

PRISCILA PEREZ DOMINGOS

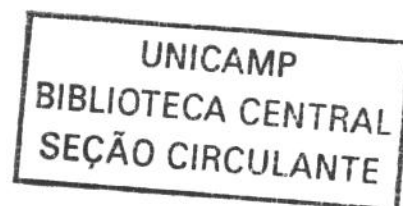
**“SINALIZAÇÃO CELULAR DURANTE AUMENTO DE
TENSÃO NO CORAÇÃO: IMPLICAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO DE HIPERTROFIA CARDÍACA.
ESTUDOS EM CORAÇÕES ISOLADOS”**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da aluna PRISCILA PEREZ DOMINGOS

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

CAMPINAS

2002



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

200305912

PRISCILA PEREZ DOMINGOS

**“SINALIZAÇÃO CELULAR DURANTE AUMENTO DE
TENSÃO NO CORAÇÃO: IMPLICAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO DE HIPERTROFIA CARDÍACA.
ESTUDOS EM CORAÇÕES ISOLADOS”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2002

UNIDADE	80
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	D 713A
V	EX
TOMBO BC/	52344
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

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

CM00179765-2

BIB ID 279808

D713s

Domingos, Priscila Perez

“Sinalização celular durante aumento de tensão no coração: implicações no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Estudos em corações isolados” / Priscila Perez Domingos. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Kleber Gomes Franchini

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

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

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

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

Kleber Franchini

Membros:

1. Professor Doutor Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Leonardo Antonio Mamede Zornoff

2. Professor Doutor José Butori Lopes de Faria

J. Butori

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data:05.02.2002

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho com muito amor aos meus pais
Jesus e Regina , meus irmãos Cristiane e Heriston e
aos meus sobrinhos Felipe, Gustavo, Bruno e Tiago.*

Obrigada por tudo!

À Deus, por iluminar sempre o meu caminho e minhas decisões.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pelo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho, e pela oportunidade de participar da sua equipe de pesquisa.

À valiosa colaboração do laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, auxiliando na realização desse trabalho, bem como em qualquer dificuldade surgida.

Ao Departamento de Clínica Médica, por me acolher durante esse período e pelo auxílio prestado.

Ao Departamento de Farmacologia pela colaboração à realização da técnica desse trabalho.

Ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental pela realização de parte experimental desse trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e ao Dr. Mário José Abdalla Saad, pela colaboração e acolhida durante os experimentos.

À todos os funcionários e amigos que colaboraram com os experimentos, pela imensa ajuda, atenção e carinho dispensados nesses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro à esse estudo.

Aos amigos Adriana Torsoni, Águeda Zaratini, Cláudia Raquel Costa, Cristina Arantes, Emiko, Fernanda Alvares, Leda Márcia Bento, Lília, Luciana Bertozzo, Mirian Ueno, Paula Belline, Priscila Fonseca, Renata Romanezi, Rodrigo Marim, Rosa Tambascia, Rosana Yuri, Rosângela Bezerra, pelo carinho e apoio durante esses anos de convivência.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a obtenção desse trabalho, meu muito obrigada!

Seja otimista!

Procure subir, e espere sempre que o melhor lhe aconteça. Embora as aparências sejam contrárias, confie em Deus, que está dentro de você, porque n`Ele existe a solução de todos os seus problemas. Olhe para o lado certo da vida, para a felicidade e o progresso, e não detenha jamais sua subida.

Seja otimista, e há de vencer!

	PÁG
RESUMO.....	<i>xiii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4. RESULTADOS.....	45
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	68
7. SUMMARY.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9. ANEXO (Artigo aceito “American Journal of Physiology”.).....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	átrio esquerdo
ANF	fator natriurético atrial
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
Ca^{++}	cálcio
CaCl_2	cloreto de cálcio
DAB	solução reveladora diamino benzina
DTT	ditiotreitól
dP/dt	derivada da pressão em relação ao tempo
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF	fator de crescimento epidermal
ϵ	espessura
ERKs	quinases reguladoras da sinalização extracelular
Fak	quinase de adesão focal
FC	frequência cardíaca
FGF2	fibroblast growth factor
Gd^{+3}	gadoline
GH	hormônio de crescimento
Grb2	proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
GTP	guanosina trifosfato
$\text{G}\alpha_q$	efetor imediato do receptor $\alpha 1$ -adrenérgico

H/E	hematoxilina/eosina
HCl	ácido clorídrico
HCO ₃	bicarbonato
H ₂ O _d	água destilada
H ₂ O ₂	água oxigenada
IB	immunoblotting
iECA	enzima conversora de angiotensina I
IGF-I	insulin growth factor- I
IP	imunoprecipitado
K ⁺	potássio
KCl	Cloreto de potássio
KD	quilo Dalton
Na ⁺	sódio
NaCl	cloreto de sódio
MAPK	quinase ativadora da atividade mitogênica
MgSO ₄	sulfato de magnésio
O ₂	oxigênio
P	pressão
PBS	tampão salina fosfato
PD	pressão diastólica
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
p-Erk1/2	fosfo-Erk1/2
PKC	proteína quinase dependente de cálcio
PI 3-K	fosfatidilinositol 3 quinase

PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
pp 185	proteína de aproximadamente 185 Kda
PS	pressão sistólica
PYK2	proteína tirosina quinase
R	raio da câmara
Raf	serina quinase citoplasmática ativada pelo Ras e ativadora das MAPKs
Ras	proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação na regulação do metabolismo e crescimento celular
Rho	GTPase de baixo peso molecular, membro da família Ras
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RTK	receptor tirosina quinase
SDS-PAGE	sódio dodecil-sulfato-gel de poliacrilamida
SH2	segunda homologia ao Src
SH3	terceira homologia ao Src
Src	quinases relacionadas ao oncogene do sarcoma de Roux
T	tensão
TGF- β	tumor growth factor (fator de crescimento para necrose tumoral)
Thr	treonina
TNF- α	tumor necrosis factor
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano
Tyr	tirosina
VE	ventrículo esquerdo
α Py	anti-fosfotirosina

	PÁG
Tabela 1: Variáveis hemodinâmicas.....	48
Tabela 2: Variáveis hemodinâmicas com diferentes concentrações de cálcio.....	59

	PÁG
Figura 1: Mecanismos responsáveis pelo crescimento celular.....	30
Figura 2: Sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda.....	35
Figura 3: Curva de pressão ventricular de corações submetidos a aumentos de pressão diastólica.....	46
Figura 4: Relação pressão diastólica/pressão sistólica do ventrículo esquerdo.....	47
Figura 5: Efeito da sobrecarga mecânica na fosforilação em tirosina da Fak.....	49
Figura 6: Exemplos representativos de experimentos de associação Fak/Src e Fak/Grb2.....	50
Figura 7: Exemplos representativos da quantidade de Erk1/2.....	51
Figura 8: Co-localização da Fak e Erk1/2 nos sítios sarcoplasmático e sarcolemal.....	52
Figura 9: Valores médios dos diâmetros dos cardiomiócitos.....	53
Figura 10: Efeito do estiramento sobre a fosforilação em tirosina da Fak.....	55
Figura 11: Exemplos representativos de blots com anti-Fak e anti-Src e anti-Grb2.....	56
Figura 12: Exemplo representativo de blot com anti-Fak e anti-fosfo-Erk1/2.....	57
Figura 13: Pressões sistólicas de corações perfundidos com concentrações crescentes de cálcio.....	58
Figura 14: Exemplo representativo de blot com anti-Fak e anti-fosfotirosina.....	60
Figura 15: Exemplo representativo de blot com anti-Fak e anti-Grb2.....	61



RESUMO

Fundamentação: O estímulo mecânico é o principal fator responsável pela indução de crescimento celular hipertrófico em miócitos cardíacos em condições de sobrecarga hemodinâmica. Dados experimentais disponíveis indicam que este efeito do estiramento mecânico se faz através da ativação de mecanismos que envolvem múltiplas vias de transdução e sinalização celular, que, por sua vez, regulam a expressão de um conjunto complexo de genes responsáveis pelas alterações fenotípicas dos miócitos cardíacos. Evidências mais recentes indicam que o estímulo mecânico é percebido e traduzido em sinais bioquímicos através de sítios especializados constituídos por proteínas transmembrana conhecidas como integrinas que conectam a matriz extracelular à rede do citoesqueleto. Em miócitos cardíacos, existem estruturas semelhantes, que conectam a linha Z do sarcômero à matriz extracelular através de integrinas. Esta estrutura estabelece ligação através da qual o estímulo mecânico pode ser transferido da matriz extracelular para as organelas, sarcômero e núcleo do miócito cardíaco.

Além disso, várias moléculas de sinalização são imobilizadas e têm suas funções dependentes da ancoragem ao citoesqueleto, estabelecendo a base física para a transdução mecano-bioquímica. Dentre as várias moléculas de sinalização envolvidas na sinalização celular mediada pelas integrinas, a quinase de adesão focal tem sido das mais estudadas, porque evidências experimentais indicaram que esta enzima tem função central nos efeitos celulares resultantes da ativação de integrinas. A ativação da Fak por estímulos mecânicos foi demonstrada em miócitos cardíacos em cultura e em miocárdio de corações intactos de gatos e ratos. Em estudos anteriores demonstramos que o estímulo mecânico ativa precocemente a Fak, bem como um complexo de sinalização associado a esta enzima. A relação estreita entre a carga mecânica e a associação Fak/Src, Fak/PI-3 Kinase/ Grb2 e a ativação simultânea da Erk1/2 indicaram que este complexo pode contribuir para a resposta miocárdica à sobrecarga mecânica.

Objetivo: O presente estudo foi planejado para avaliar a influência do estímulo mecânico na ativação da Fak em corações isolados. Além disso, a ativação da Erk1/2, um efetor da Fak foi estudada com anticorpos fosfo-específicos para Erk1/2. A importância relativa da tensão passiva/ estiramento e atividade contrátil na ativação da Fak e Erk1/2 pelo estímulo mecânico foi avaliada em corações paralizados com solução cardioplégica

em corações perfundidos com diferentes concentrações de cálcio, respectivamente. Além disso, as localizações da Fak e Erk1/2 nos miócitos cardíacos foram confirmadas pela análise por imunohistoquímica de cortes histológicos do miocárdio.

Resultados: Aumentos na pressão diastólica de ~ 0 até 15 mmHg aumentou rapidamente a fosforilação em tirosina da Fak (2,3 vezes), associação Fak/c-Src (2,8 vezes) e Fak/Grb2 (3,6 vezes). Estes resultados foram acompanhados por ativação da Erk1/2 (2,8 vezes) e aumentam a associação Fak/Erk1/2. Tanto a Fak como a Erk1/2 foram detectadas no sarcoplasma dos miócitos cardíacos, mas a Erk1/2 foi também encontrada nos núcleos de miócitos cardíacos. Estiramento do ventrículo esquerdo provocado por aumento da pressão da cavidade em corações perfundidos com solução cardioplégica provocaram ativação da Fak e Erk1/2 de maneira similar àquelas observadas em corações com batimento espontâneo. Contudo, aumentos na atividade contrátil induzida por cálcio não foram acompanhados de ativação da Fak ou Erk1/2 no miocárdio. De maneira geral, estes achados demonstraram que o estiramento mecânico e não a atividade contrátil é responsável pela ativação da Fak e da Erk1/2 durante sobrecargas mecânicas.

Conclusões: Nossos resultados acrescentaram informação sobre a ativação da Fak pelo estímulo mecânico. A demonstração de que o estiramento ou tensão passiva e não aumentos na atividade contrátil ativaram a Fak e seu efector Erk1/2 é compatível com a hipótese de que a ativação da Fak pelo estímulo mecânico pode estar ligada à ativação do complexo integrina/citoesqueleto.



1. INTRODUÇÃO

O coração adapta-se a condições de sobrecargas hemodinâmicas agudas e crônicas através de ajustes funcionais e estruturais. Situações de sobrecarga aguda são compensadas através da ativação do mecanismo de Frank-Starling e/ou através do recrutamento de mecanismos neuro-humorais que resultam em aumento da contratilidade. Apesar de eficientes em curto-prazo, estes mecanismos são limitados quando as sobrecargas são prolongadas, seja por sua adaptação, seja pelo fato de serem deletérios à função contrátil do miocárdio quando sustentados, como é o caso dos ajustes inotrópicos mediados por mecanismos neuro-humorais. Desta forma, em situações de sobrecarga hemodinâmica prolongada, os ajustes funcionais dão lugar a ajustes estruturais que implicam em aumento da massa miocárdica que assume, nesta condição, papel fundamental para a normalização da função cardíaca.

O aumento de massa miocárdica, decorrente de sobrecarga hemodinâmica é observado em quase todas as doenças que acometem o coração primária ou secundariamente. Como mecanismo adaptativo, segue a Lei de Laplace, na qual, a tensão ou carga no miocárdio é proporcional à relação $PXR/2e$ (P =pressão intracavitária, R =raio cavitário, e = espessura da parede) (COOPER, 1987; OPEIE, 1992). Assim, em situações de sobrecarga causada por aumento de pressão ou, por aumento do raio da cavidade, como nas sobrecargas volumétricas ou infarto do miocárdio, o aumento na tensão pode ser compensado por aumento na espessura relativa ou absoluta da parede ventricular.

Do ponto de vista histo-morfológico, em corações hipertróficos são encontrados fundamentalmente aumentos nas dimensões dos cardiomiócitos, sem alteração significativa em seu número, por serem os mesmos células terminalmente diferenciadas (BUGAISKY et al., 1992; CARO et al., 1978). No entanto, com frequência variável, dependendo do tempo de evolução, intensidade do distúrbio hemodinâmico e tipo de doença primária, são também encontradas degeneração dos cardiomiócitos e proliferação do estroma conjuntivo miocárdico (CARO et al., 1978). Sugere-se que, estas alterações, são responsáveis pela maior morbidade e mortalidade dos portadores de hipertrofia cardíaca (GUNTHER & GROSSMAN, 1979).

Independente da causa, a hipertrofia dos cardiomiócitos acompanha-se de reprogramação complexa de genes, incluindo-se aspectos quantitativos como o aumento de unidades sarcoméricas e enzimas mitocondriais e qualitativos, como a re-expressão de genes fetais, dentre os quais, genes que modificam a composição e regulação da unidade motora, genes que modificam o metabolismo energético e genes que codificam componentes de vias hormonais (e.g. fator natriurético atrial e enzima conversora da angiotensina) (VANDERBURGH, 1992; MORGAN & BAKER, 1991).

Alguns dos aspectos fundamentais sobre o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos e hipertrofia cardíaca ainda pouco conhecidos são os mecanismos pelos quais as sobrecargas hemodinâmicas ativam eventos bioquímicos nos cardiomiócitos, bem como as vias de sinalização celular envolvidas na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento de hipertrofia dos cardiomiócitos.

NATUREZA DO ESTÍMULO

Existem evidências clínicas e experimentais que relacionam quantitativamente a sobrecarga hemodinâmica crônica com o grau de hipertrofia (GROSSMAN, JONES, McLAURIN, 1975; SIMPSON et al., 1989). O estímulo mecânico pode ser suficiente para produzir todas as características do fenótipo de hipertrofia. No entanto, fatores de natureza neural, autócrina/parácrina, hormonal e genética podem contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

Estímulo mecânico. Os efeitos mecânicos da sobrecarga hemodinâmica se fazem sentir no miocárdio através de aumento de tensões sistólica e diastólica que se refletem em aumento de tensão e estiramento dos cardiomiócitos, fibroblastos e matriz extracelular (GROSSMAN, JONES, McLAURIN, 1975; COOPER, 1997; FLORENZANO & GLANTZ, 1993; NGUYEN, CHAGAS, GLANTZ, 1993; OMENS, 1998). Estas variáveis mecânicas podem ativar mecanismos de crescimento celular em cardiomiócitos sobrecarregados. Por outro lado, aumento do trabalho cardíaco provocado por sobrecarga também aumenta a demanda de energia que, por sua vez, pode governar o crescimento celular (COREA, BENTIVOGLIO, VERDECCHIA, 1983). No entanto, a existência deste mecanismo aguarda confirmação.

A relação entre o estímulo mecânico e o crescimento hipertrófico do miocárdio é indicada pela correlação entre a massa do ventrículo esquerdo e os níveis de pressão em valvulopatas e hipertensos (MORGAN & BAKER, 1991; SPANN et al., 1980). Em estudos experimentais esta relação é ainda mais evidente. Dentre os estudos que indicaram a relação entre estímulo mecânico e o crescimento hipertrófico dos miocárdios merece destaque um estudo realizado em gatos submetidos a bandagem da artéria pulmonar. Foram comparados os efeitos da sobrecarga hemodinâmica em músculos papilares desinseridos da parede ventricular direita em uma das extremidades com aqueles normalmente inseridos e, portanto, sujeitos às forças do miocárdio ventricular direito. Os efeitos do simpático foram eliminados por desnervação do ventrículo direito ou por bloqueio duplo α e β -adrenérgico. Constatou-se que a área de secção transversal dos cardiomiócitos apresentou correlação estreita com a carga mecânica no músculo papilar, efeito não influenciado pela desnervação ou bloqueio simpático farmacológico. Esses resultados indicaram que o crescimento hipertrófico do miocárdio depende das condições de carga local no músculo cardíaco e não da carga global imposta ao coração ou de fatores circulantes que pudessem afetar de maneira indistinta os cardiomiócitos de todo o coração (OMENS, 1998).

Outras evidências de que o estímulo mecânico, na ausência de fatores neurais ou hormonais é o principal determinante das respostas hipertróficas do miocárdio foram obtidas em estudos que utilizaram corações isolados submetidos a aumentos na pressão intraventricular (MANN, KENT, COOPER (1989); XENOPHONTOS, GORDON, MORGAN (1986), músculos papilares estirados in vitro (VON HARSDORF et al., 1989) e miócitos isolados em cultura submetidos a estiramento (PETERSON & LESCH, 1972; KOMURO et al., 1990). Nestas condições, o estímulo mecânico é suficiente para determinar o fenótipo morfológico e molecular de hipertrofia (SPANN et al., 1980; SIMPSON, Mc GRATH, SAVION, 1982; IZUMO & SADOSHIMA, 1997; KOMURO et al., 1996; YAMAZAKI et al., 1998; PENNICA et al., 1995). Portanto, as evidências disponíveis permitem a conclusão de que o estímulo mecânico é suficiente para desencadear o processo de hipertrofia e a reprogramação gênica associada ao processo de hipertrofia dos miócitos cardíacos.

Estímulo simpático: A contribuição do sistema nervoso simpático para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca continua motivo de controvérsia. O conceito de que a atividade simpática modula a hipertrofia miocárdica foi estabelecido à partir de estudos nos quais a administração de catecolaminas em doses subpressoras induziu ao aparecimento de hipertrofia ventricular esquerda (KENT et al., 1985; ALDERMAN & HARRISON, 1970; LAKS, MORADY, SWAN, 1973; KING et al., 1987). Deve-se salientar, no entanto, que na maioria desses estudos, causas hemodinâmicas outras que não a pressão arterial não foram completamente excluídas como determinantes do crescimento hipertrófico. Fatores como contratilidade miocárdica, frequência cardíaca, volemia e mesmo a pressão arterial medida em longo-prazo foram alterados pela infusão de catecolaminas ou não foram monitoradas nos vários estudos. Alterações nestas variáveis poderiam justificar o aparecimento de hipertrofia. Outras evidências para a participação do simpático no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca são o paralelismo entre a atividade simpática e a hipertrofia miocárdica em algumas condições experimentais (PATEL et al., 1991; OSTMAN, 1981) e clínicas (LINDPAINTER & SEM, 1985) e o efeito de regressão da hipertrofia provocado por intervenções simpatolíticas (COREA et al.; 1983; SEM et al., 1974). Da mesma forma, estas intervenções afetam parâmetros hemodinâmicos que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, não permitindo conclusão sobre um efeito direto da atividade simpática no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Devem ainda serem mencionados os estudos que demonstraram desenvolvimento de hipertrofia em modelos onde o simpático foi eliminado cirúrgica ou farmacologicamente (MANN, KENT, COOPER, 1989).

Investigações conduzidas em cardiomiócitos de ratos neonatos são mais consistentes em relação à indução de fenótipos característicos de hipertrofia por catecolaminas (PETERSON & LESCH, 1972). Estas células apresentam aumento da síntese protéica, crescimento e expressão de α -actina esquelética e β -MHC após exposição ao isoproterenol ou norepinefrina (SIMPSON, 1985; HUNTER, GRACE, CHIEN, 1999; FERNANDES et al., 1976, FINK et al., 2000). Esta resposta é dependente da estimulação α -adrenérgica e mediada pelo subtipo α_{1A} de receptor (SIMPSON & Mc GRATH, 1983). No entanto, a relevância de estudos em cardiomiócitos de animais neonatos é questionável em virtude de suas diferenças fenotípicas com as células de animais adultos. Em estudos

que utilizaram cardiomiócitos obtidos de animais adultos (KNOWLTON et al., 1993; FULLER et al., 1990; SCHLUTER & PIPER, 1992; DECKER et al., 1993) os resultados são conflitantes. Em pelo menos um dos estudos realizados com este tipo celular não se conseguiu demonstrar efeito de crescimento após tratamento com agente α -adrenérgico (MANN, KENT, COOPER; 1986).

Mais recentemente, o efeito da atividade simpática sobre o crescimento hipertrófico do miocárdio foi explorado em modelos de camundongos transgênicos (PINSON et al., 1993). Os resultados destes estudos também são conflitantes. Camundongos que expressam uma forma constitutivamente ativa de receptor α_{1B} , especificamente no coração, apresentam aumento da razão do peso do coração pelo peso corporal (~20%), aumento da área de secção transversal dos miócitos (~60%) e da quantidade de mRNA do fator natriurético atrial. Nestes animais a pressão arterial foi semelhante à dos camundongos controle. Estes resultados indicam que a sinalização contínua induzida pelo receptor α_{1B} pode induzir à hipertrofia ventricular esquerda independente de qualquer fator hemodinâmico. Esta situação, no entanto, também é artificial, já que situações de hiperatividade adrenérgica se acompanham de dessensibilização dos receptores adrenérgicos e não de aumento de sua atividade. Além disso, em modelo onde a forma natural do receptor α_{1B} (tipo selvagem) foi super-expressa não ocorreu hipertrofia cardíaca, apesar de ter ocorrido aumento na produção de mRNA do ANF (MILANO et al., 1994). Por outro lado, a expressão de $G_{\alpha q}$, o efector imediato do receptor α_1 -adrenérgico, resultou também em aumento do peso do coração, área do miócito e expressão de genes típicos da resposta hipertrófica (AKHTER et al., 1997). Estes efeitos somente foram observados em animais com níveis bastante elevados de $G_{\alpha q}$. Nestes animais ocorreu simultaneamente, depressão marcante da função miocárdica ou falência cardíaca. Esses resultados indicam que os efeitos observados na massa miocárdica, dimensões dos miócitos cardíacos e re-expressão de genes fetais poderiam dever-se à sobrecarga hemodinâmica imposta pela falência cardíaca induzida pela ativação permanente de vias adrenérgicas intracelulares e não a um efeito hipertrófico direto da mesma.

Portanto, as evidências experimentais disponíveis ainda não permitem uma conclusão definitiva sobre a importância do simpático no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca por sobrecarga hemodinâmica. Deve-se salientar que, apesar de ser duvidosa a participação do simpático no processo de hipertrofia, o mesmo não pode ser dito quanto a sua importância no processo de deterioração da função em corações hipertrofiados.

Ativação do sistema renina-angiotensina: O interesse pelo envolvimento do sistema renina angiotensina no desenvolvimento da hipertrofia ventricular iniciou-se após estudos clínicos e experimentais que demonstraram que o tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina I (iECA) reduz o crescimento hipertrófico e o remodelamento das câmaras cardíacas em pacientes hipertensos e com cardiopatia isquêmica ou em modelos de animais hipertensos e com infarto do miocárdio (FOUAD – TARAZI et al., 1992). Apesar de este efeito poder ser dependente de redução da carga hemodinâmica imposta ao coração, a contribuição do sistema renina-angiotensina para a hipertrofia ventricular também é apoiada pela constatação de que a angiotensina II ativa o crescimento de cardiomiócitos e que no miocárdio são expressos todos os elementos do sistema, sendo possível sua produção e regulação local (PFEFFER et al., 1995).

Experimentalmente, tratamento de ratos com coarctação da aorta com inibidor da enzima conversora ou bloqueador de receptor AT1 previniram ou causaram regressão da hipertrofia ventricular esquerda (SUZUKI et al., 1993; BRUCKSCHLEGEL et al., 1995; BAKER et al., 1992). No entanto, tratamento com hidralazina nos mesmos estudos também impediu o aparecimento de hipertrofia cardíaca, indicando que redução na carga hemodinâmica e não um bloqueio específico do sistema renina-angiotensina é o responsável pelo fenômeno de regressão ou impedimento do aparecimento da hipertrofia neste modelo.

Por outro lado, os vários elementos do sistema renina-angiotensina cardíaco são ativados durante condições de sobrecarga hemodinâmica (PFEFFER et al., 1995; KOJIMA et al., 1994; SCHUNKERT et al., 1990; BAKER et al., 1992), o que poderia indicar sua contribuição para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. As expressões de mRNA de angiotensinogênio, renina, ECA e receptor de angiotensina II estão aumentadas em modelos de sobrecarga pressora, bem como a quantidade de ECA, AT₁ e a porcentagem de miócitos contendo renina, angiotensina I e angiotensina II (SHIOJIMA et al., 1994).

Em cardiomiócitos de ratos neonatos, o estiramento cíclico acelera a expressão de angiotensinogênio, renina e ECA (ZHANG et al., 1995; SHYU et al., 1995; MALHOTRA, SADOSHIMA, IZUMO; 1994) e causa aumento de cerca de 100 vezes na concentração de angiotensina II no meio de cultura (SADOSHIMA & IZUMO, 1993). Assim, supõe-se que o estiramento cause liberação parácrina/autócrina de angiotensina II que, por sua vez, induziria o crescimento celular. Esta idéia é fortalecida pelos resultados de estudos que mostraram que o tratamento de cardiomiócitos de ratos neonatos com inibidores do receptor AT₁ inibe o aparecimento dos marcadores de hipertrofia induzidos pelo estiramento (SADOSHIMA & IZUMO, 1993; SADOSHIMA et al., 1993).

Estudos em camundongos geneticamente modificados não apresentaram, até o momento, resultados que indiquem a participação do sistema renina-angiotensina no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por sobrecarga hemodinâmica. Em camundongos “knockout” para o receptor AT₁ da angiotensina II (YAMAZAKI et al., 1995), a bandagem da aorta produziu hipertrofia ventricular esquerda semelhante àquela observada em animais controle, indicando que estímulos provenientes da ativação dos receptores AT₁ não são fundamentais para o desenvolvimento da hipertrofia por sobrecarga pressora em animais intactos.

Fatores parácrinos/autócrinos: Outros fatores parácrinos/autócrinos além do sistema renina-angiotensina cardíaco são considerados importantes para o estabelecimento da hipertrofia miocárdica. O envolvimento de fatores como FGF2 (“fibroblast growth factor”), IGF-I (“insulin growth factor-I”), TNF- α (“tumor necrosis factor”), interleucina 1 β e endotelina têm sido estudados em corações intactos e em cardiomiócitos isolados (HARADA et al., 1998; PARKER et al., 1990; BOGOYEVITCH et al., 1994; HARDER et al., 1996; KAYE et al., 1996; HEFTI et al., 1997; TONITA et al., 1997). De maneira geral, as evidências sobre a participação destes fatores no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por sobrecarga hemodinâmica são baseadas em demonstrações de que os mesmos são produzidos no miocárdio em situações de sobrecarga e também que induzem à expressão de fenótipos estruturais e moleculares de hipertrofia quando administrados a animais ou cardiomiócitos isolados. Aumentos do mRNA para o IGF-I e TGF- β foram observados em miócitos isolados de corações submetidos a sobrecarga pressora

(SCELNOWITZ et al., 1998). Em miócitos cardíacos de ratos adultos submetidos a estímulo elétrico e a estímulo mecânico, o aparecimento de fenótipo de hipertrofia foi acompanhado de aumento de FGF2 no meio de cultura (HARDER et al., 1996). A resposta hipertrófica neste modelo foi bloqueada por anticorpo específico contra FGF2. Outras evidências indicando a contribuição do FGF para a hipertrofia cardíaca são baseadas nos efeitos da infusão sistêmica em animais e tratamento de cardiomiócitos em culturas com FGF. A adição de FGF2 em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos altera o perfil de expressão das proteínas contráteis para o padrão de expressão de genes fetais (HARADA et al., 1998). No entanto, a administração crônica de FGF2 em ratos com infarto do miocárdio não se correlacionou com o desenvolvimento de hipertrofia (SCHEINOWITZ et al., 1998; CORDA et al., 1997). Portanto, apesar de ser possível a participação destes fatores parácrinos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, sua contribuição permanece indefinida.

Fatores genéticos: Além dos fatores extrínsecos representados pela carga hemodinâmica e ação de fatores neuro-endócrinos e parácrinos/autócrinos, considera-se que fatores genéticos podem contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. A natureza desta contribuição é ainda pouco conhecida. Em pelo menos uma condição, a cardiomiopatia hipertrófica familiar, onde a hipertrofia cardíaca é a doença em si, a herança é autossômica dominante e em anos recentes, demonstrou-se que mutações em vários genes codificadores de proteínas sarcoméricas são responsáveis pela doença (SCHEINOWITZ et al., 1998). O mecanismo pelo qual as mutações em proteínas sarcoméricas causa a hipertrofia não está esclarecido. No entanto, poderia dever-se a um efeito dominante negativo, i.e. as proteínas mutadas poderiam se comportar como peptídeos bloqueadores interferindo com a função das outras proteínas sarcoméricas ou produzindo um desbalanço estequiométrico das proteínas sarcoméricas devido à falência do sarcômero de incorporar regularmente as proteínas mutadas (haploinsuficiência) (NICOL, FREY, OLSON (2000).

Estudos em humanos sugerem que, em indivíduos hipertensos, a hipertrofia cardíaca seja, em parte, determinada por fatores genéticos (THIERFELDER et al., 1994; POST et al., 1997). Por exemplo, filhos normotensos de pais hipertensos têm massa ventricular esquerda maior que filhos de pais normotensos (VERHAAREN et al., 1991).

Resultados de estudos em gêmeos reforçam a influência da hereditariedade na massa ventricular esquerda (POST et al., 1997). Da mesma forma, a hipertrofia cardíaca é mais importante em negros que em brancos hipertensos, o que pode refletir influências genéticas (RAVOGLI et al., 1990). Em pelo menos um estudo experimental demonstrou-se que a hipertrofia, em decorrência de bandagem da aorta, depende da massa do ventrículo esquerdo anterior à sobrecarga (DUNN et al., 1983). Cães com índice de massa ventricular esquerda maior apresentaram maior hipertrofia e melhor adaptação à sobrecarga pressora que cães com menor índice de massa ventricular esquerda.

Vários estudos de ligação indicaram a existência de influência de alguns *loci* na massa ventricular esquerda de ratos, dependentes e independentes do nível da pressão arterial (KOIDE et al., 1997; CLARK et al., 1996; HAMET et al., 1996; HARRIS et al., 1995; INNES et al., 1998; PRAVENEK et al., 1995). Em nenhum dos casos os genes ligados ao fenótipo hipertrofia foram identificados.

MECANISMOS DE MECANOTRANSDUÇÃO EM MIÓCITOS CARDÍACOS

Como discutido anteriormente, a resposta hipertrófica é dependente, em grande parte, do estímulo mecânico induzido pela sobrecarga hemodinâmica. São conhecidos pelo menos três tipos de mecanismos que podem ser responsáveis pela mecanotransdução em miócitos cardíacos, que incluem canais iônicos sensíveis a estiramento, secreção de substâncias parácrinas/autócrinas e mecanismos de sinalização associados ao complexo integrina/citoesqueleto. Algumas propriedades são necessárias para que uma estrutura ou mecanismo comporte-se como mecanotransdutor: 1) deve existir alguma interação entre esta estrutura e a membrana celular de maneira que a tensão na superfície celular seja percebida; 2) a estrutura deve ser ativada pelo aumento de tensão na membrana e ser capaz de discriminar intensidades diferentes do estímulo mecânico e 3) estar acoplada com mecanismos intracelulares capazes de iniciar eventos em cascata que ativem vias de crescimento celular direta ou indiretamente. Os mecanismos discutidos à seguir preenchem pelo menos parte destes critérios.

Canais sensíveis ao estiramento: Inúmeras evidências (MORRIS, 1990; SACHS, 1991; FRENCH, 1992; SACKIN, 1995; HU & SACHS, 1997; BETT & SACHS, 1997; CAZORLA et al., 1999) indicam a presença de canais iônicos sensíveis a estiramento no miocárdio.

A distorção do canal iônico provocada pelo estímulo mecânico pode iniciar fenômenos elétricos localizados, representados por despolarização ou hiperpolarização da membrana celular. Por outro lado, fenômenos elétricos locais poderiam também ativar enzimas, dando início à mobilização de cascatas de eventos bioquímicos intracelulares.

Estudos com a técnica de “patch-clamp” detectaram vários tipos de canais iônicos sensíveis a estiramento por pressão negativa aplicada por sucção no segmento de membrana aderido à micropipeta. Estes canais incluem canais catiônicos não-seletivos e canais seletivos de K^+ com diferentes condutâncias iônicas (RUKNUDIN, SACHS, BUSTAMANTE (1993); SADOSHIMA et al., 1992). Por outro lado, a entrada localizada de Ca^{+2} através de canais não-seletivos pode despolarizar a membrana e induzir a ativação de mecanismos como a liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2} e ativação enzimática através de proteínas ligantes de Ca^{+2} como a calmodulina, por exemplo.

Também, a abertura de canais catiônicos não-seletivos pode provocar uma corrente de entrada, despolarização e aumento na excitabilidade da membrana (SIGURDSON, RUKNUDIN, SACHS (1992). Apesar de estes canais poderem atuar como elementos de mecanotransdução em miócitos cardíacos, o bloqueio dos mesmos com Gd^{+3} não afeta o aumento de síntese protéica induzidos por estiramento em cardiomiócitos, sugerindo que canais sensíveis a estiramento que são inibidos pelo Gd^{+3} não estão envolvidos nas respostas hipertróficas induzidas por estiramento (SADOSHIMA et al., 1992).

No entanto, o estímulo mecânico pode afetar grande variedade de canais iônicos e correntes no coração, como canais K^+ -ATP (VAN WAGONER, 1993), canal de K^+ retificador de corrente (SASAKI, MITSUIYE, NOMA (1992), canais de Cl^- (HAGIWARA et al., 1992), canais de Ca^{+2} tipo L (MATSUDA et al., 1996) e corrente gerada pela bomba Na^+/K^+ (SASAKI et al., 1994). Por outro lado, sugere-se que canais sensíveis a estiramento podem interagir com o citoesqueleto e, portanto, serem intrinsecamente sensíveis ao estiramento celular (HAMIL & McBRIDE, 1992; SOKABE & SACHS, 1992).

Ainda, alguns canais podem ser ativados secundariamente por outros segundo mensageiros e provocar aumento na concentração intracelular de Ca^{+2} (SASAKI, MITSUIYE, NOMA (1992).

Apesar de todas as evidências indicando a presença de canais sensíveis a estiramento em miócitos cardíacos, o vínculo dos mesmos com mecanismos de sinalização e crescimento celular necessita confirmação.

Secreção de fatores parácrinos/autócrinos induzida por estiramento:

A liberação de fatores autócrinos e parácrinos por ser importantes mecanismos na patogênese de hipertrofia cardíaca induzida por estímulo mecânico (TOMITA et al., 1997).

O estiramento estimula a produção ou secreção de fatores de crescimento que podem mediar o crescimento celular. Há demonstrações de que cardiomiócitos submetidos a estiramento produzem angiotensina II que teria papel fundamental no crescimento de miócitos de ratos neonatos em cultura (HARDER et al., 1996; KAYE et al., 1996; SCHEINOWITZ et al., 1998).

Também há indicações de que a endotelina-1 (BOGOYEVITCH et al., 1994) e FGF, liberados por estiramento podem ser os mediadores do crescimento hipertrófico em cardiomiócitos. Os mecanismos pelos quais o estiramento induz à liberação de fatores autócrinos e parácrinos são desconhecidos mas algumas evidências experimentais apontam para efeito mecânico direto na membrana celular aumentando a permeabilidade aos peptídeos produzidos tanto por cardiomiócitos como por outras células miocárdicas (KAYE et al., 1996).

Sistema integrina/citoesqueleto: De maneira geral, as células aderentes são sensíveis ao seu ambiente mecânico, sendo que forças mecânicas afetam sua função e estrutura (CHICUREL, CHEN, INGBER (1998). Sabe-se que o citoesqueleto, uma malha tridimensional intracelular formada por biopolímeros filamentosos transmite força e tensão para as estruturas intracelulares e, importantemente, muitos dos sistemas sinalizadores intracelulares têm suas moléculas imobilizadas na estrutura sólida desta malha (MANIOTIS, CHEN, INGBER (1997); JANMEY, 1998). Assim, a estrutura deformável do citoesqueleto fornece a base física para a transdução do sinal mecânico em sinal bioquímico conduzido por moléculas sinalizadoras intracelulares.

O citoesqueleto apresenta acoplamento funcional e estrutural com a matriz extracelular através de proteínas transmembrana conhecidas como integrinas e com as demais células através de proteínas componentes dos complexos juncionais como caderinas e anexinas, por exemplo. As integrinas são proteínas sem atividade enzimática definida mas atuam como receptores celulares para o colágeno e também laminina. O estímulo mecânico gera tensão na célula e inicia mecanismos de sinalização celular através de interações entre as integrinas e o citoesqueleto (BURRIDGE & CHZANOWSKA- WODNICKA (1996).

A ativação da sinalização celular por estímulo mecânico via citoesqueleto depende fundamentalmente de agregações das integrinas (“clustering”) que agem como elos entre a matriz extracelular e o citoesqueleto (KORNBERG et al., 1992). As integrinas conectam-se a filamentos de F-actina através de proteínas intermediárias como a vinculina, talina e α -actinina em sítios especializados da membrana celular conhecidos como complexo de adesão focal (BURRIDGE, TURNER, ROMER (1992).

Seguindo-se ao estímulo mecânico, a agregação das integrinas leva a um aumento marcante da fosforilação em tirosina de enzimas como Src e Fak e o recrutamento de várias proteínas celulares sinalizadores pela malha de actina (SCHALLER et al., 1994; BACHELOT et al., 1996; SCHLAEPFER et al., 1994). O mecanismo preciso que estabelece o vínculo entre a agregação da integrina e a ativação da Fak é ainda desconhecido, mas sabe-se que a agregação de integrinas ativa a autofosforilação da Fak no resíduo de Tyr-397 (SADOSHIMA & IZUMO, 1994).

Os complexos de adesão focal são ricos em uma variedade de moléculas sinalizadoras que incluem a Src, fatores trocadores de nucleotídeos (GEF), Ras e MAP quinases (JANMEY ,1998; BURRIDGE & CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996). Após a autofosforilação, resíduos adicionais de tirosina da Fak são fosforilados através da ação da Src que se liga à Fak no resíduo Tyr-397 via sítio de ligação SH2 (KORNBERG et al., 1992; BURRIDGE, TURNER, ROMER (1992). A este fenômeno se segue a ligação de outras proteínas com sítios SH2 como a PI-3- quinase (SCHALLER et al., 1994) e o complexo Grb2/Sos (BACHELOT et al., 1996). Esta ligação de Grb2/Sos na Tyr-925 da Fak ativa a sinalização através da via de crescimento celular Ras/Erk1/2 (SCHLAEPFER & HUNTER, 1997). Dessa forma, são ativados múltiplos componentes associados com a Fak

que, por sua vez, têm papel fundamental nos vários efeitos celulares desencadeados pela ativação do complexo integrina/citoesqueleto (BURRIDGE & CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996).

Os cardiomiócitos possuem estruturas conhecidas como costâmeros que assemelham-se aos complexos de adesão focal detectados em culturas de fibroblastos. Os costâmeros são também estruturas ricas em vinculina, talina, integrina acopladas a uma malha de actina (PARDO, SICILIANO, CRAIG (1983); DANOWSKI et al., 1992; SONODA et al., 1999). Estas estruturas encontram-se situadas na região de membrana próximas às linhas Z. Seu arranjo estrutural, sua localização e sua composição bioquímica sugerem que estas estruturas ancoram-se na matriz extracelular e são responsáveis pela ancoragem lateral do sarcômero ao sarcolema. Estes sítios, como o complexo de adesão focal, podem ser responsáveis pela transdução de forças e iniciar a ativação de mecanismos intracelulares responsáveis pelo crescimento celular (DANOWSKI et al., 1992), como indicado no esquema da figura 1.

Múltiplas isoformas de integrinas são expressas no coração e participam de processos biológicos como regulação do pH intracelular e crescimento hipertrófico (SADOSHIMA & IZUMO, 1994; SEKO et al., 1999; KUPPUSWAMY et al., 1997). Estiramento pulsátil de cardiomiócitos de ratos neonatos ativam a Fak (DANOWSKI et al., 1992). Em estudos recentes (FRANCHINI et al., 2000), determinamos que o estímulo mecânico representado por sobrecarga pressora provocada pela colocação de um clamp ajustável na crossa da aorta produz ativação rápida e duradoura da Fak em miocárdio de ratos. Esta ativação se acompanha de ativação de vias de crescimento celular representadas pela ativação de ERK1/2 e vias de inibição da apoptose, representada pela ativação da AKT. Estes resultados sugerem que a ativação da Fak pode ser um elemento central no mecanismo de resposta a estímulos mecânicos em miocárdio, podendo ser um dos principais responsáveis pelo mecanismo de crescimento hipertrófico do miocárdio durante sobrecarga pressora.

No entanto, vários aspectos importantes deste mecanismo permanecem por serem esclarecidos. Por exemplo, não é ainda conhecida a exata localização da Fak e das proteínas a ela associadas em miócitos cardíacos. Da mesma forma a maneira pela qual as sobrecargas mecânicas provocam a ativação da Fak em miócitos cardíacos não foi ainda investigada.

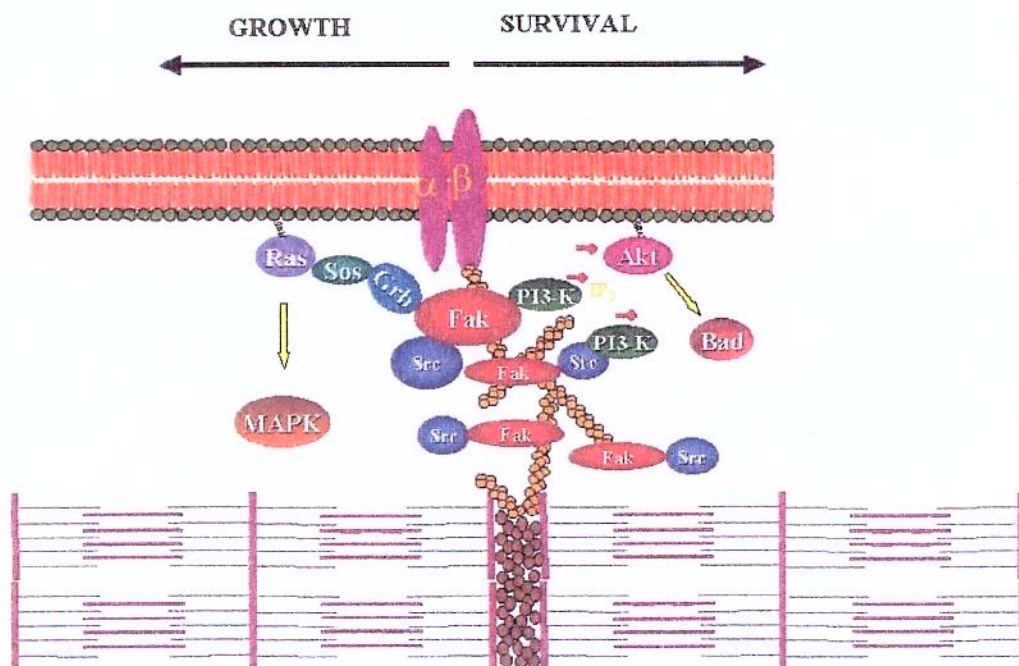


Figura 1: Mecanismos responsáveis pelo crescimento celular



2. OBJETIVOS

O Presente estudo teve como objetivos:

- 1- Determinar o curso temporal e a relação estímulo-resposta da fosforilação em tirosina da *Fak* e associação com Src, *Grb2* e Erk1/2, bem como a ativação da Erk1/2 em corações isolados submetidos a aumentos de tensão diastólica do ventrículo esquerdo.
- 2- Avaliar os efeitos isolados do estiramento e da atividade contrátil sobre a atividade do complexo de sinalização celular associado à Fak em miocárdio de ratos.
- 3- Avaliar a localização da Fak e Erk1/2 nos tipos celulares do miocárdio de ratos.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANTICORPOS E REAGENTES

Anticorpos policlonais de coelho anti-Fak, Grb-2, Src, Erk1/2 e p-Erk1/2 e monoclonal de camundongo anti-fosfotirosina foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). [¹²⁵I]Protein A foi adquirido da Amershan (Aylesbury, UK). Anticorpos secundários anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho e os demais reagentes analíticos foram obtidos da Sigma Chemical CO. Os reagentes e aparelhos para eletroforese de gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) e eletrotransferência foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, Calif., USA). Tri(hidroximetil)-aminometano (Tris-base), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 e glicerol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo., USA). Proteína A-Sepharose 6 MB foi adquirida da Pharmacia (Uppsala, Sweden) e a membrana de nitrocelulose foi da Schleicher e Schuell (Keene, N.H., USA).

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas-SP, pesando entre 200g e 250g.

3.3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Sistema de Perfusão (Técnica de Langendorff)

O sistema de perfusão de coração isolado foi constituído com um sistema cata-bolhas de vidro e envolvido por jaqueta de água conectada a um circulador para aquecimento do tampão de perfusão a 37°C, como indicado no esquema da Figura 2.

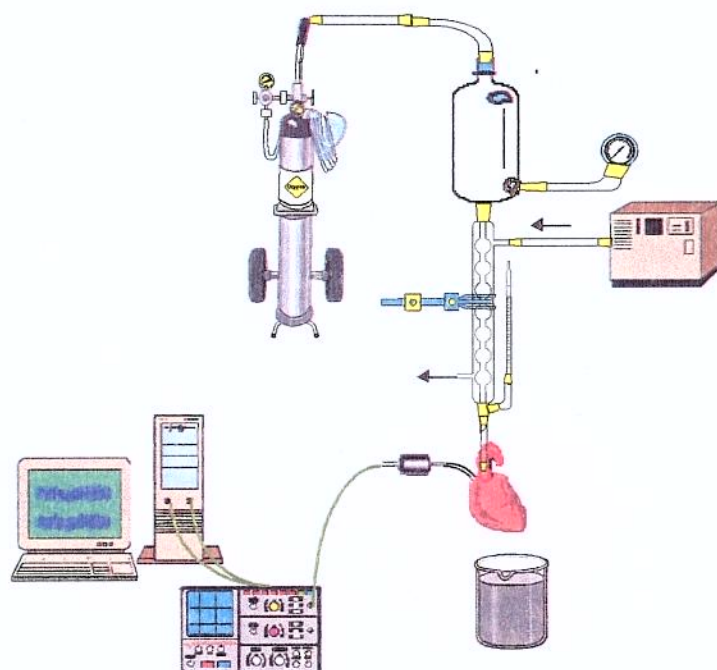


Figura 2: Esquema do sistema de perfusão de coração isolado e registro da pressão ventricular esquerda utilizado.

A extremidade superior do cata-bolhas foi conectada a um reservatório constituído de um frasco de Mariotti contendo a solução tampão de perfusão. Neste reservatório, o tampão era oxigenado com O_2 a 100% com fluxo controlado de forma a manter a pressão no frasco próxima a 70 mmHg.

A extremidade inferior do cata-bolhas foi conectada uma cânula de vidro que por sua vez, era conectada à aorta ascendente para perfusão retrógrada. Em paralelo, foi montado um balão de látex, preenchido com salina e conectado a uma seringa de Hamilton para controle de seu volume e também a um transdutor de pressão para registro contínuo da pressão intraventricular.

3.3.2. Canulação e Acoplamento do Coração ao Sistema

Ratos Wistar foram anestesiados com mistura cloridrato de cetamina (50 mg/Kg) e diazepam (2 mg/Kg) e receberam injeção intraperitoneal de heparina sódica (1000 UI). Os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida a 38°C, entubados por via orotraqueal com tubo plástico de Gelco^R e submetidos a ventilação controlada com ventilador Harvard e ar enriquecido com oxigênio a 100%. A temperatura corpórea e a ventilação permaneceram controladas durante o período de retirada do coração da cavidade torácica.

A cavidade torácica foi aberta através de secção sagital do esterno; a aorta ascendente foi identificada seccionada e conectada ao sistema de perfusão, onde foi fixada com fio de algodão 3.0, sendo iniciada imediatamente a perfusão com solução A: Tampão HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 20mM, NaCl 137mM, MgSO₄ 1,2mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1,5mM e Glicose 16mM, com pH 7,4, acrescentando insulina (100UI), xilocaína (1000UI) e heparina (1000 UI), enriquecido com 100% de oxigênio a uma pressão hidrostática de 70 mmHg e temperatura de 37°C.

Em um dos grupos experimentais, os corações foram perfundidos com solução cardioplégica, solução B: (HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 20mM, NaCl 105mM, MgSO₄ 1,2mM, KCl 40mM, CaCl₂ 0,5mM e Glicose 16mM, com pH 7,4, acrescentando insulina (100UI), xilocaína (1000UI) e heparina (1000 UI), enriquecida com 100% de oxigênio a uma pressão hidrostática de 70mmHg e temperatura de 37°C).

Em outro grupo experimental os corações isolados, foram perfundidos com tampão de perfusão com solução A, com concentrações de cálcio variando de 0.5, 1.5, 3.0 e 5.0 mM.

3.3.3. Sistema de Registro e monitoração da pressão intraventricular.

A monitorização da pressão intraventricular esquerda foi realizada com balão de látex, inserido no ventrículo esquerdo (VE) através do átrio esquerdo (AE). Este catéter foi conectado a um transdutor de pressão (COBE, ARVADA, USA) para registro contínuo da pressão intraventricular. Para tanto, utilizou-se sistema de registro Dataq (USA) com programa de aquisição e análise Windaq PRO.

O Sinal da onda de pulso da pressão foi amplificado em amplificador GP4A Steamtech, USA, convertido em sinal digital (frequência de amostragem de 300 Hz) e gravado em computador para análise posterior. A onda de pressão ventricular foi analisada quanto ao pico máximo (Pressão Sistólica), nadir (Pressão Diastólica), derivada da pressão em relação ao tempo ($\pm dP/dt$) e frequência cardíaca.

3.4. PROCEDIMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.4.1. Imunoprecipitação

Ventrículos de corações submetidos a períodos variáveis de perfusão nos diferentes protocolos foram homogeneizado em aproximadamente 6 volumes de tampão para imunoprecipitado (Triton X-100 1%, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM e 0,1mg de aprotinina/mL) a 4°C em homogeneizador Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY), operado em velocidade máxima por 30 segundos. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 11000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C por 20 minutos para remover o material insolúvel. O sobrenadante foi então utilizado para o ensaio.

A determinação da proteína foi realizada pela técnica do biureto (Bradford) utilizando-se reagentes BIO-RAD e solução de albumina bovina como padrão (Sigma). O sobrenadante foi submetido a imunoprecipitação com anticorpo anti-Fak em tubos eppendorff a 4°C *overnight*. Após este período, foram acrescentados 50 μ l de suspensão de proteína A-Sepharose 6 MB em cada amostra e os tubos mantidos sob agitação leve em câmara fria por 2 horas. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4°C para obtenção do “pellet” contendo o imunoprecipitado, sendo este lavado 3 vezes, por 5 minutos com Tampão de Lavagem.

3.4.2. Análise de proteína por immunoblotting:

As proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditiotreitol 100mM, fervidas por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto a temperatura ambiente. Após este procedimento, o sobrenadante foi submetido à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 8% em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories Rickmond, Ca) por 180 minutos a 120V. Posteriormente, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose durante 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência minituarizado da Bio-Rad. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado através de incubação com 10ml de solução bloqueadora (leite em pó desnatado 5% em Solução Basal por 2 horas a temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas com Solução Basal e incubadas em Solução Bloqueadora (leite a 3%) contendo anticorpos específicos (anti-fosfotirosina, Grb2, Fak, Src, Erk ou p-Erk) a 4°C *overnight*. Após este período foram lavadas com solução basal por 3 vezes durante 10 minutos cada. Nos ensaios com anticorpo anti-fosfotirosina, as membranas foram também incubadas em solução bloqueadora contendo 5µl de anticorpo anti-IgG de camundongo ou de coelho por 2 horas a temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas 3 vezes com solução basal, incubadas em solução bloqueadora (leite a 1%) contendo 5µl [¹²⁵I] Proteína A em câmara fria *overnight*. As membranas foram então retiradas da solução de iodo e lavadas 3 vezes por 5 minutos cada, com solução basal. As membranas foram secadas e envolvidas em filme plástico de PVC.

As bandas representativas das proteínas específicas foram quantificadas por densitometria de auto-radiografias em filmes KodaK XAR (Eastman KodaK, Rochester, NY).

3.4.3. Soluções utilizadas para imunoprecipitação e immunoblotting:

. Solução tampão de extração:

Esta solução foi composta de Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoreto) 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X100 1%, 1,1 mg/ml de aprotinina

. Tampão de Laemmli(5X):

Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10%.

. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado:

Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, Triton X-100, 0,5%. Esta solução deve ser mantida a 4°C.

. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução (“resolving”):

Utilizada para a elaboração do SDS-PAGE, gel de resolução, um tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

. Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (“stacking”):

Utilizada para confecção do SDS-PAGE, fase de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

. Solução tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM, SDS 0,4%.

. Solução tampão para transferência:

Usada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE, para a membrana de nitrocelulose. Contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a diluição de proteínas de alto peso molecular. Deve ser mantido à 4°C.

. Solução Basal:

Solução básica para manuseio da membrana de nitrocelulose, após transferência. Contém: cloreto de sódio 150 mM, Trisma base 10 mM, 0,02% de Tween 20.

. Solução bloqueadora:

Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após transferência. Composta de 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02% dissolvidos em solução basal.

. Solução para anticorpos:

A solução contendo anticorpos específicos que reagirão com as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Composta de 0,3 % de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

. Solução para stripping:

A solução para o stripping. Composta de 7,507g de glicina 0,2 M; 5,844g de NaCl a 0,2 M e água deionizada até completar 500 ml. Acertar o pH para 2,8.

3.5. ESTUDO MORFOMÉTRICO DOS MIÓCITOS CARDÍACOS EM PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA

3.5.1. Processamento do Material em Preparação Histológica

Os corações foram perfundidos com a solução tampão A em período controle por 10 minutos com a pressão diastólica mantida em 0 mmHg. Em seguida, corações individuais foram submetidos a aumentos da pressão diastólica para 5, 10 e 15 mmHg ou mantidos em 0 mmHg por mais de 10 minutos. Após o registro de pressão, os corações foram perfundidos com 20 mL de solução fixadora de paraformaldeído 4%, utilizando-se uma bomba de infusão, e mantidos por 5 horas em imersão nesta mesma solução fixadora.

Em seguida, os corações foram cortados transversalmente, lavados em PBS 0,1 M, desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados e incluídos em parafina. Secções histológicas de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo, coletadas em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina e destinadas a análise morfométrica e imunohistoquímica.

3.5.2. Análise morfométrica

Para a análise morfométrica, secções histológicas de coração foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com Hematoxilina-eosina, conforme etapas abaixo.

- 1) Hematoxilina de Ehrlich - 5 minutos;
- 2) Lavagem em água - 12 minutos
- 3) Eosina - 5 minutos

As secções foram desidratadas, montadas em bálsamo sintético Entellan e observadas ao Microscópio Óptico de luz **LEICA**. De cada secção histológica foram mensurados, ao acaso, os diâmetros de 20 miócitos cardíacos, utilizando-se uma régua calibrada acoplada a ocular do microscópio, totalizando 60 medidas por lâmina histológica. Os únicos critérios adotados para a morfometria foram a disposição das células em corte longitudinal, a mensuração do diâmetro celular no nível do núcleo (Fig 3X) e a boa preservação das características morfológicas das mesmas.

3.6. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Secções histológicas de coração foram desparafinizadas, hidratadas e submetidas a imunocitoquímica, para avaliar a distribuição subcelular da Fak e da Erk. Para tal, foram realizadas as seguintes etapas:

- 1- Lavagem em PBS 0,1M, pH7.4 - 3 x 5 min.
- 2- Bloqueio da peroxidase endógena em H₂O₂ 1% em PBS 0,1M por 30 minutos.
- 3- Lavagem em PBS 0,1M, pH 7.4 – 3x 5min.

- 4- Bloqueio de ligação inespecíficas em BSA 3%/PBS 0,1M - 45 minutos.
- 5- Incubação com anticorpo primário anti-Fak (1/100) ou Erk (1/75) em BSA 1 %/PBS 0,1M - *overnight* a 4°C.
- 6- Lavagem em PBS 0,1M, pH7.4 - 3 x 5min.
- 7- Incubar com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com biotina, diluído 1/300 em BSA 1% - 2 horas à temperatura ambiente.
- 8- Lavagem em PBS 0,1M, pH7.4 - 3 x 5min.
- 9- Incubação com complexo streptoavidina-peroxidase (Amersham/Pharmacia) diluído 1:300 em PBS 0,1M - 45 minutos
- 10- Lavagem em PBS 0,1M, pH7.4 - 3 x 5min.
- 11- Incubação com solução reveladora diamino-benzidina (DAB) por 20 minutos:

DAB – 0,5mg/ml

4,6mL de PBS 0,1M

H₂O₂ - 0,8%
- 12- Bloqueio da reação em H₂O destilada
- 13- Contracoloração com hematoxilina de Harris - 30 segundos
- 14- Lavagem rápida em H₂O destilada
- 15- Tratamento com solução saturada de carbonato de lítio - 30 segundos
- 16- Lavagem rápida em H₂O destilada
- 17- Desidratar
- 18- Diafanizar (Xilol)
- 19- Montagem das lâminas.

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

PROTOCOLOS

Protocolo 1.

Avaliação dos efeitos de aumentos crescentes da pressão diastólica sobre a atividade do complexo de sinalização associado à Fak.

Os corações foram conectados ao sistema de perfusão, sendo registradas as pressões ventriculares durante período controle (10 minutos) com a pressão diastólica mantida em 0 mmHg. Em corações diferentes as pressões diastólicas foram então aumentadas para 5, 10 e 15 mmHg ou mantidas em 0 mmHg por mais 10 minutos. Após este período os ventrículos foram homogenizados e os homogenatos submetidos a SDS-PAGE. Em um grupo diferente, os corações foram processados para análise de morformetria e imunohistoquímica.

Protocolo 2.

Avaliação dos efeitos de estiramento sobre a atividade do complexo de sinalização associado à Fak.

Os corações foram conectados ao sistema de perfusão e perfundidos com solução cardioplégica. O balão de látex posicionado na cavidade ventricular foi mantido com pressão de 0 mmHg por 10 minutos durante o período controle e posteriormente inflado até atingir pressões de 5, 10 e 15 mmHg em corações individuais, mantidas por mais 10 minutos. Nos corações controle a pressão foi mantida em 0mmHg por igual período. Após este período, os ventrículos foram retirados, homogenizados e submetidos a SDS-PAGE.

Protocolo 3.

Avaliação dos efeitos de aumentos no inotropismo sobre a atividade do complexo de sinalização associado à Fak.

Os corações foram conectados ao sistema de perfusão e perfundidos com soluções contendo concentrações crescentes de Ca^{+2} . Durante o período controle a pressão diastólica do balão de látex foi mantida em 0 mmHg por 10 minutos. Após este período a pressão diastólica foi aumentada para 5, 10 e 15 mmHg ou mantida em 0 mmHg por mais 10 minutos em corações individuais. Ao fim deste período os ventrículos foram homogenizados e submetidos a SDS-PAGE.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados são apresentados como médias e erro padrão. Diferenças entre valores médios foram testados com ANOVA sendo o teste *post hoc* o de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.



4. RESULTADOS

1. Efeito do aumento da pressão diastólica sobre a pressão sistólica, frequência cardíaca e derivada da pressão no tempo.

Na Figura 3 são apresentados exemplos típicos de curvas de pressão ventricular em experimentos em que a pressão diastólica foi aumentada de 0 para 5, 10 e 15 mmHg ou mantida em 0 mmHg, em corações individuais. Observa-se o aumento progressivo da pressão sistólica com o aumento da pressão diastólica, caracterizando a ativação do mecanismo de Frank-Starling

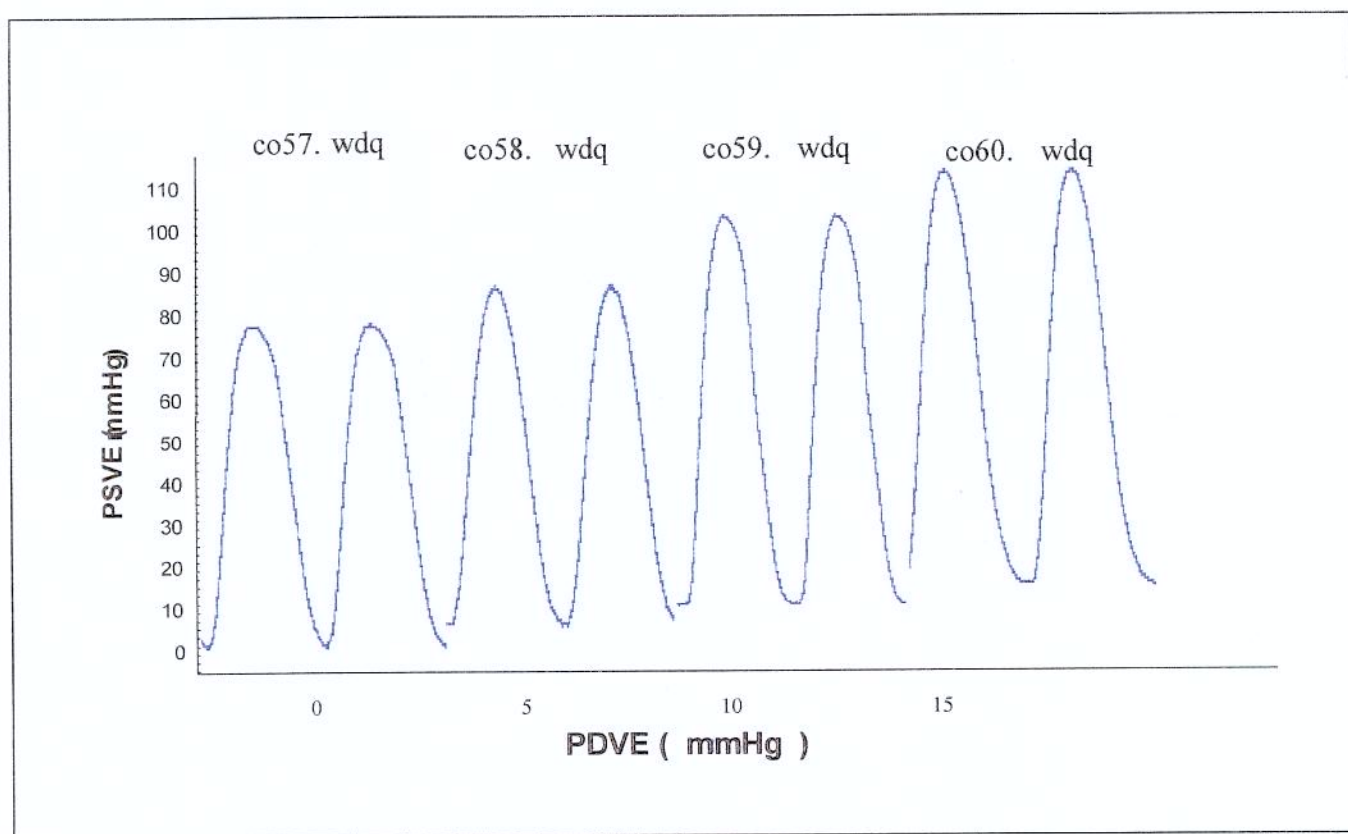


Figura 3: Curva de pressão ventricular de corações submetidos a aumentos de pressão diastólica de 0, 5, 10 e 15 mmHg.

Na Figura 4 são apresentados os valores médios (n=28) da relação entre a pressão diastólica e a pressão sistólica do ventrículo esquerdo em corações isolados e perfundidos. Após período controle de 10 minutos onde a pressão diastólica foi mantida próxima de zero, os corações foram submetidos a aumentos fixos de pressão diastólica de aproximadamente 5, 10 e 15 mmHg. Como já descrito no experimento representativo da figura 3, os aumentos de pressão diastólica se acompanharam de aumentos na pressão sistólica.

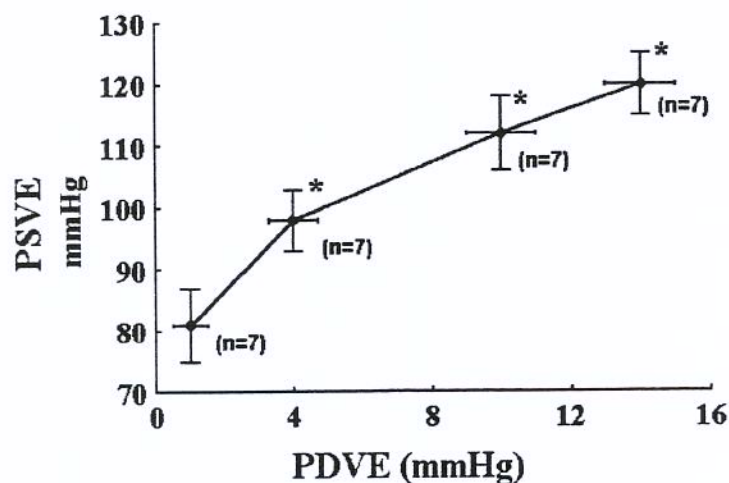


Figura 4: Relação pressão diastólica/pressão sistólica do ventrículo esquerdo em corações isolados *P<0,05 comparado à valores controle. PDVE – pressão diastólica do ventrículo esquerdo; PSVE – pressão sistólica do ventrículo esquerdo.

Tabela 1

Variáveis hemodinâmicas adicionais são apresentadas na tabela 1. A frequência cardíaca e as derivadas da pressão no tempo não apresentaram variações significativas entre as várias etapas dos experimentos.

	PSVE	PDVE	FC	dP/dt+	dP/dt-
	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg/s)	(mmHg/s)
(n=7)	81 ± 4	1 ± 0.5	265 ± 17	1717 ± 92	1152 ± 53
(n=7)	98 ± 5*	4 ± 0.7*	275 ± 15	1816 ± 89	1428 ± 92
(n=7)	112 ± 6*	10 ± 1*	268 ± 12	1973 ± 114	1378 ± 62
(n=7)	120 ± 5*	14 ± 1*	250 ± 20	2068 ± 120	1400 ± 80

PSVE=pressão sistólica do ventrículo esquerdo, PDVE=pressão diastólica do ventrículo esquerdo, FC=frequência cardíaca, dP/dt± = derivada da pressão no tempo.*P<0,05 comparado à valores controle.

2. Efeitos dos aumentos progressivos das pressões diastólica e sistólica no complexo de sinalização associado com a Fak.

Na Figura 5 estão representados exemplos de “immunoblots” realizados com anticorpos anti-Fak e anti-fosfotirosina. Os extratos de corações utilizados foram obtidos de animais controle e submetidos a aumentos de pressão diastólica de 5, 10 e 15 mmHg. Aumento da pressão diastólica de (zero) 0 mmHg para cerca de 5 mmHg elevou a fosforilação em tirosina da Fak em cerca de 2 vezes, enquanto elevações de 15 mmHg aumentaram da fosforilação em tirosina da Fak em cerca de 2,5 vezes. Como indicado na mesma figura a quantidade de Fak presente nos corações foi semelhante em todos os grupos experimentais.

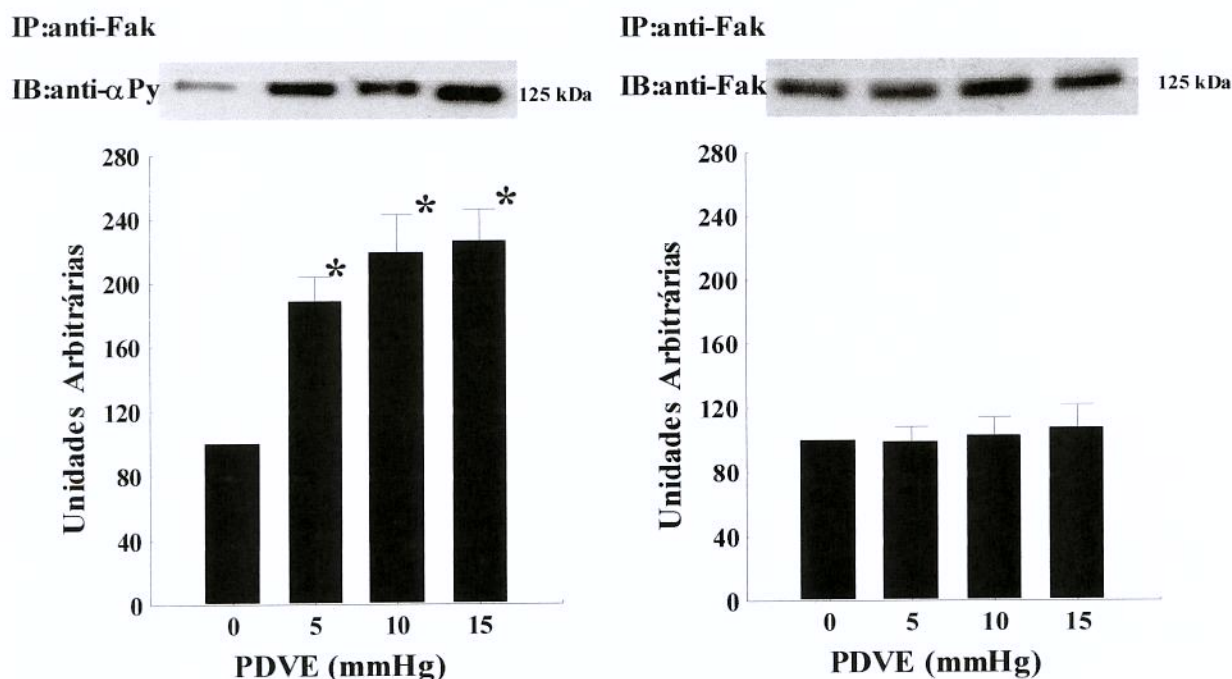


Figura 5: Efeito da sobrecarga mecânica na fosforilação em tirosina da Fak. São apresentados valores percentuais e exemplos representativos de “imunoblots” realizados com anticorpo anti-fosfotirosina (α PY) (n=28) e anti-Fak (n=28), indicativos da ativação e quantidade de Fak nos homogenatos, respectivamente * $P < 0,05$ comparado a valores controle.

A ativação da Fak leva à autofosforilação do resíduo de tirosina 397. Este por sua vez gera um sítio de ligação para outra tirosina quinase, a Src, que amplifica o sinal iniciado pela Fak (42). Para testar a hipótese de que a ativação da Fak pela sobrecarga mecânica, induz à ativação do complexo Fak/Src, realizamos experimentos de coimunoprecipitação com anticorpo anti-Fak e anti-Src. Como indicado na Fig. 6A, o aumento da fosforilação em tirosina da Fak se acompanhou, paralelamente, de associação da Fak com a c-Src.

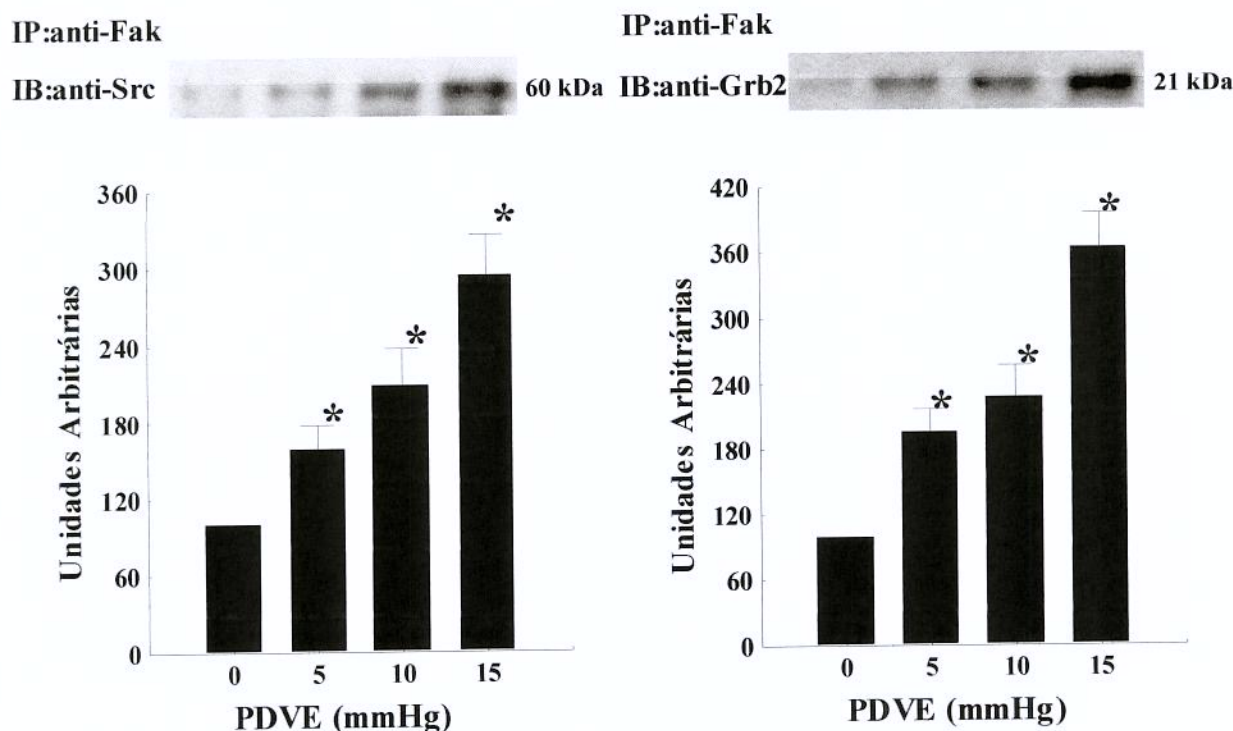
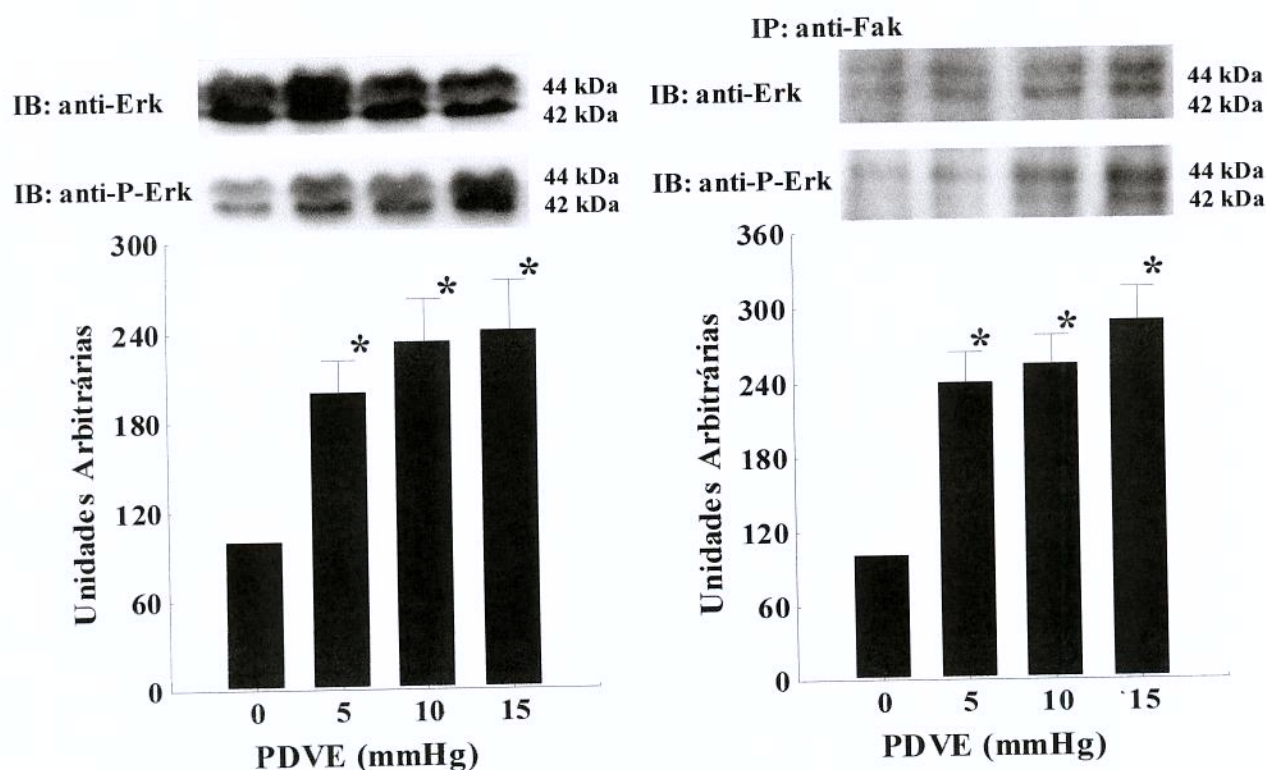


Figura 6: Valores percentuais médios e exemplos representativos de experimentos de associação Fak/Src e Fak/Grb2. Homogenatos de coração foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpo anti-Fak e as membranas de nitrocelulose foram marcadas com anticorpo anti-Src (n=28) e anti-Grb2 (n=28). *P< 0,05 comparado com valores controle.

A fosforilação do resíduo de tirosina 925 da Fak pela c-Src confere um sítio de ligação para a Grb2. Essa proteína adaptadora inicia, quando ligada à Fak, a ativação de via de sinalização que resulta em ativação de MAP Kinasas. A ativação dessas enzimas, por sua vez, tem importância central nas respostas de crescimento celular a estímulos externos. Assim a ativação dessa via pode ser tomada como marcador de ativação de vias de crescimento celular. Como demonstrado na Figura 6B, a sobrecarga aguda de pressão diastólica aumenta a associação da Grb2 com Fak em paralelo com a ativação do complexo Fak/Src. Ocorreu aumento de 2 vezes na associação Fak/Grb2 em resposta a elevação da pressão diastólica de 5 mmHg. Aumentos adicionais foram observados em corações submetidos a aumentos de 10 e 15 mmHg na pressão diastólica (2,3 e 3,6 vezes, respectivamente).

Quando a Grb2 está ligada a Fak, pode ocorrer ativação da via Ras/Erk1/2 relacionada à regulação da expressão gênica e crescimento celular. Como demonstrado na Fig.(7A) a ativação do mecanismo de Frank-Starling acompanhou-se de ativação da MAP quinases Erk1/2, demonstrada pelo aumento da quantidade de proteína marcada com anticorpo específico para a forma fosforilada da Erk1/2.

Por outro lado, experimentos de co-imunoprecipitação demonstrados na Fig. 7B demonstraram que a ativação da Fak e da Erk estímulo mecânico acompanhou-se de associação entre Fak e Erk e Fak e fosfo-Erk, indicando que a ativação da Erk1/2 nesta situação é dependente, ao menos em parte, da ativação da Fak.



Na Figura 7A: Valores percentuais médios e exemplos representativos da quantidade de Erk1/2 em homogenatos de corações (n=24) submetidos a aumentos controlados da pressão diastólica. B. Valores percentuais médios e exemplos representativos de experimentos de co-imunoprecipitação Fak/Erk e Fak/fosfo-Erk realizados com homogenatos de corações submetidos a aumentos controlados da pressão diastólica. *P< 0,05 comparado com valores controle.

3. Avaliação da localização de Fak e Erk1/2 no miocárdio de ratos.

Análise imunohistoquímica indicou que a Fak localiza-se predominantemente em miócitos cardíacos (Fig. 8 A). Em fotomicrografias ampliadas (Fig. 8 B) pode-se observar imunoreatividade do anticorpo anti-Fak localizada ao longo do sarcolema e também em pontos regularmente distribuídos no sarcoplasma. Análises imunohistoquímicas foram também realizadas para determinar a localização de Erk1/2 no miocárdio. Como demonstrado na Fig.8 C e D, a proteína Erk1/2 localiza-se no núcleo de miócitos cardíacos, mas também foi encontrada no sarcolema e sarcoplasma. O padrão de distribuição de Erk1/2 em miócitos cardíacos assemelha-se a distribuição padrão da Fak, indicando a co-localização da Fak e Erk1/2, em ambos os sítios sarcoplasmático e sarcolemal.

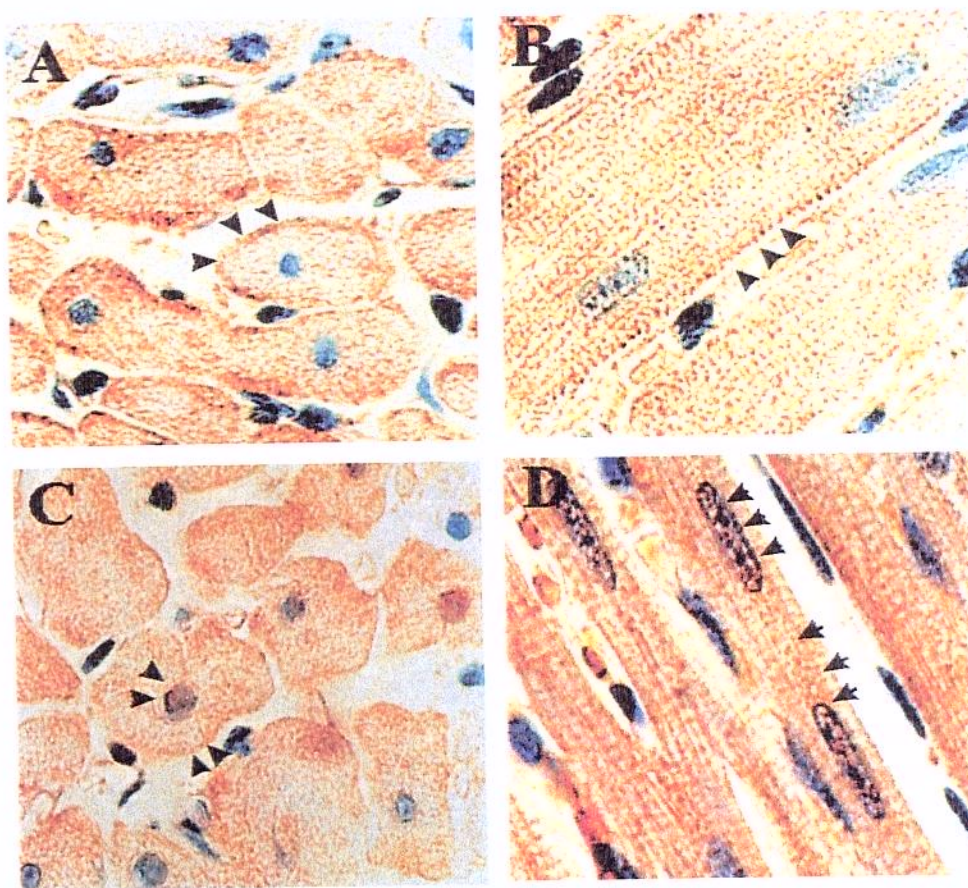


Figura 8A e B: Localização da proteína Fak (seta) observada em secções longitudinal e transversal de cardiomiócitos. C e D – Localização da proteína Erk1/2 (seta) em secções longitudinal e transversal de cardiomiócitos

4. Efeitos dos aumentos de pressão diastólica sobre o diâmetro de cardiomiócitos

Na Figura 9 estão representados os valores médios dos diâmetros de cardiomiócitos de corações submetidos a pressões diastólicas de 0, 5, 10 e 15 mmHg. Observa-se redução do diâmetro dos cardiomiócitos proporcional ao aumento da pressão diastólica. O diâmetro médio dos cardiomiócitos em corações submetidos a pressões diastólicas de 15mmHg foi cerca de 40% menor que aquele observado em cardiomiócitos de corações mantidos com pressões diastólicas de 0 mmHg.

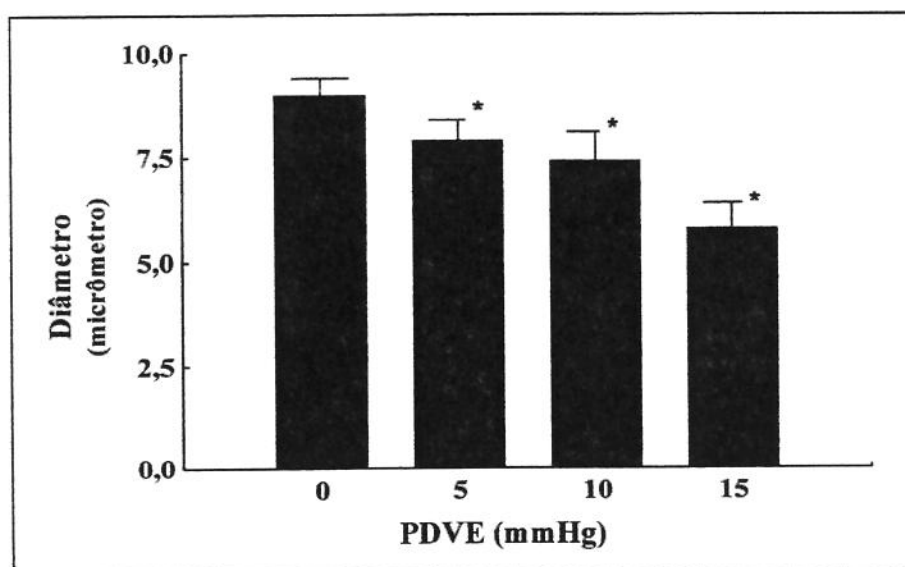


Figura 9: Valores médios dos diâmetros dos cardiomiócitos obtidos por análise morfométrica de corações submetidos a pressões diastólicas de 0, 5, 10 e 15mmHg. (n=12). *P<0,05.

5. Efeitos do estiramento em corações perfundidos com solução cardioplégica na ativação do complexo de sinalização associado à Fak.

Aumentos de pressão diastólica no ventrículo esquerdo ativam o mecanismo de Frank-Starling. Assim, aumentos na pressão diastólica acompanham-se também de aumentos na pressão sistólica, além de estiramento das fibras. Supostamente, qualquer destas variáveis pode, de forma isolada ou não, ativar mecanismos de sinalização celular. Para avaliar os efeitos isolados do estiramento na atividade do complexo de sinalização associado com a Fak, utilizamos corações perfundidos com solução cardioplégica submetidos a estiramentos por aumentos controlados da pressão no balão de látex inserido no ventrículo esquerdo.

Na figura 10 estão representados resultados de experimentos realizados com corações perfundidos com solução cardioplégica e estirados com pressões de 5, 10 e 15 mmHg ou mantidos em estado de repouso com a pressão no balão de látex mantida em 0 mmHg.

Observam-se aumentos de 3 vezes no nível de fosforilação em tirosina da Fak quando a pressão no balão foi aumentada de 0 para 5 mmHg, sendo o aumento de cerca de 5 vezes quando o balão foi inflado com pressão de 15 mmHg. Estes resultados indicam que o estiramento, de forma isolada provoca ativação da Fak.

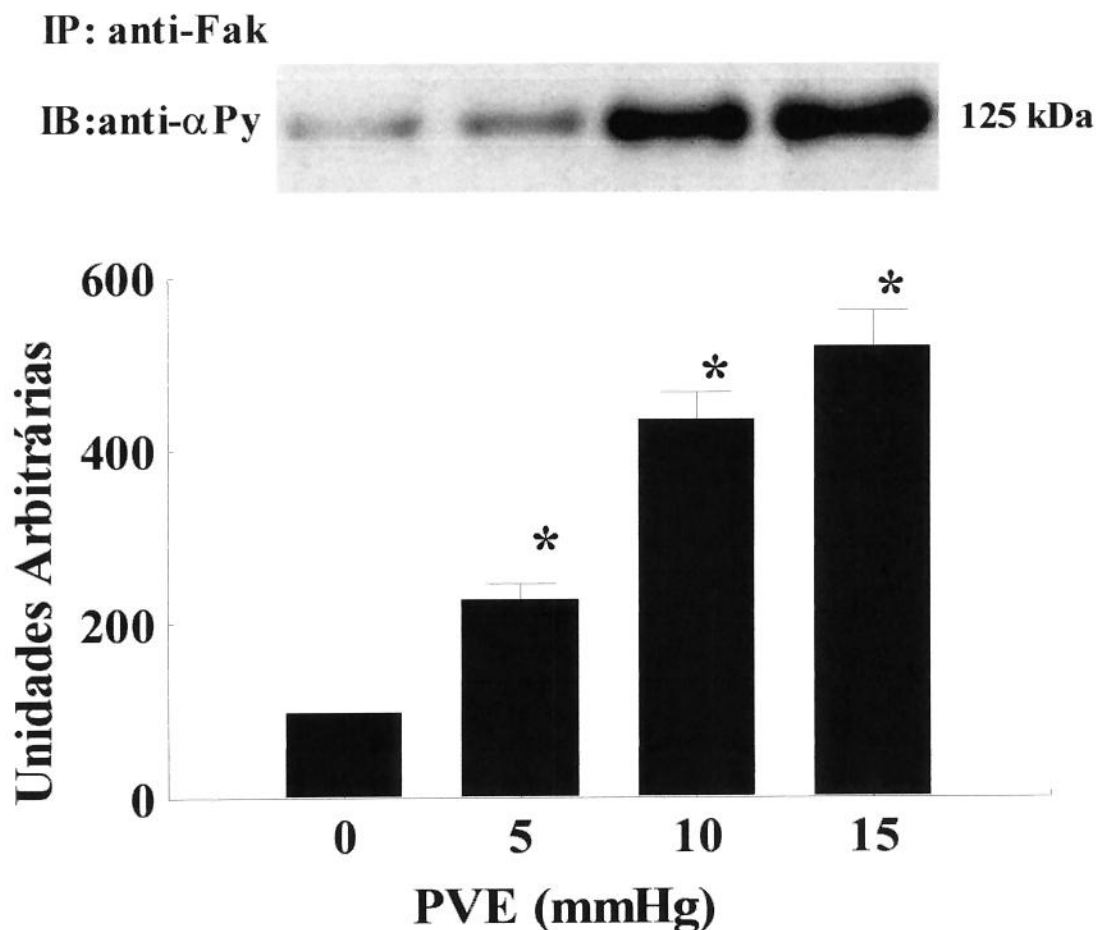


Figura 10: Efeito do estiramento sobre a fosforilação em tirosina da Fak. São apresentados valores médios percentuais (n=24) e exemplo representativo de blot realizados com imunoprecipitados de anticorpo anti-Fak e marcado com anticorpo e anti-fosfotirosina. *P<0,05 comparado com valores observados no controle.

Na figuras 11 são representados os resultados dos experimentos de co-imunoprecipitação de Fak e Src (Fig. 11 A) e Grb2 (Fig 11 B) realizados em homogenatos de ventrículos perfundidos com solução cardioplégica. Os resultados representados nesta figura indicam que o estiramento, por si, provoca também aumento na associação em Fak e Src e Fak e Grb2.

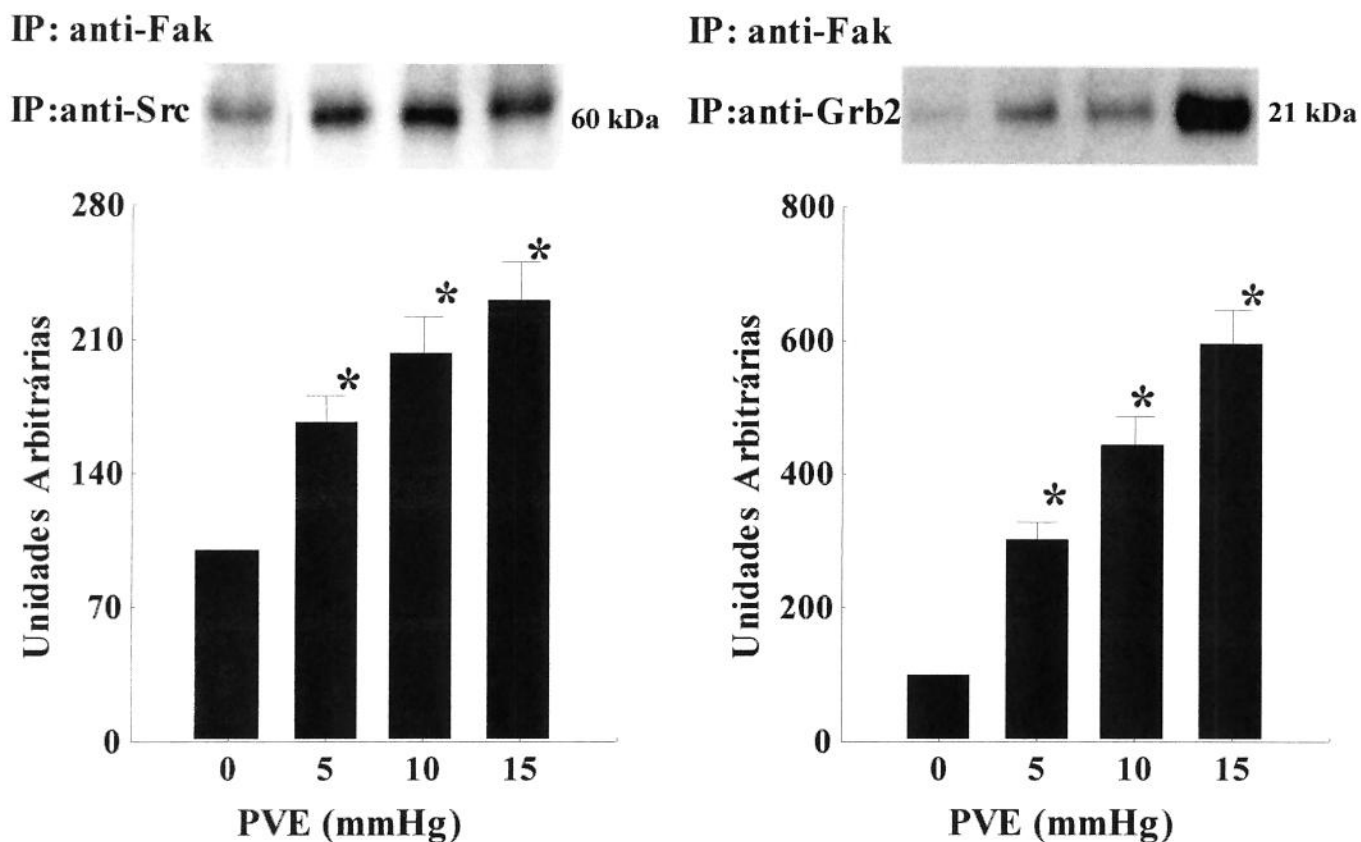


Figura 11: Médias dos valores percentuais e exemplos representativos de blots realizados com imunoprecipitados de anticorpo anti-Fak e marcados com anticorpo anti-Src (n=24) e anti-Grb2 (n=24). *P<0,05 comparado a valores controle.

Da mesma forma, foram realizados experimentos para se verificar a ativação e associação Fak/Erk em corações perfundidos com solução cardioplégica e submetidos a estiramentos controlados. Como demonstrado na figura 12 o estiramento também provocou ativação da Erk1/2 e sua associação com a Fak.

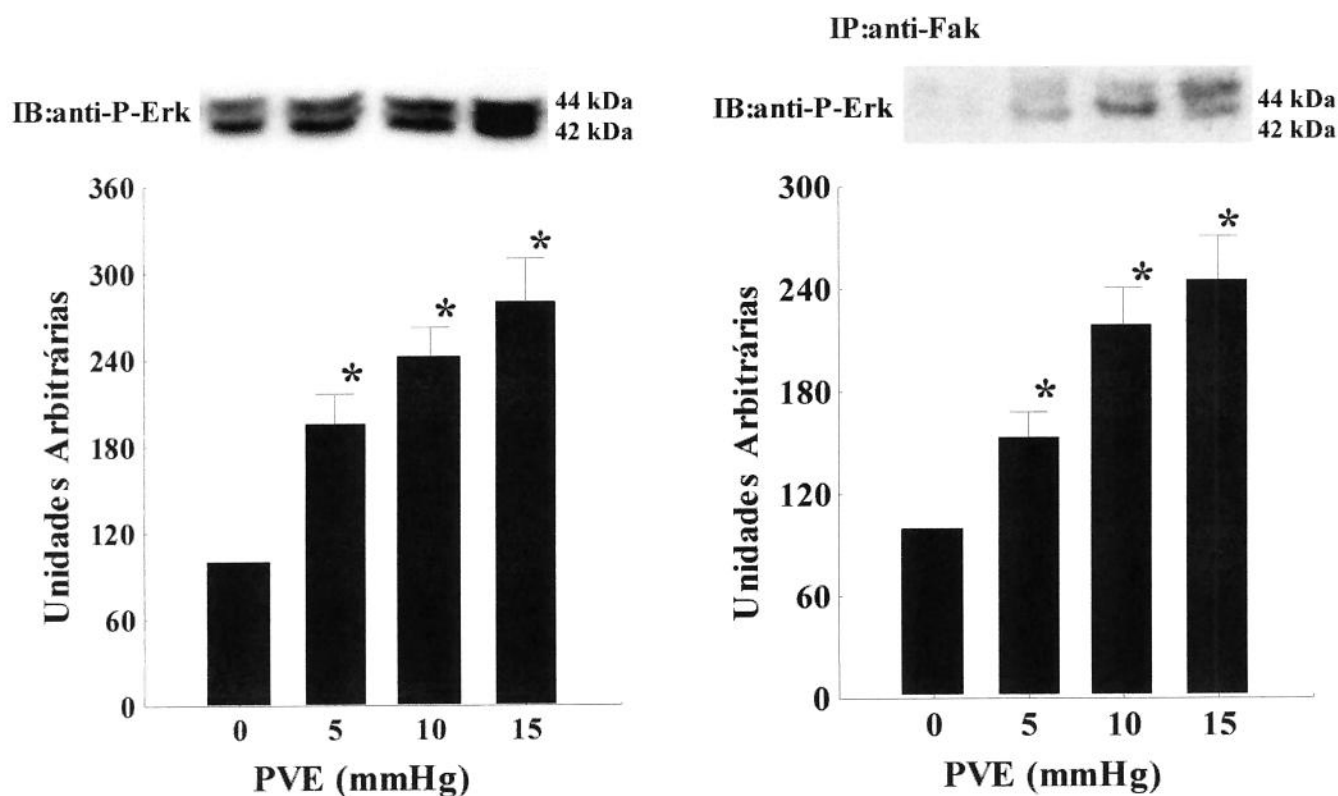


Figura 12A: Média dos valores percentuais (n=24) e exemplo representativo de blot realizado com anticorpo anti-P-Erk. B. Médias dos valores percentuais (n=24) e exemplo representativo de blot realizado com imunoprecipitado de anticorpo anti-Fak marcado com anticorpo anti-fosfo-Erk1/2. *P<0,05 comparado a valores controle.

6. Efeitos do aumento da contratilidade sobre a atividade do complexo de sinalização associado à Fak.

Para avaliar se aumentos na atividade contrátil no miocárdio, é capaz de ativar o complexo de sinalização associado à Fak, experimentos foram realizados, com corações perfundidos com diferentes concentrações de cálcio no tampão de perfusão. Como demonstrado na figura 13, aumentos na concentração de cálcio no perfusato de 0.5 para 5 mM induziu aumento progressivo na pressão sistólica, com a pressão diastólica mantida em 0 mmHg.

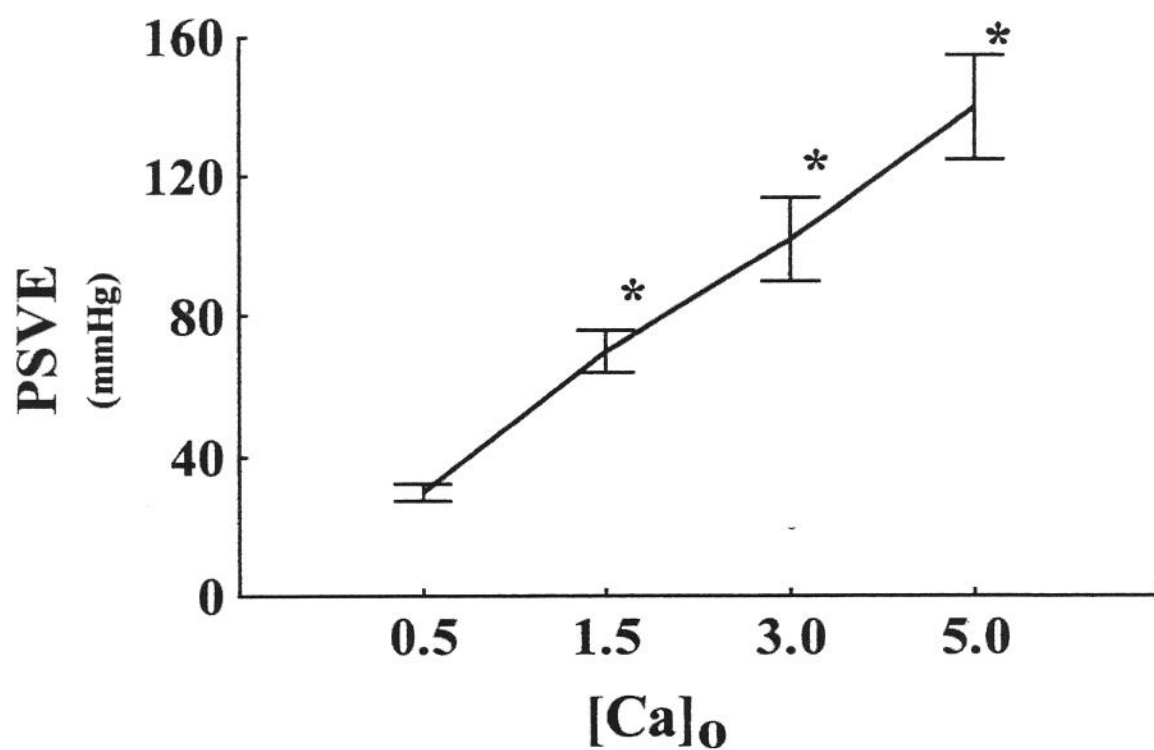


Figura 13: Valores médios das pressões sistólicas de corações perfundidos individualmente (n=16) com concentrações crescentes de cálcio. *P<0,05 comparado com valores observados com concentração de cálcio de 0.5mM.

Tabela 2

Na tabela 2 são também representados valores de frequência cardíaca e derivados da pressão no tempo, além dos valores das pressões obtidos dos experimentos realizados com diferentes concentrações de cálcio. Como esperado, aumentos na concentração de cálcio no perfusato provocaram aumentos proporcionais na frequência cardíaca e derivadas da pressão no tempo.

	PS	PD	FC	dP/dt+	dP/dt-
	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg/s)	(mmHg/s)
Ca ⁺⁺ 0.5mM (n=4)	38 ± 5	0,2 ± 1	170 ± 28	578 ± 175	381 ± 125
Ca ⁺⁺ 1.5mM (n=4)	78 ± 9	0,1 ± 0	180 ± 16	1072 ± 174	685 ± 128
Ca ⁺⁺ 3mM (n=4)	118 ± 15	0,3 ± 2	201 ± 13	1483 ± 353	1062 ± 345
Ca ⁺⁺ 5mM (n=4)	150 ± 15	0,2 ± 0	224 ± 30	2278 ± 371	1350 ± 289

PS=pressão sistólica do ventrículo esquerdo, PD=pressão diastólica do ventrículo esquerdo,

FC=frequência cardíaca, dP/dt± = derivadas da pressão no tempo. *P< 0,05 comparado com controle.

Como indicado nos resultados apresentados na Figura 14, aumentos progressivos da atividade contrátil dos corações não se acompanharam de ativação do complexo de sinalização associado com a Fak. Isto foi demonstrado pela ausência de variação no grau de fosforilação em tirosina da Fak em corações perfundidos com diferentes concentrações de cálcio.

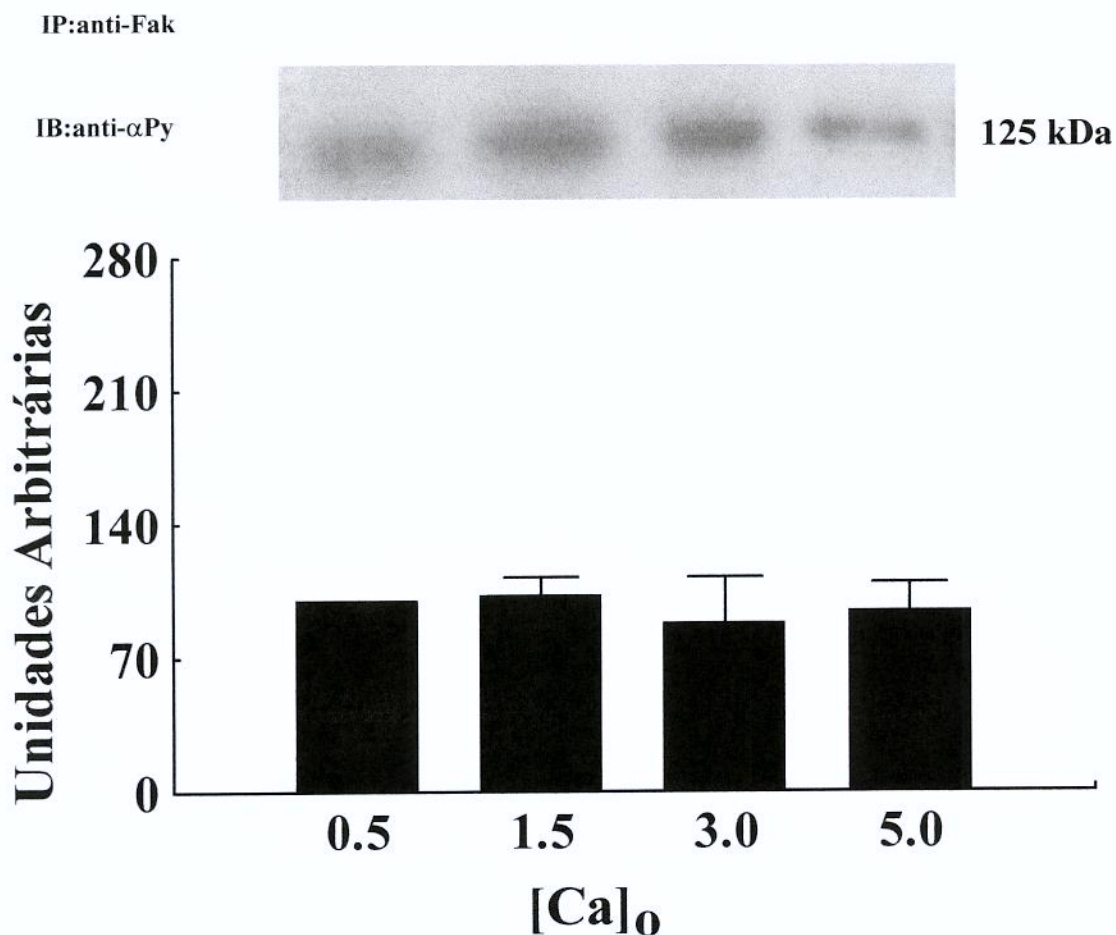


Figura 14: Valores percentuais médios (n=16) e exemplo representativo de blot de imunoprecipitado com anticorpo anti-Fak e marcado com anticorpo anti-fosfotirosina.

Da mesma forma, que para a ativação da Fak, aumentos isolados na contratilidade não acompanharam-se de variações significativas da associação Fak/Grb2 e ativação da Erk1/2, como demonstrado nos resultados da figura 15.

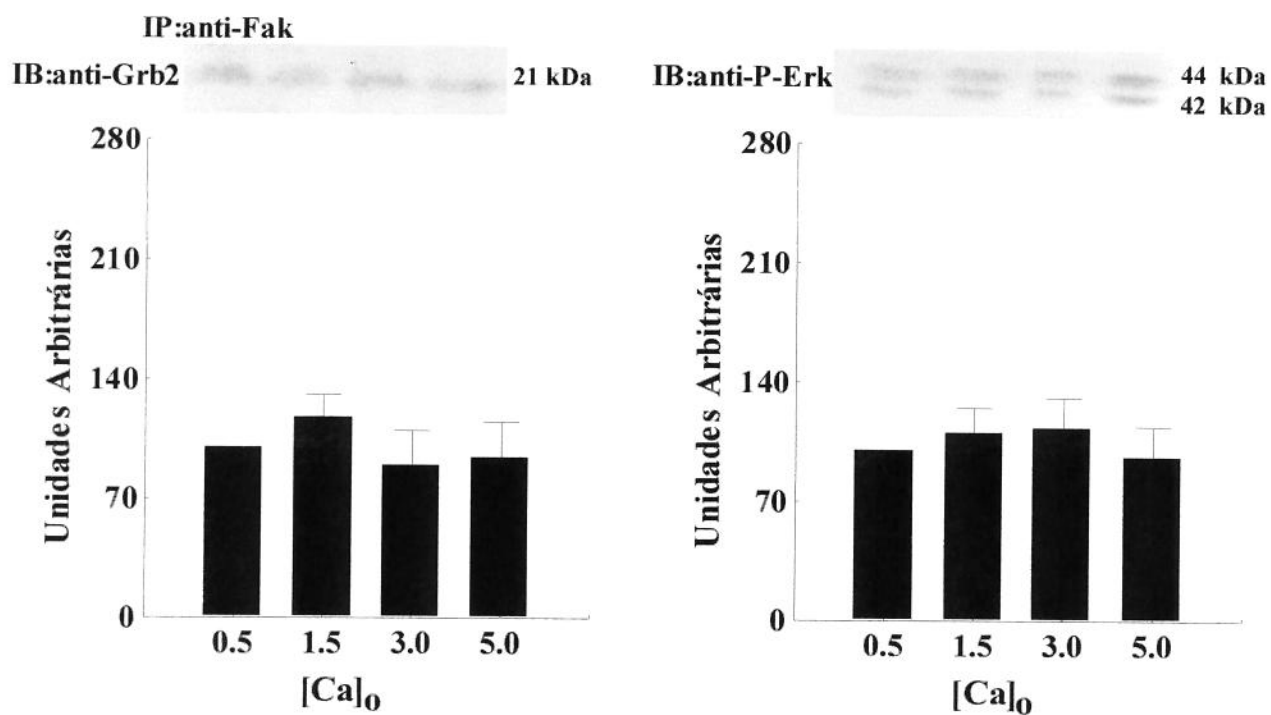


Figura 15A: Valores percentuais médios (n=16) e exemplo representativo de blot de imunoprecipitado de anticorpo anti-Fak e marcado com anticorpo anti-Grb2. B. Valores percentuais médios (n=16) e exemplo representativo de blot marcado com anticorpo anti-fosfo-Erk.



5. DISCUSSÃO

No presente estudo examinamos o efeito do estímulo mecânico na atividade do complexo de sinalização associado à Fak em corações perfundidos em sistema Langendorff. Estudos demonstraram que sobrecargas agudas em corações “*in situ*” se acompanham de ativação da quinase de adesão focal (Fak) e do complexo de sinalização a ela associado. Essa questão dificilmente poderia ser esclarecida com a preparação “*in situ*”, já que o coração pode sofrer influências múltiplas durante constrição da aorta que incluem, não apenas o estímulo mecânico, bem como a influência de hormônios circulantes como angiotensina II, vasopressina e neurotransmissores, sabidamente liberados em níveis elevados na circulação em situação de constrição aguda da aorta. Assim neste estudo foi utilizado uma preparação de coração isolado para testar a hipótese de que o estímulo mecânico e não a ação de hormônios circulantes ou de neurotransmissores é o responsável pela ativação da Fak e o complexo de sinalização celular a ela associado, com aumento de tensão no coração.

O nível de fosforilação em tirosina da Fak e presumivelmente sua atividade, sua associação com a Src, Grb2 e Erk1/2, bem como a atividade da Erk1/2 foram inicialmente avaliados em ventrículo esquerdo de corações mantidos com batimento espontâneo e submetidos a aumentos controlados da pressão diastólica através de balão posicionado em sua cavidade. Os resultados indicaram que, a ativação do mecanismo de Frank-Starling induzido pelo aumento de pressão diastólica do ventrículo esquerdo, ativa o complexo de sinalização celular associado à Fak, como demonstrado pelos aumentos na fosforilação em tirosina da Fak e associação da Fak com Src e Grb2. Estes fenômenos ocorreram paralelamente à ativação da Erk1/2, demonstrada pelo aumento na quantidade desta enzima detectada com o anticorpo fosfo- específico (Thr202/Tyr204)-Erk1/2. A idéia de que estes mecanismos, mais que simultâneos, relacionam-se de maneira causal, foi indicada pelos resultados dos experimentos de co-imunoprecipitação que demonstraram associações entre Fak e Erk1/2 e Fak e fosfo-Erk1/2 induzida pela ativação do mecanismo de Frank-Starling, bem como pelos resultados de experimentos com imunohistoquímica que indicaram a localização coincidente destas duas enzimas no sarcoplasma dos cardiomiócitos.

O aumento da pressão diastólica do ventrículo esquerdo provoca alterações complexas na estrutura e função miocárdicas que incluem, estiramento dos cardiomiócitos e aumento na força de contração. Como ambas as condições, estiramento e aumento da força de contração, poderiam provocar ativação do complexo de sinalização associado com a Fak, foram realizados experimentos para se avaliar seus efeitos isolados sobre a atividade deste complexo de sinalização.

Experimentos realizados com corações perfundidos com solução cardioplégica, submetidos a estiramentos controlados através de variações da pressão do balão intra-ventricular indicaram que o estiramento isoladamente pode ativar o complexo de sinalização celular associado com a Fak, bem como a Erk1/2.

Por outro lado, experimentos realizados em corações perfundidos com diferentes concentrações de cálcio no tampão de perfusão permitiram avaliar se aumentos na atividade contrátil no miocárdio é capaz de ativar o complexo de sinalização associado à Fak. Aumentos na concentração de cálcio de 0,5 para 5 mM aumentaram a pressão sistólica progressivamente, com pressão diastólica mantida em 0 mmHg. Esses aumentos, não se acompanharam de ativação do complexo de sinalização associado com a Fak, nem de variações significativas da associação Fak/Grb2 e ativação da Erk1/2.

Portanto, nossos resultados indicaram que o complexo de sinalização associado à Fak é ativado pelo estiramento dos cardiomiócitos, reforçando a idéia de que este complexo participa dos mecanismos de mecano-transdução no miocárdio.

ESTÍMULO MECÂNICO E ATIVAÇÃO DA FAK

Vários mecanismos poderiam estar envolvidos na ativação da Fak no miocárdio pelo estímulo mecânico. Desta forma, podem ser citados mecanismos de sinalização associados ao citoesqueleto e às integrinas, liberação de fatores parácrinos/autócrinos pelo estímulo mecânico e mesmo através da ativação de canais iônicos sensíveis a estiramento (BURRIDGE & CHRZANOWSKA – WODNICKA,1996; JANMEY,1998; LIANG & GARDNER,1998; SADOSHIMA et al.,1993; YAMAZAKI, KOMURO,KUDOH,1996).

As evidências disponíveis indicam que a ativação da Fak por estímulos mecânicos se dá predominantemente através da ativação de integrinas e depende da integridade do citoesqueleto, favorecendo a idéia de que a ativação da Fak pelo estímulo mecânico no miocárdio é mediada por este mecanismo (SCHMIDT et al.,1998; SHYY & CHIEN,1997). De acordo com esta hipótese, em estudos anteriores de nosso laboratório (FRANCHINI et al.,2000), demonstramos que a ativação da Fak induzida por sobrecarga pressora em miocárdio de ratos ocorre simultaneamente à uma rápida ligação da Fak com filamentos de β -actina, sugerindo a dependência da ligação com o citoesqueleto para a ativação da Fak pelo estímulo mecânico.

Além disso, nossa demonstração no presente estudo de que a Fak distribui-se predominantemente ao longo do sarcolema, em sítios semelhantes aos costâmeros, evidencia a hipótese de que a ativação da Fak no miocárdio induzida pelo estímulo mecânico é dependente de mecanismos mediados por integrinas, já que estas são proteínas transmembrana.

Os eventos bioquímicos que precedem a ativação da Fak poderiam ser sensíveis a variáveis mecânicas como tensão passiva, estiramento, velocidade de variação na tensão local ou atividade contrátil. Assim, qualquer destes eventos mecânicos poderia induzir a transformações conformacionais das integrinas com conseqüente ativação da Fak direta ou indiretamente. As evidências disponíveis sugerem que a ativação das integrinas pelo estímulo mecânico induz a ativação da Fak por expor a tirosina da posição 397 ao seu próprio sítio ativo (autofosforilação). Além disso, indicações de que, a modificação do domínio extracelular das integrinas por proteínas da matriz extracelular, produz as modificações conformacionais necessárias na Fak para que esta enzima seja ativada e se autofosforile no resíduo de tirosina 397 (LIPFERT et al.,1992; SHATTIL et al.,1994).

Por outro lado, a Fak também pode ser ativada por mecanismos mediados por agonistas hormonais ou locais via receptores de membrana específicos (GIANCOTTI & RUOSLAHTI,1999).

No nosso estudo, demonstramos que a ativação da Fak está relacionada a eventos que ocorrem quando o miocárdio é submetido a tensão passiva e/ou estiramento, mas não o aumento de atividade contrátil ou na velocidade de aumento da tensão sistólica. Contudo, o modelo experimental utilizado no presente estudo não nos permitiu distinguir entre os efeitos da tensão *per se* e o estiramento como fator responsável pela ativação da Fak. É importante lembrar, no entanto, que o estiramento ou tensão aplicados diretamente nos domínios extracelulares de integrinas resultam em aumento na fosforilação em tirosina de proteínas citoplasmáticas e ativação de vias de sinalização intracelulares, sugerindo que as integrinas podem funcionar como mecanotransdutores (SCHIMIDT et al.,1998; SHYY & CHIEN,1997; WANG, BUTTLER & INGBER,1993; WANG & INGBER,1994). Estudos realizados em músculos lisos da traquéia, contudo, sugeriram que o comprimento do músculo mais que a tensão é o estímulo primário para a regulação de atividade da Fak pelo estímulo mecânico (TANG, MEHTA & GUNST, 1999).

ATIVAÇÃO DA ERK1/2 INDUZIDA POR SOBRECARGA MECÂNICA

Nossos resultados que demonstraram associação a Fak à Grb2, Erk1/2 e p-Erk1/2 e a similaridade na distribuição da Fak e da Erk1/2 nos miócitos cardíacos sugerem que a Fak pode ser um ativador da via de crescimento celular mediada pela Erk1/2. Esta hipótese foi fortalecida por nossos resultados que demonstraram que a ativação da Erk1/2 durante sobrecarga do miocárdio é também dependente do estiramento ou aumento na tensão passiva, mas não da atividade contrátil. Estes resultados estão de acordo com resultados de estudos anteriores (BOGOYEVITCH et al.,1996; BOGOYEVITCH et al.,1994; CLERK et al.,1994; CLERK, MICHAEL & SUGDEN, 1998; FRANCHINI et al.,2000; POST et al.,1996; YAMAZAKI et al.,1993; ZOU et al., 1996), que demonstraram que a sobrecarga mecânica pode ativar a Erk1/2 no miocárdio. Também estão de acordo com evidências mais recentes que demonstraram que a ativação da Erk1/2 pode ser controlada pela adesão celular através da ativação da via integrina/Fak (APLIN et al.,2001; MIYAMOTO et al.,1996).

Contudo, além do estímulo mecânico, a Erk1/2 pode ser ativada por um grande número de estímulos que agem através de hormônios, fatores de crescimento, peptídeos vasoativos, citocinas inflamatórias e isquemia (KYRIAKIS & AVRUCH, 2001). Alternativamente o mecanismo integrina/citoesqueleto/Fak poderia colaborar para a potenciação dos efeitos de fatores de crescimento na ativação da Erk1/2, utilizando-se da rede de actina como suporte e a Fak como co-ativador (APLIN et al., 2001; MIYAMOTO et al., 1996). Contudo, a contribuição relativa da Fak para a ativação da Erk1/2 durante o crescimento hipertrófico do miocárdio permanece desconhecida.

Neste contexto, é importante ressaltar que a Erk1/2 pode ser um importante mediador do crescimento hipertrófico do miocárdio. A ativação precoce da Erk1/2 em miócitos cardíacos isolados em cultura contribuiu para a re-expressão de genes fetais marcadores de hipertrofia (BUENO et al., 2000). Mais recentemente, demonstrou-se que a ativação permanente das vias de ativação da Erk1/2 em linhagem de camundongos transgênicos com expressão de MEK1 (Erk quinase) restrita ao coração desenvolvem hipertrofia concêntrica, indicando a importância da via de sinalização mediada pela Erk1/2 para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (CLERK et al., 1994).



6. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que, a ativação do mecanismo de Frank-Starling induzido pelo aumento de pressão diastólica do ventrículo esquerdo, ativa o complexo de sinalização celular associado à Fak, como demonstrado pelos aumentos na fosforilação em tirosina da Fak e associação da Fak com Src e Grb2. Esses fenômenos ocorreram paralelamente à ativação da Erk1/2, demonstrada pelo aumento na quantidade desta enzima detectada com anticorpo fosfo-específico e pelos resultados de experimentos de imunohistoquímica que indicaram a localização coincidente da Fak e da Erk1/2 no sarcoplasma e sarcolema dos cardiomiócitos.

Experimentos realizados com corações perfundidos com solução cardioplégica, submetidos a estiramentos controlados, indicaram que o estiramento isoladamente pode ativar o complexo de sinalização celular associado com a Fak, bem como a Erk1/2. Por outro lado aumentos controlados da atividade contrátil, sem estiramento miocárdico, não provocou alteração na atividade do complexo de sinalização celular associado à Fak, nem na atividade de Erk1/2.

Em geral, os resultados do presente estudo, permitem a conclusão de que o estímulo mecânico provocado pela ativação do mecanismo de Frank-Starling ativa o complexo de sinalização celular associado à Fak e a MAP Quinase Erk1/2 em miocárdio de ratos através do estiramento do miocárdio. Desta forma, este mecanismo pode ser considerado como um efector da mecano-transdução no miocárdio e presumivelmente no miócito cardíaco, envolvido potencialmente nos efeitos tróficos do estímulo mecânico no miocárdio.



7. SUMMARY

The mechanical input plays a major role in cardiac adaptive responses to hemodynamic overload. In addition of triggering the force-length mechanism and the homeometric autoregulation, the mechanical input activates signaling mechanisms involved on hypertrophic growth of cardiac myocytes, the hallmark of the myocardial structural adaptation in response to sustained hemodynamic overload. How mechanical input is converted to biochemical signals that induce the myocardial responses is still not completely understood. However, increasing evidence support the notion that the living cells transduce and transmit forces into biochemical signals through specialized focal sites of the membrane whereby integrins connect the cytoskeleton to the extracellular matrix. This includes cardiac and skeletal myocytes, where the costameres, the counterpart of focal adhesion complex, connect the sarcolemma to sarcomere Z lines through cytoskeletal proteins. Such structures provide a continuous path for mechanical signal transfer from extracellular matrix to internal organelles, sarcomere and nucleus. In addition, many signaling molecules are immobilized and have their function dependent on the anchorage to the cytoskeleton, which provide the physical basis for mechano-biochemical transduction.

Among the various signaling molecules involved on integrin-mediated signaling, focal adhesion kinase (Fak) has received much attention, because experimental evidence indicate that it plays a key role in the cellular effects elicited by the integrin/cytoskeletal system, such as cell growth and gene expression. Fak activation has been demonstrated in isolated cardiac myocytes subjected to pulsatile mechanical stretch and overloaded feline and rat myocardium. The close relationship between increased load and Fak/c-Src activation, Fak/PI-3 kinase/Grb2 association and the concurrent activation of Akt and Erk1/2, two potential downstream effectors of the Fak multicomponent-signaling complex, indicated that it may play a role in the earlier myocardial responses to increased workload.

Thus, this study was designed to examine, in an isolated perfused heart preparation, the separated influence of mechanical stimulus, tension development and contractile activity on Fak activation during increases in myocardial workload. In addition, the Erk1/2 activation, a downstream effector of Fak, was studied by using an anti-phospho-specific antibody against Erk1/2. The relative importance of myocardial passive tension and

contractile activity on load-induced Fak and Erk1/2 activation were examined by perfusing isolated hearts with cardioplegic solution and by increasing calcium concentration in the perfusate, respectively. Furthermore, the locations of Fak and Erk1/2 in cardiac myocytes were confirmed by immunohistochemical analysis of myocardial sections.

Increases of diastolic pressure from ~0 up to ~15 mmHg rapidly (within 10 min) increased Fak tyrosine phosphorylation (maximum: 2.3-fold) and binding to c-Src (mx: 2.8-fold) and Grb2 (mx:3.6-fold). This was paralleled by a load-induced activation of Erk1/2 (mx: 2.8-fold) as assessed with phospho-specific antibodies, and also binding of Erk1/2 and phospho-Erk1/2 to Fak. Fak and Erk1/2 protein were immunolocalized at sarcolemmal sites of cardiac myocytes, but consistent Fak and Erk1/2 immunoreactivity were also detected regularly distributed at sarcoplasm and in the case of Erk1/2 at nuclei. Balloon inflation to raise ventricular pressure from ~0 to ~15 mmHg in hearts perfused with cardioplegic solution activated Fak and Erk1/2 to levels comparable to those seen in beating hearts. However, increases in contractile activity induced by the heart perfusion with increasing calcium concentration (from 0.5 to 5 mM) did not activate Fak multicomponent signaling complex or Erk1/2 in the myocardium. Over all, these findings demonstrated that mechanical stretch rather than contractile activity, triggers Fak and Erk1/2 activation during increased myocardium workload.

In conclusion, our results provide further argument for a role of Fak in the early myocardial responses to mechanical stimuli. The demonstration here that stretch or passive tension alone instead of increases in contractile activity can activate Fak and its downstream effectors is compatible with the appealing hypothesis that load induced Fak activation in myocardial cells could be linked to the integrin/cytoskeletal signaling complex. Furthermore, experiments showing that stretch or passive tension-induced binding of Fak to Grb2, Erk1/2, and activated Erk1/2, and also a common localization of these enzymes at the sarcolemma and sarcoplasm of cardiac myocytes, indicate a linkage between load-induced Fak and Erk1/2 activation during mechanical overload.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTER, S.A.; MILANO, C.A.; SHOTWELL, K.F.; CHO, M.C.; ROCKMAN, H.A.; LEFKO WITZ, R.J.; KOCH, W.J. - Transgenic mice with cardiac over expression of β 1-adrenergic receptors. **J. Biol. Chem.**, **272**:21253–21259, 1997.
- ALDERMAN, E.L. & HARRISON, D.C. - Myocardial hypertrophy resulting from low dose of isoproterenol administration in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **136**: 268-270, 1970.
- APLIN, A.E.; STEWART, A.S.; ASSOIAN, R.K. and JULIANO, R.L. – Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. **J Cell Biol**, **153**:273- 281, 2001.
- BACHELOT, C.; RAMEH, L.; PARSONS, T.; CANTLEY, L.C. - Association of Phosphatidylinositol 3-kinase, via SH2 domains of p85, with focal adhesion kinase in polyoma middle transformed fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta.**, **1311**:45–52, 1996.
- BAKER, K.M.; CHERNIN, M.I.; WIXSON, S.K.; ACETO, J.F. - Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. **Am. J. Physiol.**, **259**:H324–332, 1990.
- BAKER, K.M.; BOOZ, G.W.; DOSTAL, D.E. - Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. **Annu. Rev. Physiol.**, **54**:227–241, 1992.
- BETT, G. & SACHS, F. - Cardiac mechanosensitivity and stretch-activated ion channels. **Trends Cardiovasc. Med.**, **7**: 4-8, 1997.
- BOGOYEVITCH, M.A.; GILLESPIE-BROWN, J.; KETTERMAN, A.J.; FULLER, S.J.; BEM-LEVY, R.; ASHWORTH, A.; MARSHALL, C.J. & SUGDEN, P.H. – Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. P38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. **Circ Res**, **79**: 162-173, 1996.

- BOGOYEVITCH, M.A.; GLENNON, P.E.; ANDERSSON, M.B.; CLERK, A.; LAZOU, A.; MARSHALL, C.J.; PARKER, P.J.; SUGDEN, P.H. - Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. **J. Biol. Chem.**, **269**:1110-1119, 1994.
- BRUCKSCHLEGEL, G.; HOLMER, S.R.; JANDELEIT, K.; GRIMMD; MUDERS, F., KROMER, E.P.; RIEGGER, G.A; SCHUNKERT, H. - Blockade of the renin-angiotensin system In cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. **Hypertension**, **25**:250-259, 1995.
- BUGAISKY, L.B.; GUPTA, M.; ZAK, R. - Cellular and molecular mechanisms of cardiac hyper trophy. Em: **The Heart and Cardiovascular System**. Second Edition, edited by H.A. Fozzard et al. Raven Press, Ltd., New York, 1992.
- BURRIDGE, K. & CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. - Focal adhesions, contractility, and sig naling. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, **2**:463-519, 1996.
- BURRIDGE, K.; TURNER, C.E.; ROMER, L.H. - Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125 FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. **J. Cell. Biol.**, **119**:893-903.
- CARO, C.G.; PEDLEY, T.J.; SHROTER R.C., SEED, W.A. - The mechanics of the circulation. **Oxford University Press**, 1978.
- CAZORLA, O; PASCAREL, C.; BRETTE, F.; LE GUENNEC, J.Y. - Modulation of ion channels and membrane receptor activity by stretch in cardiomyocytes. Possible mechanisms for mechanosensitivity. **Progr. Bioph. Molec. Biol.**, **71**:29-57, 1999.
- CHICUREL, M.E.; CHEN, C..S.; INGBER, D.E. - Cellular control lies in the balance of forces. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, **10**: 232-239, 1998.
- CLARK, J.S.; JEFFS, B.,; DAVIDSON, A.O; LEE, W.K.; ANDERSON, N.H.; BIHOREAU, M.T.; BROSNAN, M.J.; DEVLIN, A.M.,; KELMAN, A.W.; LINDPAINTNER, K.; DOMINICZAK, A.F. - Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. **Hypertension**, **28**: 898-906, 1996.

- CLERK, A.; BOGOYEVITCH, M. A.; ANDERSON, M.B. & SUGDEN, P.H. – Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. **J Biol Chem**, **269**: 32848-32857, 1994.
- CLERK, A.; MICHAEL, A. & SUGDEN, P.H. – Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? – **J Cell Biol**, **142**:523-535, 1998.
- COOPER, G.; KENT, R.L.; UBOH, C.E.; THOMPSON, E.W.; MARINO, T.A. – Hemodynamic versus adrenergic control of cat right ventricular hypertrophy. **J. Clin. Invest.**, **75**:1403–1414, 1985.
- COOPER, G. - Basic determinants of myocardial hypertrophy: A review of molecular mechanisms. **Annu. Rev. Physiol.**, **49**:501-518, 1987
- COOPER G. - Basic determinants of myocardial hypertrophy: A review of molecular mechanisms. **Annu. Rev. Med.**, **48**:13–23, 1997.
- CORDA, S.; MEBAZAA, A.; GANDOLFINI, M.P.; FITTING, C.; MAROTTE, F.; PEYNET, J.; CHARLEMAGNE, D.; CAVAILLON, J.M.; PAYEN, D.; RAPPAPORT, L.; SAMUEL, J.L.- Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of Fibro-blast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. **Circ. Res.**, **81**:679–687, 1997.
- COREA, L.; BENTIVOGLIO, M.; VERDECCHIA, P. - Echocardiographic left ventricular hypertrophy as related to arterial pressure and plasma norepinephrine concentration in arterial hypertension: reversal by atenolol treatment. **Hypertension**, **5**:837-843, 1983.
- DANOWSKI, B.A.; IMANAKA-YOSHIDA, K.; SANGER, J.M.; SANGER, J.W. - Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. **J. Cell. Biol.**, **118**: 1411–1420, 1992.

- DECKER, R.S.; COOK, M.G.; BEHNKE-BARCLAY, M.M.; DECKER, M.L.; LESCH, M.; SA MAREL, A.M. - Catecholamines modulate protein turnover in cultured, quiescent rabbit cardiac myocytes. **Am. J. Physiol.**, **265**:H329–H339, 1993.
- DUNN, F.G.; OIGMAN, W.; SUNGAARD-RIISE, K.; MESSERLI, F.H.; VENTURA, H.; REISIN, E.; FROHLICH, E.D. - Racial differences in cardiac adaptation to essential hypertension determined by echocardiographic indexes. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **1**:1348-1351.
- FERNANDES, M.; ONESTI, G.; FIORENTINI, T.; KIM, K.E.; SWARTZ, C. - Effect of chronic administration on the blood pressure and heart weight in experimental renal hypertension. **Life Sci**, **18**:967-970, 1976.
- FINK, C.; ERGÜN, S.; KRALISCH, D.; REMMERS, U.; WEIL, J.; ESCHENHAGEN, T. - Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. **Faseb J.**, **14**: 669–679, 2000.
- FLORENZANO, F. & GLANTZ, A.S. - Left ventricular mechanical adaptation to chronic aortic regurgitation in intact dogs. **Am. J. Physiol.**, **252**:H969-H984, 1987.
- FOUAD-TARAZI, F.M.; IMAMURA, M.; BRAVO, E.L.; ROSSI, G.; NAGI, H.K.; LIN, W.W.; CRESSMAN, M.; WICKER, P. - Differences in left ventricular structural and functional changes between pheochromocytoma and essential hypertension. **Am. J. Hypertension** , **5**:134-140, 1992.
- FRANCHINI, K.G.; TORSONI, A.S.; SOARES, P.H.A.; SAAD, M.J.A. - Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ. Res.**, **87**:558-565, 2000.
- FRENCH, A.S. - Mechanotransduction. **Ann. Rev. Physiol**, **54**: 135-152, 1992.
- FULLER, S.J.; GAITANAKI, C.J.; SUGDEN, P.H. - Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. **Biochem. J.**, **266**:727–736, 1990.

- GIANCOTTI, F.G. & RUOSLAHTI, E. -Integrin signaling. **Science** **285**:1028 – 1032,1999.
- GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L.P. - Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J. Clin. Invest**, **56**:56-64, 1975.
- GUNTHER, S. & GROSSMAN W.. Determinants of ventricular fuction in pressure overload hy-pertrophy in man 59:679-687, 1979.
- HAGIWARA, N.; MASUDA, H.; SHODA, M.; IRISAWA, H. - Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. **J. Physiol.**, **456**:285–302, 1992.
- HAMET, P.; KAISER, M.A.; SUN, Y.; PAGE, V.; VINCENT, M.; KREN, V.; PRAVENEC, M.; KUNES, J.; TREMBLAY, J.; SAMANI, N.J. - HSP27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. **Hypertension**, **28**: 1112-1117, 1996.
- HAMILL, O.P. & McBRIDE, D. - Rapid adaptation of single mechanosensitive channels in Xeno-pus oocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **89**:7462–7466, 1992
- HARADA, K.; KOMURO, I.; SHIOJIMA, I.; HAYASHI, D.; KUDOH, S.; MIZUNO, T.; KIJIMA, K.; MATSUBARA, H.; SUGAYA, T.; MURAKAMI, K.; YAZAKI, Y. - Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. **Circulation**, **97**:1952–1959, 1998.
- HARDER, B.A.; SCHAUB, M.C.; EPPENBERGER, H.M.; EPPENBERGER-EBERHARDT, M. – Influence of fibroblast growth factor (2FGF) and insulin-like growth factor (IGF-I) on cyto-skeletal and contractile structures and on atrial natriuretic factor (ANF) expression in adult rat ventricular cardiomyocytes in culture. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **28**:19-31, 1996.
- HARRIS, E.L.; PHELAN, E.L.; THOMPSON, C.M.; MILLAR, J.A.; GRIGOR, M.R. - Heart mass and blood pressure have separate genetic determinants in the New Zealand genetically hypertensive (GH) rat. **J. Hypertens.**, **13**: 397-404, 1995.

- HEFTI, M.A.; HARDER, B.A.; EPPENBERGER, H.M.; SCHAUB, M.C. - Signaling pathways In cardiac myocyte hypertrophy. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **29**:2873-2892, 1997.
- HU, H. & SACHS, F. - Stretch-activated ion channels in the heart. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **29**: 1511-1523, 1997.
- HUNTER, J.J.; GRACE, A.; CHIEN, K.R. - Molecular and cellular biology of cardiac hypertrophy and failure. Em: **Molecular Basis of Cardiovascular Disease**. Editor: Kenneth R Chien. WB Saunders Company, Philadelphia, 1999, pp 211-250.
- INNES, B.A.; McLAUGHLIN, M.G.; KAPUSCINSKI, M.K.; JACOB, H.J.; HARRAP, S.B. - Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. **Hypertension**, **31**: 741-746, 1998.
- IZUMO, S. & SADOSHIMA, J. - The cellular and molecular response of cardiac myocytes to me chanical stress. **Annu. Rev. Physiol.**, **59**:551-571, 1997.
- JANMEY, P.A. - The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical cou pling. **Physiol. Rev.**, **78**: 763-781, 1998.
- KAYE, D.; PIMENTAL, D.; PRASAD, S.; MAKI, T.; BERGER, H.J.; McNEIL, P.L.; SMITH, T.W.; KELLY, R.A. - Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro. **J. Clin. Invest**, **97**:281-291,1996.
- KENT, R.L.; UBOH, C.E.; THOMPSON, E.W.; GORDON, S.S.; MARINO, T.A.; HOOBER, J.K.; COOPER, G. - Biochemical and structural correlates in unloaded and reloaded cat myocardium. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **17**:153-165, 1985.
- KING, B.D.; SACK, D.; KICHUK, M.R.; HINTZE, T.H. - Absence of hypertension despite chronic marked elevations in plasma norepinephrine in conscious dogs. **Hypertension**, **9**:682- 690, 1987.

- KOIDE, M.; NGATSU, M.; ZILE, M.R.; HAMAWAKI, M.; SWINDLE, M.M.; KEECH, G.; DE FREYTE, G.; TAGAWA, H.; COOPER, G. IV; CARABELLO, B.A. - Premorbid determinants of left ventricular dysfunction in a novel model of gradually induced pressure overload in the adult canine. **Circulation**, **95**:1601-1610, 1997.
- KOJIMA, M.; SHIOJIMA, I.; YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; ZOU, Z.; WANG, Y.; MIZUNO, T.; UEKI, K.; TOBE, K.; KADOWAKI, T. - Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. **Circulation**, **89**: 2204–2211, 1994.
- KOMURO, I.; KAIDA, T.; SHIBAZAKI, Y.; KURABAYASHI, M.; KATOH, Y.; HOH, E.; TA KAKU, F.; YAZAKI, Y. - Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. **J. Biol. Chem.**, **265**:3595–3598, 1990.
- KOMURO, I.; KUDO, S.; YAMAZAKI, T.; ZOU, Y.; SHIOJIMA, I.; YAZAKI, Y. - Me-mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. **Faseb J.**, **10**: 631–636, 1996.
- KNOWLTON, K.U.; MICHEL, M.C.; ITANI, M.; SHUBEITA, H.E.; ISHIHARA, K.; BROWN, J.H.; CHIEN, K.R. - The α 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. **J. Biol. Chem.**, 15374–15380, 1993.
- KORNBERG, L.; EARP, H.S.; PARSONS, J.T.; SCHALLER, M.; JULIANO, R.L. - Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.**, **267**:23439–23442, 1992.
- KUPPUSWAMY, D.; KERR, C.; NARISHIGE, T.; KASI, V.S.; MENICK, D.R.; COOPER, G. – Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. **J Biol Chem.**, **272**:4500–4508, 1997.
- KYRIAKIS, J.M. AND AVRUCH, J. – Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev** , **81**:807-869,2001.

- LAKS, M.M.; MORADY, F.; SWAN, H.J.C. - Myocardial hypertrophy produced by chronic infusion of subhypertensive doses of norepinephrine in the dog. **Chest**, **64**:75-78, 1973.
- LIANG, F. & GARDNER, D.G. - Autocrine/paracrine determinants of strain-activated brain natriuretic peptide gene expression in cultured cardiac myocytes. **J Biol Chem**, **273**:14612-14619, 1998.
- LINDPAINTER, K. & SEM, S. - Role of sodium in hypertensive cardiac hypertrophy. **Circ. Res.**, **57**:610-617, 1985.
- LIPFER, L.; HAIMOVICH, B.; SCHALLER, M. D.; COBB, B.S.; PARSONS, J.T. & BRUGGE, J.S. - Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. **J Cell Biol**, **119**:905-912, 1992.
- MALHOTRA, R.; SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. - Mechanical stretch upregulates expression of the local renin-angiotensin system genes in cardiac myocytes in vitro. **Circulation**, **90**:I-195, 1994 (Abstr.)
- MANIOTIS, A.J.; CHEN, C.S.; INGBER, D.E. - Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **94**: 849-854, 1997.
- MANN, D.L.; KENT, R.L.; COOPER, G. IV. - Load regulation of the properties of adult feline cardiocytes: growth induction by cellular deformation. **Circ. Res.**, **64**: 1079-1090, 1989.
- MATSUDA, N.; HAGIWARA, N.; SHODA, M.; KASANUKI, H.; HOSODA, S. - Enhancement of the L-type Ca^{+2} current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocytes. **Circ. Res.**, **78**:650-659, 1996.
- MILANO, C.A.; DOLBER, P.C.; ROCKMAN, H.A.; BOND, R.A.; VENABLE, M.E.; ALLEN, L.F.; LEFKOWITZ, R.J. - Myocardial expression of a constitutively active $\alpha 1B$ -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **91**:10109-10113, 1994.

- MIYAMOTO, S.; TERAMOTO, H.; GUTKIND, J.S. & YAMADA, K.M.- Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. **J Cell Biol**, **135**:1633-1642,1992.
- MORGAN, H.E. & BAKER, K.M. - Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. **Circulation**, **83**:13-25, 1991.
- MORRIS, C.E. - Mechanosensitive ion channels. **J. Membr. Biol.**, **113**: 93-107,1990.
- NGUYEN, T.N.P.; CHAGAS, A.C.P.; GLANTZ, A.S. - Left ventricular adaptation to gradual renal vascular hypertension in dogs. **Am. J. Physiol.**, **265**:H22-H38, 1993.
- NICOL, R.L.; FREY, N.; OLSON, E.N. - From the sarcomere to the nucleus:role of genetics and signaling in structural heart disease. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**,**01**:179-223, 2000.
- OMENS, J.H. - Stress and strain as regulators of myocardial growth. **Prog. Bioph. and Molec. Biol.**, **69**:559-572, 1998.
- OPEIE, L.H. - Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. Em: **Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine**. Editor: E. Braunwald. 5th Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1997.
- OSTMAN-SMITH, I. - Cardiac sympathetic nerves as the final common pathway in the initiation of adaptive cardiac hypertrophy. **Clin. Sci.**, **61**:265-272, 1981.
- PARDO, J.V.; SICILIANO, J.D.; CRAIG, S.W. - Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. **J. Cell. Biol.**, **97**:1081-1088, 1983.
- PARKER, T.G.; PACKER, S.E.; SCHNEIDER, M.D. - Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. **J. Clin. Invest**, **85**:507-514, 1990.

- PATEL, M.B.; STEWART, J.M.; LOUD, A.V.; ANVERSA, P.; WANG, J.; FIEGEL, L.; HINTZE, T.H. - Altered function and structure of the heart in dogs with chronic elevation in plasma norepinephrine. **Circulation**, **84**:2091–2100, 1991.
- PENNICA, D.; KING, K.L.; SHAW, K.J.; CHIEN, K.R. - Expression and cloning of cardiotrophin-1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **92**:1142-1146, 1995.
- PETERSON, M.B.; LESCH, M. - Protein synthesis and amino acid transport in the isolated rabbit right ventricular papillary muscle. Effect of isometric tension development. **Circ. Res.**, **31**:317–327, 1972.
- PFEFFER, J.M.; FISCHER, T.A.; PFEFFER, M.A. - Angiotensin-converting enzyme inhibition and ventricular remodeling after myocardial infarction. **Annu. Rev. Physiol.**, **57**:805–826, 1995.
- PINSON, A.; SCHLÜTER, K.D.; ZHOU, X.J.; SCHWARTZ, P.; KESSLER-ICEKSON, G.; PIPER, H.M. - Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **25**:477–490, 1993.
- POST, G.R.; GOLDSTEIN, D.; THUERAUF, D.J.; GLENBOTSKI, C.C. & BROWN, J.H. – Dis sociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. **J Biol Chem**, **271**: 8452-8457, 1996.
- POST, W.S.; LARSON, M.G.; MYERS, R.H.; GALDERISI, M.; LEVY, D. - Heritability of left ventricular mass: the Framingham Heart Study. **Hypertension**, **30**: 1025-1028, 1997.
- PRAVENEC, M.; GAUGUIER, D.; SCHOTT, J.J.; BUARD, J.; KREN, V.; BILA, V.; SZPIRER, C.; SZPIRER, J.; WANG, J.M.; HUANG, H.; LEZIN, E.S.; SPENCE, M.A.; FLODMAN, P.; PRINTZ, M.; LATHROP, G.M.; VERGNAUD, G.; KURTZ, T.W. - Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. **J. Clin. Invest**, **96**: 1973-1978, 1995.

- RAVOGLI, A.; TRAZZI, S.; VILLANI, A.; MUTTI, E.; CUSPIDI, C.; SAMPIERI, L.; DE AM-BROGGI, L.; PARATI, G.; ZANCHETTI, A.; MANCIA, G. - Early 24-hour blood pressure elevation in normotensive subjects with parental hypertension. **Hypertension**, **16**:491-497, 1990.
- RUKNUDIN, A.; SACHS, F.; BUSTAMANTE, J.O. - Stretch-activated ion channels in tissue-cultured chick heart. **Am. J. Physiol.**, **264**:H960-972, 1993.
- SACHS, F. - Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. **Mol. Cell. Bio-chem.**, **104**:57-60, 1991.
- SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. - Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: a critical role of the AT1 receptor subtype. **Circ. Res.**, **3**:413-423, 1993.
- SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. - Roles of integrins in cell swelling-induced tyrosine phosphorylation in cardiac myocytes. **Circulation**. 1994; 90(suppl I):I-305. (Abst).
- SADOSHIMA, J.; TAKAHASHI, T.; JAHN, L; IZUMO, S. - Roles of mechanosensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **89**:9905-9909, 1992
- SADOSHIMA, J.; XU, Y.; SLAYTER, H.S.; IZUMO, S. - Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. **Cell.**, **75**: 977-984, 1993.
- SASAKI, N.; MITSUIYE, T.; NOMA, A. - Effects of mechanical stretch on membrane currents of single ventricular myocytes of guinea-pig heart. **Jpn. J. Physiol.**, **42**: 957-970, 1992.
- SASAKI, N.; MITSUIYE, T.; WANG, Z.; NOMA, A. - Increase of the delayed rectifier K^C and Na^(C)-K^C pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. **Circ. Res.**, **75**:887-895, 1994.

- SCHALLER, M.D.; HILDEBRAND, J.D.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W.; VINES, R.R.; PARSONS, J.T. - Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. **Mol. Cell. Biol.**, **14**:1680–1688, 1994.
- SCHEINOWITZ, M.; ABRAMOV, D.; KOTLYAR, A.; SAVION, N.; ELDAR, M. – Continuous administration of insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor does not affect left ventricular geometry after acute myocardial infarction in rats. **Int. J. Cardiol.**, **63**:217–221, 1998.
- SCHEINOWITZ, M.; KOTLYAR, A.; ZIMAND, S.; OHAD, D.; LEIBOVITZ, I.; BLOOM, N.; GOLDBERG, I.; NASS, D.; ENGELBERG, S.; SAVION, N.; ELDAR, M. - Basic fibroblast growth factor induces myocardial hypertrophy following acute infarction in rats. **Exp. Physiol.**, **3**:585-593, 1998.
- SCHLAEPFER, D.D.; HANKS, S.; HUNTER, T.; VAN DER GEER, P. - Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. **Nature**, **372**:786–791, 1994.
- SCHLAEPFER, D.D. & HUNTER, T. - Focal adhesion kinase overexpression enhances Ras-dependent integrin signaling to Erk2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. **J. Biol. Chem.**, **272**:13189–13195, 1997.
- SCHLÜTER, K.D. & PIPER, H.M. - Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. **Am. J. Physiol.**, **263**:H1739–H1746, 1992.
- SCHMIDT, C.; POMMERENKE, H.; DURR, F.; NEBE, B. and RYCHLY, J. – Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. **J Biol Chem**, **273**:5081-5085, 1998.
- SCHUNKERT, H.; DZAU, V.J.; TANG, S.S.; HIRSCH, A.T.; APSTEIN, C.S.; LORELL, B.H. – Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effect on coronary resistance, contractility, and relaxation. **J. Clin. Invest**, **86**:1913–1920, 1990.

- SACKIN, H. - Mechanosensitive channels. **Annu. Rev. Physiol.**, **57**:333-353, 1995.
- SEM, S.; TARAZI, R.C.; KHAIRALLAH, P.A.; BUMPUS, F.M. - Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.**, **35**:775-781, 1974.
- SEKO, Y.; TAKAHASHI, N.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; YAZAKI, Y. - Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **259**:8-14, 1999.
- SHATTIL, S.J.; HAIMOVICH, B.; CUNNINGHAM, M.; LIPFERT, L.; PARSONS, J.T.; GRINSBERG, M.H. and BRUGGE, J.S.- Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. **J Biol Chem**, **269**:14738-14735, 1994.
- SHIOJIMA, I.; KOMURO, I.; YAMAZAKI, T.; NAGAI, R.; YAZAKI, Y. - Molecular aspects of the control of myocardial relaxation. In: Lorell BH, Grossman W, eds. **Diastolic Relaxation of the Heart**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1994, pag 25 – pag32.
- SHYY, J.Y. and CHIEN, S. – Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. **Curr Opin Cell Biol**, **9**: 707-713, 1997.
- SHYU, K.G.; CHEN, J.J.; SHIH, N.L.; CHANG, H.; WANG, D.L.; LIEN, W.P.; LIEW, C.C. – Angiotensinogen gene expression is induced by cyclical mechanical stretch in cultured rat cardiomyocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **211**:241-248, 1995.
- SIGURDSON, W.; RUKNUDIN, A.; SACHS, F. - Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels. **Am. J. Physiol.**, **262**:H1110-1115, 1992.
- SIMPSON, P.C.; LONG, C.S.; WASPE, L.E.; HENRICH, C.J.; ORDAHL, C.P. - Transcription of early developmental isogenes in cardiac myocyte hypertrophy. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **21** (Suppl V):79-89, 1989.

- SIMPSON, P. & McGRATH, A. - Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an α_1 adrenergic response. **J. Clin. Invest.**, **72**:732– 738, 1983.
- SIMPSON, P.; McGRATH, A.; SAVION, S. - Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. **Circ. Res.**, **51**: 787–801, 1982.
- SIMPSON, P. - Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an α_1 -adrenergic receptor and induction of beating through α_1 and β_1 -adrenergic receptor interaction. **Circ. Res.**, **56**:884–894, 1985.
- SPANN, J.F.; BOVE, A.A.; NATARAJAN, G.; KREULENS, T. - Ventricular performance, pump function and compensatory mechanisms in patients with aortic stenosis. **Circulation**, **62**:576–583, 1980.
- SOKABE, M. & SACHS, F. - Towards molecular mechanism of activation in mechanosensitive ion channels. In **Advances in Comparative and Environmental Physiology**, ed. F Ito, 1992; 10:55–77. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag
- SONODA, Y.; WATANABE, S.; MATSUMOTO, Y.; AIZU-YOKOTA, E.; KASAHARA, T. - FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. **J. Biol. Chem.**, **274**:36544–36549, 1999.
- SUZUKI, J.; MATSUBARA, H.; URAKAMI, M.; INADA, M. - Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. **Circ. Res.**, **73**:439–447, 1993.
- TANG, D.; MEHTA, D. & GUNST, S.T. - Mechanosensitive tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase in tracheal smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, **276**:C250–C258, 1999.
- THIERFELDER, L.; WATKINS, H.; MACRAE, C.; LAMAS, R.; MCKENNA, W.; VOSBERG, H.P.; SEIDMAN, J.G.; SEIDMAN, C.E. - Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. **Cell**, **77**:701–712, 1994.

- TOMITA, Y.; KUSAMA, Y.; SEINO, Y.; MUNAKATA, K.; KISHIDA, H.; HAYAKAWA, H. – Increased accumulation of acidic fibroblast growth factor in left ventricular myocytes of patients with idiopathic cardiomyopathy. **Am. Heart J.**, **134**:779-786, 1997.
- VAN WAGONER, D.R. - Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. **Circ. Res.**, **72**:973–983, 1993.
- VANDENBURGH, H.H. - Mechanical forces and their second messengers in stimulating cell growth in vitro. **Am. J. Physiol.**, **262**:R350-355, 1992.
- VERHAAREN, H.A.; SCHIEKEN, R.M.; MOSTELLER, M.; HEWITT, J.K.; EAVES, L.J.; NANCE, W.E. - Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). **Am. J. Cardiol.**, **68**: 661-668, 1991.
- VON HARSDORF, R.; LANG, R.E.; FULLERTON, M.; WOODCOCK, E.A. - Myocardial stretch stimulates phosphatidylinositol turnover. **Circ. Res.**, **65**:494 –501, 1989.
- XENOPHONTOS, X.P.; GORDON, E.E.; MORGAN, H.E. - Effect of intraventricular pressure on protein synthesis in arrested rat hearts. **Am. J. Physiol.**, **251**:C95–C98, 1986.
- YAMAMOTO, K.; QUYNH, N.; DANG, B.S.; MAEDA, Y.; HUANG, H.; KELLY, R.T.; LEE, R. A.- Regulation of cardiomyocyte mechanotransduction by the cardiac cycle. **Circulation**, **103**: 1459- 1464, 2001.
- YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; KUDOH, S.- Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. **J Biol Chem**, **271**:322103228, 1996.
- YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; KUDOH, S.; ZOU, Y.; SHIOJIMA, I.; MIZUNO, T.; TAKANO, H.; HIROI, Y.; UEKI, K.; TOBE, K. - Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. **Circ. Res.**, **77**:258–265, 1995.

- YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; KUDOH, S.; ZOU, Y.; NAGAI, R.; AIKAWA, R.; UOZUMI, H.; YAZAKI, Y. - Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Circ. Res.**, **82**, 430–437, 1998.
- YAMAZAKI, T.; TOBE, K.; HOH, E.; MAEMURA, K.; KAIDA, T.; KOMURO, I.; TAMEMOTO, H.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R.; YAZAKI, Y. – Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. **J Biol Chem**, **268**:12069-12076, 1993.
- WANG, N.; BUTLER, J. P. & INGBER, D.E. – Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. **Science**, **260**:1124-1127, 1993.
- WANG, N. AND INGBER, D.E. – Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape and mechanical tension. **Biophys J**, **66**:2181-2189, 1994.
- ZHANG, X.; DOSTAL, D.E.; REISS, K.; CHENG, W.; KAJSTURA, J.; LI, P.; HUANG, H.; SONNENBLICK, E.H.; MEGGS, L.G.; BAKER, K.M. - Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. **Am. J. Physiol**, **269**:H1791–802, 1995.
- ZOU, Y.; KOMURO, I.; YAMAZAKI, T.; AIKAWA, R.; KUDOH, S.; SHIOJIMA, I.; HIROI, Y.; MIZUMO, T.; YAZAKI, Y. – Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, **271**: 33592-33597, 1996.



9. *ANEXO*

Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity

PRISCILA P. DOMINGOS, PRISCILA M. FONSECA,
WILSON NADRUZ, JR., AND KLEBER G. FRANCHINI

Department of Internal Medicine, School of Medicine,
State University of Campinas, Campinas, São Paulo 13081-970, Brazil

Received 24 June 2001; accepted in final form 10 October 2001

Domingos, Priscila P., Priscila M. Fonseca, Wilson Nadruz, Jr., and Kleber G. Franchini. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H556–H564, 2002; 10.1152/ajpheart.00534.2001.—We investigated the influence of stretch and contractile activity on load-induced activation of focal adhesion kinase (FAK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 in isolated rat hearts. Increases of diastolic pressure from ~0 to ~15 mmHg rapidly increased FAK tyrosine phosphorylation (maximum: 2.3-fold) and binding to c-Src (maximum: 2.8-fold) and Grb2 (maximum: 3.6-fold). This was paralleled by activation (maximum: 2.8-fold) and binding of ERK1/2 to FAK. FAK and ERK1/2 were immunolocalized at sarcolemmal sites of cardiac myocytes and in the nuclei, in the case of ERK1/2. Balloon inflation to raise ventricular pressure in hearts perfused with cardioplegic solution also activated FAK and ERK1/2. However, increases in contractile activity induced by increasing calcium concentration in the perfusate (from 0.5 to 5 mM) did not activate the FAK multicomponent signaling complex or ERK1/2 in the myocardium. These results indicate that stretch rather than contractile activity induces FAK and ERK1/2 activation in the myocardium. In addition, the activation and binding of ERK1/2 to FAK suggest that FAK drives the load-induced activation of ERK1/2.

cytoskeleton; cell signaling; rat heart

MECHANICAL INPUT PLAYS A MAJOR ROLE in cardiac adaptive responses to hemodynamic overload (10). In addition to triggering the force-length mechanism and homeometric autoregulation, mechanical input activates signaling mechanisms involved in hypertrophic growth of cardiac myocytes, the hallmark of the myocardial structural adaptation in response to sustained hemodynamic overload (11, 27). How mechanical input is converted to biochemical signals that induce the myocardial hypertrophic response is still not completely understood. However, increasing evidence supports the notion that living cells transduce and transmit forces into biochemical signals through specialized focal sites of the membrane, whereby integrins connect

the cytoskeleton to the extracellular matrix (6, 16, 17, 23). This includes cardiac and skeletal myocytes, where the costameres, the counterpart of the focal adhesion complex, connect the sarcolemma to sarcomere Z lines through cytoskeletal proteins (4, 12, 15, 25, 33, 38). Such structures provide a continuous path for mechanical signal transfer from the extracellular matrix to the sarcomere, nucleus, and internal organelles. In addition, many signaling molecules are immobilized and have their function dependent on the anchorage to the cytoskeleton, which provides a physical basis for mechanobiochemical transduction (6, 14, 17).

Among the various signaling molecules involved in integrin-mediated signaling, focal adhesion kinase (FAK) has received much attention because experimental evidence indicates that it plays a key role in the cellular effects elicited by the integrin/cytoskeletal system, such as cell growth and gene expression (6, 14). The precise mechanism that links integrins to FAK activation is unknown, although it is clear that integrin clustering mediates FAK autophosphorylation, predominantly at Tyr³⁹⁷ (7, 29). After autophosphorylation, additional tyrosine residues of FAK are phosphorylated through the action of c-Src, which binds to FAK at Tyr³⁹⁷ via its SH2 domain (7, 29). This leads to the binding of other SH2 domain proteins such as phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (14) and the Grb2/Sos complex (30), which in turn activate, among others, the Akt and Ras/mitogen-activated protein (MAP) kinase signal transduction cascades, respectively (30, 36). FAK activation has been demonstrated to occur in isolated cardiac myocytes subjected to pulsatile mechanical stretch and in overloaded feline and rat myocardium (13, 18, 20, 32). With the use of an experimental preparation in which the in situ rat heart was subjected to controlled pressure overload, we were able to show that pressure overload elicits rapid activation of the multicomponent signaling complex associated with FAK in the rat heart (13). The close relationship among increased load and FAK/c-Src activation, FAK/PI3K/Grb2 association, and the concurrent activation of Akt and extracellular signal-regulated kinase

Address for reprint requests and other correspondence: K. G. Franchini, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz," 13081-970 Campinas SP, Brazil (E-mail: franchini@obelix.unicamp.br).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

(ERK)1/2, two potential downstream effectors of the FAK multicomponent signaling complex, indicated that it may play a role in the earlier myocardial responses to increased workload. Although these results provide evidence that FAK is activated in response to hemodynamic overload, the fact that they were obtained in an "in situ" preparation precluded a better understanding about the nature of the mechanical forces involved in this process.

Thus the present study was designed to examine, in an isolated perfused heart preparation, the separate influences of mechanical stimulus, tension development, and contractile activity on FAK activation during increases in myocardial workload. In addition, ERK1/2 activation, a downstream effector of FAK, was studied by using an anti-phospho-specific antibody against ERK1/2. The relative importance of myocardial passive tension and contractile activity on load-induced FAK and ERK1/2 activation were examined by perfusing isolated hearts with cardioplegic solution and by increasing calcium concentration (Ca_0) in the perfusate, respectively. Furthermore, the localization of FAK and ERK1/2 in cardiac myocytes were confirmed by immunohistochemical analysis of myocardial sections. Our findings demonstrate that mechanical stretch, rather than contractile activity, triggers FAK and ERK1/2 activation during increased myocardium workload.

METHODS

Antibodies and Chemicals

Antibodies against FAK, c-Src, Grb2, ERK1/2, phosphorylated (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)-ERK1/2, and phosphotyrosine were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Affinity-purified rabbit anti-mouse IgG was from Dako. ¹²⁵I-labeled protein A (¹²⁵I)protein A, anti-rabbit IgG-biotin, and streptavidin-peroxidase were from Amersham. Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia. All other reagent grade chemicals were from Sigma.

Isolated Perfused Heart Preparation

All animals received care in compliance with the principles of laboratory animal care formulated by the university's Animal Care and Use Committee. Wistar rats weighing ~200 g were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg ip). After intravenous administration of heparin (500 IU/kg), the rats' chests were opened, and the hearts were rapidly excised and mounted on a nonrecirculating Langendorff perfusion apparatus. Retrograde perfusion was established at a pressure of 70 mmHg with oxygenated normothermic HEPES buffer (pH 7.4) containing (in mM) 20 HEPES, 137 NaCl, 1.2 MgSO₄, 5 KCl, 1.5 CaCl₂, and 16 D-glucose. In experiments performed to analyze the influence of changes in contractile activity on FAK activation, Ca_0 of HEPES buffer was increased from 0.5 mM to 1.5, 3.0, and 5.0 mM. To evaluate the contribution of passive tension-stretch on FAK activation, the hearts were perfused with a cardioplegic solution containing (in mM) 20 HEPES, 127 NaCl, 15 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.5 CaCl₂, and 16 D-glucose; pH 7.4. A small fluid-filled latex balloon connected to a polyethylene-50 tube was positioned into the left ventricular chamber and connected to a pressure

transducer calibrated to a mercury manometer for ventricular pressure monitoring. The pressure signal was amplified (GP4A General Purpose Amplifier, Stentech), digitized using an analog-to-digital converter, and visualized on a personal computer loaded with Windaq software (DATAQ). Data were stored on a disk for off-line analyses. Pressure was recorded at different intraventricular volumes according to the protocols described in *Experimental Design*.

Tissue Homogenization

After the pressure recording session, the heart was rapidly removed from the perfusion apparatus, and the left ventricle was minced coarsely and homogenized in ~10 volumes of solubilization buffer [1% Triton X-100, 100 mM Tris·HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.1 mg/ml aprotinin] at 4°C with a Polytron operated at maximum speed for 30 s. The extract was centrifuged at 10,000 g at 4°C for 30 min, and the supernatant was used for the assay. Protein concentration was determined with the Bradford dye-binding method. The supernatant was treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol heated in a boiling water bath for 4 min and then resolved on SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories; Richmond, CA). Equal amounts of total protein were used for all samples.

Protein Analysis by Immunoblotting

Aliquots of whole extracts or immunoprecipitated proteins with specific antibodies and protein A-Sepharose were treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 4 min, after which they were subjected to SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) in a Bio-Rad miniature gel apparatus (Mini-Protean). Electrophoresis of proteins from the gel to nitrocellulose membrane was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean). Non-specific protein binding to the nitrocellulose membrane was reduced by preincubating the filter overnight at 4°C in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose membrane blot was incubated with anti-FAK, anti-Src, anti-phosphotyrosine, anti-Grb2, anti-ERK1/2, or anti-phosphorylated ERK1/2 antibodies diluted in 10 ml of blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4°C and then washed for 60 min in blocking buffer without milk or BSA. The blots were subsequently incubated with 2 µCi [¹²⁵I]protein A (30 µCi/µg) in 10 ml of blocking buffer for 2 h at room temperature and then washed again for 30 min as described above. [¹²⁵I]protein A bound to the specific antibodies was detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak; Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screens (DuPont; Wilmington, DE) at -80°C for 24 h. Band intensities were quantified by optical densitometry (model GS 300 densitometer, Hoefer Scientific Instruments; San Francisco, CA) of the developed autoradiographs.

Tissue Preparation for Morphometry and Immunohistochemistry

The ventricles were fixed by overnight immersion with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and processed to inclusion in Histotec (Merck). Sections used for

morphometric analysis of cardiac myocytes were stained with hematoxylin-eosin. Sections for immunohistochemistry (5 μ m thick) were transferred to poly-L-lysine-coated glass slides. The endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.03% H₂O₂ in 0.1 M phosphate-saline buffer (PBS) at room temperature, for 30 min. The sections were preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk on 0.1 M PBS) for 45 min at room temperature, followed by overnight incubation with the primary antibodies anti-FAK (1:100 dilution) and anti-ERK1/2 (1:75 dilution) at 4°C. The sections were extensively rinsed in 0.05 M PBS and incubated with biotin-conjugated secondary antibodies (1:300 dilution) for 2 h at 25°C. After sections were washed as above, they were incubated with streptavidin-peroxidase complex (1:500 dilution) for 45 min at room temperature, rinsed again, and then subjected to freshly prepared diaminobenzidine (0.5 mg/ml) containing H₂O₂ (0.8%) for 5 min. The sections were then counterstained with hematoxylin and treated with lithium carbonate. Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

Experimental Design

Group 1: diastolic-systolic pressure relationship. After the baseline pressure-recording period (15 min), the volume of the balloon positioned into the left ventricle of each beating heart was increased to raise the diastolic pressure from ~0 mmHg to ~5, 10, or 15 mmHg for 10 min. In control hearts, the balloon pressure was maintained at the baseline level for 10 min more. After this period, the hearts were rapidly removed and processed for Western blotting and histology.

Group 2: perfusion with cardioplegic solution. In this protocol, the hearts were perfused with a cardioplegic solution. The balloon positioned into the left ventricle was filled to maintain its pressure at ~0 mmHg for 15 min. After this period, the balloon was further inflated to raise the filling pressure to ~5, 10, or 15 mmHg for 10 min more before the hearts were removed and homogenized for Western blotting.

Group 3: changes in Ca_o. In this group, the hearts were prepared as described for group 1, but they were perfused with buffers containing Ca_o of ~0.5, 1.5, 3.0, and 5.0 mM. Diastolic pressure was maintained at ~0 mmHg along the 25-min experimental period. After this period, the hearts were rapidly removed and processed for Western blotting.

Statistical Analysis

Data are presented as means $\pm$ SE. Differences between mean values were tested with one-way ANOVA for repeated measures and Bonferroni's multiple-range test. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Increases in Diastolic Pressure Activate FAK Multicomponent Signaling Complex and ERK1/2 in Rat Myocardium

The functional parameters and the diameters of cardiac myocytes of perfused hearts in which diastolic pressure was raised from ~0 to ~15 mmHg are shown in Fig. 1A and Table 1. Increases of diastolic left ventricular pressure produced the expected increases of

left ventricular systolic pressure, with no significant effect on spontaneous heart rate or on the rate of systolic pressure increase or decrease. The increases in left ventricular diastolic pressure were paralleled by reductions in the diameter of cardiac myocytes, indicating that these cells were progressively stretched by the increasing balloon inflation (Table 1). Moreover, the increases in the left ventricular diastolic and systolic pressures induced by the left ventricular balloon inflation were accompanied by increases in the tyrosine phosphorylation of FAK (Fig. 1B). Increases in diastolic pressure from ~0 to ~5 mmHg, which increased the systolic pressure by ~15 mmHg and reduced the cardiac myocytes diameter by ~15%, were accompanied by a twofold increase in the amount of tyrosine-phosphorylated FAK (Fig. 1B). Modest additional increases of FAK tyrosine phosphorylation were observed with balloon inflation to increase diastolic pressure to ~10 and ~15 mmHg.

FAK autophosphorylation at Tyr³⁹⁷ recruits and activates c-Src, which is responsible for further tyrosine phosphorylation of FAK at residues Tyr⁵⁷⁵⁻⁵⁷⁷, Tyr⁸⁶¹, and Tyr⁹²⁵ (6, 9, 14, 29, 30). This elicits further recruitment of signaling molecules such as Grb2, PI3K, and paxillin, resulting in the formation of a multicomponent signaling complex linked to various cellular functions. As shown in Fig. 1C, the load-induced FAK tyrosine phosphorylation was accompanied by an increase in the amount of c-Src coimmunoprecipitated with FAK, indicating a load-induced binding of c-Src to FAK. This was also paralleled by increases in the binding of Grb2 to FAK (Fig. 1D).

Grb2 potentially links the FAK signaling complex to the Ras/ERK1/2 pathway, related to gene regulation and cell growth. The load-induced activation of ERK1/2 was demonstrated by consistent increases in the amount of ERK1/2 detected with a specific antibody against phosphorylated (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)-ERK1/2 in the homogenates of hearts subjected to increased diastolic pressure (Fig. 2A). The link between FAK and ERK1/2 activation was further demonstrated by the load-dependent coimmunoprecipitation of FAK and ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 shown in Fig. 2B.

Immunohistochemical analysis indicated that myocardial FAK protein was localized mainly in cardiac myocytes (Fig. 3A). At higher magnification (Fig. 3B), FAK immunoreactivity appeared along the sarcolemma of cardiac myocytes and also in spots regularly distributed at the sarcoplasm, resembling the distribution of T-tubules. Immunohistochemical staining was also performed to determine the localization of ERK1/2 in the myocardium. As shown in Fig. 3, C and D, ERK1/2 protein was localized at the nuclei of cardiac myocytes, but a consistent sarcolemmal and sarcoplasmic localization was also detected. The distribution pattern of ERK1/2 in the cardiac myocytes, resembling the FAK distribution pattern, suggests the colocalization of FAK and ERK1/2 both at the sarcoplasmic and sarcolemmal sites.

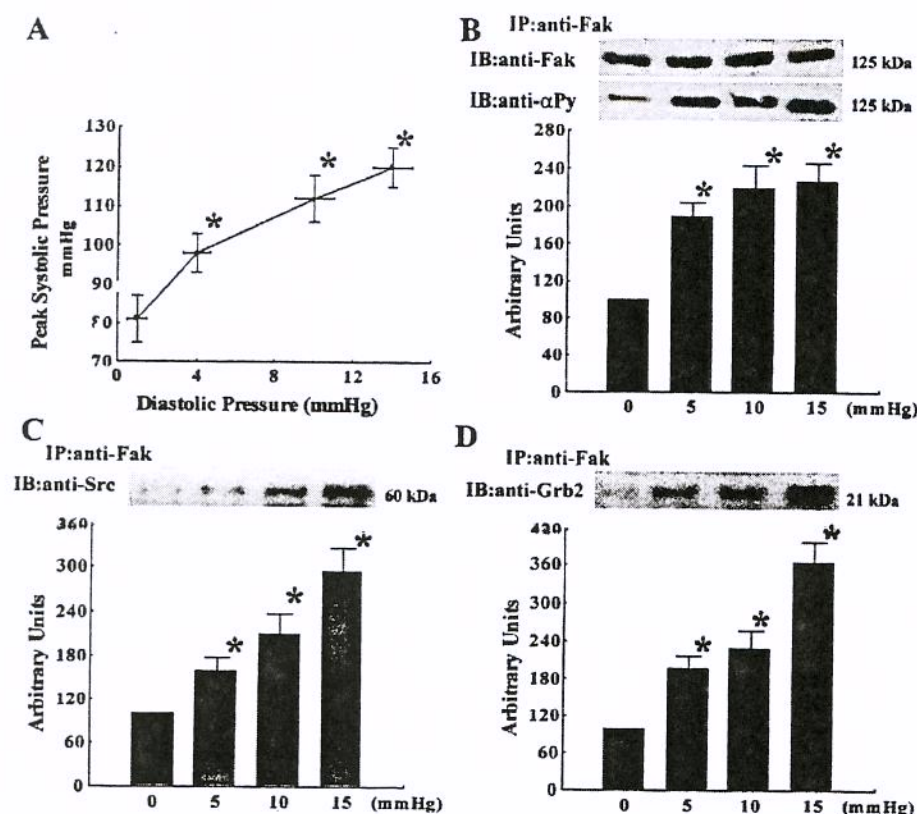


Fig. 1. Load-induced activation of the focal adhesion kinase (FAK) multicomponent signaling complex in the isolated perfused rat heart. **A**: graphic showing the diastolic/peak systolic pressure relationship of isolated perfused rat hearts ($n = 7$). **B**: representative blots (*top*) of immunoprecipitated (IP) FAK from myocardial extracts stained with anti-FAK and anti-phosphotyrosine (anti- α Py) antibodies. Increases in diastolic/peak systolic pressure above the baseline values (0/81 mmHg) was accompanied by increases in the amount of FAK tyrosine phosphorylation, whereas the amount of FAK remained constant. The graphic (*bottom*) shows the average values of the increases in FAK tyrosine phosphorylation as percent changes compared with baseline values (100%) obtained by densitometric readings of blots ($n = 7$). **C**: representative blot (*top*) and average values (*bottom*) of the amount of c-Src coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of hearts subjected to increasing workload ($n = 7$). **D**: representative blot (*top*) and average values (*bottom*) of the amount of Grb2 coimmunoprecipitated with FAK ($n = 7$ hearts). * $P < 0.05$ compared with control values. IB, immunoblotting.

Effect of Myocardial Passive Tension/Stretch on FAK and ERK1/2 Activation

Because increases in left ventricular diastolic pressure increased systolic pressure, it was not possible, in beating hearts, to distinguish between myocardial stretch and contractile activity as the major determinant of load-induced FAK and ERK1/2 activation. To test for the ability of increases in passive tension/stretch to activate these enzymes, we performed experiments in arrested hearts. As indicated in Fig. 4A, raising intraventricular pressure in these hearts still increased FAK tyrosine phosphorylation as well as the binding of c-Src (Fig. 4B) and Grb2 (Fig. 4C) to FAK.

Moreover, myocardial stretch was followed by ERK1/2 activation (Fig. 5A) and binding to FAK (Fig. 5B).

Effects of Increases in Contractile Activity on FAK and ERK1/2 Activation

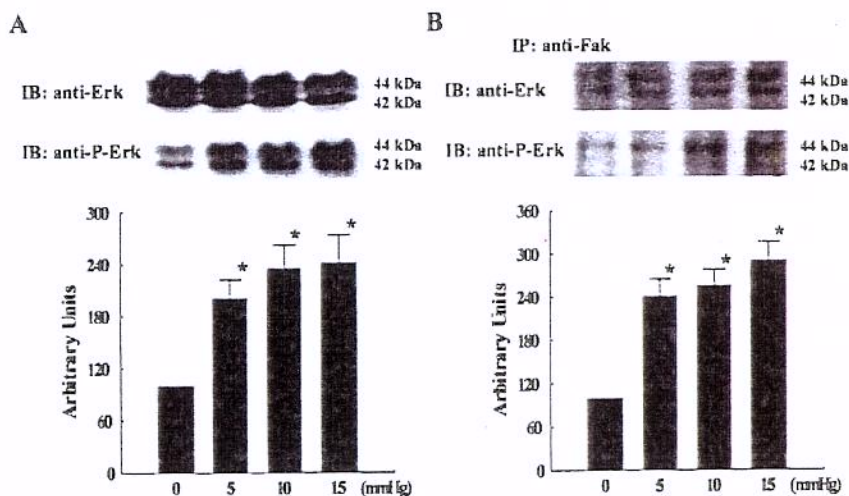
To examine whether increases in myocardial contractile activity alone are able to activate myocardial FAK and ERK1/2, experiments were performed in which the isolated hearts were perfused with different Ca_0 in the perfusate buffer. As shown in Fig. 6A, increases in the perfusate Ca_0 from 0.5 to 5 mM induced progressive increases in systolic pressure. This occurred while the diastolic pressure was maintained

Table 1. Functional parameters and diameters of cardiac myocytes of perfused hearts in which diastolic pressure was raised from ~0 to 15 mmHg

	Diastolic Pressure, mmHg			
	0	5	10	15
Systolic pressure, mmHg	81 ± 4	98 ± 5*	112 ± 6*	120 ± 5*
Diastolic pressure, mmHg	1 ± 0.5	4 ± 0.7*	10 ± 1*	14 ± 1*
Heart rate, beats/min	265 ± 17	275 ± 15	268 ± 12	250 ± 20
+dP/dt, mmHg/s	1,717 ± 92	1,816 ± 89	1,973 ± 114	2,068 ± 120
-dP/dt, mmHg/s	1,152 ± 53	1,428 ± 92	1,378 ± 62	1,400 ± 80
Myocyte diameter, μ m	9 ± 0.4	7.9 ± 0.5*	7.4 ± 0.7*	5.8 ± 0.6*

Values are means ± SE. +dP/dt and -dP/dt, rate of left ventricular pressure rise or decrease, respectively. * $P < 0.05$ compared with control values.

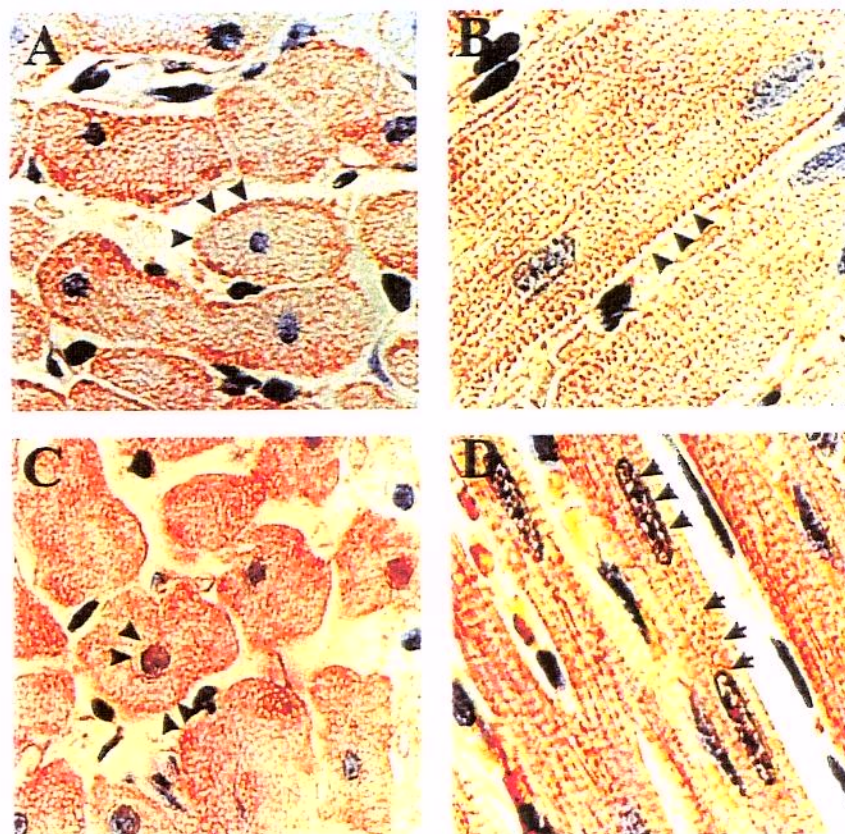
Fig. 2. Load-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 activation in isolated perfused rat hearts. *A*: representative blots (*top*) of the amount of ERK1/2 and activated ERK1/2 detected by anti-ERK1/2 and anti-phosphorylated (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)-ERK1/2 (P-ERK) in the homogenates of hearts subjected to increasing workload. The graphic (*bottom*) represents the average values of the increases in P-ERK1/2 as percent changes compared with baseline values (100%) obtained by densitometric readings of blots ($n = 6$). *B*: representative blots (*top*) of ERK1/2 and P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of rat hearts subjected to increasing workload. The graphic (*bottom*) represents the average values ($n = 6$) of experiments of the increases in P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK. * $P < 0.05$ compared with control values.



at 0 mmHg. Western blot analysis of FAK tyrosine phosphorylation showed that increases in contractile activity were not accompanied by FAK activation (Fig. 6B). In addition, no change could be demonstrated in the amount of c-Src and Grb2 (Fig. 6C) associated with

immunoprecipitated FAK in the homogenates of hearts perfused with different Ca_0 . Besides the lack of FAK multicomponent signaling complex activation, increases in contractile activity alone could not activate ERK1/2, as indicated by the absence of changes in the

Fig. 3. Myocardial distribution of FAK and ERK1/2. *A* and *B*: localization of FAK protein (arrowheads) as seen in longitudinal and transversal myofiber sections. FAK staining was detected predominantly at sarcolemmal sites, but spots are also observed regularly distributed in the sarcoplasm. *C* and *D*: ERK1/2 protein localization (arrowheads and arrows) in longitudinal and transversal myocardial sections. The staining for this protein was detected in the myocyte nuclei, but it was also found at sarcolemmal and sarcoplasmic sites in a distribution similar to that of FAK. Magnification, $\times 1,150$.



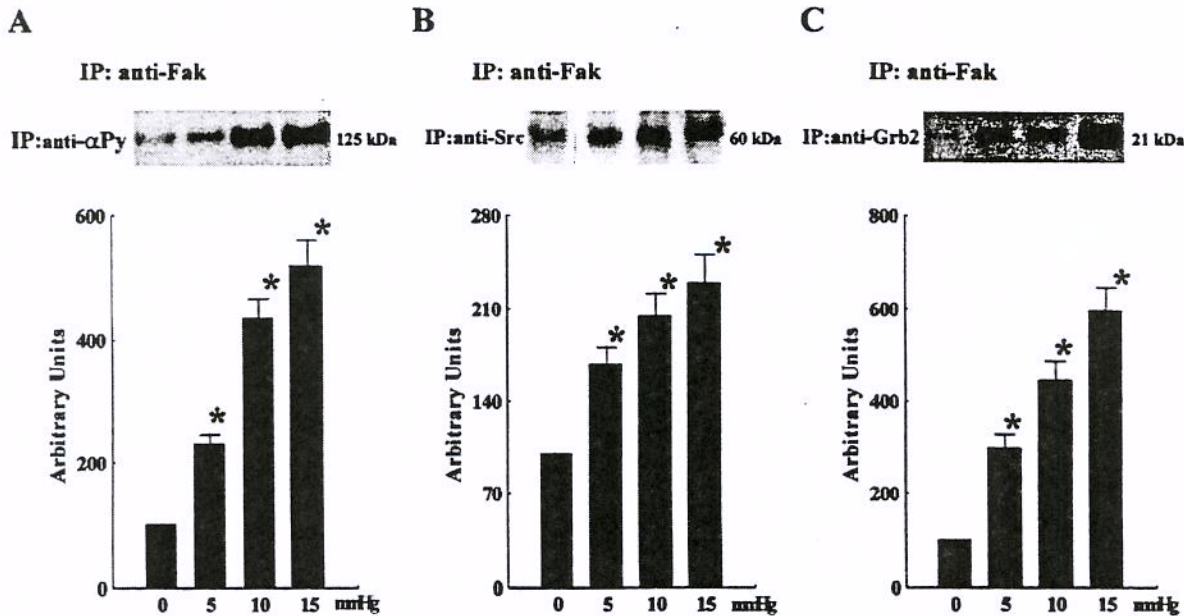


Fig. 4. Effect of increases in left ventricular pressure in isolated rat hearts perfused with a cardioplegic solution in the activation of the FAK multicomponent signaling complex. *A*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of FAK tyrosine phosphorylation detected with anti- α Py in the homogenates of arrested hearts subjected to increasing pressure by the balloon inflation. *B*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of the amount of c-Src coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of arrested hearts subjected to increasing passive tension. *C*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of the amount of Grb2 coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of arrested hearts subjected to increasing passive tension. $*P < 0.05$ compared with the values observed in hearts maintained with diastolic pressure of ~ 0 mmHg (control values).

amount of ERK1/2 detected by the phospho-specific antibody (Fig. 6D).

DISCUSSION

The present study examined the mechanical factors contributing to load-induced activation of the FAK multicomponent signaling complex in the myocardium of isolated perfused rat hearts. The results showed that the activation of the Frank-Starling mechanism induced by increases in left ventricular diastolic pressure

elicited activation of the FAK multicomponent signaling complex, as indicated by the load-induced FAK tyrosine phosphorylation and binding to c-Src and Grb2. Immunohistochemical analysis of myocardial sections confirmed that most of the myocardial FAK was localized in cardiac myocytes. The relative influences of increases in passive tension/stretch and contractile activity on the activation of the FAK multicomponent signaling complex were assessed by comparing the effects of increases in passive tension/stretch in

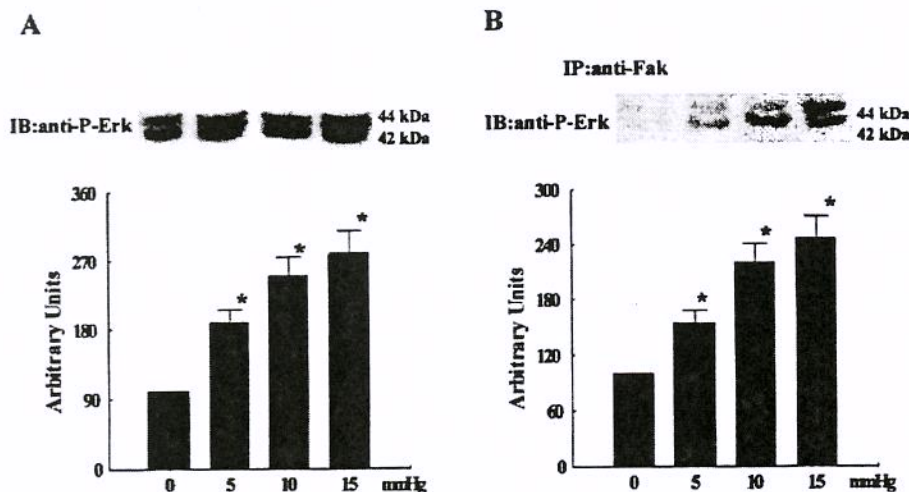
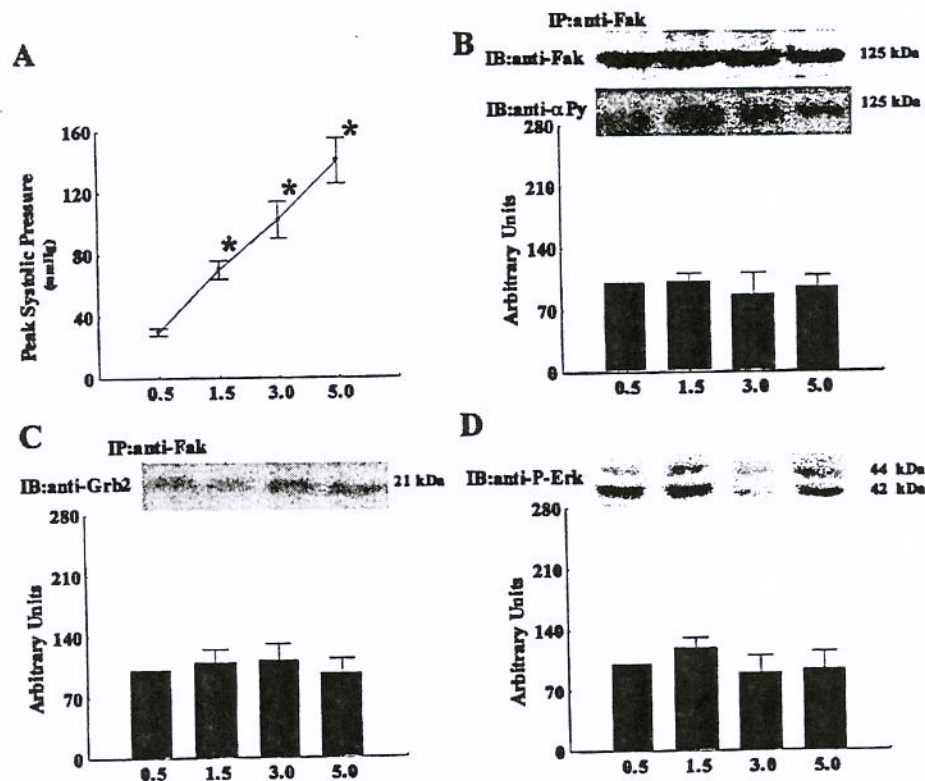


Fig. 5. Effect of increases in left ventricular pressure in isolated rat hearts perfused with a cardioplegic solution in the activation of ERK1/2. *A*: representative blot (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of the amount of activated ERK1/2 detected by anti-P-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) in the homogenates of arrested hearts subjected to increasing passive tension. *B*: representative blots (*top*) and average values (*bottom*; $n = 6$) of P-ERK1/2 coimmunoprecipitated with FAK from homogenates of rats subjected to increasing passive tension. $*P < 0.05$ compared with control values.

Fig. 6. Effect of increasing contractile activity in the activation of FAK and ERK1/2. A: graphic showing the average values ($n = 5$) of peak systolic pressure in hearts perfused with HEPES buffer with increasing calcium concentration (Ca_0). Blots (top) and average values (bottom) representing the amount of FAK, its tyrosine phosphorylation (B), Grb2 association with FAK (C), and P-ERK1/2 (D) are shown from hearts perfused with increasing Ca_0 . * $P < 0.05$ compared with control values.



hearts perfused with a cardioplegic solution with those of increases in contractile activity induced by raising Ca_0 in the perfusion buffer. Increases in the myocardial passive tension/stretch activated the FAK multicomponent signaling complex to the same levels as the ones observed in beating hearts after the activation of the Frank-Starling mechanism. However, increases in contractile activity induced by increases in Ca_0 were unable to activate this signaling system. In addition, it was shown that load-induced FAK activation was accompanied by a simultaneous activation of ERK1/2 and binding of ERK1/2 and activated ERK1/2 to FAK. These effects were also related to increases in myocardial passive tension/stretch rather than to its contractile activity. These results indicate that FAK activation drives, at least partially, the load-induced activation of ERK1/2. This notion was strengthened by the demonstration that FAK and ERK1/2 are similarly distributed at sarcolemmal and sarcoplasmic sites of cardiac myocytes.

Mechanical Stress and FAK Activation

Activation of the FAK multicomponent signaling complex induced by increases in mechanical input to myocardial cells might be mediated by a number of factors, namely, the engagement and activation of cytoskeletal proteins associated with the cytoplasmic domains of integrins, release of autocrine/paracrine factors, or stretch-induced activation of ion channels (6, 17, 21, 28, 40). However, studies in cells in culture

showing the strict dependence of FAK activation by mechanical stimuli on integrin engagement and cytoskeletal integrity favor the hypothesis that the integrin/cytoskeletal complex is the dominant mechanism of FAK activation in cells subjected to mechanical stress (31, 35). Accordingly, in our previous study (13), we showed a rapid binding of FAK to β -actin, simultaneous with its activation in the myocardium of rats subjected to acute pressure overload. Moreover, our demonstration here that FAK is chiefly distributed along the sarcolemma, at sites resembling the costameres, further supports the hypothesis that the integrin/cytoskeleton complex is centrally involved in the activation of myocardial FAK in response to mechanical stimuli.

Biochemical events that precede FAK activation might be sensitive to mechanical events related to increases in passive tension, stretch, rate of increases in local tension, or contractile activity. The prevailing hypothesis suggests that integrins may respond to mechanical stress and activate FAK by inducing the exposure of its Tyr³⁹⁷ phosphorylation site to its kinase domain. Occupation of integrin receptors by extracellular matrix proteins is one mode of inducing autophosphorylation of Tyr³⁹⁷ (22, 34). Otherwise, activation of FAK via growth factors or other mediators is thought to occur via activation of transmembrane receptors (14). Presently, we have shown that FAK activation is related to events occurring when the myocardium is subjected to passive tension/stretch but not to contrac-

tile activity or the rate of increases in systolic tension. However, the experimental model used in the present study did not allow distinction between the effects of tension per se and stretch as the factor responsible for FAK activation. Mechanical stretch or tension applied directly to the extracellular domain of integrins results in increased protein tyrosine phosphorylation, cytoskeletal stiffening, and the activation of downstream signaling pathways, suggesting that integrins can function as mechanotransducers (31, 35, 42, 43). Studies in tracheal smooth muscle, however, have suggested that muscle length rather than tension is the primary stimulus for mechanosensitive regulation of FAK activity (37).

Cardiac myocytes are normally subjected to cyclic changes in load. In this regard, a recent study (39) has shown differences in the activation of signaling mechanisms in response to load and stretch during systolic and diastolic phases of the cycle. Different phenotypic responses were observed in cardiac myocytes subjected to stretch during the contraction or relaxation phase of the cycle. Possible differences in the efficiency of load-induced FAK activation by stretch of the myocardial cell during systole or diastole were not explored in the present study and remain an open question.

Load-Induced Activation of ERK1/2 Via FAK Multicomponent Signaling Complex

Experiments showing a load-dependent association of FAK to Grb2, ERK1/2, and phosphorylated ERK1/2 to FAK and a similar distribution of FAK and ERK1/2 at sarcolemmal and sarcolemmal sites indicated that FAK activation may function as an upstream activator of ERK1/2 in cardiac myocytes. This hypothesis was strengthened by our results showing that load-induced ERK1/2 activation is also dependent on myocardial stretch or increases in passive tension rather than on contractile activity. These results are in accord with the results of previous studies (2, 3, 8, 9, 13, 26, 41, 44) that showed load-induced activation of ERK1/2 in the myocardium and cardiac myocytes. They also agree with recent evidence showing that activation of ERK1/2 may be controlled by cellular adhesion via integrins/FAK activation (1, 24). However, in addition to mechanical stimuli, ERK1/2 can be activated by a wide variety of different stimuli acting through diverse receptor families, including hormones and growth factors, vasoactive peptides, transforming growth factor- β -related polypeptides, inflammatory cytokines of the tumor necrosis factor family, and environmental stresses such as osmotic shock, ionizing radiation, and ischemic injury (19). Alternatively, the integrin/cytoskeletal/FAK mechanism might collaborate in the enhancement of growth factor activation of the ERK1/2 pathway by utilizing the actin network as a scaffold and FAK as a coactivator (1, 24). However, the relative contribution of FAK to ERK1/2 activation via the integrin/cytoskeleton system to load-induced myocardial hypertrophy remains unclear.

ERK1/2 are implicated as important regulators of cardiomyocyte hypertrophic growth in culture. The early activation of ERK1/2 in cardiac myocytes has been suggested to contribute to the reexpression of fetal ventricular genes (e.g., atrial natriuretic factor, β -myosin heavy chain, and skeletal muscle α -actin). More recently, studies (5) have shown that permanent activation of the ERK1/2 pathways in transgenic mice lines with cardiac-restricted expression of an activated MAP or ERK kinase (MEK)1 cDNA developed concentric hypertrophy. This indicates that the MEK1-ERK1/2 signaling pathway stimulates a physiological hypertrophic response associated with augmented cardiac function and partial resistance to apoptosis. The relative importance of integrin/FAK to these mechanisms is unknown.

In conclusion, our results provide further argument for a role of FAK in the early myocardial responses to mechanical stimuli. The demonstration here that stretch or passive tension alone instead of increases in contractile activity can activate FAK and its downstream effectors is compatible with the appealing hypothesis that load-induced FAK activation in myocardial cells could be linked to the integrin/cytoskeletal signaling complex. Furthermore, experiments showing that stretch- or passive tension-induced binding of FAK to Grb2, ERK1/2, and activated ERK1/2, and also a common localization of these enzymes at the sarcolemma and sarcoplasm of cardiac myocytes, indicate a linkage between load-induced FAK and ERK1/2 activation during mechanical overload. Whether this pathway is critical for load-induced hypertrophy in the myocardium deserves further study.

This study was supported by Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 98/114-7 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grant 521098/97-1.

REFERENCES

1. Aplin AE, Stewart AS, Assoian RK, and Juliano RL. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 153: 273–281, 2001.
2. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, and Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 79: 162–173, 1996.
3. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, and Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 269: 1110–1119, 1994.
4. Borg TK, Goldsmith EC, Price R, Carver W, Terracio L, and Samarel AM. Specialization at the Z line of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 46: 277–285, 2000.
5. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevisky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitis RN, and Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19: 6341–6350, 2000.
6. Burridge K and Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463–519, 1996.

7. Calalb MB, Polte TR, and 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* 15: 954-963, 1995.
8. Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, and Sugden PH. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269: 32848-32857, 1994.
9. Clerk A, Michael A, and Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* 142: 523-535, 1998.
10. Cooper G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Annu Rev Med* 48: 13-23, 1997.
11. Cooper G. Load and length regulation of cardiac energetics. *Annu Rev Physiol* 52: 505-522, 1990.
12. Danowski BA, Imanaka-Yoshida K, Sanger JM, and Sanger JW. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol* 118: 1411-1420, 1992.
13. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, and Saad MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 87: 558-565, 2000.
14. Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032, 1999.
15. Imanaka-Yoshida K, Enomoto-Iwamoto M, Yoshida T, and Sakakura T. Vinculin, talin, integrin $\alpha 6 \beta 1$ and laminin can serve as components of attachment complex mediating contraction force transmission from cardiomyocytes to extracellular matrix. *Cell Motil Cytoskeleton* 42: 1-11, 1999.
16. Ingber D. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechano-transduction. *Annu Rev Physiol* 59: 575-599, 1997.
17. Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78: 763-781, 1998.
18. Kuppaswamy D, Kerr C, Narishige T, Kasi VS, Menick DR, and Cooper G. Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. *J Biol Chem* 272: 4500-4508, 1997.
19. Kyriakis JM and Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869, 2001.
20. Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper C, Menick DR, Zile MR, and Kuppaswamy D. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 275: 35624-35630, 2000.
21. Liang F and Gardner DG. Autocrine/paracrine determinants of strain-activated brain natriuretic peptide gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273: 14612-14619, 1998.
22. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, and Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol* 119: 905-912, 1992.
23. Maniotis AJ, Chen CS, and Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 849-854, 1997.
24. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, and Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 135: 1633-1642, 1996.
25. Pardo JV, Siciliano JD, and Craig SW. Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *J Cell Biol* 97: 1081-1088, 1983.
26. Post GR, Goldstein D, Thuermer DJ, Glembotski CC, and Brown JH. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 271: 8452-8457, 1996.
27. Sadoshima J and Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59: 551-571, 1997.
28. Sadoshima J, Xu Y, Slater HS, and Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 979-984, 1993.
29. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, and Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60SRC. *Mol Cell Biol* 14: 1680-1688, 1994.
30. Schlaepfer DD, Hanks S, Hunter T, and van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786-791, 1994.
31. Schmidt C, Pommerenke H, Durr F, Nebe B, and Rychly J. Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J Biol Chem* 273: 5081-5085, 1998.
32. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, and Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase [p125(FAK)] in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 8-14, 1999.
33. Sharp WW, Simpson DG, Borg TK, Samarel AM, and Terracio L. Mechanical forces regulate focal adhesion and costamere assembly in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H546-H556, 1997.
34. Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Grinsberg MH, and Brugge JS. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem* 269: 14738-14735, 1994.
35. Shyy JY and Chien S. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 9: 707-713, 1997.
36. Sonoda Y, Watanabe S, Matsumoto Y, Aizu-Yokota E, and Kasahara T. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem* 274: 36544-36549, 1999.
37. Tang D, Mehta D, and Gunst SJ. Mechanosensitive tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C250-C258, 1999.
38. Terracio L, Rubin K, Gullberg D, Balog E, Carver W, Jyring R, and Borg TK. Expression of collagen-binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res* 68: 734-744, 1991.
39. Yamamoto K, Quynh N, Dang BS, Maeda Y, Huang H, Kelly RT, and Lee RA. Regulation of cardiomyocyte mechano-transduction by the cardiac cycle. *Circulation* 103: 1459-1464, 2001.
40. Yamazaki T, Komuro I, and Kudoh S. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271: 3221-3228, 1996.
41. Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, Maemura K, Kaida T, Komuro I, Tamemoto H, Kadowaki T, Nagai R, and Yazaki Y. Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268: 12069-12076, 1993.
42. Wang N, Butler JP, and Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260: 1124-1127, 1993.
43. Wang N and Ingber DE. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Bio-phys J* 66: 2181-2189, 1994.
44. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, and Yazaki Y. Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 271: 33592-33597, 1996.