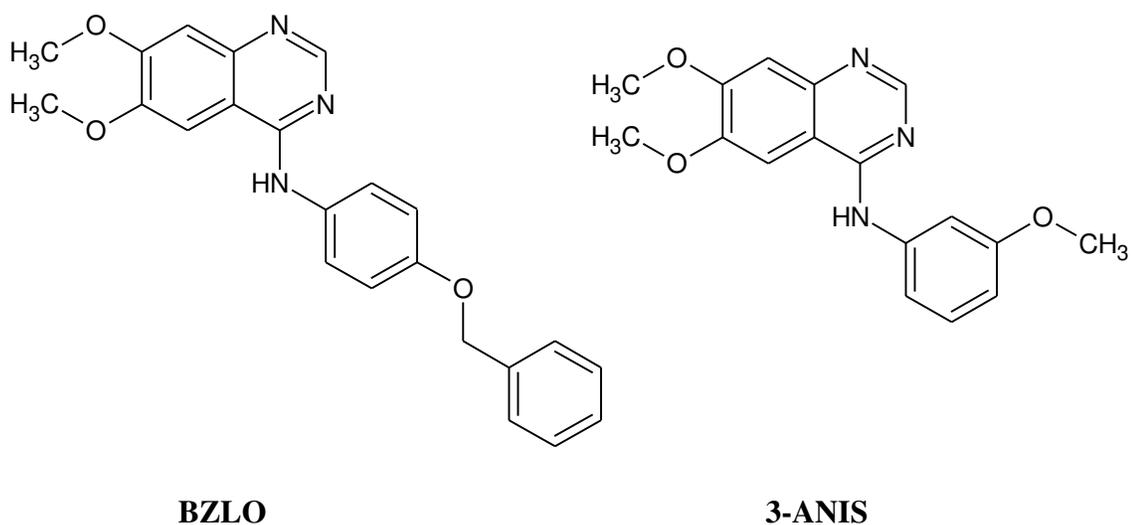


Figura 2- Estruturas químicas do BZLO e do composto usado como padrão interno 3-Anis.

3.4.1 - Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento Alliance série Waters 2695 (Milford, Mass, USA), equipado com bomba quaternária, injetor e degaseificador automáticos e detector espectrofotométrico UV-Vis (PDA) série Waters

2996. A separação dos compostos (BZLO e 3-Anis) foi realizada, à temperatura ambiente, em uma coluna cromatográfica de fase reversa OmniSpher C18 (250 mm x 4.6 mm de diâmetro interno e 5 μm de tamanho de partículas) protegida com uma pré-coluna ChromoSep SS (10 mm x 3 mm) (ambas obtidas da Varian, CA, USA). A fase móvel usada para promover a separação cromatográfica foi composta de 70% de acetonitrila e 30% de tampão acetato de amônio (0,1 mol L⁻¹ e pH 7,2) (v/v). A fase móvel foi preparada diariamente e filtrada em um sistema a vácuo através de um filtro de 0,45 μm (Millipore, Milford, Mass, USA). A coluna foi equilibrada e eluída sobre condições isocráticas, utilizando uma faixa de fluxo de 1.0 mL/min. O comprimento de onda máximo de detecção do BZLO e do padrão interno 3-Anis foi estabelecido em 340 nm e o tempo total de corrida para cada amostra foi de 8 minutos.

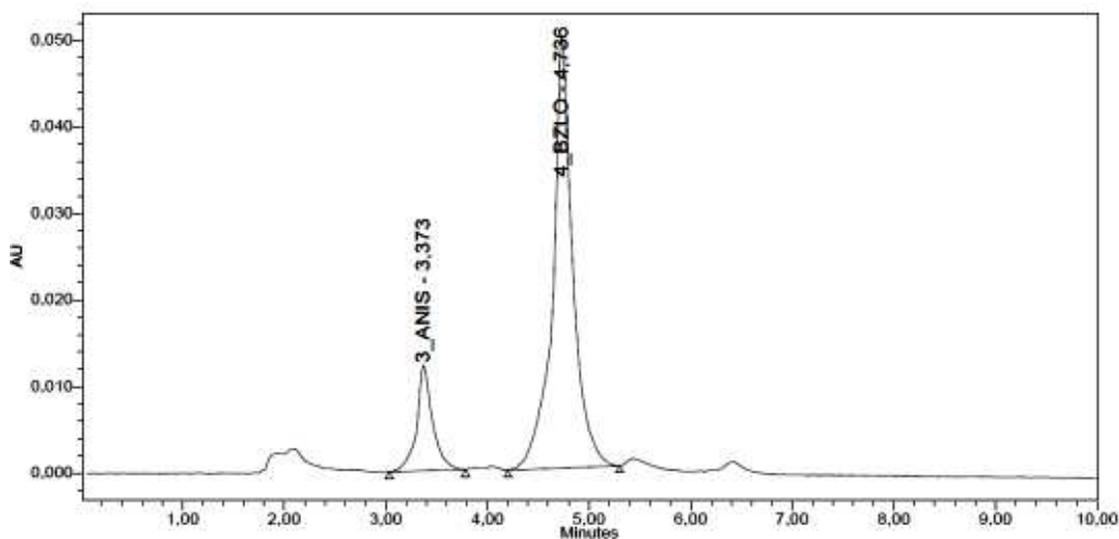


Figura 3- Cromatograma representativo da análise de uma amostra de plasma de rato Wistar contendo o 4-BZLO (25 μM) e o composto 3-Anis (1,10 μM) como o padrão interno.

O controle do sistema, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados através de um computador PC-Pentium IV da Dell, que operou com o programa Microsoft Windows XP Professional versão 2003 e com o programa cromatográfico Empower 2002. Os gráficos de calibração foram calculados através de análise de regressão linear da razão da área do pico do 4-BZLO pela área do pico do padrão interno 3-Anis (4-BZLO/3-Anis) (eixo y) versus a concentração do padrão nominal do 4-BZLO (eixo x), utilizando o programa Excel versão 2003. As amostras de plasma de ratos (Wistars machos) de concentração zero (branco) foram obtidas para se verificar visualmente a pureza dos reagentes e a potencial interferência de substâncias endógenas nas análises, mas não foram consideradas na análise de regressão linear dos padrões de calibração.

3.4.2 - Preparação das soluções estoques, padrões e controles de qualidade

As soluções estoques de 4-BZLO e do padrão interno 3-Anis foram preparadas, independentemente em duplicatas, pela dissolução de 3,89 mg de 4-BZLO e 3,11 mg de 3-Anis em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para se obter uma concentração de 10 mmol L⁻¹. As soluções foram mantidas a 4°C, em frascos de vidro, por um período não superior a 4 semanas.

Uma solução composta de 50% de acetonitrila e 50% de tampão acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,2 (50:50, v/v) foi usada para diluir as soluções estoques de 4-BZLO para uma concentração de trabalho de 500 µmol L⁻¹. As soluções estoques do padrão interno (3-Anis) foram diluídas, em acetonitrila, para uma concentração de trabalho de 50 µmol L⁻¹. A partir da solução de 500 µmol L⁻¹, diluições seriadas do 4-BZLO em plasma heparinizado de ratos (Wistar machos) foram geradas as seguintes amostras usadas para preparar os

pontos da curva de calibração: 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.00, 25.00, 50.00 e 100.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Com cada corrida analítica, estes padrões de calibração foram preparados em triplicatas. As amostras do branco de plasma (sem droga e padrão interno) e do plasma com o padrão interno 3-Anis foram também preparadas.

Grupos de amostras de controles de qualidade (CQs) foram preparados, independentemente em plasmas heparinizados, em valores de concentrações de 0,50, 1,50, 3,00, 45,00 e 90,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, estes controles de qualidade foram preparados à partir de uma solução estoque diferente (pesagem separada do 4-BZLO) daquela usada para gerar as amostras da curva padrão. Estas amostras foram utilizadas para monitorar as variações *intra-* e *inter-*corridas analíticas.

3.4.3 - Preparação das Amostras

Antes da injeção dos padrões de calibração, dos controles de qualidade e das amostras de plasmas com concentrações desconhecidas, realizou-se os procedimentos de desnaturação e precipitação das proteínas do plasma e, em seguida, a extração do 4-BZLO e do padrão interno 3-Anis. Assim, para a determinação dos níveis de concentração do 4-BZLO em plasma de ratos, foi transferido um volume de 100 μL de cada uma das amostras (com concentrações conhecidas e desconhecidas) para tubos de ensaio limpos (100 x 14 mm) e a este volume foram adicionados 30 μL de uma solução 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do padrão interno 3-Anis (a diluição proporcionou uma concentração de 1,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

O procedimento de desnaturação e precipitação das proteínas envolveu a adição de 500 μL de diclorometano às amostras de plasma e agitação da mistura através de um vortex por aproximadamente 10s. Após 10 minutos, o diclorometano foi evaporado, à secura, em

banho-maria na faixa de 50-60°C. Os resíduos foram reconstituídos pela adição de 200 µL de acetonitrila e 200 µL de tampão acetato de amônio (0,10 mol L⁻¹; pH 7,2). As amostras foram agitadas (Vortex) por aproximadamente 30s e, então, os sobrenadantes foram transferidos para tubos plásticos (Eppendorfs) para a separação do precipitado de proteínas desnaturadas. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação (8000 rpm, 5 min.) em microcentrífuga (Eppendorf, Hamburg, Germany). Finalmente, foram transferidos 100 µL de cada solução para os “vials” e alíquotas de 40 µL dos extratos reconstituídos foram injetadas para a análise no equipamento de HPLC.

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados conforme as recomendações da literatura [53a-d]. O pico da concentração máxima ($C_{m\acute{a}x.}$) e o seu tempo ($T_{m\acute{a}x.}$) foram obtidos diretamente dos dados originais. As constantes de velocidade de absorção (k_a) e eliminação (k_{el}) foram obtidas das curvas residual (*slope* residual) e da porção terminal (*slope* terminal) do perfil de concentração plasmática, respectivamente. Os tempos de meia vida de absorção ($t_{1/2a}$) e de eliminação ($t_{1/2kel}$) foram obtidos a partir de suas respectivas constantes, de acordo com a fórmula $t_{1/2} = \ln(2)/k$. O valor de $AUC_{0-2160 \text{ min}}$ foi calculado através da regra do trapézio entre o primeiro ponto (0 min) e o último tempo de amostragem (2160 min). O *clearance* total foi determinado pela divisão da dose pelo $AUC_{0-2160 \text{ min}}$. O volume de distribuição total foi calculado pela divisão da dose (100 mg/Kg) pela concentração máxima.

3.4.4 - Aplicação do método *in vivo*

Para demonstrar a aplicação do método de HPLC/UV e determinar a biodisponibilidade oral do BZLO em plasma de ratos foram utilizados ratos (n=12), machos

(*wistar*), pesando entre 200-300 (g) que foram escolhidos aleatoriamente de lotes provenientes do biotério central da Unicamp (CEMIBE). O volume administrado por animal foi de 1 mL da formulação (100 mg/Kg de BZLO diluídos em goma arábica 10%) por gavagem.

Obs: O cálculo da dose administrada nos ratos foi feito pela média do peso corporal do grupo de forma que todos os animais recebessem 1ml da suspensão.

3.4.5 – Procedimento cirúrgico e coleta das amostras

No dia anterior ao experimento de biodisponibilidade os ratos foram pesados e anestesiados com associação de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p). Após anestesia, a artéria femoral direita foi dissecada e canulada com cateteres de polietileno P10 (BD – Becton Dickinson), em seguida, a cânula foi exteriorizada no dorso do animal. A coleta de sangue através da cânula aconteceu 24hs após a recuperação do procedimento cirúrgico.

No dia seguinte, as coletas de sangue foram realizadas seguindo a metodologia abaixo:

A coleta inicial (basal - branco) de sangue foi realizada com 20 minutos de antecedência da administração do composto BZLO; as demais coletas foram realizadas nos tempos de: 20 min, 40min, 1h, 1:30h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h e 36 horas após a administração do composto BZLO. Em cada coleta foram retirados aproximadamente 300 µL de sangue. O mesmo volume de solução salina 0,9% (Baxter) foi injetado lentamente na mesma cânula após o término de cada coleta para reposição da volemia. O sangue foi heparinizado (10ul de heparina por tubo), armazenado em gelo e por fim centrifugado a 4^oC por 5 minutos a

4000 r.p.m. para a obtenção do plasma. As amostras de plasma foram armazenadas no *biofreezer* a -20°C até a análise de biodisponibilidade (por no máximo 30 dias).

3.5 - Modelo de coarctação da aorta em camundongo

O modelo de sobrecarga de pressão foi induzido pela técnica de coarctação da aorta. Para isso, os camundongos foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal (i.p) com mistura de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg). Em seguida, faz-se uma incisão na cavidade torácica na altura do segundo espaço intercostal esquerdo para facilitar a visualização e permitir a dissecação da crossa da aorta. Após dissecar e isolar a crossa da aorta foi realizado uma constrição na aorta com fio de sutura 7-0 (Ethicon – Johnson & Johnson) usando como referência da constrição o diâmetro de uma agulha 26G (BD), utilizada como guia. Depois do procedimento cirúrgico, a cavidade torácica foi fechada e após recuperação da anestesia os camundongos foram acomodados em gaiolas. Os camundongos controles foram submetidos à cirurgia fictícia (sham), com abertura da cavidade torácica, porém, sem constrição da crossa da aorta.

3.5.1 - Grupos experimentais

Camundongos heterogênicos (*Swiss*), machos, adultos, com idade entre 8 e 10 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas – SP, foram tratados com o composto BZLO ou veículo (goma arábica - 10%), por via oral na forma de gavagem. A administração do composto foi realizada diariamente na dose única de 30mg/Kg, respeitando a média do peso corporal e o volume de 200ul por animal do veículo ou da formulação (BZLO + goma arábica 10%). Os camundongos foram pesados 2 vezes por semana e quando necessário era feito o ajuste da dose, garantindo que todos os animais

recebessem a mesma dose. Os grupos foram divididos conforme a descrição e o planejamento experimental abaixo;

Grupo - Preventivo (15 ou 30 dias). Um dia antes da coarctação da aorta (TAC) ou da cirurgia fictícia (Sham) os camundongos receberam o tratamento com o BZLO (30mg/Kg + veículo) ou apenas o veículo (goma arábica 10%) por gavagem. Assim, os grupos foram definidos da seguinte forma (Sham + veículo, TAC + veículo, Sham + BZLO e TAC + BZLO). A administração do composto prosseguiu durante 15 dias ou 30 dias, respectivamente.

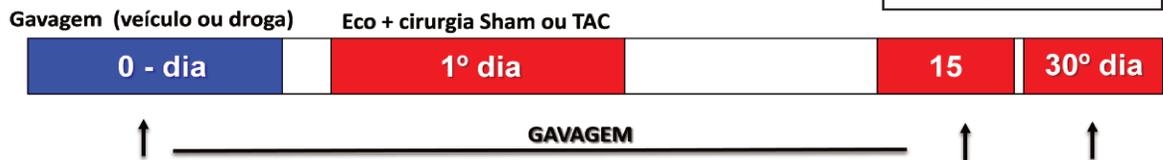
Grupo - Curativo (15 ou 30 dias). Após 15 dias da cirurgia de coarctação da aorta (TAC) ou cirurgia fictícia (Sham) os camundongos receberam o tratamento com o BZLO (30mg/Kg + veículo) ou apenas o veículo (goma arábica 10%) por gavagem. O grupo curativo foi dividido da mesma forma (Sham + veículo, TAC + veículo, Sham + BZLO e TAC + BZLO). O composto (BZLO) foi administrado 15 dias após o procedimento cirúrgico e prosseguiu por mais 15 ou 30 dias, totalizando 30 e 45 dias de duração.

Planejamento Experimental

Preventivo (15 e 30 dias)

- Sham + Veículo/BZLO
- TAC + Veículo/BZLO

Ecocardiografia
Hemodinamica
Gravimetria
Westen blotting
Histologia



Curativo (15 e 30 dias)

- Sham + Veículo/BZLO
- TAC + Veículo/BZLO

Ecocardiografia
Hemodinamica
Gravimetria
Westen blotting
Histologia

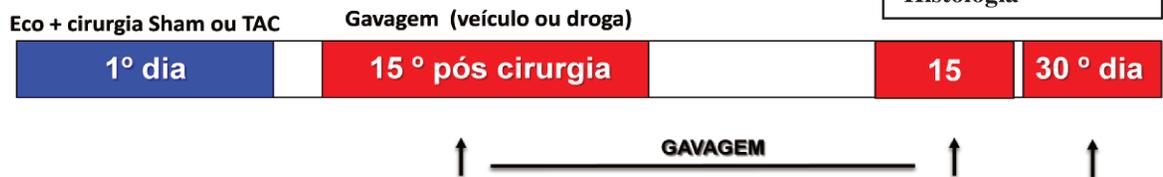


Figura 4- Planejamento experimental do estudo.

3.5.2 - Ecocardiografia

Para avaliar a função cardíaca e a espessura do ventrículo esquerdo os camundongos foram submetidos ao exame de ecocardiografia em modo-M (bidimensional), utilizando o aparelho HD-11 Philips com transdutor linear 12 MHz. Para isso, os animais foram

anestesiados com a mistura de ketamina (100mg/kg) e xilazina (5mg/kg). O exame teve início 5 minutos após aplicação do anestésico. Cortes transversais do ventrículo esquerdo, na altura dos músculos papilares, foram feitos para mensurar a espessura do septo intraventricular, da parede posterior e o diâmetro diastólico no final da diástole e diâmetro sistólico no pico da sístole. Cada medida foi repetida 3 vezes com arquivo fotográfico das mesmas.

Os valores de massa (M) do ventrículo esquerdo (mg) foram calculados pela fórmula:

$$M = [(DDVE + \text{Septo} + \text{Parede posterior})^3 - DDVE^3] * 1,055$$

Os valores de fração de encurtamento (FS%) foram calculados pela fórmula:

$$\%FS = (DDVE - DSVE) / DDVE * 100$$

Os valores de volume de ejeção (SV, em μL) foram calculados pela fórmula:

$$SV = (DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3$$

Onde:

DDVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo,

DSVE: diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

3.5.3 - Avaliação hemodinâmica

Após o exame de ecocardiografia, os camundongos foram submetidos à avaliação da pressão arterial da femoral e da carótida, assim foi possível obter o valor do gradiente de constrição da aorta. Para isso, nos inserimos cateteres de polietileno (PE-10) na artéria carótida e femoral direita, os quais foram acoplados a transdutores de pressão Power Lab 4/30 (ADInstruments- AUS). A amplificação do sinal de pressão arterial foi realizada pelo amplificador ML221 (Bridge Amp), acoplado a um conversor analógico-digital, conectado a um computador contendo o programa LabChart 6 (ADInstruments - AUS) que

possibilitou a monitoração contínua da hemodinâmica, gravação e análise dos dados. Os registros hemodinâmicos foram realizados em todos os grupos; preventivos (15 ou 30 dias) e curativos (15 ou 30 dias) no final do período experimental.

3.5.4 - Gravimetria

Finalizados os registros das pressões arteriais os camundongos foram sacrificados para obtenção dos valores gravimétricos e para as avaliações subsequentes; (western blotting e histologia). Os corações foram extraídos e as duas câmaras (VD e VE) foram separadas e pesadas. Os valores das medidas do VE foram normalizados pelo peso corporal e assim obtivemos o índice de hipertrofia cardíaca do ventrículo esquerdo (IMVE).

3.5.5 - Histologia

Para a análise morfométrica e de fibrose, ventrículos direitos de camundongos foram fixados em formalina 10% por 24 horas e secções histológicas foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com tricrômico de Masson, conforme protocolo abaixo:

1. Hematoxilina de Groat – 5 a 10 minutos
2. Lavar em água corrente e depois em água acidificada 1%
3. Rouge Malloty – 10 a 15 minutos
4. Lavar em água acidificada 1%
5. Passar em ácido fosfomolibdico 10%
6. Passar em água acidificada 1%
7. Verde luz – 13 a 15 minutos

As secções foram desidratadas, montadas em bálsamo sintético Entellan e observadas em microscópio de luz convencional. Oito campos por secção foram digitalizados na magnitude de 400x. Os diâmetros de 60 miócitos cardíacos foram mensurados ao acaso, utilizando-se uma régua calibrada acoplada ao microscópio. As áreas de fibrose, indicadas pela coloração verde, foram quantificadas pelo software Bio Color Scanner 2 Pro. Os dados de fibrose são apresentados como a razão entre a área do interstício e a área total do miocárdio.

3.6 - Western Blotting

3.6.1 - Extração de proteínas totais

Ao final da avaliação hemodinâmica os camundongos foram sacrificados com xilazina 2% por via intravenosa (i.v). A cavidade torácica foi exposta e o ventrículo esquerdo foi rapidamente removido e homogeneizado em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) a 4°C usando o homogeneizador tipo Polytron. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação da concentração total de proteínas do sobrenadante foi feita pelo método de Bradford, 1976. Após quantificação das proteínas, 400µL de amostra acrescida de 100µL de tampão de Laemmli (37,5g/L Tris-base; 2% SDS; 25% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

3.6.2 - Western Blotting do VE de camundongos

Quantidades iguais de proteínas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 10% em tampão de corrida (4X: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

As membranas foram incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente com tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos. Em seguida, foram lavadas por 15 minutos em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-FAK, fosfo-FAK, GAPDH (diluição 1:1000) em tampão de anticorpo (3% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante 12 horas, a 4°C. Após serem lavadas por 15 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas utilizando o kit de detecção *SuperSignal west Pico Chemiluminescent Substrate* de acordo com o protocolo do fabricante, as bandas correspondentes as proteínas específicas foram detectados por equipamento foto documentador ImageQuant 350 (GE Healthcare). As bandas dos filmes foram quantificadas por densitometria óptica através do software Imaje J.

3.7 - Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão. Os valores foram comparados empregando-se ANOVA (*one way*), seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4- RESULTADOS

O planejamento e síntese de compostos quinazolínicos inibidores de FAK utilizados no presente estudo é parte de linha de pesquisa do laboratório que visa o desenvolvimento de fármacos para utilização terapêutica da hipertrofia e insuficiência cardíaca. Nesse sentido é importante ressaltar que um total de 140 compostos foram planejados e desenhados baseados no farmacóforo quinazolina (família 1,3-diazanaftaleno) objetivando a inibição da FAK (quinase de adesão focal). Dentre esses foram selecionados 8 agentes que possivelmente poderiam ser inibidores potenciais da FAK, levando em consideração os estudos de *docking* molecular e parâmetros de biodisponibilidade oral. O passo seguinte do estudo envolveu a validação dos compostos na inibição da FAK. Para isso, nós inicialmente testamos os compostos em um modelo *in vitro*. Dessa forma, foi possível verificar a eficácia e determinar o IC₅₀ (concentração de inibição de 50% da enzima) de cada composto. Assim, foi selecionado o 6,7-OMe-4'-BZLO - abreviado para BZLO. Como o foco principal do estudo foi utilizar um inibidor da FAK no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por coarctação da aorta em camundongos e, tendo em vista que o composto seria administrado por gavagem, avaliamos posteriormente alguns padrões de farmacocinética (biodisponibilidade oral) do BZLO como: absorção, concentração plasmática e tempo de meia vida ($t_{1/2}$). Contudo, é importante lembrar que somente o teste para a determinação da farmacocinética do BZLO foi realizado em ratos (Wistar), devido às limitações técnicas do uso de camundongos. A análise do plasma de camundongos no final do período experimental confirmou da mesma forma que nos ratos a presença do composto após 24 horas da administração na dose de 30mg/Kg. Dessa forma, os resultados foram organizados da seguinte maneira; (1) ensaio *in vitro* com ATP radioativo e a enzima purificada (FAK); (2) farmacocinética do BZLO em ratos Wistar e (3) efeito do BZLO no modelo *in vivo* de camundongos submetidos à coarctação da aorta e tratados com o composto BZLO.

4.1 - Ensaio *in vitro* (FAK)

O ensaio de ATP radioativo (*in vitro*) foi utilizado na verificação da eficácia do composto (BZLO). O resultado apresentado na figura 5 sugere que o composto foi capaz de inibir a atividade da FAK em 50% na concentração de 1nM. O composto foi testado em concentrações crescentes variando entre 1 nM e 1000 nM, sendo que a menor concentração demonstra potencial para inibição da FAK em 50% e a maior concentração 1000nM, indica uma provável inibição de 85%.

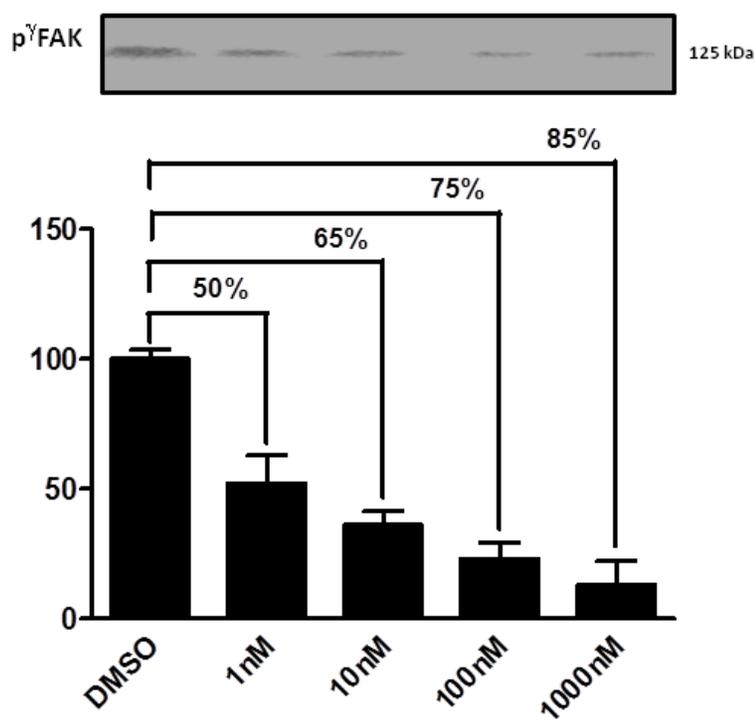


Figura 5- Resultado do ensaio para quinase (FAK) com ATP radioativo para o composto BZLO.

4.2 - Avaliação da biodisponibilidade oral do composto BZLO em ratos

A figura 6 e a tabela 1, apresentam o perfil da concentração sérica do composto derivado de quinazolina (BZLO) em plasma de ratos (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) *versus* tempo (em horas) das amostras coletadas após administração por gavagem (solução aquosa de goma arábica 10% como agente de suspensão da substância BZLO) em dose única de 100 mg/kg em ratos de aproximadamente 250 gramas.

As determinações dos parâmetros farmacocinéticos do composto BZLO foram feitas de acordo com métodos previamente descritos (Athani et al, 1990; Makoid e Cobby, 1996; Grabielson e Weiner, 2000; Abdel-Rahman e Kauffman, 2004).

Inicialmente, foi estabelecido o método de HPLC (*High-performance liquid chromatography*) em amostras padrões que foram usadas como controle de qualidade. Em seguida, determinou-se o perfil da concentração plasmática do composto em função do tempo. A figura 6 mostra a detecção do composto (BZLO) no plasma de ratos, sendo que após 20 minutos de sua administração o composto foi detectado. A concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) do BZLO detectada foi de $66,27 \mu\text{mol L}^{-1}$ no período de 360 minutos ($T_{\text{máx}}$), sendo que o composto ainda permaneceu no plasma por um período superior a 36 horas.

Alguns parâmetros farmacocinéticos, considerando dose oral, foram determinados. O BZLO apresentou boa absorção com valor de $t_{1/2a}$ de 58 minutos e velocidade de eliminação lenta com valor de $t_{1/2el}$ de 347 minutos. O valor para o $AUC_{0-2160\text{min}}$ foi de $74618 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ ($28 \text{ mg mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). O *clearance* total foi estimado em $3,57 \text{ mL kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ e o valor do volume de distribuição ($\text{dose}/C_{\text{max}}$) foi de $4,02 \text{ L/Kg}$. Com isso, os resultados indicam que o composto BZLO possui boa absorção, taxa de eliminação lenta e

boa distribuição, sugerindo que o composto possui propriedades farmacológicas interessantes.

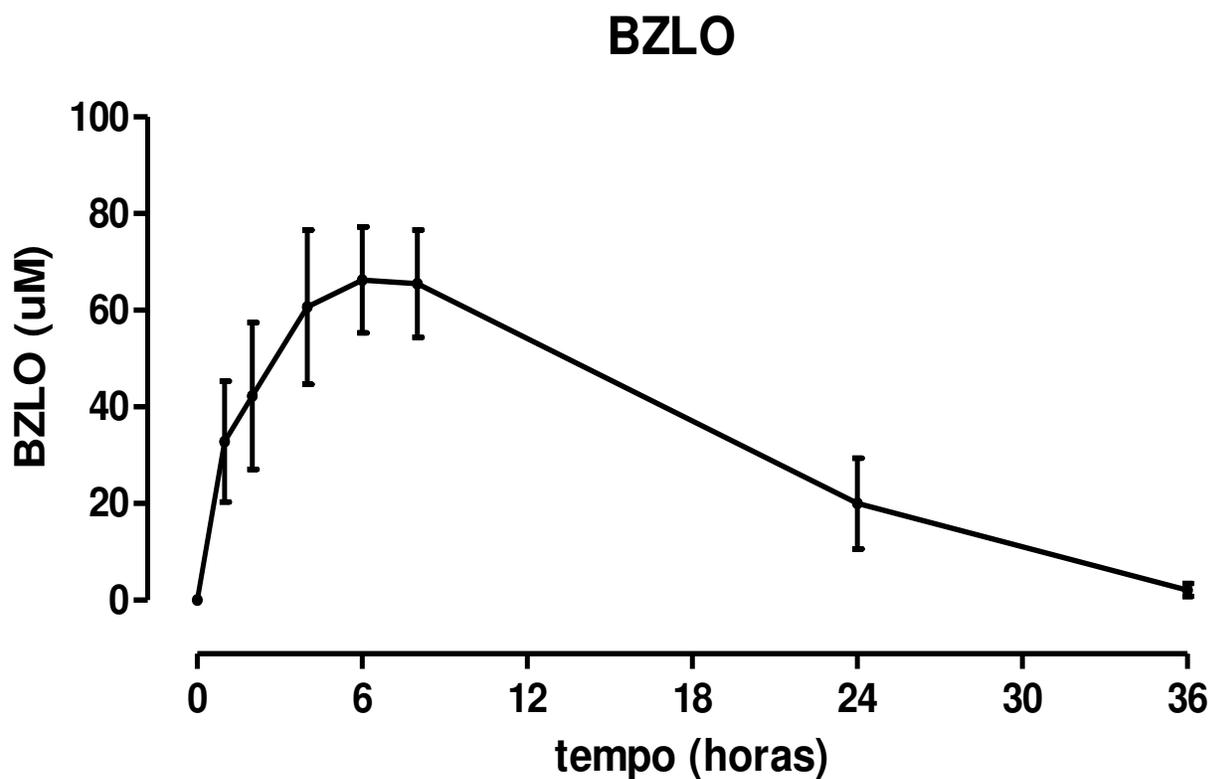


Figura 6- Perfil da concentração sérica do BZLO em plasma de ratos (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) *versus* o tempo (em horas) de coletas, após a administração por gavagem de uma dose única de 100 mg/Kg suspensa em solução aquosa de goma arábica 10%.

A tabela 1 abaixo indica os tempos e os valores da concentração sérica do BZLO na dose de 100mg/Kg administrado por gavagem ao longo do tempo (36 h) em ratos.

Tempo (horas)	4-BZLO (N=6 animais) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
0	0,00 \pm 0,00
20 min	20,95 \pm 4,27
40 min	32,20 \pm 8,81
1 h	32,79 \pm 12,49
1 ½ h	43,50 \pm 20,58
2 h	42,28 \pm 15,20
4 h	60,65 \pm 15,94
6 h	66,27 \pm 10,96
8 h	65,52 \pm 11,08

Tabela 1- Níveis de concentração sérica do BZLO no plasma de ratos. Valores médios erros padrões da concentração sérica do 6,7-Dimetóxi-4-BZLO ao longo do tempo (horas).

4.3 - Efeito do BZLO no tratamento da hipertrofia do ventrículo esquerdo em camundongos

O modelo de coarctação da aorta em camundongos é utilizado rotineiramente em nosso laboratório. A técnica leva a hipertrofia do VE devido ao aumento da resistência ao fluxo sanguíneo na aorta e, posteriormente, progride para a insuficiência cardíaca. Neste estudo, avaliamos a intensidade da sobrecarga de pressão por meio da análise do gradiente de pressão sistólico de constrição em camundongos anestesiados. As alterações estruturais e funcionais originadas do modelo de coarctação foram avaliadas por meio da análise de parâmetros de hemodinâmica, ecocardiografia, gravimetria e histologia. A expressão e atividade da FAK no miocárdio foram avaliadas por *western blotting* utilizando anticorpo específico anti-FAK e anti-pFAK (Tyr 397).

Para avaliar a eficácia do composto BZLO no tratamento da hipertrofia cardíaca proveniente do modelo de coarctação da aorta, os camundongos foram divididos em 2 grupos, preventivos (15 e 30 dias) e curativos (15 e 30 dias), submetidos a coarctação da aorta TAC (*Transverse aortic constriction*) ou a cirurgia fictícia (Sham) e ao tratamento com o composto (BZLO) e/ou veículo (goma arábica 10%). Ambos, o composto e/ou veículo foram administrados por gavagem diariamente na dose única de 30mg/Kg diluído em goma arábica 10%, respeitando sempre o mesmo horário. O grupo preventivo recebeu o composto um dia antes do processo cirúrgico e foi tratado durante 15 ou 30 dias. Já o grupo curativo, o tratamento com BZLO ou veículo foi iniciado 15 dias após o processo cirúrgico e se estendeu por mais 15 ou 30 dias, totalizando 30 ou 45 dias de experimento, respectivamente.

4.4 – Grupos Preventivos (15 ou 30 dias)

A Tabela 2 (preventivos - 15 ou 30 dias) reúne os dados obtidos pela avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos ou não à coarctação da aorta e ao tratamento como o BZLO.

Tabela 2- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta

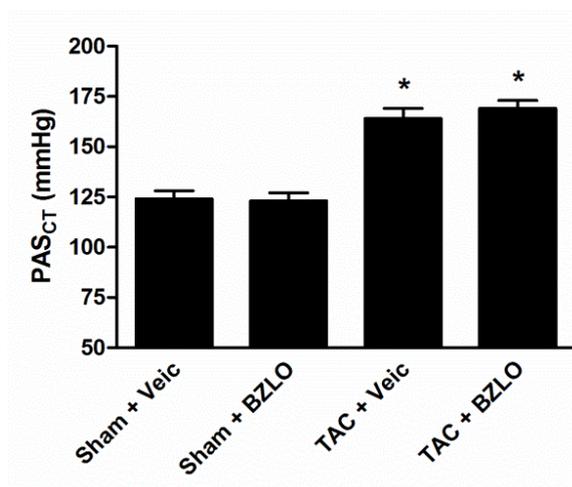
	Preventivo				Preventivo					
	Grupo - 15 dias	Sham + Veículo	Tac + Veículo	Sham + BZLO	Tac + BZLO	Grupo - 30 dias	Sham + Veículo	Tac + Veículo	Sham + BZLO	Tac + BZLO
Número	10	15	9	12		16	13	13	13	
Hemodinâmica					Hemodinâmica					
PAS _{CT} (mmHg)	124 ± 4	164 ± 5*	123 ± 4	169 ± 4*		114 ± 3	163 ± 7*	107 ± 3	162 ± 8*	
PAS _{FE} (mmHg)		93 ± 4		96 ± 4			98 ± 6		102 ± 5	
GrS (mmHg)		71 ± 5*		72 ± 4*			65 ± 5*		60 ± 6*	
Ecocardiografia					Ecocardiografia					
DDVE (mm)	3.9 ± 0.06	3.6 ± 0.06	3.9 ± 0.07	3.7 ± 0.06		3.8 ± 0.07	3.9 ± 0.10	3.8 ± 0.08	3.9 ± 0.10	
DSVE (mm)	2.3 ± 0.09	2.1 ± 0.08	2.3 ± 0.10	2.0 ± 0.08		2.3 ± 0.09	2.4 ± 0.16	2.3 ± 0.06	2.3 ± 0.11	
EPVE (mm)	0.51 ± 0.01	0.65 ± 0.02*	0.50 ± 0.01	0.58 ± 0.01*†		0.52 ± 0.01	0.68 ± 0.01*	0.51 ± 0.01	0.60 ± 0.02*†	
FS (%)	40 ± 1.7	43 ± 1.5	41 ± 1.9	45 ± 1.7		41 ± 1.6	38 ± 3.2	40 ± 0.9	43 ± 1.9	
Volume ejeção (ml)	0.78 ± 0.02	0.81 ± 0.01	0.79 ± 0.02	0.83 ± 0.02		0.79 ± 0.02	0.74 ± 0.03	0.79 ± 0.01	0.81 ± 0.02	
Morfometria					Morfometria					
Peso corporal	37 ± 0.9	35 ± 0.5	37 ± 0.9	36 ± 0.4		37 ± 0.7	40 ± 0.8	37 ± 0.8	38 ± 1.1	
IMVE (mg/g)	2.8 ± 0.04	3.8 ± 0.09*	2.9 ± 0.09	3.4 ± 0.06*†		2.8 ± 0.06	4.1 ± 0.16*	2.8 ± 0.07	3.6 ± 0.14*†	
DCM (um)	9.0 ± 0.37	13.0 ± 0.48*	9.0 ± 0.34	10.0 ± 0.37†		10.0 ± 0.52	16.4 ± 0.63*	10.0 ± 0.63	13.4 ± 0.46*†	
AI (%)	2.0 ± 0.3	6.3 ± 0.4*	1.6 ± 0.2	3.3 ± 0.3†#		2.1 ± 0.4	8.4 ± 0.87*	1.5 ± 0.2	4.7 ± 0.6†#	

Grupos - Preventivos (15 e 30 dias). Camundongos submetidos à cirurgia fictícia tratados com veículo (Sham + Veículo) ou BZLO (Sham + BZLO) e camundongos coarctados tratados com veículo (TAC + Veículo) ou BZLO (TAC + BZLO), receberam o tratamento por gavagem 1 dia antes do procedimento cirúrgico e por mais 15 ou 30 dias, respectivamente; PAS_{CT}, pressão arterial sistólica aferida na carótida, PAS_{FE}, pressão arterial sistólica aferida na femoral; GrS, gradiente sistólico; DDVE, diâmetro diastólico do VE; DSVE, diâmetro sistólico do VE; EPVE, espessura da parede do VE; FS, fração de encurtamento do VE; Volume de ejeção do VE; IMVE, índice de massa do VE; DCM, diâmetro do cardiomiócito; AI, área do interstício. *P<0,05 vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. †P<0,05 vs TAC + Veículo. #P<0,05 vs Sham + BZLO

4.4.1 - Hemodinâmica

A avaliação da pressão arterial e determinação do gradiente sistólico (diferença entre pressão sistólica da carótida e da femoral) indicou que ambos os grupos preventivos (15 e 30 dias) após a coarctação da aorta apresentaram gradiente sistólico variando entre 60 e 75 mmHg e não houve diferença entre os grupos (Tabela 2, Figura 7 e 8). Estes resultados mostram que os camundongos estavam coarctados.

15 dias



30 dias

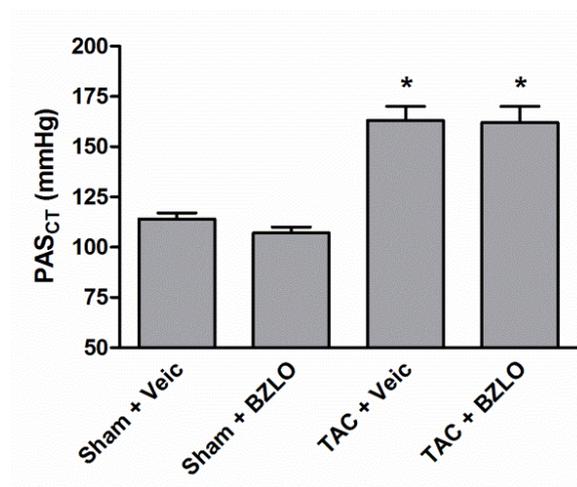


Figura 7- Análise hemodinâmica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO, TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios da pressão arterial sistólica aferido na carótida (PAS_{CT}). *P<0,05 vs Sham + Veículo e Sham + BZLO.

15 dias

30 dias

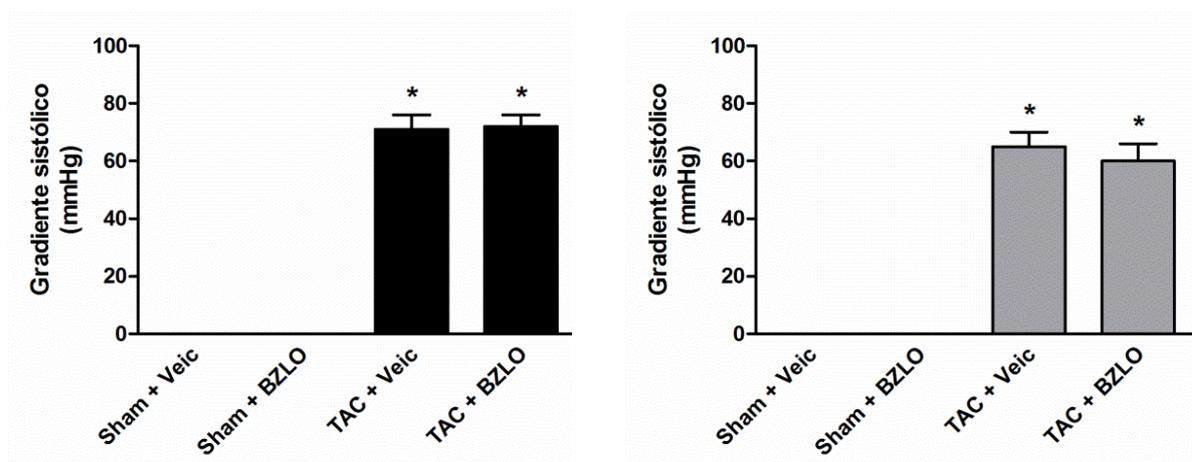


Figura 8- Análise hemodinâmica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO, TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios dos gradientes sistólicos (GrS). *P<0,05 vs Sham + Veículo e Sham + BZLO.

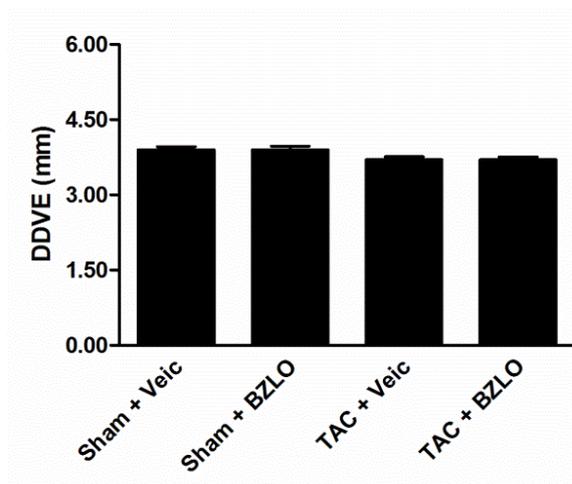
4.4.2 - Ecocardiografia

Os camundongos coarctados durante 15 e 30 dias, tratados com veículo (TAC + Veículo) ou com BZLO (TAC + BZLO), não apresentaram diferença no diâmetro diastólico do VE (DDVE) e sistólico do VE (DSVE) quando comparados aos controles (Sham + Veículo) e (Sham + BZLO), indicando que não houve dilatação da câmara cardíaca (Figura 9 e 10).

A avaliação feita por ecocardiografia mostrou (Figura 11) que a coarctação da aorta induz o aumento da espessura da parede posterior do VE (EPVE) após 15 e 30 dias. Os camundongos coarctados por 30 dias apresentaram a medida da EPVE ainda maior conforme esperado nesse modelo. As mesmas figuras sugerem que o tratamento com o BZLO (TAC + BZLO) atenuou o aumento da espessura da parede posterior do VE (EPVE), induzido pela coarctação da aorta em ambos os grupos (15 e 30 dias).

Verificou-se também que não houve diferença na fração de encurtamento (FS%) entre os grupos (Figura 12), indicando que a hipertrofia cardíaca ainda se encontrava em um estágio compensatório.

15 dias



30 dias

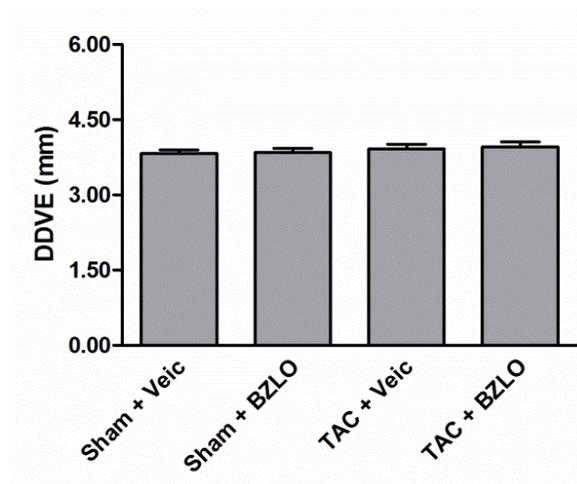
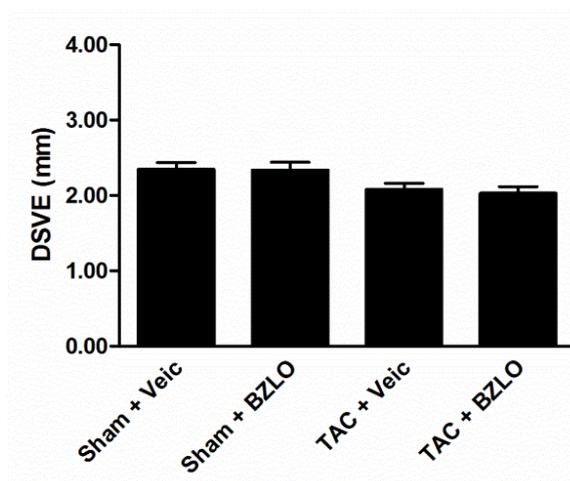


Figura 9- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do DDVE (diâmetro diastólico final do VE).

15 dias



30 dias

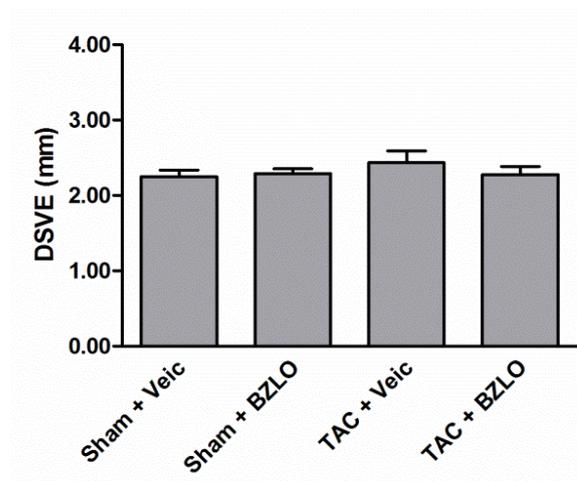
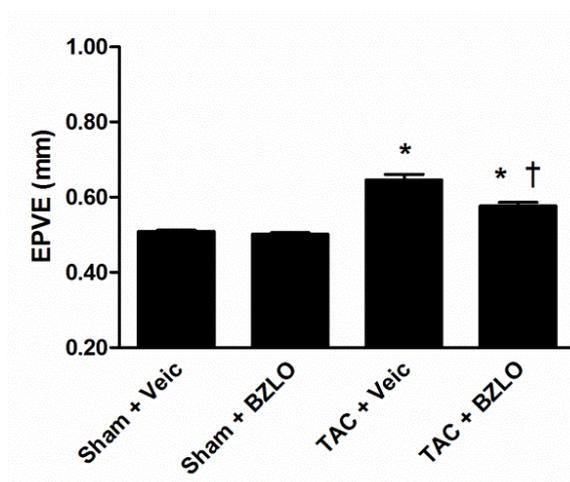


Figura 10- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do DSVE (diâmetro sistólico final do VE).

15 dias



30 dias

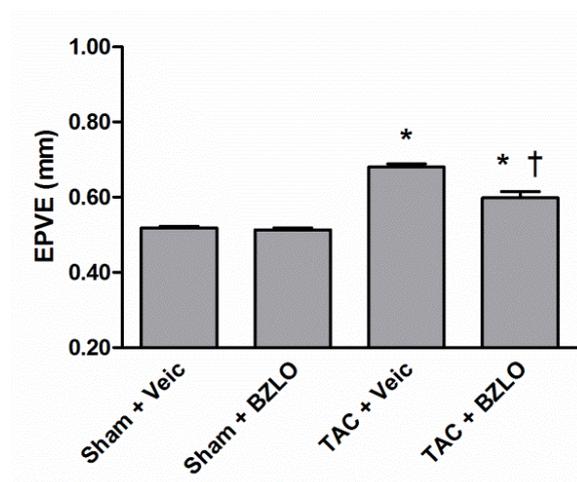
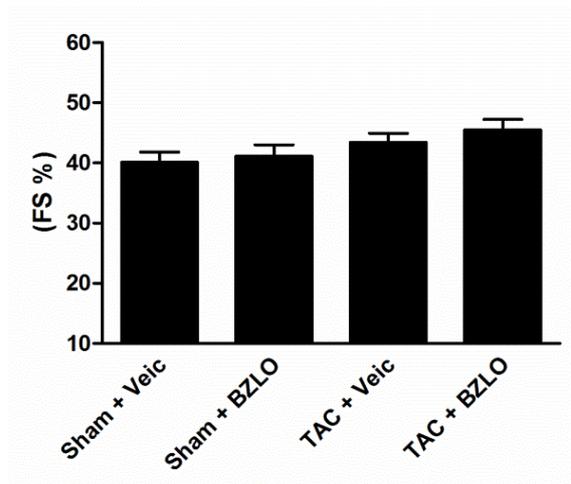


Figura 11- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios da EPVE (espessura da parede posterior do VE). * $P < 0,05$ vs Sham + Veic e Sham + BZLO, † $P < 0,05$ vs TAC + Veic.

15 dias



30 dias

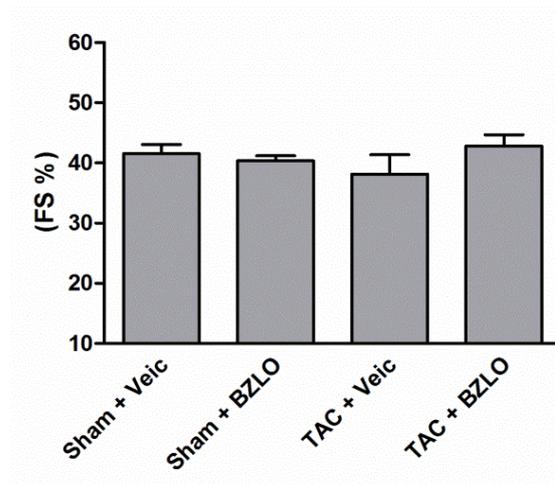
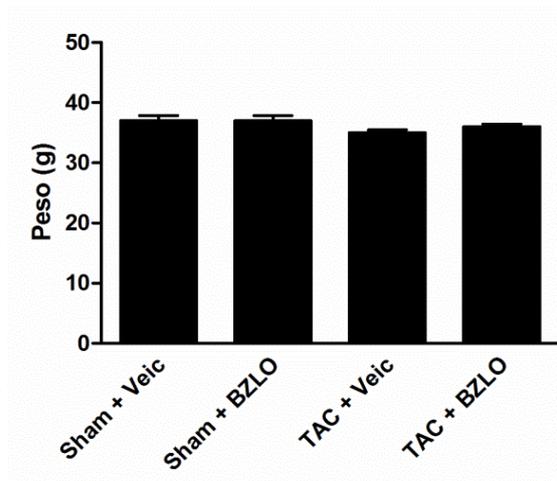


Figura 12- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios da FS % (fração de encurtamento).

4.4.3 - Gravimetria

O tratamento com o BZLO por gavagem não alterou o peso corporal dos camundongos como pode ser observado na tabela 2 e na figura 13. O índice de massa do VE (IMVE) que é o peso do VE normalizado pelo peso corporal (Figura 14) confirmou que houve aumento da massa do VE dos corações submetidos à coarctação da aorta nos grupos (TAC + Veículo) e (TAC + BZLO). Entretanto, os animais coarctados e tratados (TAC + BZLO) apresentaram menor aumento da massa do VE em ambos os grupos (15 e 30 dias). Esses dados corroboram com os dados das medidas indiretas da espessura da parede posterior (EPVE) obtidas na avaliação ecocardiográfica, indicando que o BZLO pode ter atenuado o processo de hipertrofia cardíaca.

15 dias



30 dias

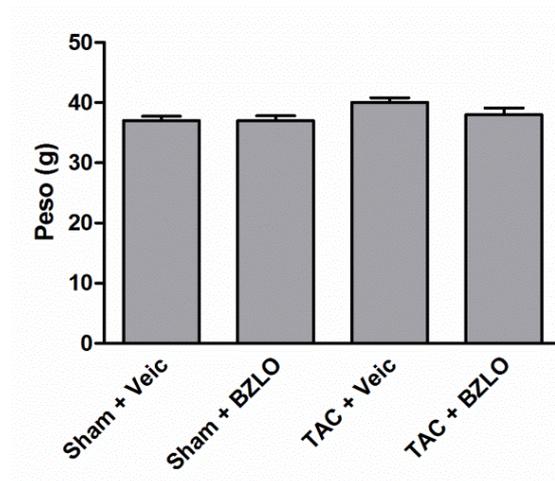
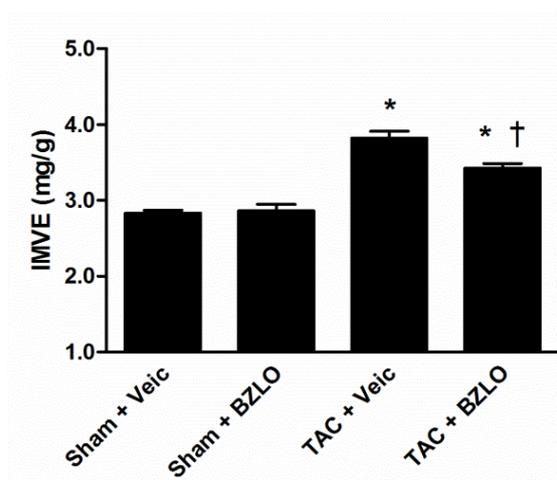


Figura 13- Análise gravimétrica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do peso corporal.

15 dias



30 dias

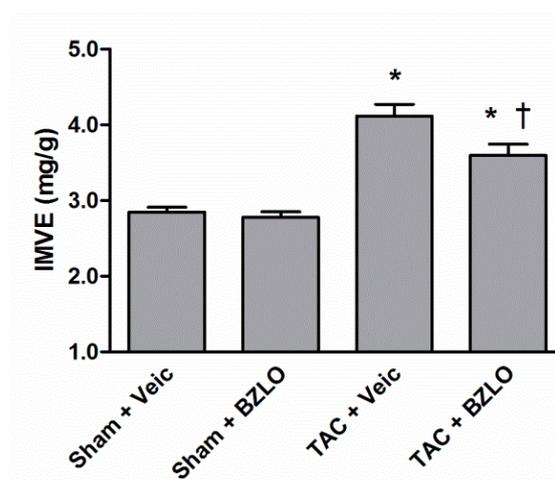


Figura 14- Análise gravimétrica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do índice de massa do VE (IMVE). * $P < 0,05$ vs Sham + Veic e Sham + BZLO, † $P < 0,05$ vs TAC + Veic.

4.4.4 - Histologia

A análise morfométrica de secções histológicas de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta mostrou hipertrofia dos cardiomiócitos nos coarctados (TAC + Veículo), em relação aos camundongos controles tratados com veículo (Sham + Veículo) ou com BZLO (Sham + BZLO), indicada pelo aumento do diâmetro médio (Figura 15 e 16). Os camundongos coarctados e tratados com o composto BZLO (TAC + BZLO) do grupo preventivo 15 dias (Figura 15) apresentaram atenuação do crescimento do cardiomiócito quando comparado ao grupo coarctado sem tratamento (TAC + Veículo).

Com relação aos camundongos do grupo preventivo de 30 dias (Figura 16), o tratamento com BZLO inibiu parcialmente o crescimento dos cardiomiócitos nos camundongos coarctados (TAC + BZLO) em relação aos camundongos coarctados (TAC + Veículo). Como pode ser observado na figura 16, o tratamento não previniu completamente o crescimento do cardiomiócito, como verificado (Figura 15) no grupo tratado (TAC + BZLO) durante 15 dias.

15 dias

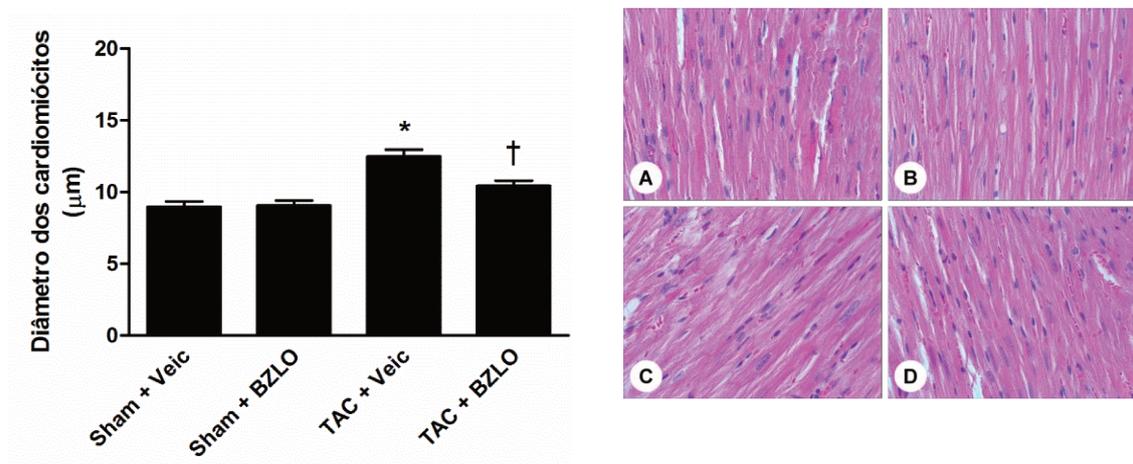


Figura 15- Gráfico de barras indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos e as fotomicrografias representativas coradas com Hematoxilina-Eosina (400x). * $P < 0,05$ vs Sham + Veic e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veic.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

30 dias

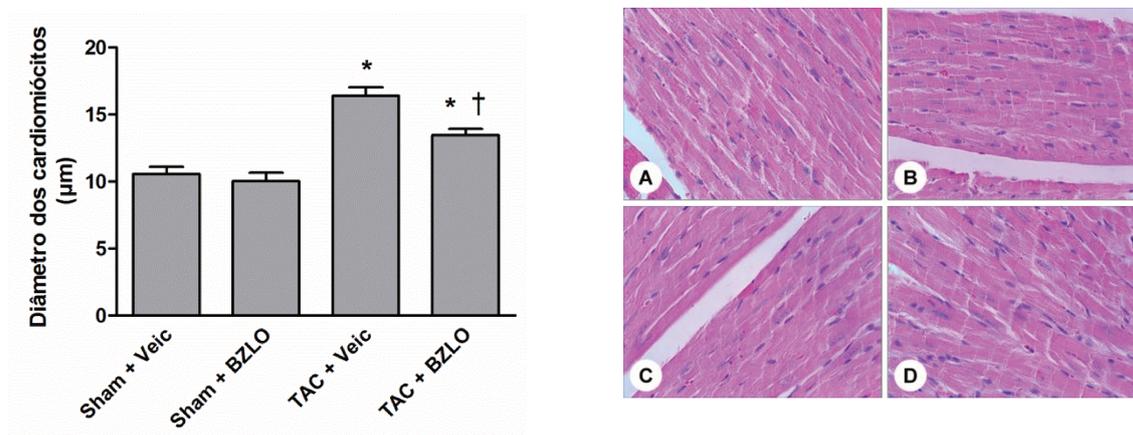


Figura 16- Gráfico de barras indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos e as fotomicrografias representativas coradas com Hematoxilina-Eosina (400x). * $P < 0,05$ vs Sham + Veic e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veic.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

A análise quantitativa das áreas de fibrose miocárdica do grupo preventivo de 15 dias foi predominantemente maior nos animais coarctados que não receberam tratamento (TAC + Veículo), pois como ilustrado na (Figura 17), os camundongos coarctados e tratados com o BZLO (TAC + BZLO) apresentaram menor formação de fibrose intersticial em relação ao (TAC + Veículo).

O resultado do grupo preventivo de 30 dias (Figura 18) foi semelhante ao grupo de 15 dias, mostrando novamente que os camundongos coarctados e tratados (TAC + BZLO) apresentaram diminuição da fibrose intersticial em relação aos coarctados não tratados (TAC + Veículo).

15 dias

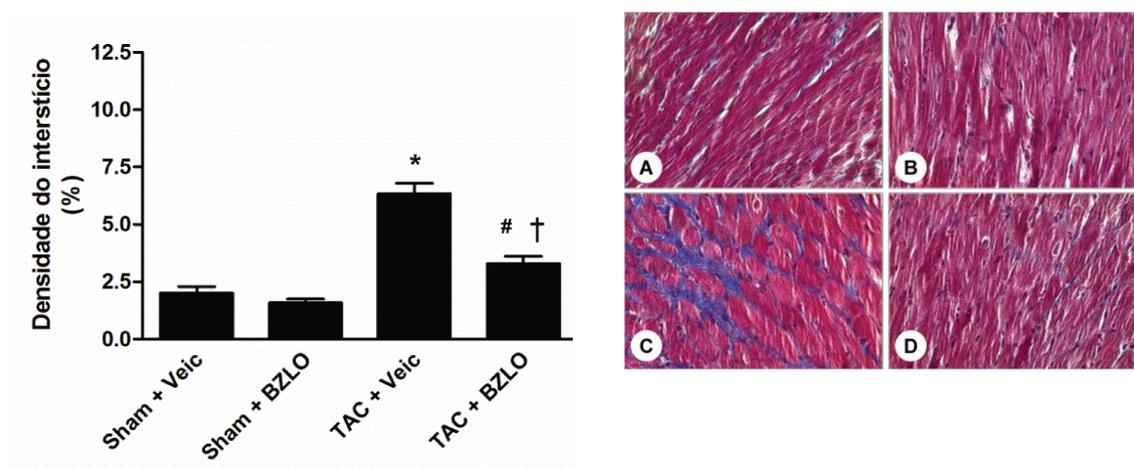


Figura 17- Gráfico de barras indicam os valores médios da fibrose intersticial e as fotomicrografias representativas coradas com Tricômio de Masson (400x). *P<0,05 vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. †P<0,05 vs TAC + Veículo. #P<0,05 vs Sham + BZLO.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

30 dias

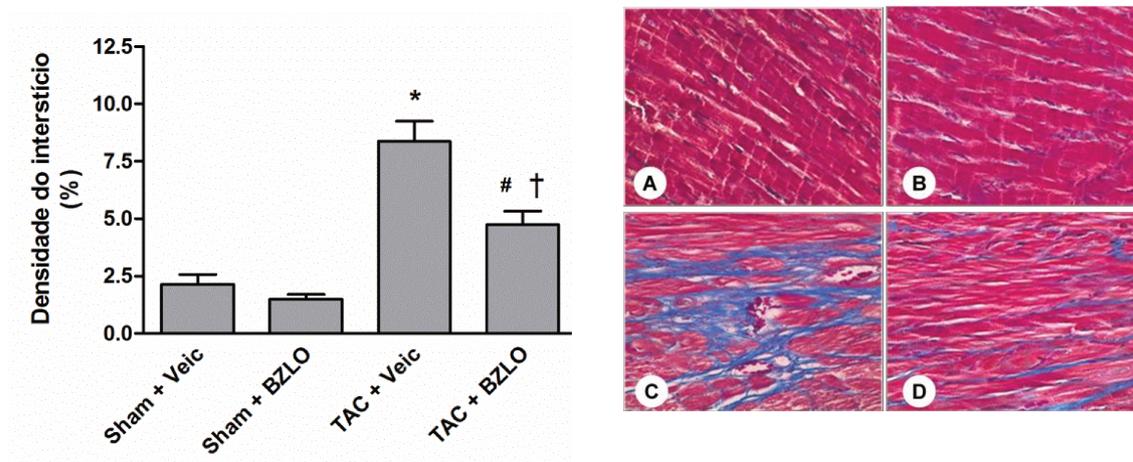


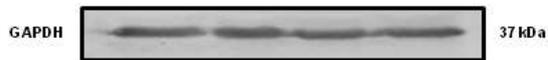
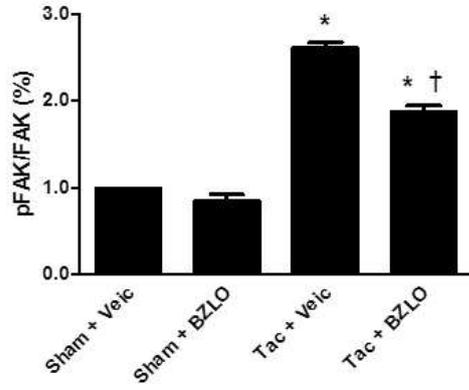
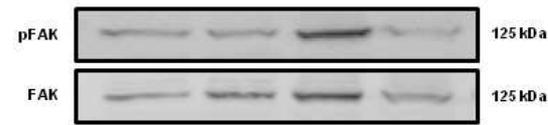
Figura 18- Gráfico de barras indicam os valores médios da fibrose intersticial e as fotomicrografias representativas coradas com Tricômio de Masson (400x). * $P < 0,05$ vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veículo. # $P < 0,05$ vs Sham + BZLO.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

4.4.5 - Western Blotting

Com intuito de verificarmos se o composto BZLO bloqueou a fosforilação da FAK no VE dos camundongos, avaliamos a expressão e atividade da FAK por *western blotting*. Como mostra a figura 19, a atividade da FAK encontra-se aumentada no VE dos camundongos coarctados (TAC + Veículo), comparado aos controles (Sham + Veículo) e (Sham + BZLO). Entretanto, em ambos os grupos preventivos (15 e 30 dias) os camundongos coarctados e tratados com o BZLO (TAC + BZLO) mostram a atividade da FAK diminuída em relação aos camundongos coarctados não tratados (TAC + Veículo). Juntamente, estes resultados sugerem que o efeito anti-hipertrófico induzido pelo BZLO é decorrente da inibição da FAK.

15 dias



30 dias

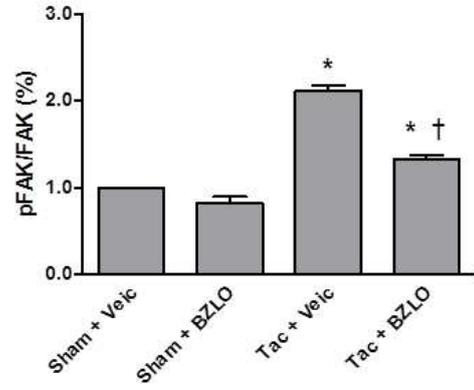
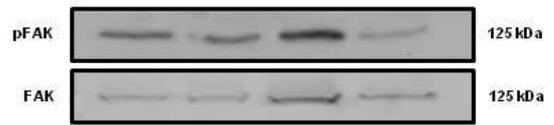


Figura 19- Gráfico de barras indicam a atividade da FAK nos grupos preventivos de 15 e 30 dias, respectivamente. * $P < 0,05$ vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veículo.

4.5 - Grupos curativos (15 ou 30 dias)

Os resultados dos grupos curativos (15 e 30 dias) seguiram os mesmos parâmetros de avaliação utilizados nos grupos preventivos. A Tabela 3 (curativo 15 e 30 dias) reúne os dados obtidos pela avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de camundongos submetidos ou não à coarctação da aorta e ao tratamento com BZLO e/ou veículo (goma arábica 10%).

Os camundongos dos grupos curativos receberam o tratamento com o veículo e/ou composto BZLO após 15 dias do procedimento cirúrgico (Sham ou TAC) e foram tratados por mais 15 ou 30 dias, totalizando 30 e 45 dias, respectivamente. O tratamento foi idêntico ao utilizado nos grupos preventivos, ou seja, a administração do composto BZLO foi feito por gavagem diariamente na dose única de 30mg/Kg diluído em goma arábica 10%, respeitando o mesmo horário.

Tabela 3- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta

Grupo - 15 dias	Curativo				Grupo - 30 dias	Curativo			
	Sham + Veículo	Tac + Veículo	Sham + BZLO	Tac + BZLO		Sham + Veículo	Tac + Veículo	Sham + BZLO	Tac + BZLO
Número	9	17	8	12	10	7	10	7	
Hemodinâmica					Hemodinâmica				
PAS _{CT} (mmHg)	123 ± 4	167 ± 4*	114 ± 3	168 ± 8*	114 ± 5	173 ± 9*	112 ± 3	175 ± 9*	
PAS _{FE} (mmHg)		94 ± 3		96 ± 4		100 ± 4		104 ± 5	
GrS (mmHg)		74 ± 3*		72 ± 6*		73 ± 13*		71 ± 9*	
Ecocardiografia					Ecocardiografia				
DDVE (mm)	3.9 ± 0.08	3.9 ± 0.07	3.8 ± 0.11	3.9 ± 0.05	4.2 ± 0.05	4.2 ± 0.10	4.1 ± 0.08	4.1 ± 0.10	
DSVE (mm)	2.3 ± 0.06	2.3 ± 0.11	2.2 ± 0.14	2.1 ± 0.08	2.5 ± 0.08	2.9 ± 0.17	2.6 ± 0.10	2.6 ± 0.14	
EPVE (mm)	0.51 ± 0.01	0.67 ± 0.01*	0.50 ± 0.01	0.56 ± 0.01*†	0.53 ± 0.01	0.79 ± 0.01*	0.52 ± 0.01	0.73 ± 0.02*†	
FS (%)	43 ± 1.1	40 ± 1.9	43 ± 2.4	46 ± 1.8	40 ± 1.6	32 ± 1.8#	38 ± 1.4	38 ± 1.8	
Volume ejeção (ml)	0.81 ± 0.01	0.78 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.83 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.68 ± 0.02#	0.76 ± 0.02	0.76 ± 0.02	
Morfometria					Morfometria				
Peso corporal	38 ± 1.0	37 ± 0.5	36 ± 0.7	37 ± 0.6	41 ± 0.9	41 ± 1.0	39 ± 0.9	42 ± 1.8	
IMVE (mg/g)	2.7 ± 0.05	4.11 ± 0.11*	2.7 ± 0.05	3.7 ± 0.11*†	2.7 ± 0.07	4.4 ± 0.13*	2.7 ± 0.07	3.9 ± 0.15*†	
DCM (um)	10 ± 0.26	18 ± 0.13*	10 ± 0.18	15 ± 0.10*†	10 ± 0.18	18 ± 0.18*	10 ± 0.04	15 ± 0.16*†	
AI (%)	2.2 ± 0.1	9.0 ± 0.7*	2.2 ± 0.1	5.3 ± 0.2*†	2.2 ± 0.2	10.6 ± 0.3*	1.91 ± 0.1	5.90 ± 1.1†	

Grupos - Curativos (15 e 30 dias). Camundongos submetidos à cirurgia fictícia tratados com veículo (Sham + Veículo) ou BZLO (Sham + BZLO) e camundongos coarctados tratados com veículo (TAC + Veículo) ou BZLO (TAC + BZLO), receberam o tratamento por gavagem após 15 dias do procedimento cirúrgico e por mais 15 ou 30 dias; PAS_{CT}, pressão arterial sistólica aferida na carótida, PAS_{FE}, pressão arterial sistólica aferida na femoral; GrS, gradiente sistólico; DDVE, diâmetro diastólico do VE; DSVE, diâmetro sistólico do VE; EPVE, espessura da parede do VE; FS, fração de encurtamento do VE; Volume de ejeção do VE; IMVE, índice de massa do VE; DCM, diâmetro do cardiomiócito; AI, área do interstício. *P<0,05 vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. †P<0,05 vs TAC + Veículo. #P<0,05 vs Sham + Veículo.

4.5.1 - Hemodinâmica

A avaliação hemodinâmica dos grupos curativos foi semelhante aos grupos preventivos. A figura 20 ilustra o aumento pressão arterial sistólica aferida na carótida. Nos camundongos coarctados (TAC + Veículo) e (TAC + BZLO) foi verificado aumento da pressão sistólica em relação aos controles cirurgia fictícia (Sham + Veículo) e (Sham + BZLO), independente do tratamento.

A avaliação do gradiente sistólico de coarctação indicou que os grupos curativos (15 e 30 dias) após a coarctação da aorta apresentaram variação no gradiente sistólico entre 60 e 75 mmHg, sem diferença entre os grupos (Tabela 3, figura 21). Indicando que os animais estavam coarctados.

15 dias

30 dias

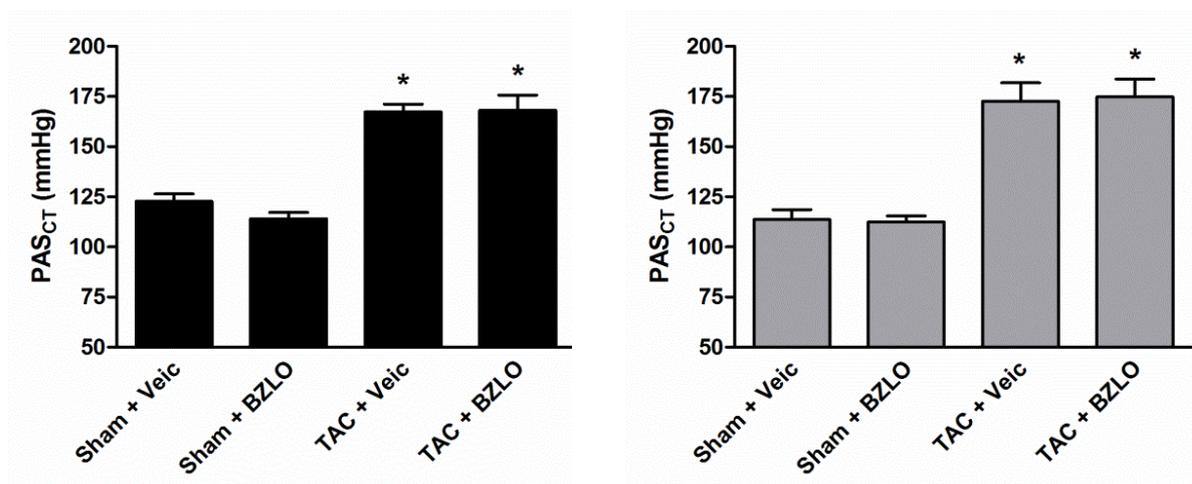
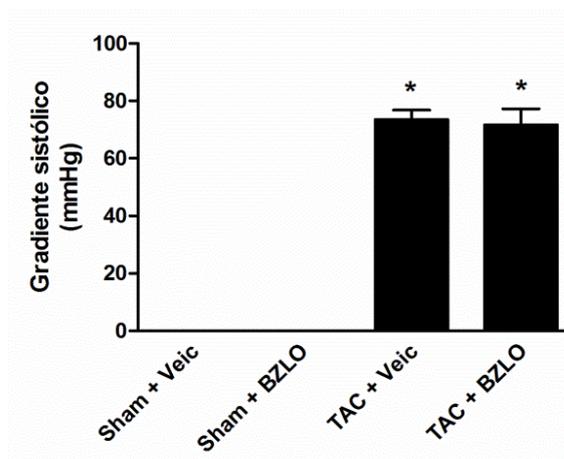


Figura 20- Análise hemodinâmica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO, TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios da pressão arterial sistólica aferido na carótida (PAS_{CT}). *P<0,05 vs Sham + Veículo e Sham + BZLO.

15 dias



30 dias

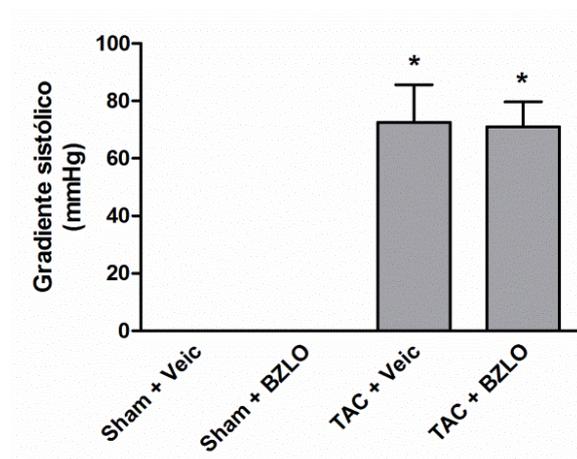


Figura 21- Análise hemodinâmica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO, TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios dos gradientes sistólicos (GrS). *P<0,05 vs Sham + Veículo e Sham + BZLO.

4.5.2 – Ecocardiografia

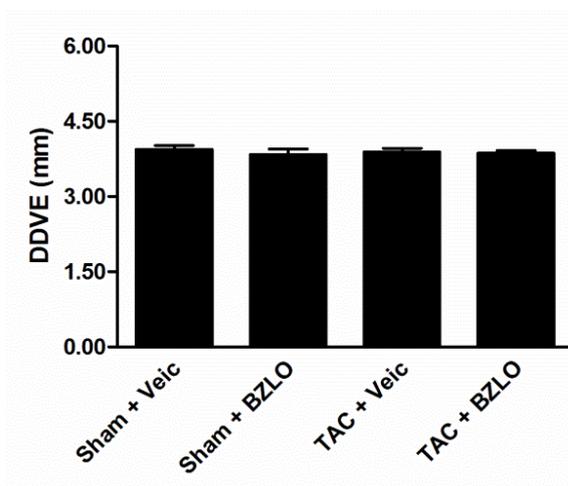
Os dados de ecocardiografia dos grupos curativos (15 e 30 dias) apresentados na figura 24 indicam que o modelo de coarctação da aorta induz a hipertrofia cardíaca rapidamente. Resultados semelhantes foram verificados nos grupos preventivos.

No grupo curativo também foi possível observar (Figura 22 e 23) que não houve diferença no tamanho da câmara cardíaca na diástole (DDVE) e na sístole (DSVE) nos camundongos coarctados tratados ou não (TAC + BZLO) e (TAC + Veículo), comparado aos controles (Sham + Veículo) e (Sham + BZLO) nos dois grupos (15 e 30 dias). Os dados também indicam que esses camundongos estavam com a função cardíaca preservada. Entretanto a figura 25 (curativo -30 dias) mostra que os camundongos coarctados sem tratamento (TAC + Veículo) apresentaram redução da

fração de encurtamento (FS%) em relação ao controle (Sham + Veículo), o que poderia caracterizar o início da insuficiência cardíaca. Este resultado sugere que o composto (BZLO) pode retardar a progressão da hipertrofia cardíaca adaptativa para a insuficiência cardíaca, uma vez que o grupo curativo de 30 dias (TAC + BZLO) apresentou a fração de encurtamento preservada.

Além disso, os grupos curativos (15 e 30 dias) coarctados e tratados com o composto (TAC + BZLO) apresentaram (Figura 24) redução da espessura da parede do VE (EPVE) quando comparado ao grupo coarctado sem tratamento (TAC + Veículo). Novamente, sugerindo que o composto não é capaz de impedir totalmente o crescimento da espessura da parede do VE (EPVE), mas pode retardar a progressão da hipertrofia cardíaca para a insuficiência cardíaca.

15 dias



30 dias

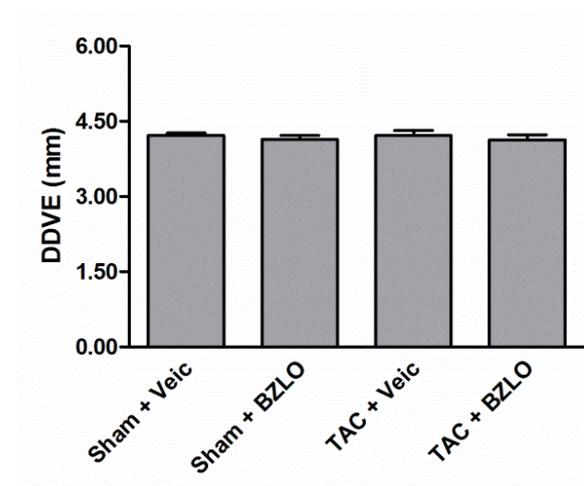
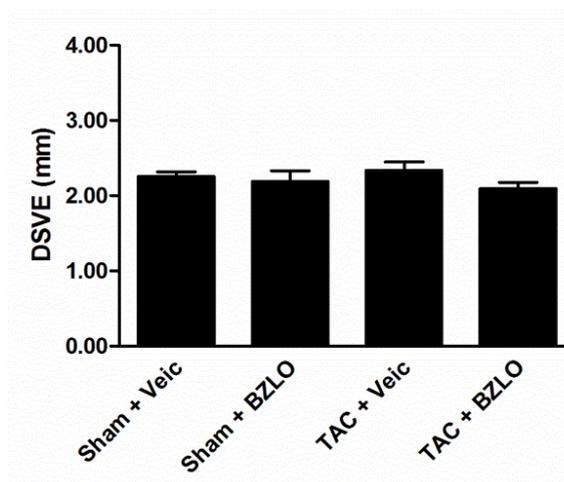


Figura 22- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do DDVE (diâmetro diastólico final do VE).

15 dias



30 dias

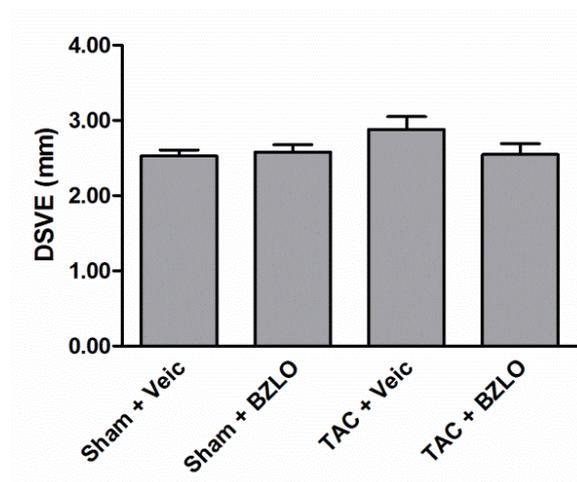
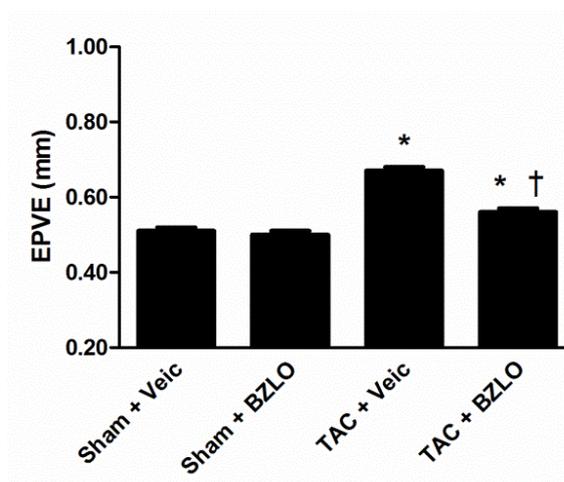


Figura 23- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do DSVE (diâmetro sistólico final do VE).

15 dias



30 dias

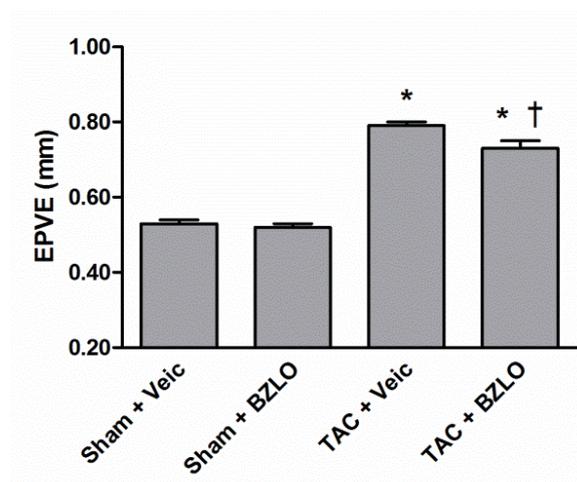
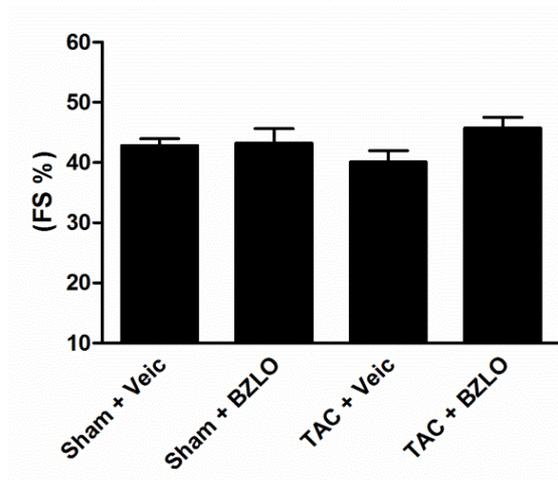


Figura 24- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios da EPVE (espessura da parede posterior do VE). *P<0,05 vs Sham + Veic e Sham + BZLO, †P<0,05 vs TAC + Veic.

15 dias



30 dias

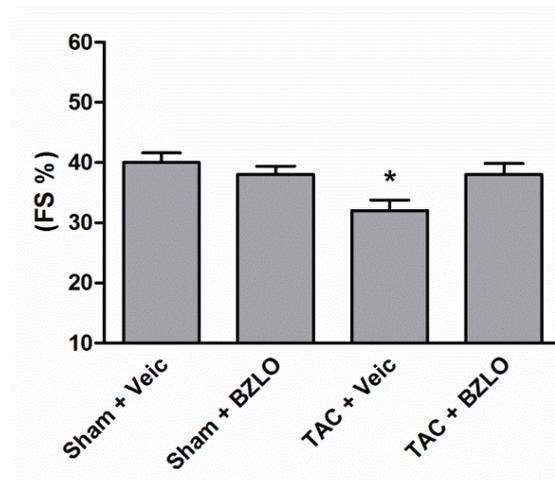
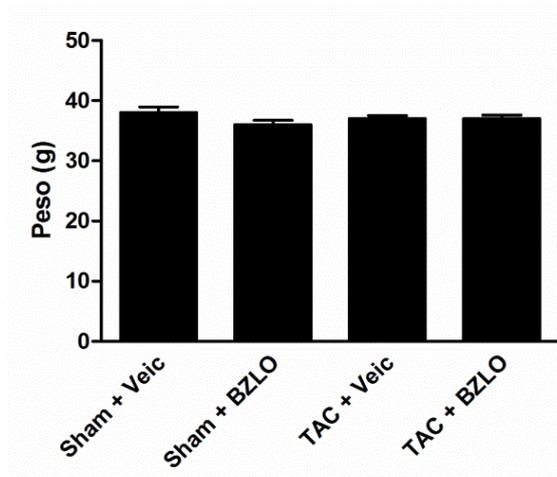


Figura 25- Análise ecocardiográfica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO do grupo curativo de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios da FS % (fração de encurtamento). *P<0,05 vs Sham + Veic.

4.5.3 - Gravimetria

Os camundongos dos grupos curativos (15 e 30 dias) não apresentaram diferença no peso corporal (Figura 26), independente do tratamento. O índice de massa do VE normalizado pelo peso corporal (IMVE) confirmou que houve aumento da massa do VE nos camundongos submetidos à coarctação da aorta em ambos (TAC + Veículo) e (TAC + BZLO), mesmo após o tratamento de 15 ou 30 dias. Entretanto, os camundongos coarctados e tratados com o composto (TAC + BZLO) apresentaram menor índice da massa (EPVE) quando comparado ao grupo que não recebeu o tratamento (TAC + Veículo) em ambos os curativos (15 e 30 dias). Dessa forma, indicando que o tratamento também foi eficiente no grupo curativo.

15 dias



30 dias

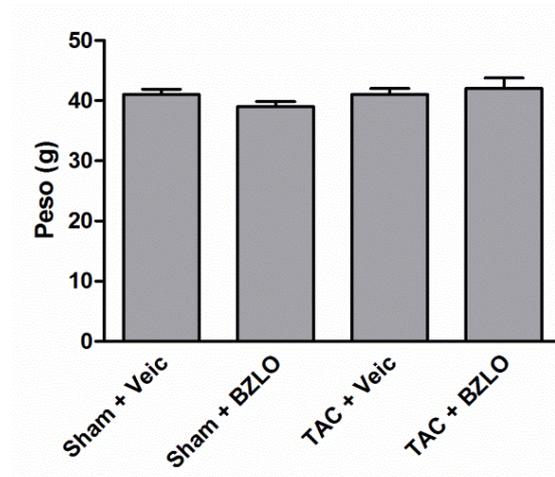
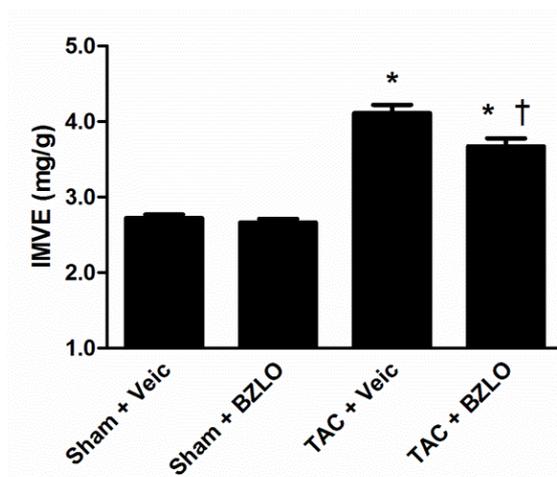


Figura 26- Análise gravimétrica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do peso corporal.

15 dias



30 dias

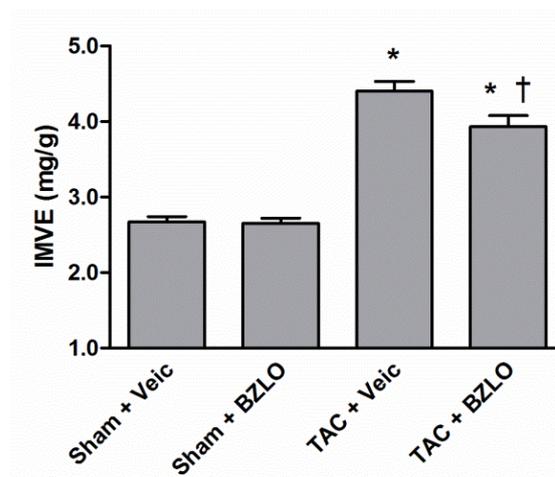


Figura 27- Análise gravimétrica de camundongos: Sham + Veic; Sham + BZLO; TAC + Veic; TAC + BZLO dos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. Gráficos de barras indicam os valores médios do índice de massa do VE (IMVE). * $P < 0,05$ vs Sham + Veic e Sham + BZLO, † $P < 0,05$ vs TAC + Veic.

4.5.4 - Histologia

A análise histológica dos grupos curativos (Figura 28 e 29) mostrou hipertrofia dos cardiomiócitos nos camundongos coarctados (TAC + Veículo), em relação aos controles tratados com veículo (Sham + Veículo) ou com o BZLO (Sham + BZLO), indicada pelo aumento do diâmetro médio dos cardiomiócitos. Já os camundongos dos grupos curativos (15 e 30 dias) coarctados e tratados com o composto BZLO (TAC + BZLO) apresentaram atenuação do crescimento do cardiomiócito quando comparados aos grupos coarctados não tratados (TAC + Veículo), apontando que o composto retarda o crescimento do cardiomiócito.

15 dias

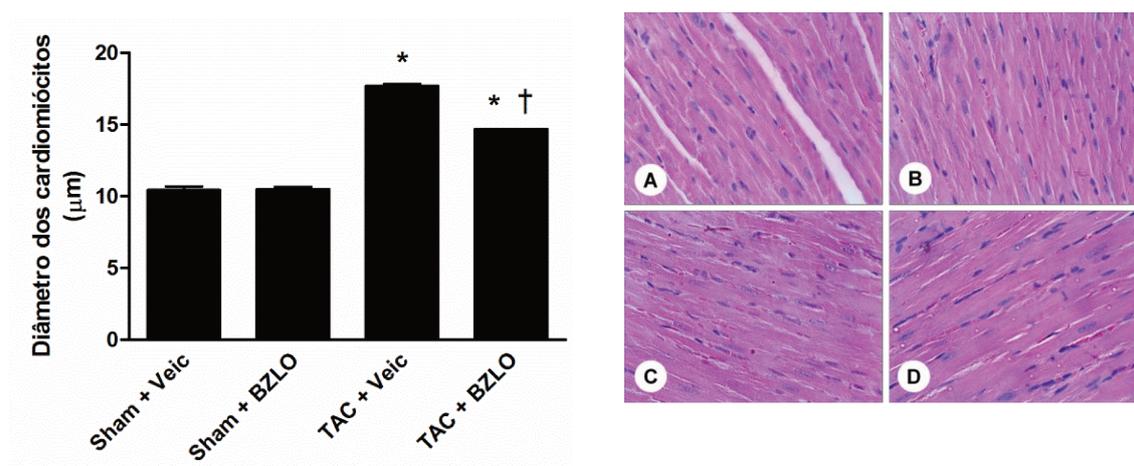


Figura 28- Gráfico de barras indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos e as fotomicrografias representativas coradas com Hematoxilina-Eosina (400x). *P<0,05 vs Sham + Veic e Sham + BZLO. †P<0,05 vs TAC + Veic.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

30 dias

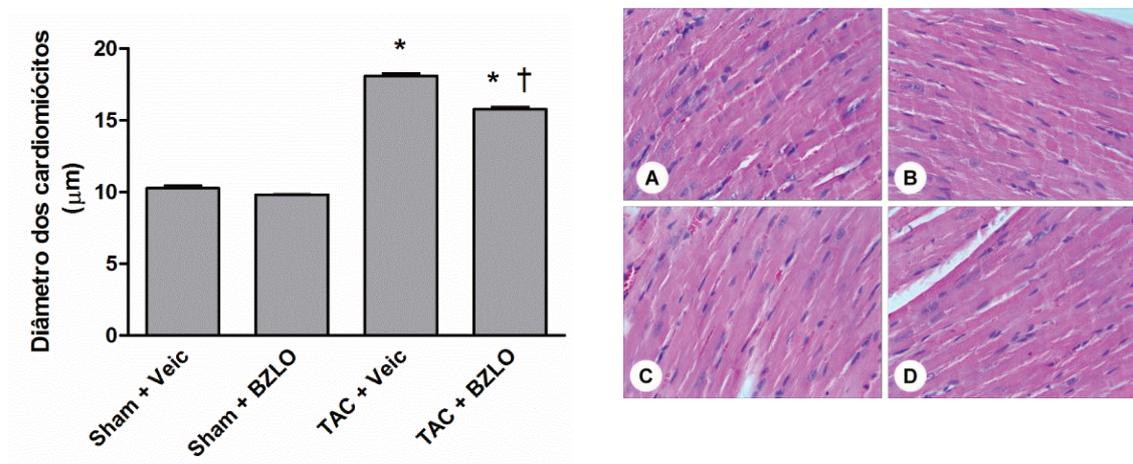


Figura 29- Gráfico de barras indicam os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos e as fotomicrografias representativas coradas com Hematoxilina-Eosina (400x). * $P < 0,05$ vs Sham + Veic e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veic.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

A análise quantitativa das áreas de fibrose intersticial do miocárdio dos grupos curativos (Figura 30 e 31) novamente mostraram-se maiores nos animais coarctados que não receberam o tratamento (TAC + Veículo). Contudo, os camundongos coarctados e tratados (TAC + BZLO) de ambos os grupos curativos (15 e 30 dias) mostram uma redução importante da fibrose intersticial quando comparado ao grupo sem tratamento (TAC + Veículo). Esses resultados são semelhantes aos que ocorreram nos grupos preventivos.

15 dias

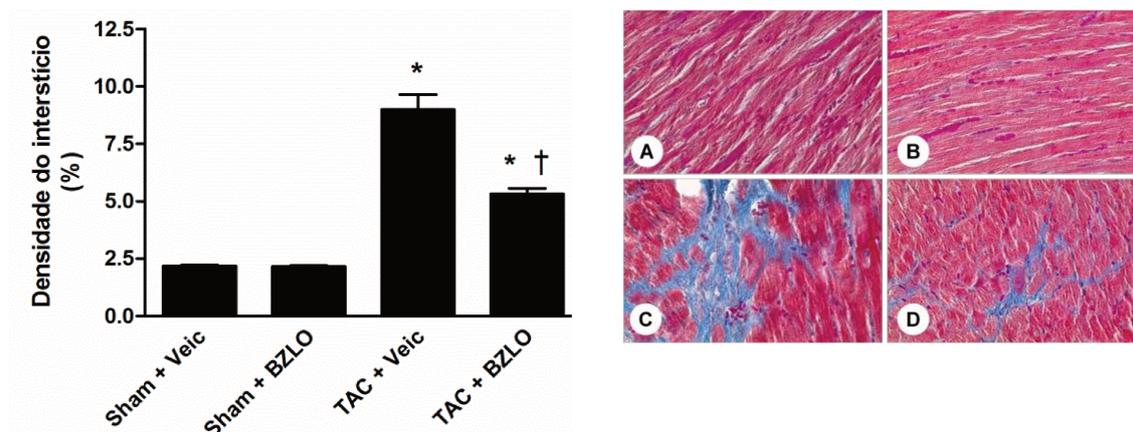


Figura 30- Gráfico de barras indicam os valores médios da fibrose intersticial e as fotomicrografias representativas coradas com Tricômio de Masson (400x). * $P < 0,05$ vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veículo.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

30 dias

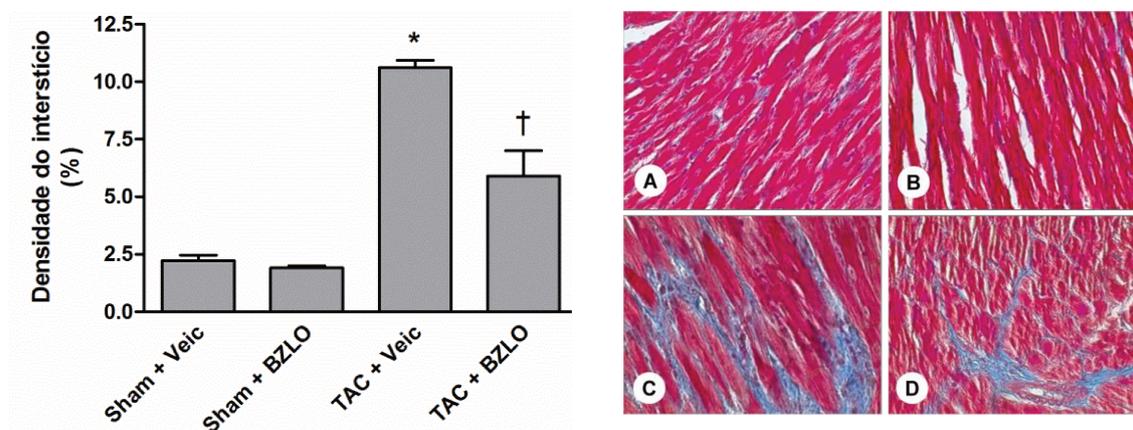


Figura 31- Gráfico de barras indicam os valores médios da fibrose intersticial e as fotomicrografias representativas coradas com Tricômio de Masson (400x). * $P < 0,05$ vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veículo.

- A - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + Veic)
- B - Miocárdio proveniente do grupo (Sham + BZLO)
- C - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + Veic)
- D - Miocárdio proveniente do grupo (TAC + BZLO)

4.5.5 - *Western Blotting*

A expressão protéica e atividade da FAK no VE (ventrículo esquerdo) foi avaliada pela técnica de *western blotting*. Como pode ser observado (Figura 32) a coarctação da aorta induziu aumento na expressão e atividade da FAK. Como esperado, o tratamento com BZLO induziu diminuição na expressão e atividade da FAK em ambos os grupos curativos (15 e 30 dias). Embora o grupo curativo (15 dias) tratado como o BZLO (TAC + BZLO) tenha apresentado uma redução discreta da atividade da FAK. Estes dados sugerem que o composto BZLO é um inibidor da FAK e que sua utilização pode ser importante para o controle do desenvolvimento da hipertrofia e insuficiência cardíaca.

15 dias

30 dias

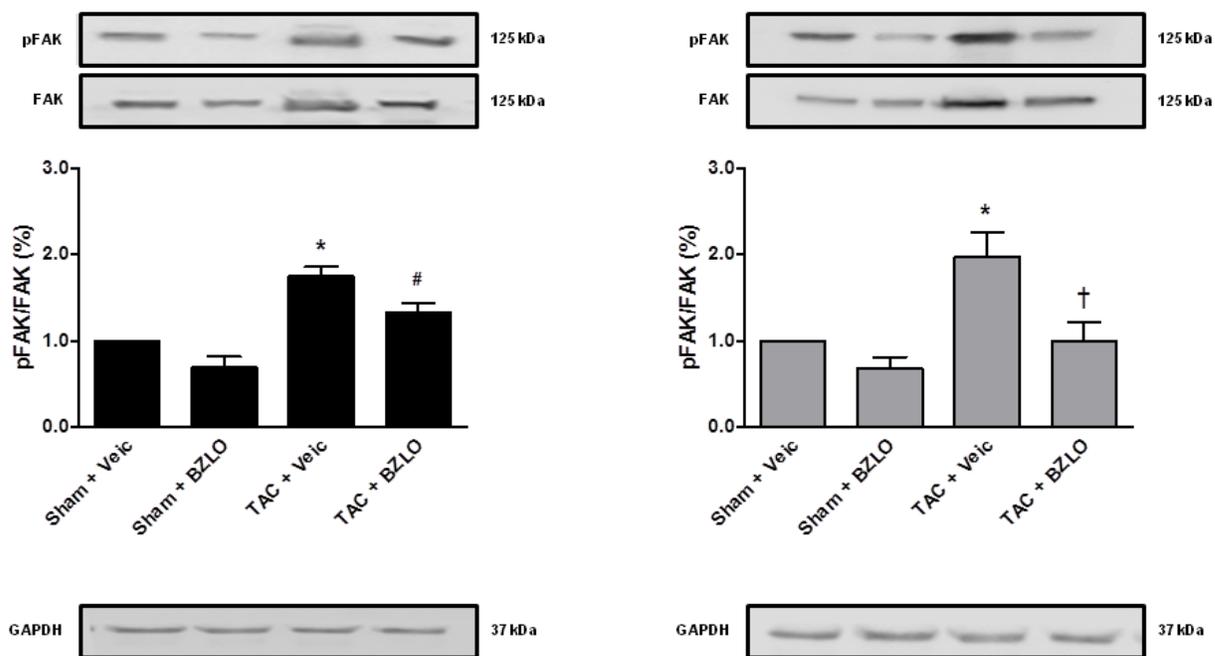


Figura 32- Gráficos de barras indicam a atividade da FAK nos grupos curativos de 15 e 30 dias, respectivamente. * $P < 0,05$ vs Sham + Veículo e Sham + BZLO. † $P < 0,05$ vs TAC + Veículo. # $P < 0,05$ vs Sham + BZLO.

5- DISCUSSÃO

O presente estudo foi planejado para avaliar os efeitos do tratamento com BZLO na hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida por sobrecarga pressórica. Outros estudos conduzidos paralelamente em nosso laboratório resultaram no composto BZLO, um derivado quinazolínico com seletividade *in vitro* para a FAK. De fato, observamos que o tratamento com BZLO resultou em normalização dos níveis elevados de FAK fosforilada no resíduo de tirosina 397 no ventrículo esquerdo de camundongos submetidos à coarctação da aorta, indicando que o tratamento com BZLO foi eficaz para inibir a ativação da FAK em corações hipertróficos de camundongo.

Com relação aos efeitos do BZLO sobre a hipertrofia cardíaca, contemplamos a avaliação dos efeitos de BZLO na prevenção, i.e. com o tratamento iniciado antes do estabelecimento da sobrecarga pressórica induzida por coarctação da aorta, e na regressão da hipertrofia, ou seja, tratamento iniciado após estabelecida a hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica.

Os resultados indicaram que o tratamento antecipado atenuou em cerca de 50% (avaliado pelo índice de massa ventricular esquerda e pela espessura ecocardiográfica da parede do ventrículo esquerdo) o desenvolvimento da hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida por coarctação da aorta em camundongos. Essa atenuação na hipertrofia do ventrículo esquerdo foi acompanhada por atenuação semelhante na espessura dos miócitos cardíacos e da área de fibrose intersticial do ventrículo esquerdo. Da mesma forma, o tratamento com BZLO iniciado após estabelecida a hipertrofia, reduziu significativamente a massa do ventrículo esquerdo, a espessura do miócitos e a extensão da fibrose intersticial. Notavelmente, os efeitos anti-hipertróficos do tratamento com BZLO ocorreram sem que fossem observadas reduções na pressão arterial sistólica na aorta ascendente ou no

gradiente sistólico de transconstrução, indicando que os mesmos não se deveram a reduções na sobrecarga hemodinâmica.

De maneira geral, os dados desse estudo demonstram que o tratamento com BZLO foi capaz não apenas de prevenir o desenvolvimento, mas, eficientemente, promover a regressão de hipertrofia do ventrículo esquerdo mesmo sem interferir na sobrecarga pressórica de camundongos submetidos à coarctação da aorta. Esses efeitos podem ser atribuídos, ao menos parcialmente, à inibição da hiperatividade da FAK no coração hipertrófico de camundongos.

Nos últimos anos, diversos estudos têm indicado que a tirosina quinase FAK tem papel importante na resposta hipertrófica do coração, potencialmente com implicações no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Bayer et al, 2002; Peng et al, 2006; Di Michele et al, 2006; Lopes et al, 2007; Clemente et al, 2007).

Estudos *in vitro* demonstraram que a ativação da FAK contribui decisivamente para a hipertrofia de cardiomiócitos em resposta a estímulos mecânicos ou mediadores neuro-humorais (Franchini et al, 2000; Taylor et al, 2000; Eble et al, 2000; Kovacic-Milivojević et al, 2001; Domingos et al; 2002; Torsoni et al, 2003, Fonseca et al, 2005).

A importância da FAK para o desenvolvimento da hipertrofia do ventrículo esquerdo foi recentemente confirmada em modelos de camundongos geneticamente modificados. De fato, demonstrou-se que a expressão cardíaco-específica de transgene da FAK resulta em hipertrofia moderada do ventrículo esquerdo de camundongos (Di Michele et al, 2006). Por outro lado, a deleção gênica condicional da FAK no coração de camundongos resultou em perda da resposta hipertrófica tanto a estímulos mecânicos quanto a estímulos humorais e desenvolvimento precoce de insuficiência cardíaca (Peng et al, 2006).

Já estudos em camundongos adultos tratados com siRNA indicaram que a depleção miocárdica de FAK atenuou o desenvolvimento de hipertrofia do ventrículo esquerdo de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica crônica, acompanhada de redução da mortalidade (Clemente et al, 2007).

Associada a esses efeitos, verificou-se redução na fibrose intersticial cardíaca, indicando que a importância da FAK na hipertrofia cardíaca não se restringe aos efeitos hipertróficos em cardiomiócitos, mas abrange também outros mecanismos, como a ativação da fibrogênese (Clemente et al, 2007).

De fato, estudos realizados em fibroblastos cardíacos isolados demonstraram que a ativação da FAK, seja por estímulo mecânico, seja por estímulo de mediadores neuro-humorais, tem papel crítico na ativação de fibroblastos quiescentes e sua transformação em miofibroblastos com alta atividade fibrogênica indicadas pela elevada capacidade de produzir colágeno e metaloproteínases de matriz (Wang et al, 2001; Dalla Costa et al, 2010; Lagares et al, 2012).

Dados obtidos em fragmentos de miocárdio humano por meio de biópsia intraoperatória em pacientes portadores de hipertrofia do ventrículo esquerdo decorrente de valvulopatias indicaram aumento expressivo da atividade da FAK em miocárdio hipertrófico humano, particularmente no tecido fibrose intersticial (Lopes et al, 2007). De maneira geral esses dados corroboram a idéia de que a FAK possui um papel importante na hipertrofia cardíaca e na transição para a disfunção e insuficiência cardíaca.

Além disso, dada a reversão do processo de hipertrofia patológica em experimentos de depleção miocárdica da FAK, pode-se considerar a FAK como um alvo terapêutico potencial. Os resultados do presente estudo dão suporte adicional a essa hipótese, indicando que o tratamento com inibidor seletivo da FAK não apenas atenua, mas reverte

parcialmente a hipertrofia e as alterações patológicas do miocárdio associadas a ela, como a hipertrofia dos cardiomiócitos e a fibrose miocárdica, independente de efeitos hemodinâmicos.

Um aspecto crítico quando se consideram os inibidores de proteínas quinases refere-se à seletividade dos inibidores. As proteínas quinases constituem cerca de 500 enzimas diferentes, pertencentes a famílias como aquelas das tirosino quinases e serino/treonino quinases por exemplo (Davies et al, 2001; Bain et al, 2007; Garuti et al, 2010; Eglen e Reisine, 2010). Tipicamente, essas enzimas apresentam o domínio catalítico bastante conservado, o que dificulta o estabelecimento de inibidores seletivos.

Porém, variações discretas no sítio catalítico e a existência de sítios alostéricos próximos à região de acoplamento ao ATP têm permitido a obtenção de compostos que apresentam razoável grau de seletividade.

No caso específico do BZLO, os dados disponíveis indicam inibição da FAK *in vitro* em concentrações na faixa de nanomolar, enquanto a inibição de outras tirosino quinases como os receptores c-KIT e PDGFR são inibidos em concentrações mais elevadas na faixa de micromolar. Apesar dos resultados apontarem para uma seletividade do BZLO, não é possível assegurar a seletividade *in vivo* do BZLO na dose utilizada no presente estudo (30 mg/Kg). No entanto, é importante ressaltar que apesar dos efeitos anti-hipertróficos observados no presente estudo poderem representar a contribuição da inibição de outras tirosino quinases, demonstramos que a atividade da FAK foi inibida em paralelo ao efeito anti-hipertrófico do BZLO, sugerindo que, ao menos em parte, os efeitos do tratamento com BZLO se deveram à inibição da FAK. Em suporte a essa hipótese, estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que o tratamento com um inibidor seletivo da

FAK reverteu completamente à hipertrofia induzida por transgene cardíaco-específico da FAK em camundongos (Clemente et al, 2012).

Estudos futuros, realizados com tratamentos com doses menores associados a mapeamento da atividade de outras tirosino quinases potencialmente inibidas pelo BZLO, poderão esclarecer definitivamente sobre a seletividade dos seus efeitos na FAK no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica em camundongos.

É importante ressaltar a magnitude dos efeitos anti-hipertróficos observados com o tratamento com BZLO, sobretudo a magnitude da regressão observada nos camundongos com hipertrofia estabelecida decorridos 15 dias após a coarctação da aorta. Dados de estudos anteriores do nosso laboratório indicam o período de 15 dias como ideal para uma boa parte do crescimento hipertrófico e da fibrose intersticial já estarem estabelecidos nesse modelo.

Verificamos no presente estudo que o tratamento com BZLO atenuou em cerca de 10% o aumento da massa do ventrículo esquerdo tanto preventivamente como quando implementado após já estabelecida a hipertrofia. Esse resultado torna-se ainda mais expressivo quando se considera que o tratamento não modificou as condições hemodinâmicas que levaram à hipertrofia. Condições estas compatíveis com situações clínicas consideradas como de intensa sobrecarga mecânica (gradiente sistólico cerca de 75 mmHg). Isso reforça a idéia de que a sinalização mediada pela FAK tem papel crítico não apenas no desenvolvimento, mas também na manutenção da hipertrofia induzida por sobrecarga mecânica.

Observou-se que o tratamento com BZLO não apenas preveniu, mas também promoveu regressão da hipertrofia dos cardiomiócitos dos corações de camundongos submetidos a sobrecarga pressórica crônica. No presente estudo não avaliamos vias de

sinalização celular pelas quais o tratamento com BZLO poderia produzir esse efeito. No entanto, considerando-se o efeito dependente de FAK, demonstramos em estudos anteriores que a FAK promove hipertrofia cardíaca por ativar a via de MAP quinases mediada pelas ERK1/2, bem como a via PI3K/AKT/mTOR/S6K (Torsoni et al, 2003, Franchini et al, 2000; Domingos et al, 2002).

É interessante notar que diversas evidências indicam que essas vias de sinalização são críticas para o desenvolvimento da hipertrofia de cardiomiócitos, sendo consideradas vias finais comuns que medeiam processos de transcrição e tradução gênica em resposta a diferentes estímulos. Outro aspecto importante dessas vias diz respeito ao fato de que quando ativadas de forma branda ou transiente resultam na ativação de mecanismos que conduzem a uma hipertrofia dos cardiomiócitos com características de crescimento fisiológico e adaptativo.

Por outro lado, a ativação persistente ou intensa da via PI3K/AKT/mTOR/S6K parece contribuir para o desenvolvimento de hipertrofia patológica maladaptiva. Portanto, é plausível admitir que, na situação patológica representada pela hipertrofia em resposta à sobrecarga pressórica crônica, a ativação persistente da FAK poderia representar um fator a contribuir para alterações maldaptativas dos cardiomiócitos. Isso explicaria a atenuação da hipertrofia dos cardiomiócitos em resposta ao tratamento com BZLO, sem deterioração funcional do coração dos camundongos submetidos a sobrecarga pressórica crônica.

A avaliação dessa hipótese no presente estudo foi prejudicada porque nos restringimos a avaliar os camundongos com sobrecarga pressórica crônica em fases precoces (até 45 após a coarctação da aorta), quando ainda não manifestaram insuficiência cardíaca plena. No entanto, no grupo de camundongos no qual o tratamento foi iniciado após o estabelecimento da hipertrofia verificamos que o tratamento com BZLO impediu a

deterioração da função cardíaca (queda da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo) observada no grupo tratado com veículo, sugerindo que a modulação da atividade da FAK pode contribuir para atenuar o desenvolvimento das alterações patológicas da hipertrofia maladaptativa.

A inclusão de camundongos com disfunção ou insuficiência cardíaca em estudos futuros deverá esclarecer não apenas se a ativação da FAK contribui para a deterioração estrutural e funcional dos miócitos, mas também se sua inibição é capaz de reverter essas alterações nos estágios mais avançados da hipertrofia patológica.

Mais ainda, os dados indicando não só a prevenção, mas também a regressão da fibrose intersticial cardíaca pelo tratamento com BZLO é surpreendente e traz à tona uma importante discussão sobre a reversibilidade da fibrose intersticial do coração com hipertrofia maladaptativa e nos estágios mais avançados quando já se instalaram a disfunção ou a insuficiência cardíaca. Da mesma forma que para o cardiomiócito, como discutido anteriormente, a regressão da fibrose pelo tratamento com BZLO sugere que a FAK contribui para manutenção da atividade dos processos que levam à fibrose intersticial. Essa idéia está de acordo com resultados de estudos anteriores que demonstraram o papel crítico da FAK na transformação dos fibroblastos quiescentes em miofibroblastos (Dalla Costa et al, 2010).

Nesse contexto, é interessante notar que existe estreita associação entre a atividade de fibroblastos, a progressão da fibrose intersticial e a deterioração funcional na hipertrofia maladaptativa (Lopes et al, 2007; Clemente et al; 2007). Sendo a FAK crítica para o processo de ativação dos fibroblastos, tratamentos que interfiram em sua função poderiam ser importante para sua regressão não apenas nos estágios iniciais da hipertrofia, como demonstrado aqui, mas também, nos estágios avançados onde já houvesse disfunção e

insuficiência cardíacas. Novamente, estudos adicionais com BZLO em modelos em fase de disfunção e insuficiência cardíacas poderão esclarecer se a inibição da FAK pode contribuir para reverter a fibrose miocárdica em estágios de hipertrofia patológica maladaptativa.

Ainda no contexto dos efeitos cardiovasculares do BZLO, ressaltamos que não foram avaliados possíveis efeitos desse composto nos vasos da microcirculação. Diversas evidências suportam a hipótese de que intervenções que aumentem a microcirculação miocárdica resultam em efeitos benéficos para a função cardíaca em estados patológicos (Beyer e Gutterman, 2012; Camici et al; 2012).

Por outro lado, intervenções que resultam em redução da microcirculação podem contribuir para deterioração funcional e estrutural de corações hipertróficos. Sendo importante mencionar os dados disponíveis que indicam que a FAK pode exercer influência na angiogênese (Ilic et al, 2003; Baren et al, 2006; Angelucci e Bologna, 2007; Weis et al, 2008; Lim et al, 2010; Peng e Guan, 2011) e conseqüentemente os efeitos de sua inibição poderiam resultar em alterações da microcirculação. À vista desses aspectos será importante em estudos futuros avaliar os efeitos do tratamento com BZLO na microcirculação cardíaca.

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com o derivado quinazolínico BZLO, um inibidor seletivo da FAK, não apenas previne, mas, efetivamente, promove a regressão da hipertrofia patológica induzida por sobrecarga pressórica em camundongos. Esse efeito é acompanhado de regressão similar da hipertrofia dos cardiomiócitos e da fibrose intersticial, com preservação da função ventricular, particularmente nos casos em que promove simultaneamente a regressão da hipertrofia.

Tais resultados reforçam a idéia de que a FAK é um alvo terapêutico potencial. Além disso, os dados apresentados nesse estudo indicam efeitos benéficos do tratamento no

modelo de hipertrofia cardíaca patológica em camundongo, sem evidências de efeitos colaterais ou deletérios indicando potencial de aplicação clínica dessa modalidade de tratamento.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman SM, Kauffman RE. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding dose-response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:111-36.

Accili D, Cama A, Barbetti F, Kadowaki H, Kadowaki T, Taylor SI. Insulin resistance due to mutations of the insulin receptor gene: an overview. *J Endocrinol Invest.* 1992 Dec;15(11):857-64.

Acharya AN, Ostresh JM, Houghten RA. Novel approaches for the solid-phase synthesis of biheterocyclic dihydroimidazole analogues. *J Comb Chem.* 2002 May-Jun;4(3):214-22.

American Heart Association. International Cardiovascular Disease Statistics [online]. <http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1236204012112INLT.pdf> (2009).

Anderson ME, Higgins LS, Schulman H. Disease mechanisms and emerging therapies: protein kinases and their inhibitors in myocardial disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 Aug;3(8):437-45.

Angelucci A, Bologna M. Targeting vascular cell migration as a strategy for blocking angiogenesis: the central role of focal adhesion protein tyrosine kinase family. *Curr Pharm Des.* 2007;13(21):2129-45.

Arold ST, Hoellerer MK, Noble ME. The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure* 2002;10:319–27.

Arya P, Chou DT, Baek MG. Diversity-Based Organic Synthesis in the Era of Genomics and Proteomics NRC publication no. 43843. David Thomas is a senior colleague and mentor. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2001 Jan 19;40(2):339-346.

Athani AV; Makoid MC, Banakar UV. Issues in contemporary drug delivery. Part III. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. *J Pharm Technol.* v. 6, p. 337-503, 1990.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 2007 Dec 15;408(3):297-315.

Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science.* 2006 May 26;312(5777):1175-8.

BASIC PHARMACOKINETICS - CHAPTER 3: Pharmacological Response. Author: Michael Makoid and John Cobby. 1996-1999. <http://pharmacy.creighton.edu/pha443/pdf/>.

Bayer AL, Heidkamp MC, Patel N, Porter MJ, Engman SJ, Samarel AM. PYK2 expression and phosphorylation increases in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Aug;283(2):H695-706.

Belmonte SL, Blaxall BC. G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2011 Jul 22;109(3):309-19.

Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation.* 1992 Mar;85(3):1046-55.

Beyer AM, Gutterman DD. Regulation of the human coronary microcirculation. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Apr;52(4):814-21.

Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science.* 1987 Jan 16;235(4786):305-11.

Bogoyevitch MA, Fairlie DP. A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding. *Drug Discov Today.* 2007 Aug;12(15-16):622-33.

Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S et al. Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med.* 2003 Jan;9(1):68-75.

Branowska D, Rykowski A, Wysocki W. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 6223-6226.

Braren R, Hu H, Kim YH, Beggs HE, Reichardt LF, Wang R. Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. *J Cell Biol.* 2006 Jan 2;172(1):151-62.

Braunschweig F, Cowie MR, Auricchio A. What are the costs of heart failure? *Europace.* 2011 May;13 Suppl 2:ii13-7.

Bridges AJ. Chemical inhibitors of protein kinases. *Chem Rev.* 2001 Aug;101(8):2541-72.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982 Jul 22;307(4):205-11.

Buchanan JG, Sable HZ. *Selective Organic Transformations*; (Ed.: Thyagarajan, B. S.), Wiley-Interscience, New York, Vol. 2, 1972, pp. 1–95.

Burger A. Isosterism and bioisosterism in drug design. *Prog Drug Res.* 1991;37:287-371.

Buyandelger B, Ng KE, Miodic S, Gunkel S, Piotrowska I, Ku CH et al. Genetics of mechanosensation in the heart. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011 Jun;4(3):238-44.

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.

Calalb MB, Zhang X, Polte TR, Hanks SK. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;228: 662–8.

Camici PG, Olivotto I, Rimoldi OE. The coronary circulation and blood flow in left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Apr;52(4):857-64.

Ceccarelli DF, Song HK, Poy F, Schaller MD, Eck MJ. Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2006;281:252–9.

Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Theocharis SE. Clinical significance of FAK expression in human neoplasia. *Histol Histopathol.* 2008 May;23(5):629-50.

Chen MH, Kerkelä R, Force T. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation.* 2008 Jul 1;118(1):84-95.

Cheng H, Force T. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ Res.* 2010 Jan 8;106(1):21-34.

Choi HS, Wang Z, Richmond W, He X, Yang K, Jiang T et al. Design and synthesis of 7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as focal adhesion kinase inhibitors. Part 2. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 May 15;16(10):2689-92.

Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I et al. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* 2007 Dec 7;101(12):1339-48.

Clemente CF, Xavier-Neto J, Dalla Costa AP, Consonni SR, Antunes JE, Rocco SA et al. Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic growth by activating the AKT and mTOR pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Feb;52(2):493-501.

Cohen P. Protein Kinase-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Apr;1(4):309-315.

Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem.* 2001 Oct;268(19):5001-10.

Cohn JN. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation.* 1995 May 15;91(10):2504-7.

Connolly DJ, Cusack D, O'Sullivan TP, Guiry PJ. Synthesis of quinazolinones and quinazolines. *Tetrahedron.* 2005;61(43):10153-10202.

Cooper LA, Shen TL, Guan JL. Regulation of focal adhesion kinase by its aminoterminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 2003;23: 8030–41.

Cowan-Jacob SW. Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Nov;63(22):2608-25.

Dalla Costa AP, Clemente CF, Carvalho HF, Carvalheira JB, Nadruz Jr W, Franchini KG. FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex. *Cardiovasc Res* 2010;86:421–31.

Dar AC, Shokat KM. The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annu Rev Biochem.* 2011 Jun 7;80:769-95.

Davies CH, Davia K, Bennett JG, Pepper JR, Poole-Wilson PA, Harding SE. Reduced contraction and altered frequency response of isolated ventricular myocytes from patients with heart failure. *Circulation.* 1995 Nov 1;92(9):2540-9.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 2000 Oct 1;351(Pt 1):95-105

Delvin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations, 3RD edition. Wiley-Liss, 1992. p. 319-350, 891,894.

Devereux RB, Wachtell K, Gerdts E, Boman K, Nieminen MS, Papademetriou V et al. Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *JAMA.* 2004 Nov 17;292(19):2350-6.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA et al. ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail.* 2008 Oct;10(10):933-89.

Dickstein K, Vardas PE, Auricchio A, Daubert JC, Linde C, McMurray J et al. Committee for Practice Guidelines of the European Society of Cardiology. 2010 focused update of ESC Guidelines on device therapy in heart failure: an update of the 2008 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure and the 2007 ESC Guidelines for cardiac and resynchronization therapy. Developed with the special contribution of the Heart Failure Association and the European Heart Rhythm Association. *Eur J Heart Fail.* 2010 Nov;12(11):1143-53.

DiMichele LA, Doherty JT, Rojas M, Beggs HE, Reichardt LF, Mack CP et al. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ Res.* 2006 Sep 15;99(6):636-45.

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 Heart Circ Physiol.* 2002 Feb;282(2):H556-64.

Dong Z, Qi X, Xie K, Fidler IJ. Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. *J Immunol*. 1993 Sep 1;151(5):2717-24.

Dorn GW 2nd, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*. 2003 Jun 13;92(11):1171-5.

Douglas PS, Morrow R, Ioli A, Reichek N. Left ventricular shape, afterload and survival in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1989 Feb;13(2):311-5.

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996 May;2(5):561-6.

Dunty JM, Gabarra-Niecko V, King ML, Ceccarelli DF, Eck MJ, Schaller MD. FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Mol Cell Biol* 2004;24:5353–68.

Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, Samarel AM Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 May;278(5):H1695-707.

Edwards AM, Isserlin R, Bader GD, Frye SV, Willson TM, Yu FH. Too many roads not taken. *Nature*. 2011 Feb 10;470(7333):163-5.

Eglen RM, Reisine T. The current status of drug discovery against the human kinome. *Assay Drug Dev Technol.* 2009 Feb;7(1):22-43.

Engh RA, Bossemeyer D. The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation - targets for therapeutic intervention. *Adv Enzyme Regul.* 2001;41:121-49.

Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ et al. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation.* 2002 Jan 1;105(1):85-92.

Fabbro D, Cowan-Jacob SW, Möbitz H, Martiny-Baron G. Targeting cancer with small-molecular-weight kinase inhibitors. *Methods Mol Biol.* 2012;795:1-34.

Fedorov O, Müller S, Knapp S. The (un)targeted cancer kinome. *Nat Chem Biol.* 2010 Mar;6(3):166-169.

Finckenberg P, Mervaala E. Novel regulators and drug targets of cardiac hypertrophy. *J Hypertens.* 2010 Sep;28 Suppl 1:S33-8.

Fiorelli AI, Coelho HB, Oliveira Junior JL, Oliveira AS. Insuficiência cardíaca e transplante cardíaco. *Rev Med (São Paulo).* 2008 abr.-jun.;87(2):105-20.

Fischer EH, Krebs EG. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem.* 1955 Sep;216(1):121-32.

Fischer PM. The design of drug candidate molecules as selective inhibitors of therapeutically relevant protein kinases. *Curr Med Chem.* 2004 Jun;11(12):1563-83.

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 Jan 7;96(1):73-81.
Epub 2004 Dec 2.

Force T, Kerleä R. Cardiotoxicity of the new cancer therapeutics-mechanisms of, and approaches to, the problem. *Drug Discovery Today.* 2008 Sep;13(17-18):778-84.

Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:802–14.

Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, Saad MJ. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res.* 2000 Sep 29;87(7):558-65.

Franchini KG. Focal adhesion kinase -- the basis of local hypertrophic signaling domains. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Feb;52(2):485-92.

Frank D, Kuhn C, Brors B, Hanselmann C, Lüdde M, Katus HA, Frey N. Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension*. 2008 Feb;51(2):309-18. Epub 2007 Dec 24.

Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Jun;84(6):446-68.

Frey N, Barrientos T, Shelton JM, Frank D, Rütten H, Gehring D et al. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12):1336-43.

Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004 Apr 6;109(13):1580-9.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:45-79.

Fry DW, Bridges AJ, Denny WA, Doherty A, Greis KD, Hicks JL et al. Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 29;95(20):12022-7.

Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR et al. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science*. 1994 Aug 19;265(5175):1093-5.

Fry DW. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. *Pharmacol Ther*. 1999 May-Jun;82(2-3):207-18.

Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1992 Jun;19(7):1550-8.

García-Echeverría C, Traxler P, Evans DB. ATP site-directed competitive and irreversible inhibitors of protein kinases. *Med Res Rev*. 2000 Jan;20(1):28-57.

Gardin JM, Lauer MS. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? *JAMA*. 2004 Nov 17;292(19):2396-8.

Garuti L, Roberti M, Bottegoni G. Non-ATP competitive protein kinase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2010;17(25):2804-21.

Goswami S, Adak AK, Mukherjee R, Jana S, Dey S, Gallagher JF. A Convenient Palladium Catalyzed Synthesis of Symmetric Biaryls, Biheterocycles and Biaryl Chiral Diamides. *Tetrahedron*, 2005, 61, 4289-95.

Grabielson J and Weiner D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts & Applications, 3rd Edition, Apotekarsocieteten, 2000.

Griffin JE, Ojeda SR (eds). Textbook of Endocrine Physiology, 2nd Edition, Oxford University Press, New York, 1992.

Grimminger F, Schermuly RT, Ghofrani HA. Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Dec;9(12):956-70.

Gupta S, Das B, Sen S. Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2007 Jun;9(6):623-52.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995 May;9(8):576-96.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 1988 Jul 1;241(4861):42-52.

Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* 2003;4(5):111.

Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Aug;7(8):589-600.

Hibino S, Choshi T. Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpenoid unit. *Nat Prod Rep*. 2001 Feb;18(1):66-87.

Hodges P. Heart failure: epidemiologic update. *Crit Care Nurs Q*. 2009 Jan-Mar;32(1):24-32.

Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):225-36.

Hunter T. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998 Apr 29;353(1368):583-605.

Ilic D, Kovacic B, McDonagh S, Jin F, Baumbusch C, Gardner DG, Damsky CH. Focal adhesion kinase is required for blood vessel morphogenesis. *Circ Res*. 2003 Feb 21;92(3):300-7.

Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:714-727.

Irena Melnikova and James Golden. Targeting protein kinase. *Nature* 2004. Vol 3; 993-994.

Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1384–91.

Johnson LN. The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* 2009 Aug;37(Pt 4):627-41.

Joule JA, Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*; 4th ed., Blackwell Science: Oxford, 2000.

Kacker IK, Zaheer SH. Potential analgesics.1. Synthesis of substituted 4-quinazolinones. *J.Indian Chem. Soc.* 1951, 28, 344-346.

Kamal A, Ramana KV, Rao MV. Chemoenzymatic synthesis of pyrrolo[2, 1-b]quinazolinones: lipase-catalyzed resolution of vasicinone. *J Org Chem.* 2001 Feb;66(3): 997-1001.

Kannel WB, Gordon T, Offutt D. Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1969; 71: 89-105.

Katritzky AR, Pozharskii AF. In *Handbook of Heterocyclic Chemistry*; Pergamon Press, Oxford, 2003.

Katritzky AR. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; (Eds.: Katritzky, A. R., Rees, C. W., Scriven, E. F. V.), Pergamon Press, Oxford, 1996.

Kaye DM, Krum H. Drug discovery for heart failure: a new era or the end of the pipeline? *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Feb;6(2):127-39.

Kehat I, Molckentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation.* 2010 Dec 21;122(25):2727-35.

Kelly D. Our future society: a global challenge. *Circulation* 1997;95:2459-64.

Kenichi O, Yoshihisa Y, Toyonari O, Toru I, Yoshio I. Studies on 4(1H)-Quinazolinones. 5. Synthesis and Antiinflammatory Activity of 4(1H)-Quinazolinone Derivatives. *J Med Chem.* 1985, 28, 568-576.

Klutchko SR, Zhou H, Winters RT, Tran TP, Bridges AJ, Althaus IW et al. Tyrosine kinase inhibitors. 19. 6-Alkynamides of 4-anilinoquinazolines and 4-anilinopyrido[3,4-d]pyrimidines as irreversible inhibitors of the erbB family of tyrosine kinase receptors. *J Med Chem.* 2006 Feb 23;49(4):1475-85.

Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 2002 Dec 27;111(7):943-55.

Koepfli JB, Mead JF, Brockman JA Jr. An alkaloid with high antimalarial activity from *Dichroa febrifuga*. *J Am Chem Soc.* 1947 Jul;69(7):1837.

Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1992;267:23439–42.

Kovacic-Milivojević B, Roediger F, Almeida EA, Damsky CH, Gardner DG, Ilić D. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 2001 Aug;12(8):2290-307.

Krebs EG, Fischer EH. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1956 Apr;20(1):150-7.

Krebs EG, Kent AB, Fischer EH. The muscle phosphorylase b kinase reaction. *J Biol Chem.* 1958 Mar;231(1):73-83.

Lagares D, Busnadiego O, García-Fernández RA, Kapoor M, Liu S, Carter DE, Abraham D et al. Inhibition of focal adhesion kinase prevents experimental lung fibrosis and myofibroblast formation. *Arthritis Rheum.* 2012 May;64(5):1653-64.

Landreau C, Deniaud D, Meslin JC. From thiourea to bicyclic structures: an original route to imidazo[2,1-b]thiazoles, 5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidines, 7H-imidazo[2,1-b][1,3]thiazines, and 2H,6H-pyrimido[2,1-b][1,3]thiazines. *J Org Chem.* 2003 Jun 13;68(12):4912-7.

Levitzki A, Mishani E. Tyrphostins and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:93-109.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990 May 31;322(22):1561-6.

Liao L, Allen LA, Whellan DJ. Economic burden of heart failure in the elderly. *Pharmacoeconomics.* 2008;26(6):447-62.

Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 2007;129:1177–87.

Lim ST, Chen XL, Tomar A, Miller NL, Yoo J, Schlaepfer DD. Knock-in mutation reveals an essential role for focal adhesion kinase activity in blood vessel morphogenesis and cell motility-polarity but not cell proliferation. *J Biol Chem.* 2010 Jul 9;285(28):21526-36.

Linzbach AJ. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol.* 1960 Mar;5:370-82.

Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2010 Feb 23;121(7):e46-e215.

Lopes MM, Ribeiro GC, Tornatore TF, Clemente CF, Teixeira VP, Franchini KG. Increased expression and phosphorylation of focal adhesion kinase correlates with dysfunction in the volume-overloaded human heart. *Clin Sci (Lond).* 2007 Aug;113(4):195-204.

Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 2000 Jul 25;102(4):470-9.

Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeyer TJ, Quaipe RA et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997 Nov 1;100(9):2315-24.

Lyle, F. R. *U.S. Patent 5,973,257*, 1985; [*Chem. Abstr.* 1985, 65, 2870].

MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JW, Boyd J, Finlayson A et al. Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation*. 2000 Sep 5;102(10):1126-31.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34.

Marin TM, Clemente CF, Santos AM, Picardi PK, Pascoal VD, Lopes-Cendes I, et al. Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res* 2008;103:813–24.

Matsuda H, Yoshikawa M, Ko S, Iinuma M, Kubo M 1998. Antinociceptive and antiinflammatory activities of evodiamine and rutaecarpine. *Nat Med*. 1998;52: 203-208.

McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet*. 2005 May 28-Jun 3;365(9474):1877-89.

Mellinghoff IK, Tran C, Sawyers CL. Growth inhibitory effects of the dual ErbB1/ErbB2 tyrosine kinase inhibitor PKI-166 on human prostate cancer xenografts. *Cancer Res*. 2002 Sep 15;62(18):5254-9.

Mhaske SB, Narshinha P, Argade NP. The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. *Tetrahedron*. 2006;62(42):9787-826.

Mudd JO, Kass DA. Reversing chronic remodeling in heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007 May;5(3):585-98.

Nicolaou KC, Vourloumis D, Winssinger N, Baran PS. The Art and Science of Total Synthesis at the Dawn of the Twenty-First Century. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2000 Jan;39(1):44-122.

Norman P. (2007) Kinase therapeutic pipelines: an assessment of targets and agents in development. *Insight Pharma Reports* (www.insightpharmareports.com/reports/2007/90_Kinase_Inhibitors/overview.asp)

Nowakowski J, Cronin CN, McRee DE, Knuth MW, Nelson CG, Pavletich NP, et al. Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure* 2002;10:1659–67.

Okram B, Nagle A, Adrián FJ, Lee C, Ren P, Wang X et al. A general strategy for creating “inactive-conformation” abl inhibitors. *Chem Biol.* 2006 Jul;13(7):779-86.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet.* 2006 Jan 28;367(9507):356-67.

Osherov N, Levitzki A. Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem.* 1994 Nov 1;225(3):1047-53.

Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003;116:1409–16.

Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci.* 2004;1(2):101-115.

Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrín S, Mayor F Jr. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2006 Jan;69(1):46-56.

Peng X, Guan JL. Focal Adhesion Kinase: from In vitro Studies to Functional Analyses in vivo. *Curr Protein Pept Sci* 2001;12:52–67.

Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A et al. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 2006 Jan;116(1):217-27.

Pham CG, Harpf AE, Keller RS, Vu HT, Shai SY, Loftus JC, et al. Striated musclespecific beta(1D)-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2916–26.

Pokharel S, Sharma UC, Pinto YM. Left ventricular hypertrophy: virtuous intentions, malign consequences. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Jun;35(6):802-6.

Pytel D, Sliwinski T, Poplawski T, Ferriola D, Majsterek I. Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009 Jan;9(1):66-76.

Rewcastle GW, Denny WA, Showalter HDH. Synthesis of 4-(phenylamino)pyrimidine derivatives as ATP-competitive protein kinase inhibitors with potential for cancer chemotherapy. *Curr Org Chem.* 2000; 4: 679–706.

Ross JJ. Mechanisms of cardiac contraction. What roles for preload, afterload and inotropic state in heart failure? *Eur Heart J.* 1983;4(suppl A):19 –28.

Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc.* 1993 Apr;25(2):2041-3.

Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.* 2000 Mar 24;287(5461): 2204-15.

Sata Y, Krum H. The future of pharmacological therapy for heart failure. *Circ J.* 2010 May;74(5):809-17.

Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5192-5196.

Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 1994;14:1680–8.

Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 2011;123:1007–13.

Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991 Feb;83(2):504-14.

Schaufelberger M, Swedberg K, Köster M, Rosén M, Rosengren A. Decreasing one-year mortality and hospitalization rates for heart failure in Sweden; Data from the Swedish Hospital Discharge Registry 1988 to 2000. *Eur Heart J*. 2004 Feb;25(4):300-7.

Schlaepfer DD, Hunter T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 1996;16:5623–33.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):211-25.

Schwartz PA, Murray BA. Protein Kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chemistry*. 2011 Dec;39(5-6): 192-210.

Shafazand M, Schaufelberger M, Lappas G, Swedberg K, Rosengren A. Survival trends in men and women with heart failure of ischaemic and non-ischaemic origin: data for the period 1987-2003 from the Swedish Hospital Discharge Registry. *Eur Heart J*. 2009 Mar;30(6):671-8.

Sherbenou DW, Druker BJ. Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2067-74.

Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 2000 May;2(5):249-56.

Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2001 Jun;3(3):315-22.

Superti-Furga G, Courtneidge SA. Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays*. 1995 Apr;17(4):321-30.

Tamargo J, López-Sendón J. Novel therapeutic targets for the treatment of heart failure. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Jun 24;10(7):536-55. doi: 10.1038/nrd3431.

Taylor JM, Rovin JD, Parsons JT. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2000 Jun 23;275(25):19250-7.

Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1998 May 5;97(17):1708-15.

Tilley DG. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circ Res.* 2011 Jul 8;109(2):217-30.

Tiseo M, Loprevite M, Ardizzoni A. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new prospective in the treatment of lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2004 Mar;4(2):139-48.

Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W Jr, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):140-7.

Traxler P, Allegrini PR, Brandt R, Brueggen J, Cozens R, Fabbro D et al. AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* 2004 Jul 15;64(14):4931-41.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997 Oct 30;389(6654):990-4.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990 Apr 20;61(2):203-12.

Undheim, K.; Benneche, T. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; (Eds.: Gilchrist, T. L., Gribble, G. W.); Pergamon Press; Oxford, Vol. 11, 1999, p 21.

Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2001 Mar;141(3):334-41.

Vansteenkiste J. Gefitinib (Iressa(R)): a novel treatment for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4:5-17.

Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Levy D. Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1997 May 8;336(19):1350-5.

Vatner SF. Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1988 Sep 9;62(8):94E-98E.

Via MC. (2007) Monoclonal antibodies: pipeline analysis and competitive assessment.

Insight

Pharma

Reports

(www.insightpharmareports.com/reports/88_Monoclonal_Antibodies/overview.asp).

Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist*. 2003;8(6):531-538.

Wang HB, Dembo M, Hanks SK, Wang Y. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11295-300.

Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*. 1997 Dec 2;96(11):4065-82.

Weinstein SL, Gold MR, DeFranco AL. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 15;88(10):4148-52.

Weis SM, Lim ST, Lutu-Fuga KM, Barnes LA, Chen XL, Göthert JR et al. Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *J Cell Biol*. 2008 Apr 7;181(1):43-50.

Wissner A, Berger DM, Boschelli DH, Floyd MB Jr, Greenberger LM, Gruber BC et al. 4-Anilino-6,7-dialkoxyquinoline-3-carbonitrile inhibitors of epidermal growth factor

receptor kinase and their bioisosteric relationship to the 4-anilino-6,7-dialkoxyquinazoline inhibitors. *J Med Chem.* 2000 Aug 24;43(17):3244-56.

Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 1999 May-Jun;82(2-3):241-50.

World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks [online]. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf (2009).

Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jan;9(1):28-39.

Zsila F, Fitos I, Bencze G, Kéri G, Orfi L. Determination of human serum alpha1-acid glycoprotein and albumin binding of various marketed and preclinical kinase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2009;16(16):1964-77.



UNICAMP



CEUA/Unicamp

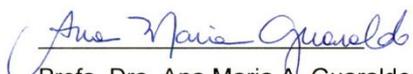
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

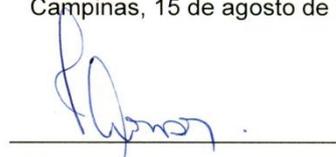
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Utilização farmacológica de um composto derivado de quinazolina como inibidor potencial da FAK no processo de hipertrofia cardíaca em camundongos" (protocolo nº 2510-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini / Leandro Cardoso, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de agosto de 2011.

Campinas, 15 de agosto de 2011.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>