

ANA PAULA DALLA COSTA

**Mecanismos de controle da expressão e
atividade de Metaloproteinases 2 e 9 pela
quinase de adesão focal em fibroblastos
cardíacos de rato**

Campinas - SP

2009

ANA PAULA DALLA COSTA

**Mecanismos de controle da expressão e
atividade de Metaloproteinases 2 e 9 pela
quinase de adesão focal em fibroblastos
cardíacos de rato**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica. Área de Concentração: Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

**Campinas – SP
2009**

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

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

C823m Costa, Ana Paula Dalla
Mecanismos de controle da expressão e atividade de metaloproteinase 2 e 9 pela quinase de adesão focal em fibroblastos cardíacos de rato / Ana Paula Dalla Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Quinase de adesão focal. 2. Metaloproteinase 2 da matriz. 3. Metaloproteinase 9 da matriz. 4. Fibroblasto. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Mechanisms of control metalloproteinases 2 and 9 expression and activity by focal adhesion kinase in mouse cardiac fibroblasts

Keywords: • Focal adhesion kinase
• Matrix metalloproteinase 2
• Matrix metalloproteinase 9
• Fibroblasts

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Data da defesa: 05-03-2009

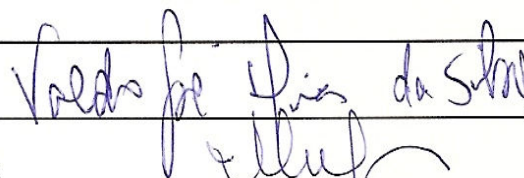
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Ana Paula Dalla Costa

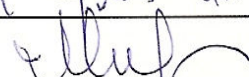
Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

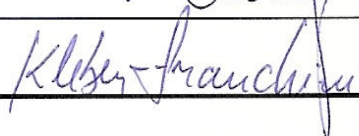
1. Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva



2. Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



3. Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/03/2009

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pelas oportunidades para carreira científica, pela confiança e respeito ao meu trabalho, e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Por compartilhar seus conhecimentos, seu tema de pesquisa e oferecer seus ensinamentos vão além da ciência.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho e Alexandre Bruni Cardoso pelo auxílio técnico, disponibilidade e aconselhamentos.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular: Aline Mara dos Santos Álisson Campos Cardoso, Ana Helena Macedo, Ana Carolina Deckmann, Carla Judice, Carolina Clemente, Jackeline Lima, Maria Carolina Guido, Michel Vaz, Michelle Bueno, Mônica Siqueira, Márcia Story, Thaís Franchini Tornatore, Thaís Holtz Theizen, Talita Marin, Silvana Rocco; Rodrigo Marin, pelo acolhimento, companheirismo, ensinamentos e contribuições na realização deste estudo.

À CNPq, pela concessão da bolsa.

“O mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”. (Platão)

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Estrutura do miocárdio e os mecanismos de Mecanotransdução	19
1.2 Quinase de Adesão Focal (FAK)	29
1.2.1 Estrutura	30
1.2.2 Controle da Atividade da FAK	33
1.2.3 Efeitos da Ativação da FAK no Coração	34
1.3 Metaloproteinases de Matriz	37
1.3.1. Estrutura e função	38
2. OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo:	45
2.2 Objetivos específicos:	45
2.3 Hipótese:	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1.1 Anticorpos e Reagentes	47
3.1.2 Soluções e Tampões	47
3.1.3 Animais	49
3.2.1 - Isolamento de fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (FCRN)	49
3.2.2- Análise de crescimento celular	52
3.2.3-Avaliação da proliferação celular dos FCRNs mantidos em cultura	52
3.2.3.a Ensaio de incorporação de BrdU	52
3.2.4- Estiramento Pulsátil Contínuo de Fibroblastos Cardíacos de Ratos Neonatos (FCRN)	53
3.2.5 - Homogeneização e Determinação do conteúdo de proteínas totais (<i>Western Blot</i>)	55
3.2.6 – <i>Immunoblotting</i>	56
3.2.7- Zimografia	57
3.2.8 – Análise por microscopia de fluorescência	58
3.2.9 -Ensaio Biologia Molecular- Síntese siRNA	59
3.2.10- Análise morfológica	60
3.2.11 Análise Estatística	61
4. RESULTADOS	62
4.1 Caracterização da cultura de fibroblastos cardíacos	63
4.2-Efeito do estiramento cíclico na proliferação dos FCRNs	65

4.3 - Efeito do estiramento cíclico na diferenciação dos FCRNs	67
4.4 - Expressão e fosforilação da FAK em FCRNs submetidos a estiramento cíclico	68
4.5 Distribuição da FAK em FCRNs submetidos a estiramento cíclico	75
4.6 Efeito do estiramento mecânico sobre as Metaloproteinases 2 e 9 (MMPs 2 e 9)	77
4.7- Silenciamento gênico da FAK nos FCRNs mantidos em cultura por iRNA	82
4.8- Efeito do silenciamento gênico da FAK em FCRNs submetidos ao estímulo mecânico	86
4.9- Avaliação da proliferação de FCRNs silenciados para FAK por iRNA.	89
4.10- Avaliação da diferenciação de FCRNs silenciados para FAK por iRNA	90
4.11- Avaliação do efeito do silenciamento gênico da FAK por iRNA na expressão, atividade e distribuição das MMPs 2 e 9 em FCRNs	93
4.12- Complexo mTOR medeia os efeitos da FAK na ativação de fibroblastos induzida por estiramento mecânico.	97
4.13- Tratamento de rapamicina, inibidor de mTOR, atenua a diferenciação e a proliferação de FCRNs.	99
5. DISCUSSÃO	101
6. CONCLUSÃO	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura da MEC cardíaca. Esquema do arranjo da relação do colágeno fibrilar, miócitos cardíacos e a vasculatura coronária.....	20
Figura 02. Esquema representativo da estrutura linear da FAK, demonstrando os 3 domínios (FERM, KINASE E FAT). Representado os resíduos de tirosina que são fosforilados durante a sua ativação.....	30
Figura 03. Esquema da estrutura geral das isoformas da família da MMPs.....	40
Figura 04. Características morfológicas dos FCRNs mantidos em cultura. Imagem de microscopia de imunofluorescência de fibroblastos cardíacos controle marcados com DAPI e, com anti-vimentina.(A) e anti-desmina (B). Gráfico da curva de crescimento dos fibroblastos cardíacos por diferentes períodos em cultura (C). Coloração por HE dos FCRNs em diferentes períodos em cultura (D), aumento de 200 x.....	64
Figura 05. Efeito do estiramento cíclico sobre a proliferação dos FCRNs. Imagens de microscopia de fluorescência anti-BrdU e anti-Ki67 nas condições: controle e estiradas e gráfico representativo da contagem de células positivas para BrdU e Ki67. Valores percentuais médios (n=4). * $p<0,05$, em relação ao respectivo controle.....	66
Figura 06. Efeito do estiramento cíclico sobre a diferenciação dos FCRNs. A- <i>Immunoblotting</i> representativo das quantidades totais de α -SMA nos FCRNs controles e submetidos ao estiramento mecânico. Gráfico indica os valores percentuais médios da quantidade de proteína marcada com α -SMA normalizada pela quantidade de GAPDH. B-Imagem de microscopia de fluorescência de FCRNs controles marcados com α -SMA e DAPI. Aumento 100X.....	68
Figura 07. Ensaio de padronização de alongamento Exemplos de <i>Immunoblottings</i> representativos das quantidades totais de FAK e de fosfo-FAK em FCRNs submetidos ao estiramento cíclico com diferentes alongamentos (5, 10 e 15 %). Gráfico dos valores percentuais médios das quantidades de proteína marcada com fosfo-específico anti-FAK em tirosina 397 (pFAK) normalizada pela quantidade de FAK em FCRNs, controle e submetido ao estiramento cíclico com diferentes alongamentos (5, 10 e 15 %). Valores percentuais médios (n=4).	71
Figura 08. <i>Immunoblotting</i> representativo das quantidades totais de FAK em FCRNs submetido ao estiramento agudo (15, 30 e 60 minutos). Gráfico e <i>Immunoblotting</i> representativo da expressão e fosforilação de FAK em FCRNs, controle e submetido ao estiramento por 15, 30 e 60 minutos. Valores percentuais médios (n=3).....	73
Figura 09. Curso temporal de estiramento prolongado em FCRNs. Exemplos representativos de <i>immunoblottings</i> realizados com homogenatos de FCRNs em cultura e anticorpos anti-FAK, anti-pFAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores	

percentuais médios das quantidades de proteína marcada com fosfo-específico anti-FAK em tirosina 397 (pFAK) normalizada pela quantidade de FAK em FCRNs, controle e submetido ao estiramento cíclico com diferentes tempos de duração (2, 4, 6, e 8 horas). Valores percentuais médios (n=4). * $p < 0,05$, em relação ao controle não estirado..... 74

Figura 10. Distribuição da FAK em FCRNs controle e submetido ao estiramento mecânico. Imagem de microscopia de fluorescência, sendo A controle não estirado e B estirado. FAK marcada verde e faloidina em vermelho marcando actina do citoesqueleto. Aumento 400X..... 76

Figura 11. Co-localização da FAK e da α -SMA em FCRN submetido ao estiramento mecânico. Imagem de microscopia de fluorescência, FAK marcada em verde e α -SMA em vermelho, áreas de co-localização amarelo. Aumento 400X..... 77

Figura 12. Avaliação da expressão de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetidos ou não ao estiramento cíclico por diferentes intervalos. A-*Imunoblotting* representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 2 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4) B-*Imunoblotting* representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 9 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4)..... 78

Figura 13. Avaliação da atividade de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetidos ou não ao estiramento cíclico por diferentes intervalos. A-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 2. B-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 9..... 80

Figura 14. Distribuição das MMP2 e MMP9 e da α -SMA em FCRNs submetido ou não ao estiramento mecânico. Imagens de microscopia de fluorescência, MMPs 2 e 9 marcadas em verde e α -SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 400X..... 82

Figura 15. Avaliação da expressão de FAK em ensaio de dose resposta para siRNA_{FAK} nos FCRNs mantidos em cultura. Exemplos representativos de *immunoblotings* realizados com homogenatos de FCRNs em cultura e anticorpos anti-FAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios das quantidades de proteína marcada com anti-FAK normalizada pela quantidade de GAPDH em FCRNs, controle, lipofectamina e, transfectado com 10 e 40 nM de siRNA_{FAK}. Valores percentuais médios (n=4)..... 84

Figura 16. Avaliação da expressão de FAK em ensaio de especificidade do siRNA_{FAK} nos FCRNs mantidos em cultura. Exemplos representativos de *immunoblotings* realizados com homogenatos de FCRNs em cultura e anticorpos anti-FAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios das quantidades de proteína marcada com anti-FAK normalizada pela quantidade de GAPDH em FCRNs, controle, lipofectamina e, transfectado com 40 nM de siRNA_{GFP} e siRNA_{FAK}. Valores percentuais médios (n=4)..... 86

Figura 17. Avaliação do silenciamento do gene da FAK nos FCRNs tratados com siRNA_{FAK} anterior ao estiramento cíclico. Exemplos representativos de *immunoblottings* com homogenatos de FCRNs anti-FAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios de proteínas marcada com anti-FAK normalizada pela quantidade de GAPDH (n=4). 88

Figura 18. Efeito do silenciamento gênico da FAK sobre a proliferação dos FCRNs. Gráfico representativo da contagem de células positivas para Ki67. Valores percentuais médios (n=4). * p<0,05, em relação ao respectivo controle, e #, em relação a condição estiramento..... 90

Figura 19 Avaliação da diferenciação de FCRNs silenciados para FAK por iRNA. A- Exemplos representativos de *immunoblottings* com homogenatos de FCRNs anti- α -SMA e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios de proteínas marcada com anti- α -SMA normalizada pela quantidade de GAPDH .(n=4). B- Distribuição de α -SMA em FCRNs transfectados com siRNA_{FAK}. Imagem de microscopia de fluorescência, 100x aumento. Imagem de microscopia de fluorescência, α -SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 100X. C- Distribuição de α -SMA em FCRNs transfectados com siRNA_{FAK} e submetidos ao estiramento mecânico. Imagem de microscopia de fluorescência, α -SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 100X..... 92

Figura 20. Avaliação da expressão de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetido ou não a transfecção de siRNA_{FAK} (40nM). A-*Imunoblotting* representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 2 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4) B-*Imunoblotting* representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 9 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4) * p<0,05, em relação ao FCRNs estiramento..... 94

Figura 21. Avaliação da atividade de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetido ou não a transfecção de siRNA_{FAK} (40nM). A-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 2. (N=4). B-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 9. (N=4) * p<0,05, em relação ao controle..... 95

Figura 22. Distribuição das MMP2 e MMP9 e da α -SMA em FCRNs submetido ou não a transfecção de siRNA_{FAK} (40nM). Imagens de microscopia de fluorescência, MMPs 2 e 9 marcadas em verde e α -SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 400X..... 97

Figura 23. Estiramento cíclico aumenta a fosforilação de AKT Ser473, TSC2 Thr1462, e S6K Thr389, e a depleção da FAK por técnica de siRNA diminui a fosforilação de AKT Ser473, TSC2 Thr1462, e S6K Thr389 em FCRNs estirados e não estirados. O siRNA_{GFP} não alterou a expressão e a fosforilação destas proteínas. Os *immunoblottings* correspondem a *pool* de amostras de 3 culturas de FCRNs..... 98

Figura 24- Efeito do tratamento farmacológico com rapamicina sobre a proliferação e a diferenciação dos FCRNs. Imagens de microscopia de fluorescência anti-Ki67e anti- α

SMA, nas condições: controle e estiradas e tratados com rapamicina e gráfico representativo da contagem de células positivas para Ki67 e - α SMA. Valores percentuais médios (n=4). * p<0,05, em relação ao respectivo controle, #, em relação ao estiramento.....100

LISTA DE ABREVIATURAS

ANF - *atrial natriuretic factor*

AKT - *murine thymoma viral oncogene protein kinase B*

BrdU- 5-bromo-2'-deoxiuridina/ Bromodeoxiuridina

CT – Controle

CD – *Cluster of differentiation*

DAPI – 4'-6-diamino-2-fenilindol

DMEM – Meio *Eagle* modificado por Dulbelcco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTT – 1,4-Dithiothreitol

EDTA – Ácido etilenodiamino teracetico

EMT - Transição epitelial-mesenquimal

EndMT - Transição endotelial-mesenquimal

ERK - *Extracellular signal-regulated kinase*

FAK - Quinase de adesão focal

FAS – (*Supermature focal adhesions*) adesões focais super-maduras

FAT - *Focal Adhesion Targeting*

FCRNs - Fibroblastos cardíacos de ratos neonatos

FERM - *Ezrin-Radixin-Moesin homology*

GFP – Proteína Fluorescente verde

Grb2 - *Growth factor receptor-bound protein 2*

GST - Glutathione S-Transferase

HDAC-II - Desacetilases de histonas da classe II

Ig – Imunoglobulina

JNK - *Jun N-terminal kinase*

kDa – quilo Daltons

KI67- Antígeno nuclear KI67

LN – Laminina

MAP - *Mitogen-activated protein*

Mdm2 – *Mouse double minute 2*

MEC – Matriz Extracelular

MEF2 - *Myocyte enhancer factor 2*

mg – Miligramas

mm – Milímetros

MMP – Família Metaloproteinases

MMP2-Metaloproteinase de Matriz 2/ Gelatinase A

MMP9–Metaloproteinase de Matriz 9/ Gelatinase B

mTOR- *Mammalian target of rapamycin (mTOR)*

MSCs - (*Circulating mesenchymal stem cells*) células-tronco mesenquimais

MT-MMPs - *Membrane-type matrix metalloproteinase*

MVRN - Miócitos ventriculares de ratos neonatos

ng – Nanogramas

nm – Nanômetros

NS – Sem diferenças estatisticamente significantes

pb - Pares de base

PBS – Solução salina tamponada por fosfato

PBS Triton – PBS contendo 0,2% de Triton X100

PBS Tween – PBS contendo 0,05% de Tween 20

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PDGF- *Platelet-derived growth factor*

PF – Paraformaldeído

PGs – Proteoglicano(a)s

PI 3-quinase - *Phosphoinositide 3-kinases*

PMSF - Phenylmethylsulphonyl fluoride

RGD – Peptídeo de Arginina-Glicina-Asparagina

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

S6 K- *p70 S6 kinase*

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB – Soro Fetal Bovino

SH₂- *Src homology 2*

SHP2 - *Src homology 2-containing tyrosine phosphatase*

Src- - c-Src (*Rous sarcoma virus*)

siRNA_{FAK} – *Small interference RNA* para a FAK

α -SMA – α -*Smooth muscle actina* / α -actina de músculo liso

TGF- β – Fator de crescimento transformador

TSC- *Tuberous sclerosis protein 2*,

TxRd – Vermelho do Texas

VGEF - *Vascular endothelial growth factor*

Mudanças dinâmicas que ocorrem no interstício do coração contribuem diretamente para o remodelamento miocárdico decorrente de doenças cardíacas tais como infarto do miocárdio, cardiopatia hipertensiva e cardiomiopatias. As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) são importantes no remodelamento destas doenças. Estímulos mecânicos e neuro-humoral regulam a expressão e atividade de MMPs através de múltiplos processos. Em estudos prévios verificamos que o silenciamento da FAK no VE de camundongos inibe a fibrose e reduz a atividade de MMP2. Objetivamos avaliar o papel da FAK no controle da ativação de fibroblastos cardíacos de ratos (FCRNs), induzidos por estiramento mecânico. Os FCRNs foram cultivados em placas Bioflex e submetidos a estiramento cíclico (10%) por até 8 horas, exceto os controles. A expressão e atividade da FAK foram avaliadas por *imunoblottings* com anticorpos específicos para FAK ou pFAK Tyr397, respectivamente. A expressão das MMPs 2 e 9 foi avaliada em *imunoblottings* e a atividade por zimografia ambas no sobrenadante da cultura. O estiramento provocou aumento de 2.4 vezes da quantidade de FAK fosforilada em Tyr397, além da expressão e a atividade de MMP 2 e 9. Além disto, modificou os parâmetros de proliferação dos FCRNs, mostrando aumento de células positivas para Ki67 e BrdU. Do mesmo modo, a diferenciação em miofibroblastos foi ativada (células positivas para α -actina de músculo liso (α -SMA)). A inibição gênica da FAK através da técnica de interferência de RNA (siRNA_{FAK}), nos FCRNs, inibiu a expressão de α -SMA, a atividade e a expressão das MMPs 2 e 9. Além disso, a depleção da FAK em FCRNs promoveu a diminuição da fosforilação em AKT Ser473, TSC-2 Thr1462, e S6 quinase Thr389 em resposta ao estiramento mecânico. A ativação dos FCRNs foi impedida pelo pré-tratamento com o inibidor do complexo mTOR, rapamicina. Assim mostramos que a FAK media a ativação de FCRNs invocado pelo estresse mecânico, possivelmente através da coordenação da via de sinalização mTOR. Os resultados do presente estudo indicam a ativação da FAK pode ter um papel crítico na proliferação e diferenciação, e na ativação de MMPs em FCRNs quando submetidos a estiramento, e ainda o *knockdown* da FAK apresenta efeitos contrários, logo, infere-se o papel da FAK na ativação de fibroblastos cardíacos.

Palavras-chaves: quinase de adesão focal, metaloproteinases de matriz 2 e 9 e fibroblastos cardíacos.

Dynamic changes that occur in the heart interstitium contribute directly to the myocardial remodeling due to heart disease such as myocardial infarction, hypertensive heart disease and cardiomyopathies. The extracellular matrix-metalloproteinases (MMPs) play an important role in remodeling in these diseases. Mechanical and neuro-humoral stimuli regulate the MMPs expression/activity through several processes which include the control of expression, activation by cascades of own MMPs and endogenous inhibitors. In recent studies from our laboratory showed that the FAK silencing in the left ventricle of mice inhibits the fibrosis development, and in parallel reduced the MMP2 activity and expression. The purpose of this study was to evaluate the role of FAK in controlling the MMP 2 and 9 expression and activity in rat cardiac fibroblasts. Cardiac fibroblasts from neonatal rat (FCRNs) were grown on silicon plates and then subjected to cyclic stretch (10%) for up to 8 hours, except the controls. The FAK expression and activity were assessed for immunoblottings through with specific antibodies to FAK or phospho -FAK Tyr397, respectively. The expression of MMP 2 and 9 was evaluated with specific antibodies in immunoblottings and activity through zymography both in the supernatant culture. Furthermore, FCRNs depleted of FAK was defective in AKT Ser473, TSC-2 Thr1462, and S6 kinase Thr389 phosphorylation in response to cyclic stretch. The activation of CF-P3/80 invoked by cyclic stretch was prevented by pre-treatment with the mTOR complex inhibitor rapamycin. These findings demonstrate that FAK signaling plays a critical role in mediating the activation of cardiac fibroblasts invoked by mechanical stress possibly by coordinating the downstream mTOR signaling pathway. The results of this study indicate that the activation of FAK can have a critical role to MMPs activation in cardiac fibroblasts, as well as, the proliferation and differentiation of these cells when subjected to stretching, and the FAK knockdown presents contrary effects, therefore, to corroborate infer the FAK role in differentiation and proliferation cell, and the MMPs balance in cardiac fibroblasts.

Key words: focal adhesion kinase, the matrix metalloproteinases 2 and 9 and cardiac fibroblasts

1. INTRODUÇÃO

1.1- Estrutura do miocárdio e os mecanismos de Mecanotransdução

O miocárdio é organizado em um arranjo complexo de elementos celulares e acelulares e vasos sanguíneos. Além dos miócitos cardíacos, os executores da atividade contrátil, o miocárdio contém um número relativamente grande de fibroblastos. Estimativas dão conta de que os fibroblastos constituem entre 30 e 70% dos elementos celulares do miocárdio normal em camundongos e ratos, respectivamente (BANERJEE et al. 2007) apesar de seu volume total representar apenas uma pequena fração em comparação com os miócitos cardíacos.

Os fibroblastos cardíacos são células de origem mesenquimal, sendo o principal tipo celular responsável pela síntese dos elementos acelulares do estroma intersticial, i.e. a matriz extracelular (MEC) (YOUNG AA et al, 1998). O interstício miocárdico é responsável por manter as fibras de miócitos cardíacos alinhadas, o que otimiza a atividade mecânica cardíaca. De fato, o acoplamento mecânico das fibras de miócitos cardíacos contribui para a função cardíaca global, através da coordenação do encurtamento dos miócitos.

Os miócitos cardíacos são circundados pela membrana basal cujo principal componente estrutural é o colágeno não-filamentar do tipo IV. No entanto, os miócitos de fibras paralelas estão arranjos em lâminas (YOUNG AA et al, 1998), constituídas de dois a cinco miócitos de espessura, circundados por uma rede de fibrilas e fibras de colágeno tipos I e III, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, conhecida como endomísio (FIGURA 1). Os fibroblastos formam uma rede de células interconectadas dentro da rede de colágeno endomisial das lâminas de miócitos cardíacos (BORG TK, et al, 1981; CAMELLITI P, BORG TK, AND KOHL

P., 2005; GOLDSMITH EC, et AL, 2004; YOUNG AA et al, 1998). Lâminas paralelas de miócitos são ainda circundadas pelo perimísio, constituído por uma bainha de colágeno. Os feixes perimisiais são, por sua vez, circundados pelo epimísio, também constituído por uma rede de fibroblastos e colágeno.

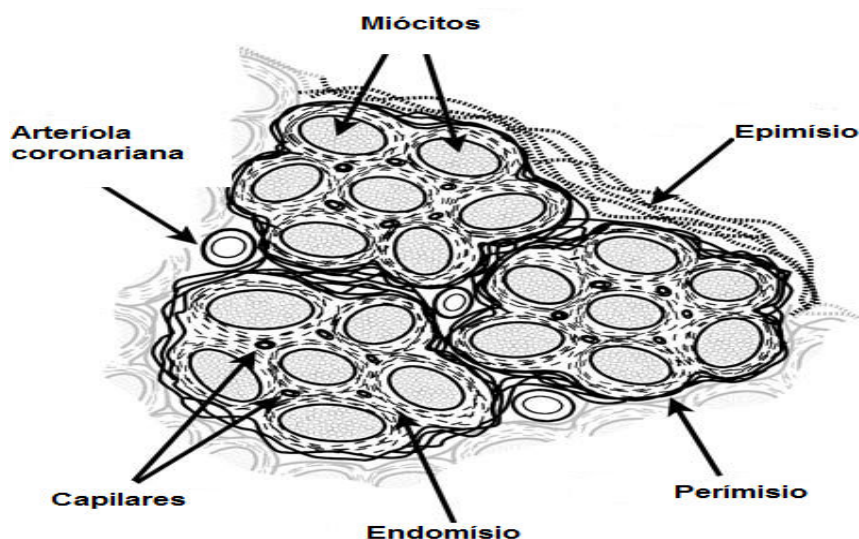


Figura 1: Estrutura da MEC cardíaca. Esquema do arranjo da relação do colágeno fibrilar, miócitos cardíacos e a vasculatura coronária. Adaptado (Eghbali M, Weber KT. 1990).

Os principais componentes da MEC cardíaca são os colágenos tipo I (80%) e III (10%), mas também são encontrados colágenos do tipo IV, V e VI, laminina, elastina, (BOSMAN FT, STAMENKOVIC I., 2003; JUGDUTT BI, 2003).

A MEC provê o microambiente físico, no qual, não apenas os miócitos cardíacos, mas também os fibroblastos estão ancorados, conectados nas proteínas filamentosas através de receptores de membrana celular, conhecidos como integrinas. Além disso, proteínas da MEC conhecidas como proteínas matricelulares que incluem fatores de crescimento, citocinas e proteases, parecem ser críticas para a regulação fenotípica, trófica e da migração dos fibroblastos cardíacos (PLOPPER

G. et al, 1995.). As proteínas matricelulares, por outro lado, regulam a interação fibroblastos-MEC exercendo importante função na interação e resposta daquelas células a mudanças no microambiente. (CAMELLITI P, BORG T, e KOHL P 2005; LOFTIS M, SEXTON D, e CARVER W, 2003). Portanto, coletivamente, a MEC: 1) forma uma rede organizacional que envolve e interconecta estruturas celulares, 2) fornece sustentação aos miócitos e não-miócitos, 3) distribui forças mecânicas em todo o miocárdio, 4) transmite sinais mecânicos para células individuais, através de receptores da superfície celular ECM (mecanotransdução), e 5) participa de movimento fluido no meio extracelular (HOLMES JW, BORG TK, e COVELL JW, 2005).

Fibroblastos Cardíacos

O fibroblasto é um tipo celular extensamente distribuído nos animais vertebrados e é a célula mais comum do tecido conjuntivo. Os fibroblastos sintetizam as proteínas da MEC, preferencialmente colágenos e elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. (EGHBALI-WEBB M, 1994; KANEKAR S, 1998). São definidos tradicionalmente como células de origem mesenquimal, que produzem o colágeno intersticial. Todavia, atualmente acredita-se que fibroblastos podem ser derivados de várias fontes (QUAN TE, COWPER SE, BUCALA R, 2006). Diversos relatos ilustram a extensa heterogeneidade fenotípica entre fibroblastos de diferentes tecidos e em circunstâncias fisiológicas distintas. Os fibroblastos contribuem para o desenvolvimento cardíaco, estrutura do miocárdio, sinalização celular; e função

eletro-mecânica no miocárdio em condições fisiológicas e patológicas (KOHL P., NOBLE D, 1996; MACKENNA D., SUMMEROUR S.R., VILLARREAL F.J., 2000; SUN Y et al, 2002).

É descrito que os fibroblastos necessitam da membrana basal e exibem múltiplos processos ou extensões do tipo *sheet-like*. Estas células contêm citoplasma ramificado, um núcleo oval com um ou dois nucléolos. As características morfológicas dos fibroblastos podem variar amplamente de acordo com sua atividade metabólica. As células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, enquanto as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos.

Quando os fibroblastos estão ativos apresentam extenso retículo endoplasmático rugoso e proeminente aparelho de Golgi, assim como abundante material granular citoplasmático. Os fibroblastos *in vitro* quando cultivados em substratos 3D (hidrogéis ou géis de colágeno) mostram extensões dentríticas, e quando em substrato planar e rígido (vidro ou plástico), os fibroblastos estão submetidos ao estado de alta tensão, e por isto, apresentam formato estrelar/bipolar, sítios proeminentes de adesão focal, fibras de estresse de actina e extensões tipo lamelipódios, nestas condições são denominados protomiofibroblastos. (RHEE S, JIANG H, HO CH, GRINNELL F., 2007; HINZ B et al, 2007).

Os fibroblastos quiescentes, os fibrócitos, são menores e com escasso citoplasma (BANKS, 1992). Eles são considerados importantes no processo cicatricial por contribuírem no mecanismo de formação do granuloma, na atividade antigênica, na produção de colágeno e na matriz protéica, participação na remodelagem e na inflamação como uma fonte rica de citocinas (ABE et al., 2001;

QUAN, 2004), na produção de fatores de crescimento, na produção de fatores angiogênicos, na contribuição na formação de novos vasos sanguíneos e em algumas desordens fibróticas (METZ, 2002; QUAN, 2004).

Sabe-se que, em muitas instâncias, o fibroblasto é sensível às mudanças nas propriedades químicas e mecânicas dos tecidos (BURGESS ML et al, 1995). É sabido que o miocárdio responde às sobrecargas crônicas hemodinâmicas com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Estruturalmente, este processo é caracterizado por afetar principalmente os miócitos. (EGHBALI M., 1992; WILKE A et al., 1996; NICOLETTIA E MICHEL JB, 1999; MACKENNA D, SUMMEROUR SR E VILLAREAL FJ, 2000; PIPER C et al, 2003). No entanto, a hipertrofia do miocárdio também está associada a um aumento da atividade dos fibroblastos cardíacos (BISHOP J. et al., 1994; CHAPMAN D, WEBER K, e EGBALI M., 1990; PIPER C et al, 2003).

Observa-se que em resposta as mudanças na tensão mecânica, vários grupos de fatores, incluindo fatores de crescimento, tais como TGF- β , angiotensina II, e PDGF, bem como as citocinas, afetam a expressão de colágeno e/ou o crescimento de fibroblastos (BOOZ G. e BAKER K., 1995). Neste aspecto, reconhece-se o papel dos estímulos mecânicos na patogênese de alterações fenotípicas do miocárdio e câmaras cardíacas nas várias doenças que acometem o coração.

Os diferentes padrões de remodelamento da MEC, no coração, dependem de condições mecânica e química alteradas, o que contribui para a disfunção cardíaca. (BISHOP J, e LINDAHL G., 1999; HEENEMAN S, 2000; MACKENNA D, SUMMEROUR S e, VILLARREAL F., 2000; VAN EMPEL e DE WINDT, 2004). Normalmente, o remodelamento miocárdico envolve mudanças na quantidade e

organização dos componentes da MEC. Estas mudanças na MEC alteraram os parâmetros fisiológicos cardíacos. Observa-se relevantemente a ativação e proliferação de fibroblastos cardíacos, além da migração destas células para ocupar áreas do miocárdio, onde antes havia outras estruturas como vasos e os miócitos cardíacos, ao mesmo tempo em que produzem colágenos e se diferenciam em miofibroblastos, com consequente, o acúmulo excessivo de MEC (EGHBALI, 1992; WILKE et al, 1996; NICOLETTI e MICHEL, 1999; MacKENNA, 2000). Os eventos estruturais no processo de remodelamento cardíaco incluem, portanto, alterações na composição da MEC.

Especificamente, a fibrose presente no miocárdio hipertrófico decorre de proliferação e transformação de fibroblastos em miofibroblastos e aumento da síntese de colágeno. A fibrose tem consequências funcionais para o coração. Primeiro, os aumentos na deposição de MEC resultam em rigidez mecânica e contribuem para a disfunção diastólica. Os aumentos progressivos da fibrose podem também causar disfunção sistólica e hipertrofia ventricular esquerda (ZILE e BRUSTSAERT, 2002b). Além disso, aumento dos níveis de colágeno perturba a comunicação eletrônica entre os miócitos. Ademais, a fibrose perivascular das arteríolas miocárdicas prejudica a disponibilidade de oxigênio e agrava a isquemia.

Diferenciação dos fibroblastos em miofibroblatos

Deste modo, a ativação de fibroblastos cardíacos e sua diferenciação em miofibroblastos são consideradas de interesse clínico, devido seu papel central ser

sintetizar proteínas da MEC (CHIEN KR, 1999) e sua reconhecida contribuição na fibrose e hipertrofia cardíacas.

Especificamente, sabe-se que sob a estimulação apropriada, os fibroblastos relativamente inertes podem adquirir um fenótipo sintético, contrátil e expressar diversos marcadores de células de músculo liso, que não são típicos de fibroblastos (TOMASEK JJ et al, 2002). Tradicionalmente, os fibroblastos cardíacos respondem à sobrecarga mecânica diferenciando-se em miofibroblastos, os quais expressam α -actina de músculo liso (SMA- *smooth muscle actin*), comumente usada como marcador molecular de miofibroblatos (LESLIE KO, et al, 1991).

A SMA é uma isoforma de actina restrita normalmente a células musculares vasculares passa a ser expressa nestes fibroblastos diferenciados, devido ao processo de cicatrização e em lesões fibro-contráteis (RONNOV-JESSEN L, e PETERSEN OW, 1996; GRINNELL F, 1994, SERINI G, e GABBIANI G, 1999). Contudo, nestes fibroblastos diferenciados (miofibroblastos) não são expressos outros marcadores de células de músculo liso (p.ex: cadeias pesadas de miosina do músculo liso).

Os miofibroblastos são descritos como células grandes fusiformes definidas por núcleo dentilhado, fibras de estresse e por junções célula-matriz descritas como um complexo especializado transmembrana mecano-perceptível formado por microfilamentos contráteis intracelulares e por fibronectina denominado “fibronexus” *in vivo* e “adesões focais super-maduras” (FAS - *supermature focal adhesions*) *in vitro* (EYDEN BP, 1993; HINZ B, 2006). Em cultura, o protomiofibroblasto é um fenótipo estável, representando estágio intermediário na maioria das condições *in vivo* prossegue em direção ao “miofibroblasto diferenciado” (HINZ, B et al, 2001).

Ainda não é definido nenhum marcador imunocitoquímico específico para miofibroblasto. Conseqüentemente, a caracterização destas células é baseada em uma combinação de marcadores positivos: as isoformas de actina especializadas na contração celular tal como α -SMA e γ -SMA; a proteína paladina Ig₄, a glicoproteína transmembrana podoplanina tipo-mucina, o filamento intermediário- vimentina, a molécula de adesão célula-célula caderina-11/ caderina OB, a enzima de maturação do colágeno do tipo 4-prolina-hidroxilase I (P4H). Ainda, há marcadores negativos: o marcador de citoqueratina epitelial, o marcador CD14 do monócito, o marcador endotelial CD31, o marcador CD34 de fibrócito e a *smoothelin-musculin* marcador da célula de músculo liso. Além destes marcadores citoplasmáticos e de membrana, os miofibroblasto também expressam a integrina α_{11} , e componentes da MEC, tais como colágenos (tipo I, III e IV), Metaloproteinases (principalmente as 3 e 9) e inibidores tissulares de Metaloproteinases- TIMP' s (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) (De WEVER O, MAREEL M, 2003).

Com a exceção dos folhetos das válvulas cardíacas, os miofibroblastos não são encontrados normalmente no tecido cardíaco saudável. Todavia, em lesões, os miofibroblastos aparecem no miocárdio. Inicialmente pensava-se que os miofibroblastos locais residentes no interstício e na adventícia fossem os principais produtores dos componentes da MEC após lesão tecidual (KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, 2005), mas atualmente acredita-se que fibroblastos podem ser derivados de várias fontes (QUAN TE, COWPER SE, BUCALA R, 2006).

Além das células residentes, os miofibroblastos possuem outras três possíveis origens. 1) São derivados de células epiteliais em um processo denominado de transição epitelial-mesenquimal (EMT) (KALLURI R e NEILSON EG, 2003; WILLIS

BC, DU BOIS RM, BOROK Z, 2006). 2) Mais recentemente, foi sugerido que um processo semelhante ocorre com células endoteliais, denominado transição endotelial-mesenquimais (EndMT), em que mostrou-se que a fibrose cardíaca está associada com a emergência dos fibroblastos derivados de células endoteliais, sugerindo a EndMT, similar aos eventos que ocorrem durante a formação do coxim atrioventricular no coração embrionário (ZEISBERG EM. et al, 2007). 3) BUCALA et al (1994) também identificaram um tipo celular circulante semelhante aos fibroblastos, o qual é derivado de células-tronco da medula óssea. Estes por via sanguínea de células-tronco mesenquimais progenitores-MSCs (*circulating mesenchymal stem cells*) têm um fenótipo fibroblasto/miofibroblasto (que expressam CD34, CD45 e colágeno tipo I) e agora são comumente chamados fibrócitos CD 34⁺ ou MSCs (BRITTAN M et al, 2002; DIREKZE NC et al, 2003; FORBES SJ et al, 2004, EBIHARA Y et al, 2006). Finalmente, em alguns tecidos, os fibroblastos residentes não são a única fonte de miofibroblastos. Por exemplo, no fígado fibrótico, as células estreladas residentes parecem ser a fonte primária de miofibroblastos, embora células derivadas de medula óssea, também possam contribuir (FORBES SJ, 2004; RUSSO FP et al, 2006).

Qualquer que seja a origem dos miofibroblastos, vários estudos tentam indicar o papel das várias subpopulações de miofibroblastos em doenças fibroproliferativas (PHILLIPS RJ et al, 2004). Sobre este aspecto, estudos recentes indicam que a produção de fatores de crescimento, quimiocinas e proteínas de fase aguda, proteínas da MEC e de proteases por estas células é crítica para o reparo, a fibrose e a organogênese tecidual (BROWN e DEJANA E, 2003). A deficiência de

apoptose dos miofibroblastos é sugerida como essencial para dirigir a progressão à fibrose.

A diferenciação para miofibroblastos pode ser promovida por citocinas, tal qual TGF- β (fator de crescimento de transformação), o qual modula a expressão de α -actina em cultura de fibroblastos (DESMOULIERE A et al, 1993), e pela conformação do substrato (ARORA PD, NARANI N, e McCULLOCH CA, 1999), sugerindo um papel dos sinais mecânicos na regulação da expressão de α -actina.

A tensão mecânica também é considerada como um importante fator promotor da diferenciação de fibroblastos em cultura em miofibroblastos e a expressão de α -SMA (TOMASEK JJ, et al, 2002). O sistema de aplicação de forças em amplitude e duração precisas permite a análise dos efeitos do estímulo mecânico em fibroblastos cardíacos funcionais *in vitro*. Algumas das repostas induzidas pelas forças mecânicas em fibroblastos cardíacos descrevem o aumento de proliferação e aumento da produção de colágeno (BUTT RP, LAURENT GJ, e BISHOP JE, 1995).

O citoesqueleto dos miofibroblastos pode funcionar como mecanotransdutor, em que os estímulos mecânicos são traduzindo em sinais bioquímicos, o que envolve vias de tirosina fosfatase e quinases (GIANNONE, G e SHEETZ, MP., 2006). As vias de sinalização que medeiam esses efeitos induzidos mecanicamente podem ser identificadas *in vitro* incluem como, por exemplo: a ERK-Extracellular signal-regulated protein kinases (OECKLER RA, KAMINSKI PM, e WOLIN MS, 2003; SADOSHIMA J, 1992), JNK- *c-Jun N-terminal kinases* (ARORA PD, NARANI N, e McCULLOCH CA, 1999; LEW AM, GLOGAUER M, e MCULLOCH CA., 1999; MACKENNA DA et al, 1998; WANG J, SETH A, e MCCULLOCH CA., 2000), e p38 quinase- *p38 MAP Kinase* (D'ADDARIO M, et al, 2002).

A interferência na expressão de α -SMA inibe a geração de força e a formação de adesões focais e fibras de estresse (HINZ B, GABBIANI G, e CHAPONNIER C, 2002). A SMA em miofibroblastos organiza-se nos filamentos de actina, e parte dos filamentos de SMA se localizam nas adesões focais. Esta observação é muito importante porque a transmissão das forças de tensão envolvidas na indução de genes regulados por estímulos mecânicos requer os filamentos de actina (KHAITLINA S.Y., 2001), e as adesões focais são reconhecidas funcionalmente como mecano-sensores (MCHUGH KM, CRAWFORD K, LESSARD JL, 1991; HAUTMANN MB, 1998). Sendo reconhecido o envolvimento dos miofibroblastos no processo fibrótico, uma possível abordagem terapêutica para tratamento de uma variedade de doenças fibróticas seria a interrupção do desenvolvimento, recrutamento e/ou ativação dos miofibroblastos (QUAN TE, COWPER SE, BUCALA R, 2006).

1.2 Quinase de Adesão Focal (FAK)

A Quinase de adesão focal (FAK) é uma importante proteína sinalizadora na mediação da sinalização celular via integrinas (GUAN et al, 1991; KORNBERG et al, 1992). Também pode ser ativada por receptores tirosinas quinases e por receptores acoplados a proteína G (EBLE et al, 2000; TORSONI et al, 2003), constituindo assim um efetor comum a múltiplas vias de sinalização. A FAK é um importante mediador na transdução de sinais mecânicos em diferentes células (MOALLI MR, 2001; MONTIEL M, de la BLANCA EP, e JIMINEZ E, 2005; SHIKATA Y et al , 2005, WANG JG, et al, 2001).

1.2.1. Estrutura

A FAK é uma tirosina-quinase citoplasmática, de aproximadamente 1052 aminoácidos, com uma massa molecular aproximado de 125kDa. A estrutura da FAK é única dentre as famílias de tirosina quinases, sendo dividida em três domínios em sua estrutura: o domínio N-terminal, o domínio quinase e o domínio C-terminal, o que provavelmente permite que a mesma se associe a múltiplos substratos e determine a ativação de diversas vias de sinalização celular (PETIT e THIERY, 2000). (Figura 02)

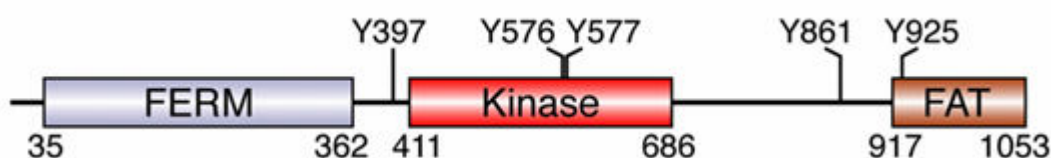


Figura 02. Esquema representativo da estrutura linear da FAK, demonstrando os 3 domínios (FERM, KINASE E FAT). Acima representado os resíduos de tirosina que são fosforilados durante a sua ativação.

O domínio N-terminal é composto por um domínio FERM, responsável pela interação com a extremidade citoplasmática da subunidade da integrina beta (SCHALLER et al., 1995), além disso, este domínio também foi relatado regular a atividade de quinase da FAK através de um mecanismo inibitório intramolecular (COOPER et al., 2003; LIETHA et al., 2007). Esse domínio é composto por 3 lobos (F1, F2 e F3). O lobo F1 é responsável pela interação com a proteína supressora tumoral p53. O lobo F2 foi descrito ser responsável pela translocação para o

núcleo celular. Já o lobo F3 do domínio FERM está relacionado à interação com a proteína Mdm2 (*mouse double minute 2*) (LIM et al., 2008).

Há uma conexão entre os domínios N-terminal e o domínio quinase caracterizada por ser uma seqüência de aminoácidos (*linker*). Esta seqüência contém o resíduo de tirosina 397, que é sítio de autofosforilação e ativação da FAK e um sítio para a ligação da porção SH2 da proteína Src (CECCARELLI, et al., 2006).

O domínio quinase na região central correspondente a porção catalítica da enzima, apresenta uma alça de ativação que contém os resíduos de tirosina 576 e 577 (CALALB, et al., 1995).

Já o domínio C-Terminal, é rico em sítios de interação proteína-proteína (seqüências ricas em prolina), um sítio de reconhecimento SH3 e uma extremidade C-terminal conhecida como FAT (*Focal Adhesion Targeting*) responsável pela adesão focal (HILDEBRAND et al., 1993) e pela associação com as proteínas talina (CHEN et al., 1995) e paxilina (HILDEBRAND et al., 1995).

A sinalização via FAK requer que esta seja ativada através da autofosforilação no resíduo de tirosina 397. Essa fosforilação em tirosina resulta na formação de um sítio de alta afinidade para a porção SH2 da Src e essa associação favorece a fosforilação em outros resíduos de tirosina da FAK (407, 576, 577, 861 e 925), levando a uma atividade máxima desta enzima (CALALB, et al., 1995). Estudos recentes utilizando técnicas de espectrometria de massas identificaram 6 novos sítios de fosforilação (148, 347, 441, 503, 850, 1007), cuja fosforilação não dependeria da associação com a Src (CICCIMARO et al., 2006).

O resíduo 397 fosforilado constitui um sítio de ligação para outras proteínas como a PI3K, participando nas cascatas de sinalização anti-apoptóticas via AKT. Os resíduos de tirosina 576 e 577 se encontram no interior do domínio quinase da FAK e a fosforilação destes sítios estão envolvidos na regulação da atividade enzimática (MAA e LEU, 1998). Já a fosforilação da tirosina 925, localizada no domínio C-terminal da FAK, cria sítios de ligação para o domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2. Essa associação leva a ativação de MAP kinases, reguladoras do crescimento e proliferação celular (SCHWARTZ ET AL., 1995; PARSONS, 1996; SCHLAEPFER ET AL., 1998).

Estudos anteriores demonstraram que estímulos mecânicos em miócitos cardíacos induzem um aumento na fosforilação e, por conseguinte, na atividade da FAK. O estiramento aplicado diretamente em miócitos cardíacos de ratos neonatos provoca a ativação da FAK (TORSONI et al., 2003). Além disso, a ativação da FAK por estiramento não depende da ativação de fatores parácrinos, o que indica ser a ativação da FAK, pelo estiramento, dependente de mecanismo intrínseco do miócito ligado diretamente ao estímulo mecânico (TORSONI et al., 2003). Da mesma forma, a sobrecarga pressórica, induzida pela constrição do arco aórtico, induz um aumento na fosforilação da FAK (FRANCHINI et al., 2000). Uma vez ativada essa proteína ativa uma série de proteínas (ERK, JNK, MAP, RhoA/ROCK) envolvidas no processo de hipertrofia cardíaca (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002; TORSONI et al., 2003; FONSECA et al., 2005; TORSONI et al., 2005; NADRUZ et al., 2005).

Controle da Atividade da FAK

Recentemente, mostrou-se que o domínio FERM tem papel importante na regulação de sua atividade e estado de fosforilação em células (TOUTANT et al., 2002). Deleções da região N-terminal da FAK resultam em hiperfosforilação da região C-terminal, sugerindo que o domínio FERM exerce influência inibitória no domínio catalítico da FAK (COHEN e GUAN, 2005). Estudos demonstram que o domínio FERM interage com o domínio catalítico, sugerindo que esta interação é responsável pela influência inibitória que a região N-terminal tem na atividade da FAK (COOPER et al. 2003). Com base nesses dados, presume-se que, a ativação da FAK depende de interação com proteínas regulatórias que se ligam à região amino-terminal e/ou de modificação conformacional intra-molecular que desabilite a interação entre os domínios FERM e catalítico (COOPER et al 2003).

Ainda neste contexto, foi proposto anteriormente (TORSONI et al., 2003; FONSECA et al., 2005) que ativação da FAK em miócitos cardíacos, pode ser dependente da interação entre o domínio FERM da FAK e a cadeia pesada da miosina sarcomérica. Os resultados desses estudos demonstraram que FAK e miosina estão associadas na banda A sarcomérica em miócitos cardíacos e que a ativação da FAK, por estímulo mecânico, reduz drasticamente essa associação. Esses estudos sugerem que a deformação da miosina sarcomérica induzida pelo estiramento, daria início ao processo de desbloqueio da autoinibição que o domínio FERM exerce no domínio catalítico da FAK, possibilitando a fosforilação e ativação do sítio de tirosina 397.

Estudos anteriores demonstraram que FAK e RhoA estão associadas em miócitos cardíacos não estirados e que a ativação da FAK, por estímulo mecânico é controlada pela via de sinalização RhoA/ROCK. A ativação da Rho aumenta a fosforilação da FAK, por outro lado sua inibição a diminui (TORSONI et al., 2005).

Estudos demonstram que o nível de fosforilação basal da FAK seja regulado pela atividade basal da tirosino-fosfatase SHP2 e também que a sustentação de níveis elevados de fosforilação da FAK em miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos se deve à inibição da atividade da SHP2. (MANES et al 1999). Além disso, estudos demonstram que a inativação da SHP2 é acompanhada por aumento na fosforilação em tirosina e, conseqüentemente, ativação da FAK, em células em cultura (Yu et al., 1998). A depleção da Shp2 através do uso de interferência por RNA (siRNA_{Shp2}), foi acompanhada por um aumento na fosforilação em tirosina da FAK e induziu o desenvolvimento de fenótipo hipertrófico em miócitos cardíacos não estirados (MARIN et al., 2008).

1.2.3 Efeitos da Ativação da FAK no Coração

A FAK uma vez ativada participa na transdução de sinal em decorrência de estímulo mecânico. Conforme descrito anteriormente, a fosforilação da FAK em tirosina 397 cria sítio para a interação com a Src. Essa interação FAK/Src é importante para a fosforilação de resíduos adicionais de FAK, a associação com PI 3-quinase e Grb2, e ativação das vias de crescimento, mediada pela ERK1/2 e da via de sobrevivência celular mediada pela AKT (FRANCHINI et al. 2000; DOMINGOS et al. 2002).

A ativação da FAK por estiramento em miócitos cardíacos tem papel crítico na regulação da re-expressão de genes do programa fetal induzida por estímulo mecânico (TORSONI et al., 2003; NADRUZ et al., 2005). Existe ampla constatação experimental (HOSHIJIMA e CHIEN, 2002) de que a re-expressão do programa gênico fetal é parte essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos.

Estudos em animais com deleção gênica da FAK resultaram em defeitos mesodermis e letalidade embrionária, por volta da segunda semana, principalmente devido a defeitos no desenvolvimento cardíaco (ILIC et al, 1995; FURUTA et al. 1995). Além disso, animais com deleção gênica condicional para FAK em miócitos cardíacos apresentaram também, alta letalidade embrionária com defeitos na parede ventricular e defeitos no septo ventricular (PENG et al., 2008). Esses dados indicam que a FAK estaria envolvida em processos essenciais no desenvolvimento do coração.

Mais recentemente, a importância da FAK para as alterações fenotípicas do ventrículo esquerdo, desencadeadas por sobrecarga pressórica, foi demonstrada em modelo de camundongo com deleção condicional para FAK em miócitos cardíacos. Dois trabalhos independentes foram desenvolvidos utilizando o mesmo modelo e apresentaram fenótipos diferentes. PENG et al., (2006) demonstrou que os animais com deleção restrita para a FAK apresentaram hipertrofia cardíaca excêntrica, aumento da fibrose e aumento no tamanho dos miócitos cardíacos. Por outro lado, DIMICHELE et al (2006), relatou uma atenuação da hipertrofia cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica.

Dados do nosso laboratório, utilizando inibição gênica da FAK através do uso de interferência por RNA (siRNA_{FAK}), impediu a deterioração estrutural e funcional de ventrículos esquerdos hipertróficos, sugerindo que a ativação permanente da FAK no miocárdio pode não apenas contribuir para o crescimento hipertrófico, mas também, para a deterioração que resulta, em última instância, em falência cardíaca. (CLEMENTE et al., 2007). De acordo com esta hipótese, verificamos também, aumento na expressão e atividade da FAK paralela ao desenvolvimento de hipertrofia e de falência miocárdicas em camundongos submetidos à constrição da aorta. Notavelmente, o aumento da expressão da FAK no miocárdio hipertrófico foi detectado tanto em miócitos cardíacos como no interstício, coincidindo com as áreas de fibrose. Isto sugere que a participação da FAK na deterioração estrutural e funcional do miocárdio hipertrófico inclui sua atividade em fibroblastos além daquela já conhecida nos miócitos cardíacos. Também neste estudo, CLEMENTE e cols (2007), constataram que o silenciamento da FAK no miocárdio de camundongos inibe os aumentos da expressão e da atividade de MMP-2 e MMP-9 induzidos por sobrecarga pressórica, indicando que a ativação da FAK contribui para o aumento da expressão e atividade de MMPs no miocárdio hipertrófico. Este dado é concordante com a hipótese de que a ativação permanente da FAK contribui para a hipertrofia cardíaca. E ainda indica que a ativação de MMPs por um mecanismo mediado pela FAK, provavelmente em fibroblastos cardíacos, é um dos fatores determinantes da progressão do miocárdio hipertrófico para o desarranjo estrutural e funcional. A sinalização da adesão focal via FAK pode representar outra via central através da qual, os sinais bioquímicos e biofísicos da MEC, assim como fatores de crescimento solúveis, são integrados (THANNICKAL, VJ et al, 2003; GOFFIN, JM; et al, 2006).

1.3 Metaloproteinases de Matriz

As Metaloproteinases (MMP) têm um papel muito importante na manutenção apropriada do homeostasia entre a degradação e a regeneração da substância básica dos tecidos. A MMP é uma família de enzimas capazes de digerir praticamente todos os componentes da MEC. As MMPs foram primeiramente descritas por Jermome Gross e Charles Lapiere (1962) os quais observaram a atividade enzimática destas: a degradação da tripla hélice de colágeno. Como se sabe a MEC dos tecidos constitui não somente a sustentação para as células, mas também participa na regulação do metabolismo celular. Por isto, todo o distúrbio no balanço entre a degradação da matriz e a regeneração é o indício ao patofisiologia de diversas patologias.

Situações experimentais ou clínicas em que o balanço entre MMPs e TIMPs favorecem a atividade das MMPs ocorre o aumento da degradação do colágeno, o que predispõe à dilatação ventricular (BRADHAM et al., 2002; POLAYAKOVA et al., 2004). A dilatação ventricular pode então precipitar um ciclo vicioso de degeneração através de mecanismos que incluem aumento da tensão na parede ventricular, ativação neuro-humoral e estresse oxidativo (CHENG et al., 1995).

Os dados disponíveis indicam ser a ativação das MMPs estão envolvidas, entre diversos fatores, com a deterioração estrutural e funcional do miocárdio hipertrófico que culmina com a falência cardíaca.

1.3.1.Estrutura e função

As Metaloproteinases são endopeptidases contendo zinco, requerem um pH neutro e Ca^{+2} , têm atividade hidrolítica de amplo espectro para as proteínas extracelulares. As MMPs estão amplamente distribuídas no organismo humano onde desempenham uma série de funções fisiológicas como, por exemplo, na cicatrização (WOLF et al, 1992), na reabsorção óssea (DELAISSÉ et al, 1992), na involução mamária (TALHOUK et al, 1992) e em outras funções fisiológicas associadas à gravidez e parto (JEFFREY, 1991). Recentemente, tem-se demonstrado que as MMPs também estão implicadas em processos patológicos variados como na artrite reumatóide (HARRIS, 1990), na enfermidade periodontal (PAGE, 1991), na esclerose múltipla (CHANDLER et al, 1997), em certas alterações hematológicas (GUEDEZ et al, 1996), diversos tipos de cânceres (AHMAD et al, 1998; ALLGAYER et al, 1998; MURRAY et al, 1996; TALVENSAARI-MATTILA et al, 1998), e em doenças cardiovasculares (TAMARINA et al, 1997).

A família das MMPs apresenta mais de 25 espécies. Todas as espécies apresentam similaridade de estrutura e função. Embora cada membro da família MMP seja o produto de um gene, a análise da estrutura protéica revelou quatro estruturas modulares conservadas (WOESSNER JF JR, NAGASE H, 2000; HERMAN MP, 2001; NAGASE H, VISSE R, 2006). Basicamente são compostas por um sítio catalítico, contendo zinco e cálcio, e de um pró-peptídeo, ligado a este sítio catalítico por uma ligação sulfidríla, o que as mantém em sua forma inativa. O domínio hemopexina/vitronectina (*hemopexin-like*) é encontrado em todas as MMPs, exceto em MMP-7 e, é responsável pelo reconhecimento e adesão aos componentes da MEC (BODE e MASKOS, 2003; BRINCKERHOFF e MATRISIAN, 2002; NAGASE

e WOESSNER, 1999), o que confere especificidade ao substrato (VISSE R, NAGASE H., 2003). As seqüências do peptídeo sinal e pró-peptídeo constituem o domínio.NH₂ –terminal. Já, o domínio catalítico contém região vinculativa o zinco (Zn²⁺) e, é responsável pela atividade proteolítica (Figura 03).

Para a ativação das MMPs é requerida uma seqüência de eventos proteolíticos. No estado latente, o domínio catalítico de MMP é ocultado pelo pró-peptídeo mediado por uma interação cisteína-Zn²⁺ (PARK AJ, et al, 1991; CHEN LC, NOELKEN ME, NAGASE H, 1993; WILSON CL, MATRISIAN LM. MATRILYSIN, 1998; MORGUNOVA E et al, 1999). As pró-MMPs encontram-se ligadas às proteínas específicas da MEC e permanecem enzimaticamente quiescentes até o domínio pró-peptídeo ser clivado. Para ativação de MMP ocorrer a seqüência pró-peptídeo do domínio NH₂-terminal é clivada, resultando na exposição do sítio vinculativo Zn²⁺ do domínio catalítico.

As MMPs estão presentes na matriz extracelular de vários tecidos, incluindo miocárdio, musculatura lisa vascular, endotélio, entre outros. Sendo as gelatinases A e B (MMP 2 e MMP 9, respectivamente), as mais associadas a algumas doenças cardiovasculares (GALLIS e KHATRI, 2002; RAFFETO e KHALIL, 2008).

As gelatinases A e B (MMP 2- 72kDa e 9- 92kDa) têm como principais substratos o colágeno tipo IV e gelatinas -colágeno denaturado-, além de componentes da membrana basal, colágeno I, V, VII, XIV. São distinguidas pela presença de um domínio adicional inserida no domínio catalítico a região gelatina-vinculativo. Esta região está posicionada imediatamente antes do motivo de Zinco vinculativo, e que forma uma unidade separada dobrável que não perturbar a estrutura do domínio catalítico e estabiliza o pró-peptídeo.

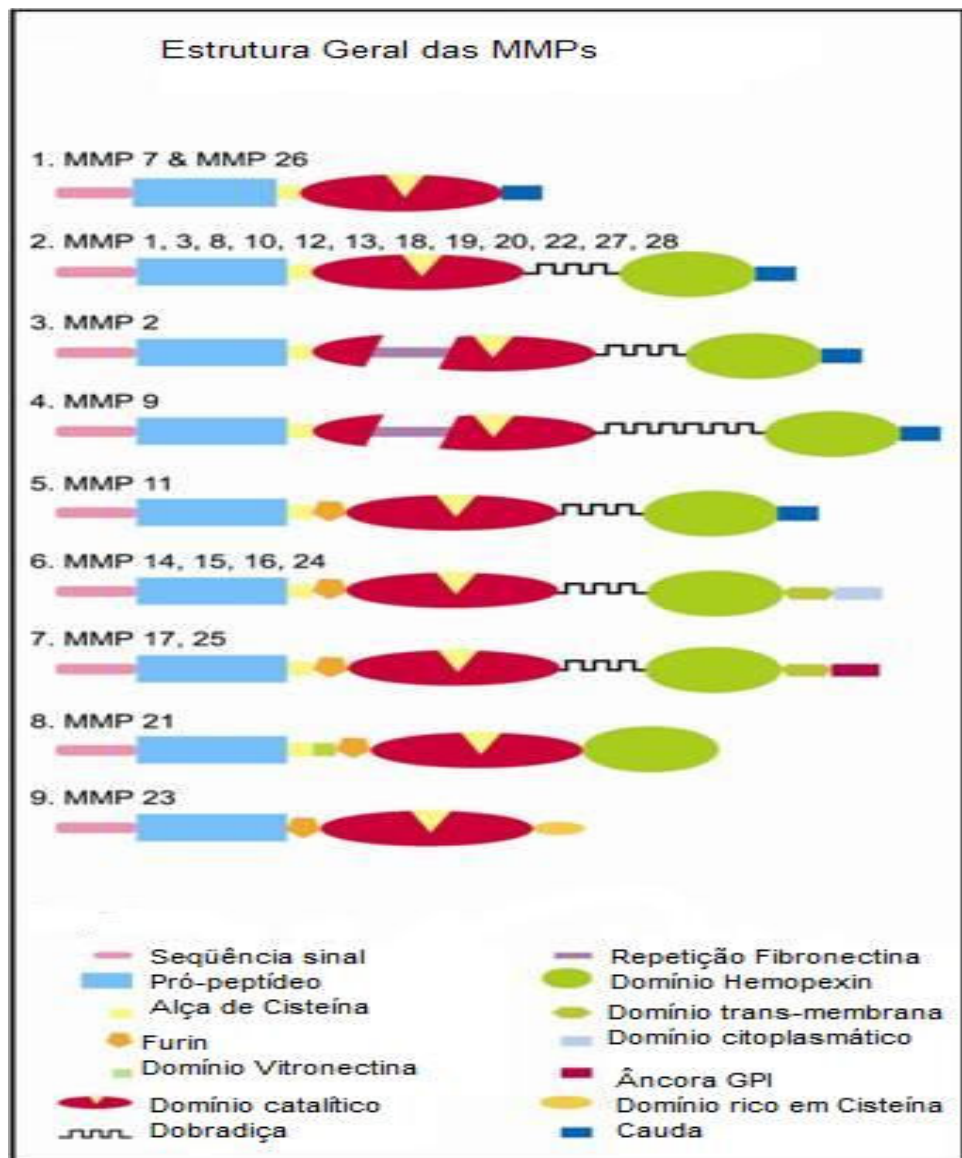


Figura 03. Esquema da estrutura geral das isoformas da família da MMPs.

As MMPs podem diferenciar-se em relação à localização celular, regulação transcricional, e principalmente pela especificidade a substratos (VISSE e NAGASE e, 2003). As gelatinases A e B são responsáveis pela degradação dos componentes da membrana basal, tais como, colágeno tipo IV, V, laminina, além do colágeno tipo I e III, elastina e da fibronectina, entre outros (NAGASE et al., 2006).

Estas peptidases são sintetizadas e secretadas em uma pró-forma latente (zimogênios ou pró-MMPs), e a sua atividade depende, na maior parte das vezes, da ruptura dos seus domínios pró-peptídicos, do sítio ativo da enzima. Algumas proteases, como a plasmina e MT-MMPs (metaloproteinases de membrana-são caracterizadas por um domínio transmembrana que é responsável pela ancoragem destas enzimas à membrana plasmática (NGUYEN *et al*, 2001; LIENKENS *et al*, 2001), foram consideradas importantes para este processo de ativação (BODE e MAKOS, 2003; BRINCKERHOFF e MATRISIAN, 2002; NAGASE e WOESSNER, 1999).

Em adição, também já descrito, que vários fatores como citocinas, angiotensina II, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e oxidativo podem regular a atividade destas MMPs (BOKIS e TRACHUK, 2003; DESCHAMPS e SPINALE, 2006; PARKS *et al*, 2002; SPINALE, 2002). Esta regulação se dá de três maneiras: (i) indução da expressão gênica, (ii) ativação de suas pró-formas latentes, e (iii) inibição por TIMPs (inibidores teciduais/tissulares de MMPS).

Fisiologicamente há um equilíbrio entre a ativação das MMPs e sua inativação pelos TIMPs. Estes inibidores endógenos das MMPs podem ser classificados em quatro tipos diferentes: TIMP-1, TIMP-2 TIMP-3 e TIMP-4. Essa classificação deve-se a localização tecidual, mas principalmente, a especificidade ao(s) substrato(s). Por exemplo, o TIMP-1 mostra maior seletividade a MMP-9, enquanto o TIMP-2 para MMP-2 (BODE e MAKOS, 2003; NAGASE *et al.*, 2006).

De modo geral, as MMPs promovem a degradação de várias proteínas da MEC, por isso estão envolvidas ativamente no processo de remodelamento tecidual (PAGE-McCAW *et al.*, 2007). O desequilíbrio na regulação destas MMPs pode

resultar em um aumento significativo de suas atividades, o que contribui como já citado, para o desenvolvimento e/ou progressão de várias doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão (GALLIS e KHATRI, 2002; RAFFETO e KHALIL, 2008).

Em situações experimentais ou clínicas em que o balanço entre MMPs e TIMPs favorece a atividade das MMPs, ocorre aumento da degradação do colágeno o que predispõe à dilatação ventricular (BRADHAM et al., 2002; POLAYAKOVA et al., 2004). A dilatação ventricular pode então precipitar um ciclo vicioso de degeneração através de mecanismos que incluem aumento da tensão na parede ventricular, ativação neuro-humoral e o estresse oxidativo (CHENG et al., 1995).

O mecanismo de regulação da transcrição das MMPs por estímulo mecânico é extensamente estudado, todavia há diversas questões ainda desconhecidas. Uma hipótese para isto seria a transdução de sinais da MEC para as células. Sabe-se que a MEC é integrada ao compartimento intracelular através de uma série de proteínas transmembrana, as integrinas. É provável, que as mudanças no estresse mecânico ao que o miocárdio está submetido, deve alterar vias de sinalização intracelular envolvidas na atividade transcrricional das MMPs (BURGESS ML et al, 2002; MACKENNA D, SUMMEROUR SR, VILLARREAL FJ, 2000; RIDLEY AJ et al, 2003; ROSS RS, 2004; RUWHOF C, VAN DER LAARSE A, 2000; SHEETZ MP, FELSENFELD DP, e GALBRAITH CG, 1998; TRUTER SL et al., 2004). Os dados disponíveis indicam que a ativação das MMPs é um dos principais fatores associados à deterioração estrutural e funcional do miocárdio hipertrófico que culmina com a falência cardíaca.

Apesar de não existirem ainda dados disponíveis que indiquem a participação da FAK no controle de MMPs em fibroblastos, existem evidências experimentais que

indicam a participação da FAK no controle da expressão de MMPs e também do fenótipo invasivo em células tumorais (HAUCK, CR; HSIA,DA; PUENTE,XS et al, 2002; HSIA,DA; MITRA, SK, HAUCK, CR, et al.; 2003; MITRA, SK; HANSON, DA e SCHLAEPFER, DD; 2005). Os estudos indicam que a FAK contribui para o controle da expressão de MMP-2 através da via $\alpha_v\beta_1$ integrina/FAK/p130^{Cas}/ERK1/2 e JNK1. (HU, B et al, 2006).

Assim realizamos que a FAK tem papel crítico na regulação da expressão de metaloproteinases em fibroblastos cardíacos por resposta a estímulos mecânicos. Tendo a revelância, configurada na possível identificação de eventos moleculares de sinalização celular responsáveis pelo controle da expressão e atividade de metaloproteinases em células do miocárdio. Observa-se a contribuição para o entendimento dos mecanismos básicos responsáveis pelas alterações estruturais, verificadas no miocárdio hipertrófico e pela deterioração estrutural e funcional, cujo resultado é a insuficiência cardíaca. Espera-se que este conhecimento estabeleça as bases para o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas voltadas para o controle da hipertrofia e prevenção da insuficiência cardíaca.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da quinase de adesão focal (FAK) no controle da expressão e atividade de MMPs em fibroblastos de ratos submetidos a estímulos mecânicos

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do estiramento sobre a proliferação e diferenciação de fibroblastos cardíacos de ratos neonatos.
2. Avaliar a expressão, atividade e distribuição basal e após estiramento de MMP-2, MMP-9 em fibroblastos cardíacos de rato mantidos em cultura.
3. Avaliar a expressão, fosforilação em tirosina e distribuição basal e após estiramento de FAK em fibroblastos cardíacos de rato mantidos em cultura.
4. Avaliar o efeito do silenciamento da FAK na expressão e atividade de MMP-2, MMP-9 em fibroblastos cardíacos de ratos mantidos em cultura.

2.3. Hipótese

A FAK tem papel crítico na regulação da expressão de metaloproteinases em fibroblastos cardíacos por resposta a estímulos mecânicos. Tendo a revelância, configurada na possível identificação de eventos moleculares de sinalização celular responsáveis pelo controle da expressão e atividade de MMPs em células do miocárdio. Espera-se que este conhecimento estabeleça o desenvolvimento para o controle da hipertrofia e prevenção da insuficiência cardíaca.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Anticorpos e Reagentes

Os anticorpos utilizados no presente estudo (anti-FAK, anti-pFAK, anti-GAPDH, anti-vimentina, anti-desmina, anti- α -sma, anti-BrdU, anti-JNK, rabbit anti-FITC e faloidina conjugada a rodamina) foram obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc, já os anticorpos anti-MMP 2 e anti-MMP 9 foram adquiridos da Chemicon empresa Millipore. Reagentes para SDS-PAGE e *immunoblotting* foram obtidos da Bio-Rad. Proteína A-Sepharose 6MB, Percoll (densidade 1.131 g/ml), 125 I-Protein A e membranas de nitrocelulose foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech. Meio de cultura (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Life Technology. Colagenase fração IV foi obtida da empresa Worthington Biochemical Corp., propriedade, NJ. Placas de cultura Bioflex (Flex I) foram obtidas da empresa Flexcell International (catalog no. 35-P-1001C, type I). GE Healthcare. PMSF, aprotinina, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glicerol, soro de albumina bovino (BSA-fração V), pancreatina, tripsina, gelatina, rapamicina e demais reagentes utilizados foram obtidos da empresa Sigma Chemical CO.

3.1.2 Soluções e tampões

-Solução Basal (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20)

-Solução Corante de Proteínas (45% álcool etílico, 10% ácido acético glacial, 0.27% azul de comassie)

-Solução Descorante de Proteínas (5% álcool etílico, 12.5% ácido acético glacial)

-Solução de Lowry:

- Solução A: 2% Na_2CO_3 ; 0.1N NaOH
- Solução B1: 1% CuSO_4
- Solução B2: 2% NaK tartarato
- Solução C: para cada 10 ml de solução A, adicionar 100 μL de solução B1 e 100 μL de solução B2.

-Tampão de extração para *Western blotting* e imunoprecipitado (100mM Tris-HCL pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 10mM EDTA; 100mM fluoreto de sódio; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0.2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100)

-Tampão de incubação (20 mM Tris HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina; 1mM PMSF; 1mM DTT; 1% Trtion X-100)

-Tampão de Laemmli (0.28M Tris-HCl pH 6.8; 30% glicerol; 2.5% SDS; 100mM DTT; 0.002% azul de bromofenol)

-Tampão PBS (0,2M NaH_2PO_4 ; 0,2M Na_2HPO_4 ; 0,3M NaCl).

3.1.3. Animais

Para o presente estudo foram utilizados ratos neonatos da linhagem *Wistar* provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP, com 1 a 3 dias de vida. Estes permaneceram juntamente com a mãe no CEMIB até o dia do experimento. O uso dos animais no presente estudo foi aprovado e de conhecimento do Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEa-IB-UNICAMP), segundo o protocolo nº1643-1.

3.2 Métodos

3.2.1 - Isolamento de fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (FCRN)

Os fibroblastos cardíacos ventriculares provenientes de ratos *Wistar* neonatos de 1 a 3 dias de vida, são submetidos a digestão enzimática conforme descrito por Nakamura e colaboradores (NAKAMURA et al. 1993) Os neonatos têm seu coração extraído da cavidade torácica e os ventrículos são separados dos átrios, reduzidos a pequenos fragmentos com o auxílio de pinça e tesoura estéreis e transferidos para uma placa contendo solução/tampão ADS 1X estéril (6,8 g NaCl, 4,76 g Hepes, 0,138 g NaH₄PO₄, 1,0 g D-glucose, 0,4 g KCl, 0,195 g MgSO₄ * 7 H₂O e água MilliQ para um volume final de 100 ml), para a aquisição de fibroblastos, e também de cardiomiócitos. O tecido cardíaco é então submetido à múltiplas digestões enzimáticas (5 a 6 digestões de 20 minutos, cada) à 37 °C usando-se para isso uma mistura de collagenase tipo II (80 Mandl U/ml) e pancreatina (0,6 mg/ml) (tampão

ADS 1X, 80 unidades/ml collagenase tipo II e 0,6 mg/ml pancreatina). A solução obtida em cada digestão e, é transferida para um tubo contendo 1,0 ml de soro fetal bovino (SFB), centrifugada (3000 rpm, 5 minutos, 37° C) e os *pellets* resultantes são ressuspensos em 1,0 ml de SFB, colocados em placa de cultura e mantidos em uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, à 37° C, até o final da digestão do restante do tecido. Ao fim, as células decantam-se, e obtêm-se a separação das células aderente das não-aderentes. Sendo, a porção aderente caracterizada exclusivamente por fibroblastos. É retirado o sobrenadante, para subsequente separação de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos através do gradiente de densidade Percoll.

Às placas de cultivo é adicionado meio de plaqueamento (fibroblastos aderentes) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), 10% SFB, U/ml penicilina-estreptomicina. Estas células são mantidas por 24-48hs (confluentes ou subconfluentes) cada passagem com solução de tripsina 0,25%, até a terceira passagem. Neste momento, os fibroblastos são plaqueados em uma densidade de 1×10^6 células/cm² em placas com base de silicone pré-cobertas com colágeno tipo I (Bioflex) para estiramento à vácuo biaxial cíclico em Sistema Flexercell 3000T (Flexercell International, USA) e mantidos em uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio foi trocado por meio de manutenção (DMEM e 0,5% penicilina-estreptomicina) e os FCRNs são então incubados por um período de 24 horas antes de serem submetidos ou não ao estiramento mecânico, ou qualquer outro ensaio. A pureza dos fibroblastos foi avaliada através de imunofluorescência, usando-se para isso o marcador TRITC-faloidina, para

cardiomiócitos, para células endoteliais VGEF e vimentina para fibroblastos. As preparações foram montadas e observadas em um microscópio de fluorescência.

Toda a manipulação ocorreu em capela de fluxo laminar. O crescimento das células foi monitorizado diariamente por microscópio invertido de fase, e o meio de cultura trocado de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a sub-confluência eram sub-cultivadas. Em todos os procedimentos de cultivo foram observados cuidados para a manutenção da esterilidade.

Os fibroblastos cardíacos de ratos *Wistar* neonatos (FCRNs) mantidos em cultura suplementados com Meio DMEM sobre placas Bioflex. foram cultivadas e divididas, primeiramente em dois grupamentos: 1) grupo submetido a estiramento, como estímulo mecânico, em aparelho Flexercell FX-3000 em 60 ciclos/min(1Hz); 10% de alongamento, por períodos variáveis, de uma (1) até 8 horas. Ainda, 2) FCRNs controle não submetidos ao estiramento pulsátil também serão cultivados em placas Bioflex. . Além disso, ambos os grupos foram tratados ou não com siRNA^{FAK}. Logo foram os grupos experimentais:

- 1) Cultura fibroblastos cardíacos de ratos *Wistar* neonatos (FCRNs) não submetida a estiramento mecânico e não tratada.
- 2) Cultura fibroblastos cardíacos de ratos *Wistar* neonatos (FCRNs) não submetida a estiramento mecânico e tratada com siRNA^{FAK}.
- 3) Cultura fibroblastos cardíacos de ratos *Wistar* neonatos (FCRNs) submetida a estiramento mecânico e não tratada.
- 4) Cultura fibroblastos cardíacos de ratos *Wistar* neonatos (FCRNs) submetida a estiramento mecânico e tratada com si RNA^{FAK}.

3.2.2- Análise de crescimento celular

Os fibroblastos cardíacos foram plaqueados em triplicata em "wells" em placas de cultura de 6- "wells" (Corning Sci. Prod. Inc., Acton MA, USA) na concentração de 2×10^5 células em meio de cultura DMEM e incubados à 37°C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Incubados com DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino. Antes de cada passagem, células em subconfluência em intervalos a cada 2 dias, os grupos referentes a cada dia de cultura foram gentilmente lavados com PBS. Assim para avaliar o crescimento celular dos FCRNs, os quais são proliferativos, as células foram separadas do assoalho da placa de cultura pela adição de 1 ml de uma solução de tripsina à 0,25% em PBS, com técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de Trypan (Sigma Co., EUA), seguindo as recomendações de Frehney (2001), sendo somente consideradas as células viáveis- não coradas por Azul de Trypan. O índice de crescimento celular foi determinado por contagem da população celular em câmara de Neubauer/hemocitômetro. Este ensaio foi realizado em triplicata, através da mediana de três contagens independentes.

3.2.3-Avaliação da proliferação celular dos FCRNs mantidos em cultura

3.2.3.a Ensaio de incorporação de BrdU

Os FCRNs foram plaqueados na concentração de 2×10^5 células em meio de cultura DMEM e incubados à 37°C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Incubados com DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino. Sob as condições de cada experimento, as culturas fibroblastos cardíacos foram lavadas e mantidas, por 24

horas prévias de qualquer ensaio, em DMEM livre de soros e antibióticos. Era acrescido BrdU (10 μ M), após 4 horas de incorporação as células foram lavadas e fixadas em paraformaldeído 4%. A incorporação do BrdU pelas células em proliferação foi avaliada através da técnica de imunofluorescência. O índice de incorporação foi expresso como porcentagem de células marcadas com BrdU foi determinado por contagem de 500 células para cada condição proposta, e os resultados indicam a média da contagem.

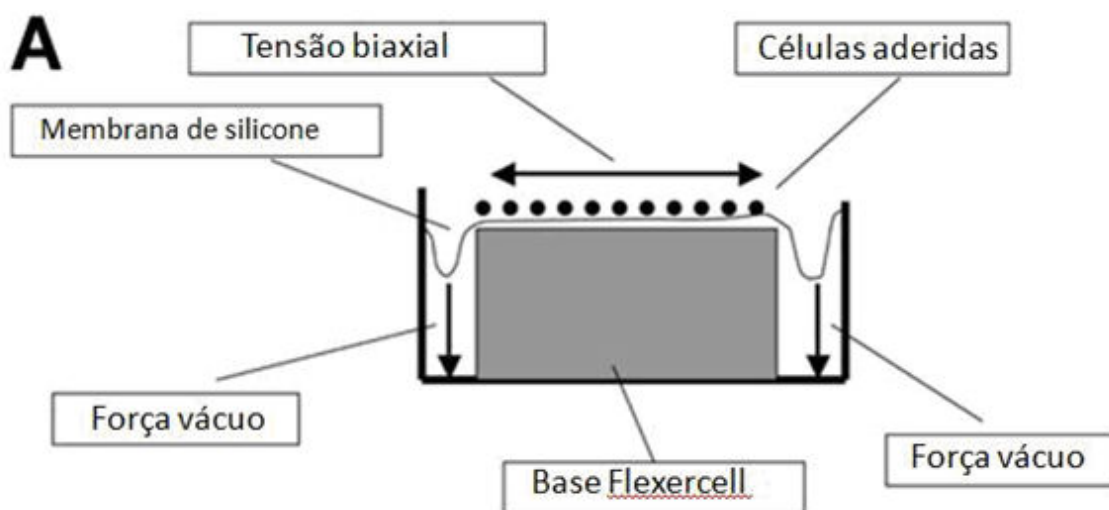
3.2.4- Estiramento Pulsátil Contínuo de Fibroblastos Cardíacos de Ratos Neonatos (FCRNs)

Após permanecerem por 24 horas em meio de manutenção (DMEM acrescido de anitibióticos 1%), os fibroblastos cardíacos de ratos *Wistar* neonatos (FCRNs) mantidos em cultura sobre placas Bioflex foram estirados em aparelho Flexercell FX-4000 em 60 ciclos/min; 10% de alongamento, por um período variável de até 8 horas. Para estes experimentos os FCRNs foram cultivados em placas de seis wells (25-mm de diâmetro) com fundo de silicone elástico (placa BioFlex; Flexercell Corp, McKeesport, PA). As células foram submetidas a uma deformação mecânica com a Unidade de Estiramento Flexercell 4000 (Flexercell Corp). O aparelho consiste de uma unidade de vácuo ligada a uma válvula controlada por computador conforme descrito anteriormente. Quando o vácuo é aplicado às placas, os *wells* das placa de cultura são deformados de acordo com o grau de deformação, que é traduzida para as células em cultura, resultando no alongamento das células. O vigor dos vários níveis de vácuo na membrana durante estiramento foi calculado matematicamente. A força sobre as células acompanha um eixo primário, o que

implica um grau de alongamento não-homogêneo ao longo da membrana. Uma vez que a periferia sofre um elevado grau de estiramento, enquanto que o centro passa por um grau relativamente mais baixo de alongamento. Neste conjunto de experimentos, a membrana flexível dos *wells* foram submetidos a deformação por - 2,0 kPa de vácuo em 60 ciclos / minuto- 1Hz (0.5 segundo de alongamento alternando com 0.5 segundo de relaxamento de ação). Portanto, o comprimento das células aderentes sobre as placas de silicone elástico foi acrescida uma média de 10% de alongamento, paralelo ao do raio da monocamada celular. Os FCRNs controle não submetidos ao estiramento pulsátil (estiramento mecânico) também foram cultivados em placas Bioflex e incubados em meio de manutenção por 24 horas. Em seguida, foram submetidos a diversas técnicas.



Imagem do equipamento Flexercell, que controla o estiramento mecânico.



Esquema de aplicação de força de tensão em cultura de células no equipamento Flexercell.

3.2.5 - Homogeneização e Determinação do conteúdo de proteínas totais

O material extraído conforme descrito nos item 2 foi submetido a homogeneização em tampão de extração (100 mM Trisma base, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina), à 4 °C, utilizando-se para a homogeneização dos FCRNs em cultura, o material foi submetido a várias aspirações com seringa de insulina. Os fragmentos celulares foram então centrifugados (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizada para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método de Lowry, utilizando comprimento de onda de 660 nm, enquanto a outra parte foi submetida à imunoprecipitação e *immunoblotting* com anticorpos específicos.

3.2.6 - Immunoblotting

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. A seguir, quantidades iguais de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos à 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD. A ligação dos anticorpos à membrana foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente (TA) (5% BSA dissolvido em solução basal). A membrana de nitrocelulose foi incubada, *overnight*, com anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpo (3% BSA dissolvido em solução basal), e então, lavada por 15 minutos com solução basal (150 mM NaCl, 10 mM Tris base e 0.02% Tween 20). Após, a membrana foi incubada com 5 μ Ci de [125 I] Proteína A (30 μ Ci/ μ g) em solução de iodo (1% BSA dissolvido em solução basal) por 120 minutos à TA e lavada novamente por 15 minutos, como descrito anteriormente. A proteína A [125 I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Para isso, o cassete contendo a membrana e o filme foram mantidos à temperatura de - 80 °C e, após 12 - 120 horas, o filme foi revelado de maneira convencional. As bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um scanner de mesa ColorPage HR6X (Genius) e o programa de domínio público *ImageJ (Image Processing and Analysis in Java)* / rsb.info.nih.gov/ij/download/.

3.2.7 -Zimografia

A zimografia é uma técnica eletroforética específica para detectar atividade enzimática. Para tanto, o meio condicionado obtido das amostras de culturas nos diferentes tratamentos e controles. Segue-se a quantificação de proteína por método de Lowry. O meio foi colocado então em tampão de amostra (sample buffer), contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60 mM de Tris pH 6.8, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol.

As amostras (20µg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 7% e 0,1% de gelatina. Após a eletroforese a 20 mA, o gel foi lavado em Tampão de 10mM de Tris (pH 8) incluindo 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida foi incubado por 15 minutos em solução reveladora do gel (50mM de Tris pH 8.8, 5 mM de CaCl_2 , 0,02% NaN_3), e Triton 100-X (2-3 ml) na mesma solução, por temperatura ambiente e depois a 37 °C por 20 horas. Depois de corar com Comassie Brilliant Blue R-250 overnight e descorado por metanol 40 %, e ácido acético glacial 10%. As metaloproteinases ativas são identificados como banda claras de lise (negativas) em fundo azul.

Para comprovar se as bandas realmente se referiam a MMP 2 e MMP 9, um dos géis sempre era mantido no tampão de incubação com 15 mM de ETDA. Este quelante inibe especificamente as MMPs provocando bandas menos intensas no gel de gelatina. Um padrão de massa molecular para gel SDS 8-16% (Fermentas Life Sciences) foi utilizado para determinar a massa aproximada das enzimas. As áreas das bandas de degradação enzimática obtidas também foram comparadas por densitometria, utilizando o programa de domínio público Image J (NIH).

3.2.8 – Análise por microscopia de fluorescência

3.2.8.1- Fixação e processamento do material

FCRNs em cultura foram lavados em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e fixados com tampão paraformaldeído 4% mais sacarose 4%, durante 15 minutos, à TA. Em seguida, este material foi submetido à reação de imunofluorescência.

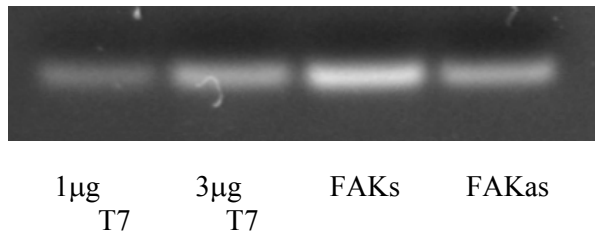
3.2.8.1a. Reação de Imunofluorescência

Após lavagem em PBS 0,1 M, pH 7,4, conforme descrito anteriormente, FCRNs foram incubados com solução bloqueadora (0,8% Triton X-100, 3% leite em pó desnatado, diluído em PBS 0,1 M, pH 7,4), por 1 hora, à TA, a fim de se evitar a ligação de proteínas não-específicas. Em seguida, foram incubados com o anticorpo primário (anti-FAK, anti-desmina na diluição 1:200, anti-MMP2, anti-MMP 9, anti-vimentina, anti-BrdU, anti- α sma na diluição da 1:100 ou anti-KI67 na diluição de 1:50) em solução de marcação (1% BSA diluída em PBS 0,1M, pH 7,4), em câmara úmida e fechada, *overnight*, à 4 °C. Os cortes chamados de controle negativo receberam somente solução de marcação (sem adição de anticorpo). Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS 1x. Anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 568 ou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) foram utilizados. As lâminas foram montadas com o meio de montagem Vectashield com ou sem DAPI. A especificidade do anticorpo secundário foi testada através de lâminas controle positivo e negativo.

Experimentos controles, com omissão do anticorpo primário foram realizados para verificar a especificidade da marcação, bem como marcação de células não transfectadas com anticorpos primários e secundários. As imagens foram obtidas utilizando-se microscópio de fluorescência (Leica DM4000).

3.2.9- Síntese de siRNA^{FAK} *in vitro*

Foi utilizado um molde de DNA correspondente a posição 669 no RNAm do gene da FAK (AF020777). Como controle foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma sequência irrelevante (GFP), sem homologia com genes de camundongo. A síntese *in vitro* do siRNA^{FAK} e siRNA^{GFP} foi realizada sob domínio do promotor da RNA polimerase III T7, utilizando o kit Ampliscribe T7 high yield transcription (Epicentre), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM tris-acetato, 2mM EDTA, pH 8,5), 1µL dos RNAs e 1 e 3µg de T7, utilizados como padrão para a quantificação. As bandas resultantes foram quantificadas por densitometria óptica através do software *Scion*, e a concentração dos RNAs foi determinada com base no padrão de T7, como mostra o gel representativo da Figura 1. *Primers* utilizados: FAK669 fita *sense*: 5' GCG AAA TCC ATA GCA GGC CAC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3' e fita *antisense*: 5' ACG TGG CCT GCT ATG GAT TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'; GFP fita *sense*: 5' GTG TCT TGT AGT TCC CGT CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3' e fita *antisense*: 5' ATG ACG GGA ACT ACA AGA CAC CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'; T7: 5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'.



Gel representativo da quantificação das fitas de RNA. T7= promotor da RNA polimerase III (padrão de quantificação), FAKs = fita de RNA FAK senso, FAK as = fita de RNA FAK antisense.

Após quantificação, quantidades iguais, em μg , das fitas sense e antisense foram incubadas por 5 minutos a 95°C e aneladas por resfriamento lento durante a noite. O siRNA resultante foi armazenado a -20°C .

3.2.10- Análise morfológica

Para a análise morfométrica dos FCRNs, nos intervalos e tratamentos adequados estas células foram fixadas em metanol P.A. por 20 minutos a TA.

Coloração Hematoxilina-eosina

- hematoxilina de Harris – 1 minuto
- lavagem em água – 5 minutos
- eosina – 30 segundos

3.2.11 – Análise estatística

Bandas de proteínas obtidas por *immunoblotting* foram analisadas pelo programa *ImageJ* (análise densitométrica). Utilizamos para análise estatística o teste *t* (amostras não-pareadas) ou ANOVA. A análise *post hoc* foi realizada com Bonferroni *multiple-range test*. O valor adotado para *p* foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM.

4. RESULTADOS

4.1- Caracterização da cultura de fibroblastos cardíacos

Os FCRNs de corações de ratos neonatos de 1-2 dias de idade, foram cultivados até a terceira passagem com confluência de ~ 80%. As células foram plaqueadas em membranas flexíveis de silicone. Tipicamente, 98,7% destas células apresentavam-se positivas para vimentina e negativas para desmina por técnica de imunofluorescência, indicando a predominância e pureza desta cultura celular primária de fibroblastos cardíacos. (Figura 4A, B).

Os fibroblastos cardíacos apresentam velocidade de crescimento em cultura média a alta, seguindo as recomendações de Freshney (2001). O índice de crescimento celular foi determinado por contagem da população celular em câmara de Neubauer/hemocitômetro. Este ensaio foi realizado em triplicata, através da mediana de três contagens independentes, a proliferação deste tipo celular está representada no gráfico de curva de crescimento destas células mantidas em cultura e isoladas de ratos neonatos (Figura 4C).

A coloração das células pela técnica convencional de HE e análise em microscopia de luz demonstrou que os FCRNs proliferaram em orientação paralela respeitando o espaço que deve normalmente existir entre as membranas celulares, o que é característico deste tipo celular. E, em condições de confluência celular não foi observado empilhamento, desorganização na distribuição ou morte celular. Morfologicamente em condições de subconfluência celular, os fibroblastos também mantêm estas características. Os FCRNs exibiram formato fusiforme com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. redução no volume celular dos

fibroblastos em condições de confluência celular é resultado da redução no volume citoplasmático, e não no volume nuclear (Figura 4 D).

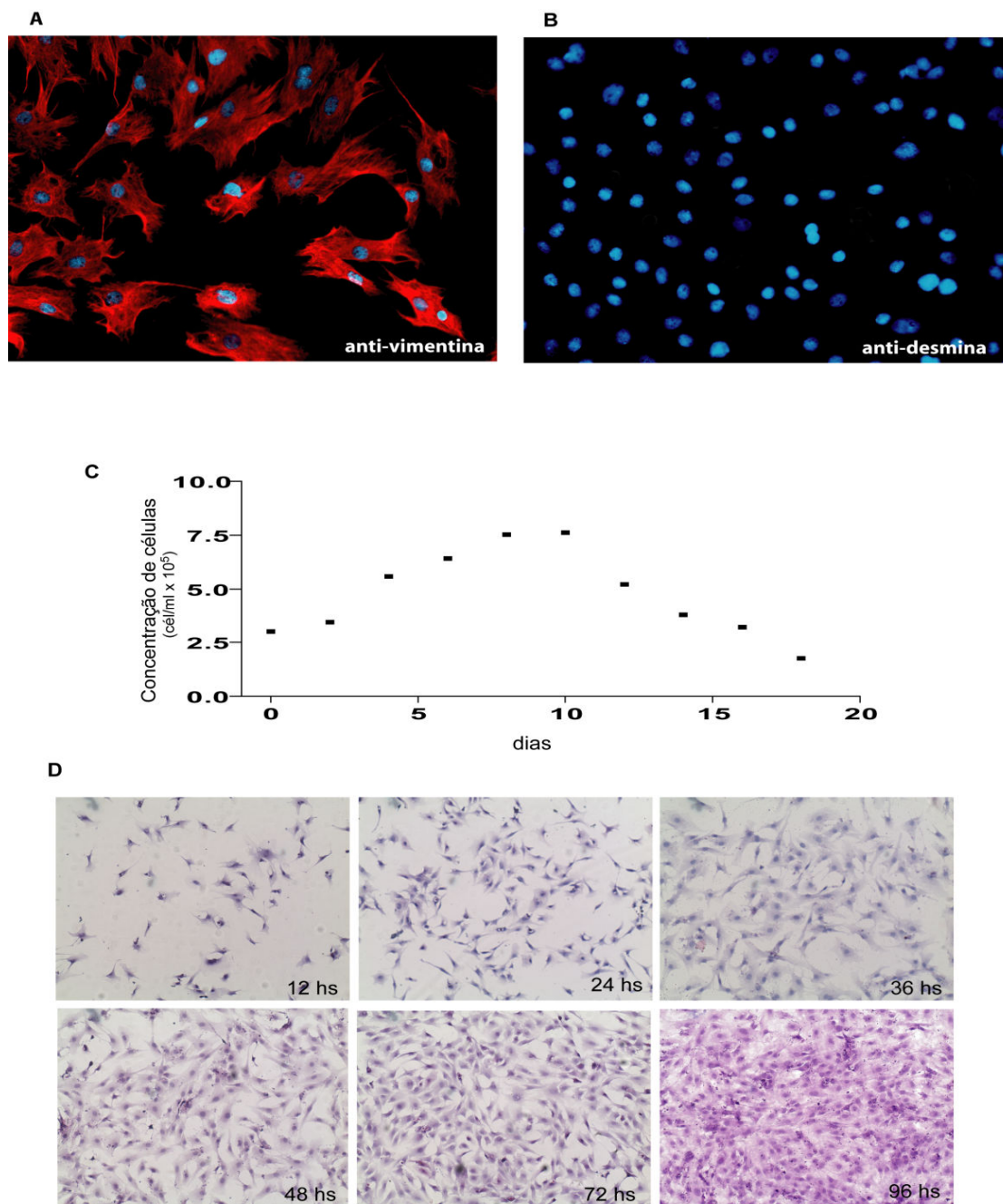


Figura 4. Características morfológicas dos FCRNs mantidos em cultura. Imagem de microscopia de imunofluorescência de fibroblastos cardíacos controle marcados com DAPI e, com anti-vimentina.(A) e anti-desmina (B). Gráfico da curva de crescimento dos fibroblastos cardíacos por diferentes períodos em cultura (C). Coloração por HE dos FCRNs em diferentes períodos em cultura (D), aumento de 200X.

4.2-Efeito do estiramento cíclico na proliferação dos FCRNs

Os fibroblastos cardíacos isolados e cultivados foram submetidos, primeiramente a caracterização deste tipo celular utilizado no presente estudo. Para tanto a proliferação e a diferenciação dos fibroblastos foram avaliadas.

Através da técnica de microscopia de imunofluorescência foram empregados os anticorpos anti-BrdU (1:100) e anti-Ki67 (1:50) para detecção das células em proliferação. Sendo BrdU incorporado na síntese de DNA das células, com o tratamento prévio na concentração final de 10 μ M por 4 horas. Portanto as células positivas para anti-BrdU encontram-se na fase S do ciclo celular. Já o Ki67 por ser um antígeno nuclear não-histona que faz parte da estrutura protéica conhecida como suporte cromossômico, e tem sua expressão determinada pelo gene situado no locus 10q25 e ocorre no final da fase G1, em S, G2 e M (FONATSCH C, DUCHROW M, RIEDER MH. et al, 1991). Portanto, ambas as marcações caracterizam células em proliferação. Foram utilizados 4 experimentos distintos e independentes, contando 500 células para cada uma das condições propostas, e estes resultados indicam a média da contagem. (Figura 5). Este resultado caracterizou que a cultura de FCRNs controle não submetidos ao estiramento mecânico possui 27% $\pm$ 0,86 de células positivas para BrdU e 31% $\pm$ 0,84 para Ki67, ambos marcadores de proliferação celular, ou seja, cerca de 30% dos FCRNs controle estão em proliferação, mais especificamente entre as fases G1 a M do ciclo celular. Entretanto, quando os FCRNs foram submetidos ao protocolo de estimulação mecânica por estiramento

cíclico (10% de alongamento e 1 Hz) por 4 horas contínuas, observou-se que $48\% \pm 0,89$ das células apresentavam-se positivas para BrdU e $57\% \pm 0,92$ para Ki67.

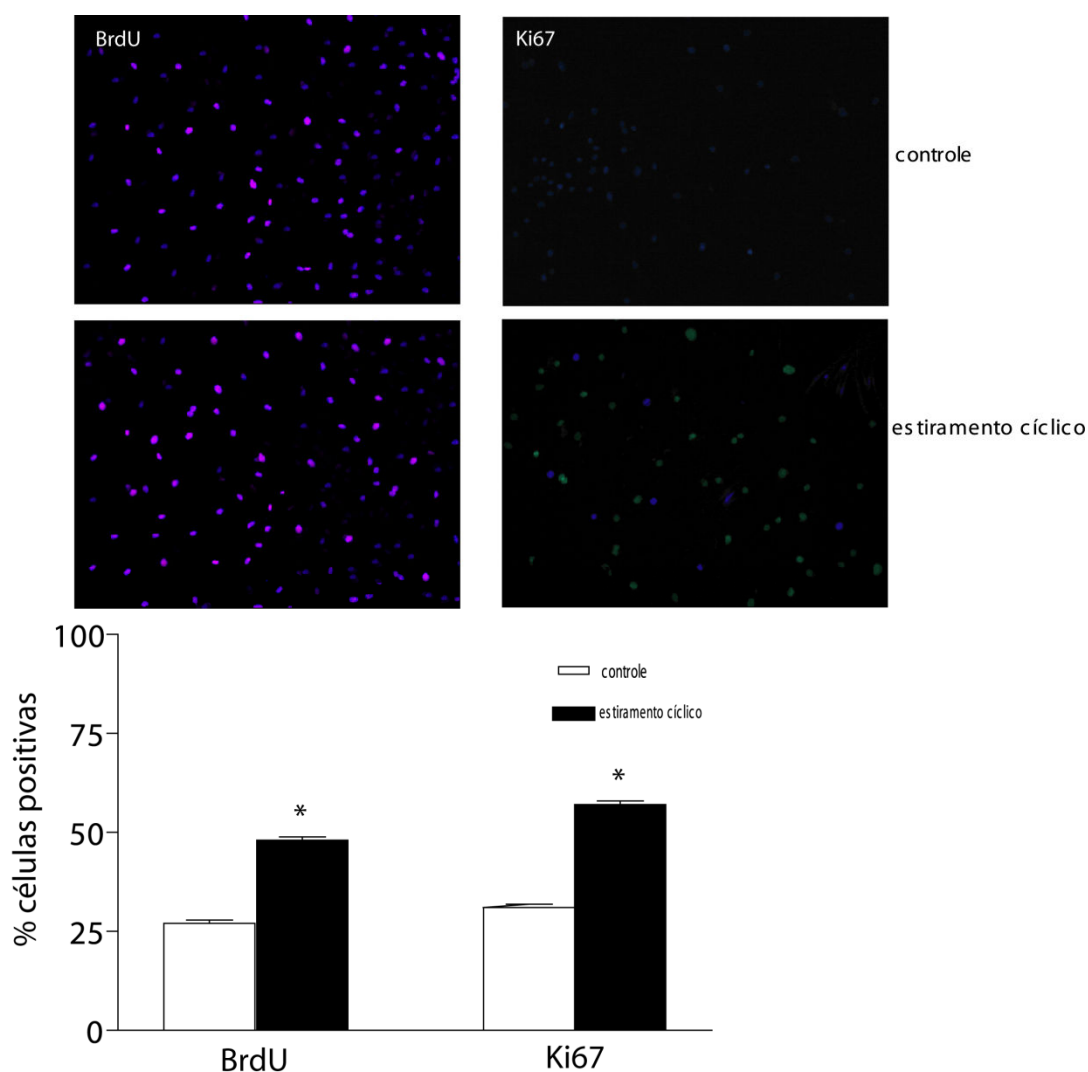


Figura 5- Efeito do estiramento cíclico sobre a proliferação dos FCRNs.

Imagens de microscopia de fluorescência anti-BrdU e anti-Ki67 nas condições: controle e estiradas e gráfico representativo da contagem de células positivas para BrdU e Ki67. Valores percentuais médios (n=4).

* $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle.

4.3- Efeito do estiramento cíclico na diferenciação dos FCRNs

O estiramento mecânico está associado a mudanças morfológicas nas células, como a hipertrofia celular e a organização de fibras de estresse. Os fibroblastos cardíacos respondem à sobrecarga mecânica diferenciando-se em miofibroblastos, os quais expressam α -actina de músculo liso (*smooth muscle actin*- SMA).

Para determinar os níveis de expressão de α SMA na cultura de FCRNs controle ou submetidos ao estiramento cíclico por 4 horas contínuas foi inicialmente utilizado a técnica de *western blotting*. Extratos totais de proteínas das culturas celulares de fibroblastos cardíacos controles e submetidos a estiramento mecânico foram separados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-mouse contra a α SMA). Conforme a Figura 6A, representativa dos *immunoblotting* para α -SMA, nota-se o aumento da expressão de α -SMA, na razão de aproximadamente 2 vezes, quando comparada as células controle não estiradas com as submetidas ao estiramento cíclico. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de GAPDH.

Ainda na Figura 6B, imagem de microscopia imunocitofluorescência representa a contagem de FCRNs que expressam α -SMA no grupo controle e no submetido ao estiramento mecânico. Nos controles, verificou-se que cerca de 14% ($13.7\% \pm 1.589$) são fibroblastos diferenciados em miofibroblastos. Já o grupo submetido a estiramento mecânico mostrou aumento no número destas células na cultura de FCRNs quanto comparado ao grupo controle não estirado, uma vez que $56\% \pm 1.893$ das células foram positivas para α -SMA (Figura 6C).

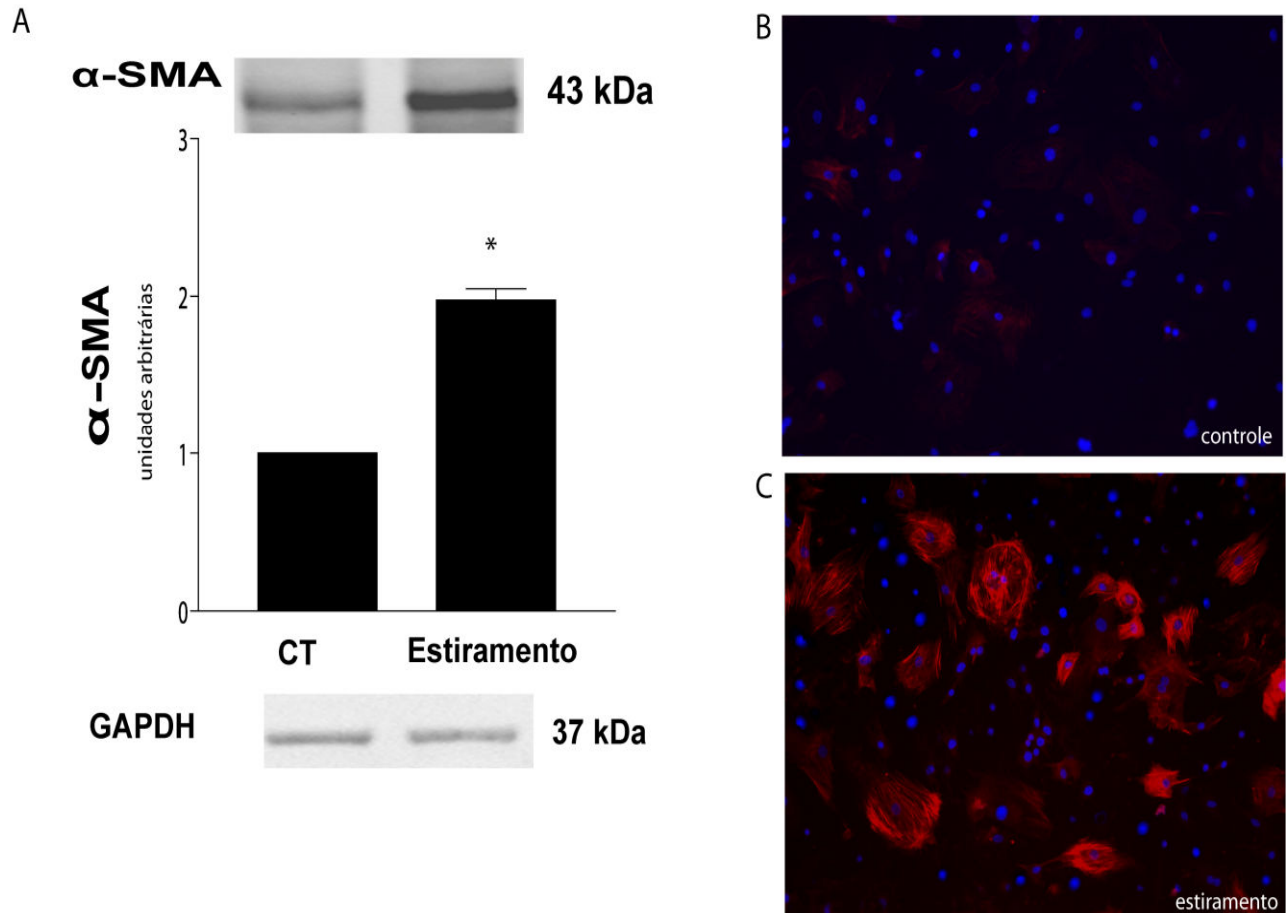


Figura 6- Efeito do estiramento cíclico sobre a diferenciação dos FCRNs.

A-Immunoblotting representativo das quantidades totais de α -SMA nos FCRNs controles e submetidos ao estiramento mecânico. Gráfico indica os valores percentuais médios da quantidade de proteína marcada com α -SMA normalizada pela quantidade de GAPDH. (n= 4)

B-Imagem de microscopia de fluorescência de FCRNs controles marcados com α -SMA e DAPI. Aumento 100X

C-Imagem de microscopia de fluorescência de FCRNs submetidos ao estiramento mecânico marcados com α -SMA e DAPI. Aumento 100X

* $p < 0,05$, em relação ao controle não estirado.

4.4- Expressão e fosforilação da FAK em FCRNs submetidos a estiramento cíclico.

Em estudos anteriores do nosso laboratório constatamos que a FAK participa dos mecanismos envolvidos no crescimento hipertrófico em miócitos cardíacos isolados, em que é rapidamente ativada pelo estiramento e que, uma vez ativada, controla a expressão de fatores de transcrição como o MEF2 e também de genes do programa hipertrófico como o ANF e da isoforma β da miosina cardíaca (FRANCHINI, 2000; TORSONI et al., 2003; NADRUZ, 2005 e TORSONI, 2005). Estudos mais recentes do nosso laboratório indicaram que o silenciamento da FAK no miocárdio de camundongos impediu a deterioração estrutural e funcional de ventrículos esquerdos hipertróficos, sugerindo que a ativação permanente da FAK no miocárdio, pode não apenas contribuir para o crescimento hipertrófico (CLEMENTE et al., 2007) confirmando a importância da FAK neste processo do miocárdio em resposta a estímulos mecânicos. Notavelmente, indicaram o aumento da expressão da FAK no miocárdio hipertrófico foi detectado tanto em miócitos cardíacos quanto no interstício, coincidindo com as áreas de fibrose. Isto sugere que a participação da FAK no miocárdio hipertrófico inclui sua atividade em fibroblastos além daquela já conhecida nos miócitos cardíacos.

No presente estudo, os fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (FCRNs) isolados foram plaqueados em placas de silicone (Bioflex, 25mm) e submetidos a estiramento mecânico, com o aparelho Flexercell FX-3000. Primeiramente, foi necessária a padronização dos protocolos para este objetivo. Logo, experimentos

preliminares com os FCRNs, sobre qual seria o melhor alongamento, duração dos ensaios e substratos a serem usados.

Padronização do estiramento cíclico em FCRNs

Primeiramente as células foram submetidas a estiramentos cíclicos biequi axial com 5, 10 e 15% de alongamento por uma hora. Os extratos dos FCRNs dos diferentes alongamentos foram analisados através de ensaio de *Western blot* com anticorpo dirigido para a porção carboxi-terminal da FAK. O nível de fosforilação foi determinado através de *Western blots* com anticorpo fosfo-específico dirigido para a tirosina 397 da FAK.

A figura 7 mostra os resultados na expressão e fosforilação da FAK em resposta aos diferentes alongamentos propostos. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de GAPDH. Observa-se que, em relação ao controle não estirado, nos blots da Figura 7, o estímulo mecânico aplicado sobre os FCRNs em placa de silicone, não produziu alterações significativas na expressão da FAK. No entanto, o estiramento cíclico em qualquer um dos alongamentos produziu uma tendência ao aumento de fosforilação da FAK em tirosina 397. Entre estes os resultados notou-se que o alongamento de 10% promoveu maior ativação da FAK. Com base neste resultado, os experimentos com os FCRNs estirados foram conduzidos com o alongamento de 10%.

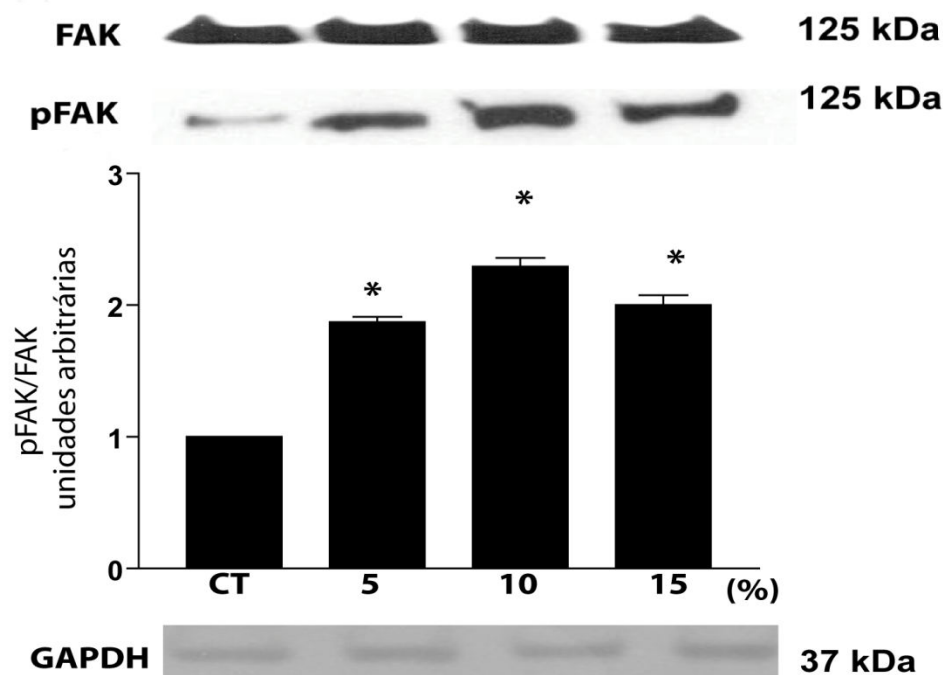


Figura 7 - Ensaio de padronização de alongamento
Exemplos de *Immunoblottings* representativos das quantidades totais de FAK e de fosfo-FAK em FCRNs submetidos ao estiramento cíclico com diferentes alongamentos (5, 10 e, 15 %). Gráfico dos valores percentuais médios das quantidades de proteína marcada com fosfo-específico anti-FAK em tirosina 397 (pFAK) normalizada pela quantidade de FAK em FCRNs, controle e submetido ao estiramento cíclico com diferentes alongamentos (5, 10 e, 15 %). Valores percentuais médios (n=4).
* p < 0,05, em relação ao controle não estirado.

Padronização da duração do estiramento

4.4.1 - Estiramento rápido

No presente estudo foram também realizados experimentos que confirmaram a fosforilação da FAK nos fibroblastos cardíacos mantidos em cultura quando submetidos ao estresse mecânico, configurado pelo estiramento cíclico mimetizando a sobrecarga mecânica pressórica aguda. Desta forma, foram avaliados os níveis de expressão e fosforilação da FAK nos FCRNs controle e também nos FCRNs submetidos ao estiramento cíclico de 10% de alongamento por 15, 30 e 60 minutos.

As células foram coletadas e seus extratos processados para a realização de experimentos com a técnica de *Western blot* com anticorpos anti-FAK e fosfo-específico anti- FAK tirosina 397. Para determinar os níveis de expressão e fosforilação da FAK, os extratos totais obtidos de FCRNs controles e daqueles submetidos ao estiramento agudo (15, 30 e 60 minutos) foram separados através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e, este gel foi transferido para membranas de nitrocelulose as quais foram então incubadas com anticorpo policlonal contra a porção carboxi-terminal da FAK, e com anticorpo fosfo-específico da FAK.

Conforme demonstrado no gráfico da Figura 8, o estímulo mecânico aplicado sobre os FCRNs em placa de silicone, não produziu alterações significativas na expressão da FAK quando as amostras provenientes de células submetidas ao estiramento foram comparadas ao controle. No entanto, o estiramento cíclico promoveu uma elevação da fosforilação da FAK em tirosina 397, estes resultados semelhantes já haviam sido demonstrados em cardiomiócitos de ventrículo de ratos neonatos, em trabalhos anteriores de nosso laboratório (TORSONI et al., 2003; TORSONI et al., 2005; NADRUZ et al. 2005).

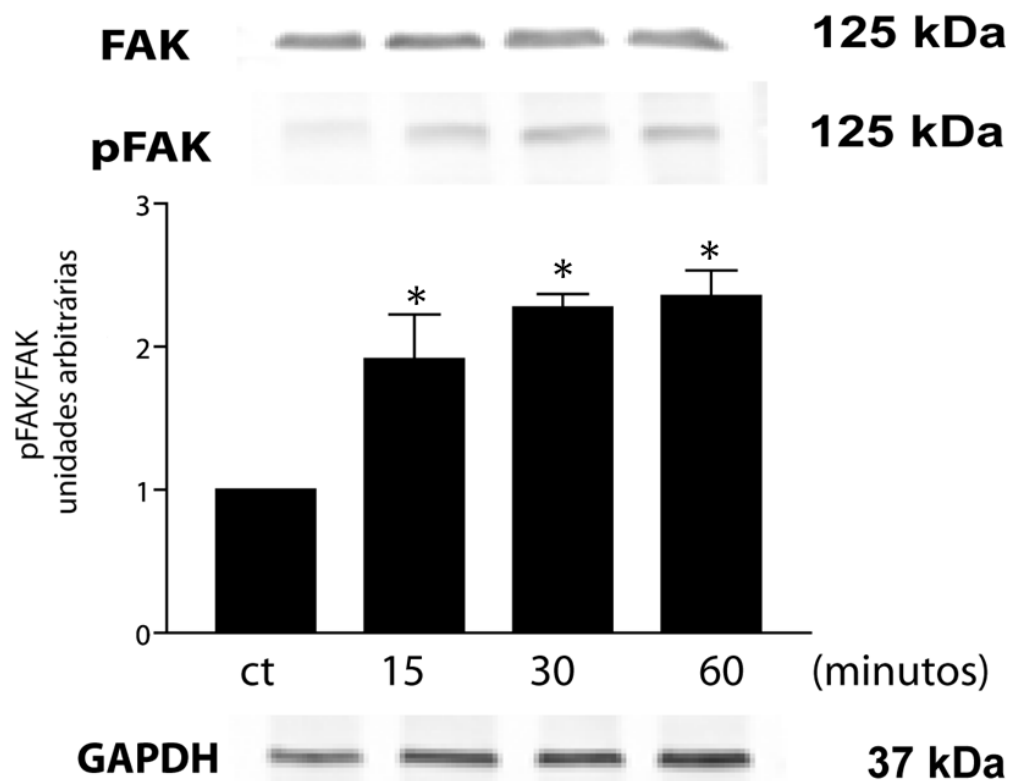


Figura 8 - *Immunoblotting* representativo das quantidades totais de FAK em FCRNs submetido ao estiramento agudo (15, 30, e 60 minutos). Gráfico e Immunoblotting representativo da expressão e fosforilação de FAK em FCRNs, controle e submetido ao estiramento por 15, 30 e 60 minutos. Valores percentuais médios (n=3). * $p < 0,05$, em relação ao controle não estirado.

4.4.2 - Estiramento mecânico prolongado

Foi avaliado também se em intervalos maiores de duração do protocolo de estímulo mecânico a FAK se manteria ativa, sendo observada sua fosforilação em tirosina 397. Para tanto, os FCRNs isolados foram plaqueados em placas de silicone (Bioflex, 25 mm) e com o aparelho Flexercell FX-3000, com alongamento de 10%, submetidos ao estiramento mecânico contínuo de 2, 4, 6 e 8 horas.

Os extratos dos FCRNs nas diferentes durações de estiramento foram analisados através de ensaio de *Western blot* com anticorpo dirigido para a porção carboxi-terminal da FAK. O nível de fosforilação foi determinado através de *Western blots* com anticorpo fosfo-específico dirigido para a tirosina 397 da FAK. A Figura 9 mostra que, em FCRNs submetidos ao estiramento cíclico por intervalos prolongados, há uma elevação expressiva da quantidade de FAK reconhecida pelo anticorpo fosfo-específico anti-FAK tirosina 397 (pFAK). Contudo, o estímulo mecânico prolongado não promoveu alterações significativas na expressão da FAK. Fica claro que o estiramento cíclico como estímulo mecânico é um bom modelo para a avaliação de mecanismo de ativação da FAK em FCRNs.

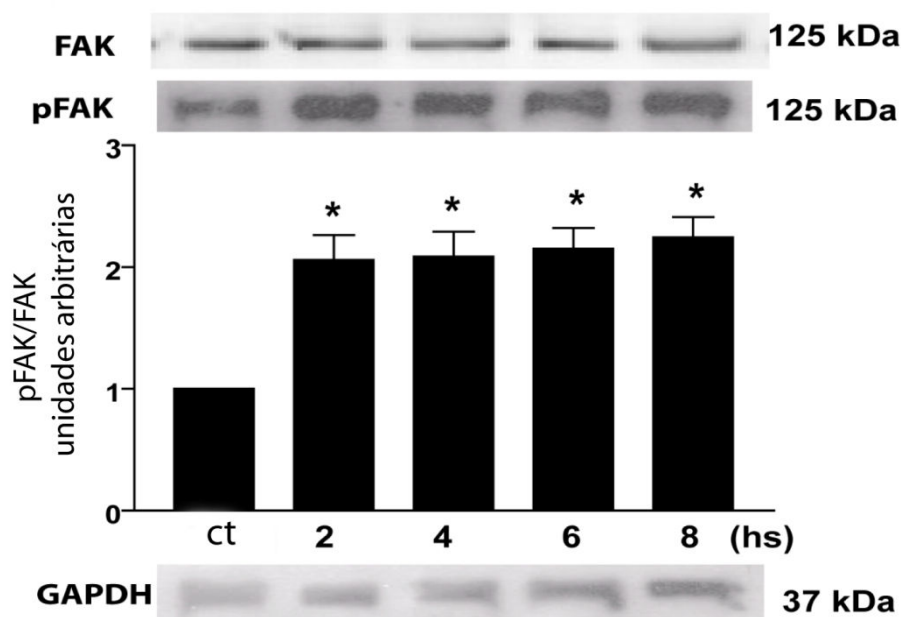


Figura 9 - Curso temporal de estiramento prolongado em FCRNs. Exemplos representativos de *immunoblottings* realizados com homogenatos de FCRNs em cultura e anticorpos anti-FAK, anti-pFAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios das quantidades de proteína marcada com fosfo-específico anti-FAK em tirosina 397 (pFAK) normalizada pela quantidade de FAK em FCRNs, controle e submetido ao estiramento cíclico com diferentes tempos de duração (2, 4, 6, e 8 horas). Valores percentuais médios (n=4).

* $p < 0,05$, em relação ao controle não estirado.

4.5-Distribuição da FAK em FCRNs submetidos a estiramento cíclico.

Técnicas de imunocitoquímica permitem localizar proteínas em sítios sub-celulares. Para a avaliação da distribuição da FAK no FCRNs após a submissão ao estímulo mecânico, uma vez que já se notou sua ativação neste estudo, os FCRNs controle e submetidos a estiramento cíclico (1Hz/ 60 ciclos/minutos, 10% de alongamento e 4 horas contínuas) foram fixados com paraformaldeído 4% e marcados com anti-FAK (1:200 policlonal) e anticorpo secundário marcado com Alexa Green ₄₈₈ (verde) e faloidina 1:50 (vermelho). As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência Leica DM4000, com software Leica Application Suite AF 6000).

A Figura 10, em A, mostra que em fibroblasto controle não estirado a FAK é predominantemente localizada nas áreas perinuclear e nos lamelipódios. Já, em Figura 10 B, pode-se observar que na imagem de microscopia de fluorescência de FCRN estirado que a FAK ocupa principalmente nas extremidades das fibras de estresse nas regiões denominadas sítios de adesão focal super-maduros.

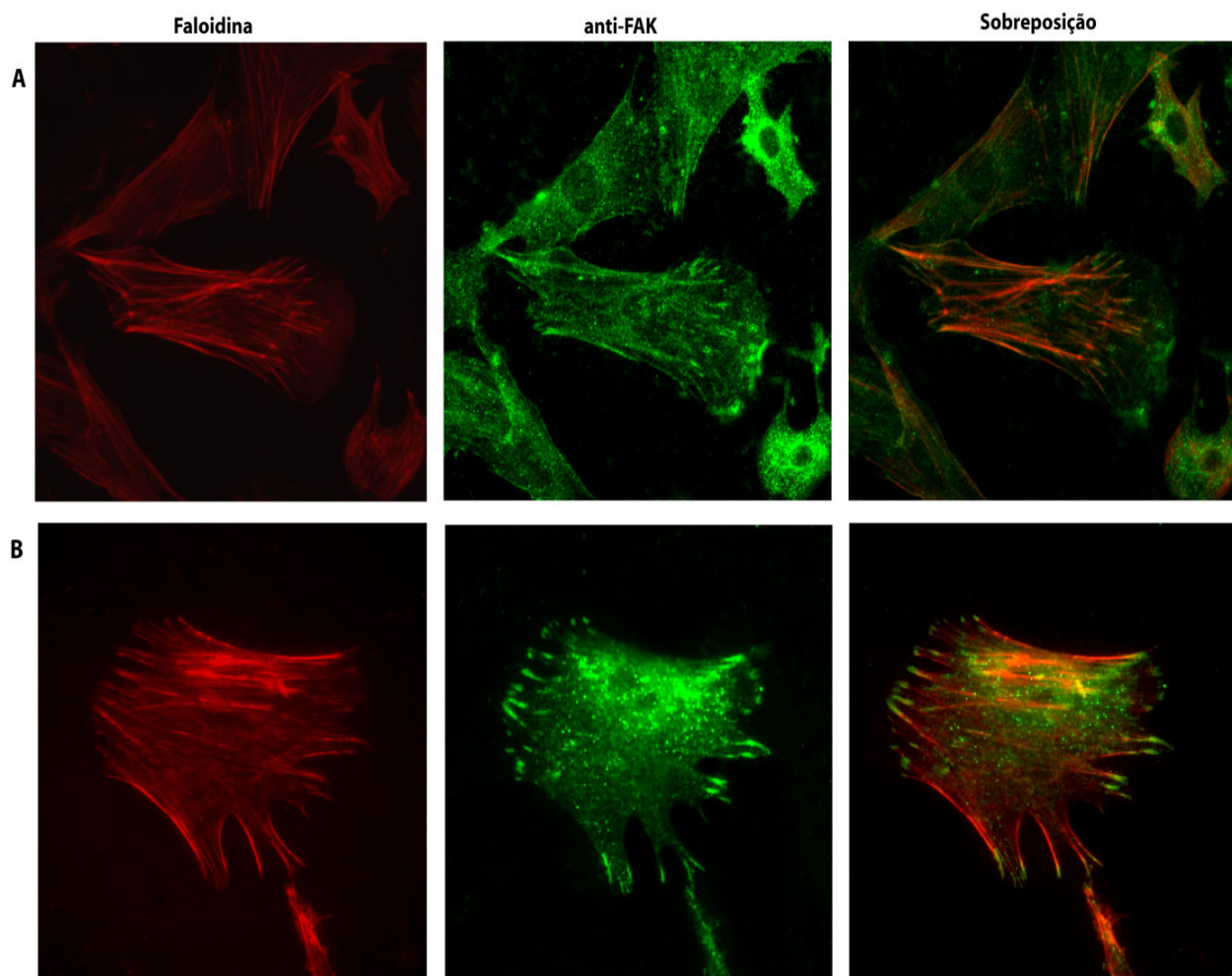


Figura 10- Distribuição da FAK em FCRNs controle e submetido ao estiramento mecânico. Imagem de microscopia de fluorescência, sendo A controle não estirado e B, estirado. FAK marcada verde e faloidina em vermelho marcando actina do citoesqueleto. Aumento 400X.

Para a determinação da distribuição da FAK e da α -SMA nos FCRNs submetidos a estiramento cíclico, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, seguida de técnica de imunocitoquímica. As células foram marcadas com anticorpo anti-FAK (1:200) e anticorpo secundário marcado com Alexa Green ₄₈₈ (verde) e; anti α -SMA (1:100) e anticorpo secundário marcado com Alexa Red ₅₆₈ (vermelho). O resultado deste protocolo permite a definição da localização celular de α -SMA e a

sua relação com a FAK. A Figura 11 demonstra a co-localização da FAK com a α -SMA nos sítios de adesão focal super-maduros.

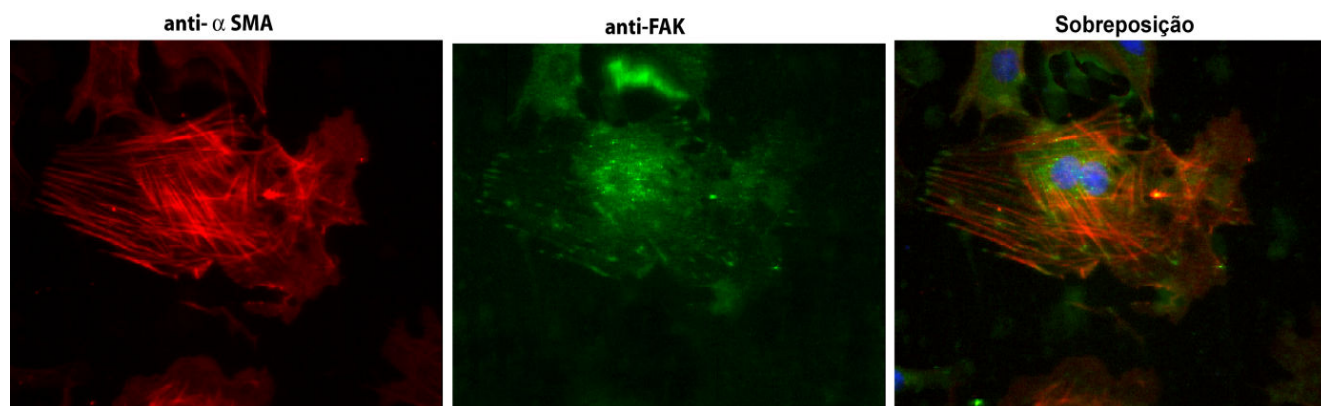


Figura 11-Co-localização da FAK e da α -SMA em FCRN submetido ao estiramento mecânico. Imagem de microscopia de fluorescência, FAK marcada em verde e α -SMA em vermelho, áreas de co-localização amarelo. Aumento 400X.

4.6 -Efeito do estiramento mecânico sobre as Metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9)

4.6.1- Avaliação da expressão de MMP 2 e 9 nos FCRNs em resposta ao estímulo mecânico

A MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) são dois membros da família das MMPs as quais degradam componentes da MEC e possuem importante papel no remodelamento ventricular esquerdo em resposta a sobrecarga hemodinâmica (CREEMERS et al., 2003). Os fibroblastos são as principais células secretoras de MMPs no coração envolvidas com o processo de fibrose. No presente

estudo, foi examinado se o estiramento cíclico poderia alterar a expressão e atividade das MMP2 e MMP9 em fibroblastos cardíacos mantidos em cultura.

A Figura 12 mostra que o estiramento cíclico eleva a expressão e a atividade de MMP 2 e MMP 9 em FCRNs mantidos em cultura. As amostras utilizadas na técnica de *western blot* eram provenientes do meio de cultura (DMEM, livre de soros e antibiótico), uma vez que as estas gelatinases, principalmente são secretadas pelos fibroblastos.

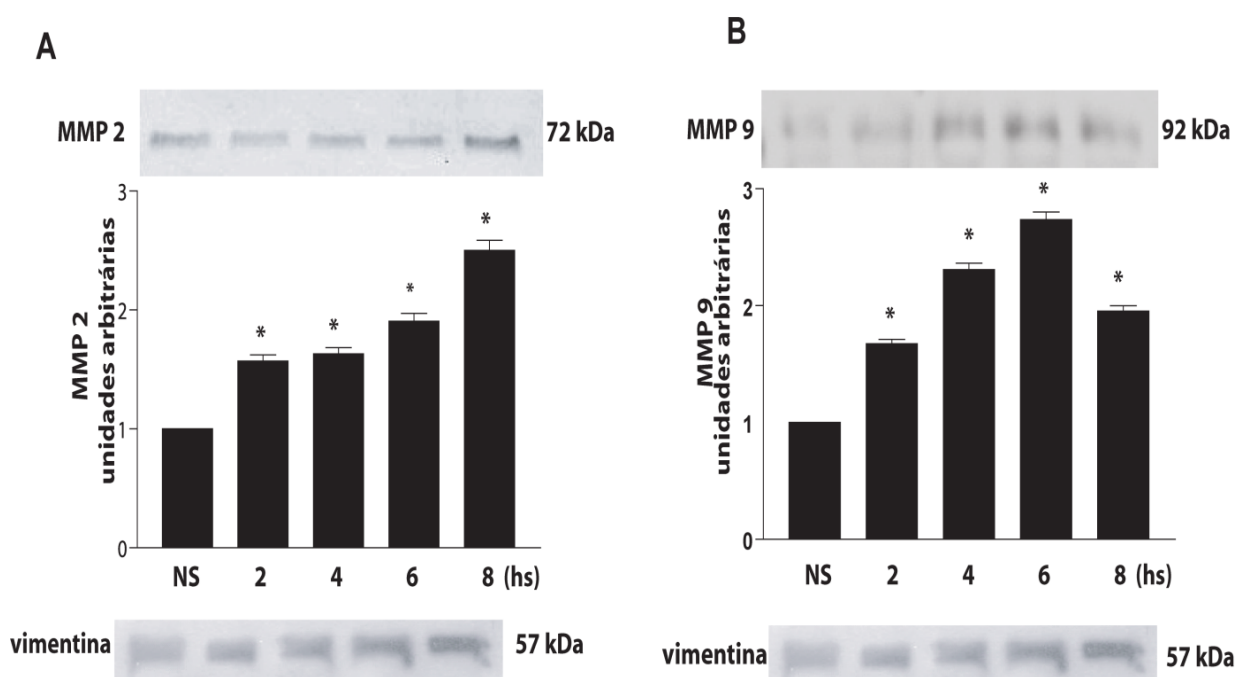


Figura 12- Avaliação da expressão de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetidos ou não ao estiramento cíclico por diferentes intervalos.

A-Imunoblotting representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 2 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4)

B-Imunoblotting representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 9 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4)

* $p < 0,05$, em relação ao controle não estirado.

4.6.2- Avaliação da atividade de MMP 2 e 9 nos FCRNs em resposta ao estímulo mecânico

Gross e Nagai (1965) utilizando o método de eletroforese em gel poliacrilamida relataram uma reação de collagenase ocorrida em 70 kDa. Este estudo orientou o desenvolvimento da técnica de zimografia, a qual emprega a combinação de um substrato de colágeno e eletroforese, para examinar a presença de enzimas. Com efeito, enzimas collagenolíticas no miocárdio foram descritas, primeiramente, usando esta técnica zimográfica (ARMSTRONG PW et al., 1994; BRILLA CG et al, 1995; CLEUTJENS J P, et al, 1995; GILBERT SJ et al, 1997; GROSS e NAGAI, 1965; TYAGI SC, KUMAR S, GLOVER G, 1995; TYAGI SC, MATSUBARA L, WEBER KT., 1993; TYAGI SC, RATAJSKA A, WEBER KT, 1993). Enquanto a primeira enzima proteolítica foi denominada collagenase, tornou-se claro a partir de estudos posteriores que esta era uma família de enzimas heterogêneas, que atualmente são denominadas Metaloproteinases - MMPs.

As MMPs estão relacionadas ao processo fibrótico e possuem sua expressão e atividade aumentadas no coração em condição de estresse mecânico, já que o remodelamento é um processo dinâmico. Para avaliar a atividade das gelatinases MMPs 2 e 9 após o estiramento cíclico dos FCRNs, nos mesmos intervalos de duração em que se apresentou a elevação da fosforilação da FAK, as amostras de meio de cultura respectivos foram analisados por técnica de zimografia.

De acordo com a Figura 13, os FCRNs controle não estirados não demonstram mudanças significativas na atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9. Entretanto o estiramento cíclico induziu um aumento de aproximadamente de duas

(2) ou mais vezes na atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 ativas/intermediárias. Nota-se que as bandas com atividade gelatinolítica apresentam-se posições diferentes nos zimogramas, isto se deve a clivagem a que foram submetidas na ocasião da ativação dessas enzimas, resultando na variação no tamanho molecular.

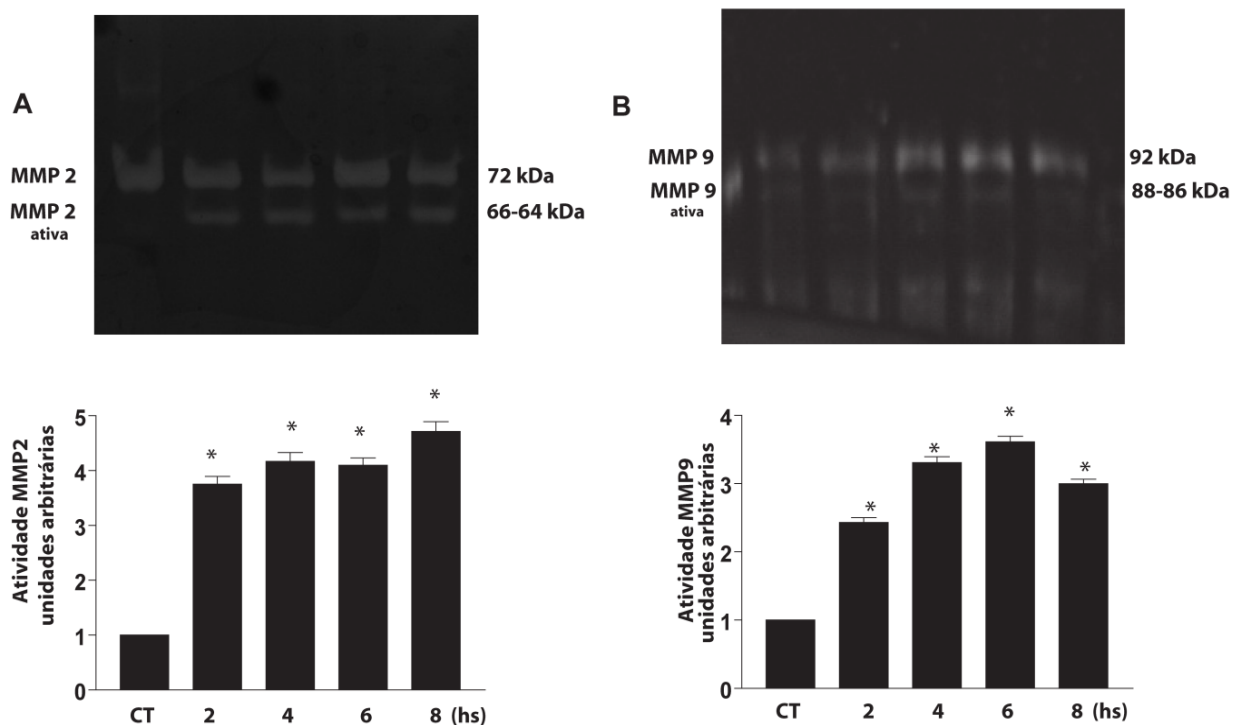


Figura 13- Avaliação da atividade de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetidos ou não ao estiramento cíclico por diferentes intervalos.

A-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 2. (N=4).

B-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 9.(N=4)

* $p < 0,05$, em relação ao controle não estirado.

4.6.3 Avaliação da localização da MMPs 2 e 9 e da α -SMA em FCRNs controle e submetidos a estímulo mecânico

Para a determinação da distribuição das MMPs 2 e 9 e da α -SMA nos FCRNs submetidos a estiramento cíclico foram fixados em paraformaldeído 4% e marcados com anti-MMP 2 (1:100) e MMP 9 (1:100) anticorpo secundário marcado com Alexa Green ₄₈₈ (verde) e; anti α -SMA (1:100) e anticorpo secundário marcado com Alexa Red ₅₆₈ (vermelho). O resultado deste protocolo permite a definição da localização sub-celular de MMP 2 e MMP 9 e a sua relação com a α -SMA, o núcleo marcado com DAPI. Na Figura 14, estão representadas dupla-marcação, ou seja, as localizações simultâneas das MMP 2 e MMP 9 com a α -SMA nos FCRNs controle (A e C) e submetidos a estiramento (1Hz/ 60ciclos/min, 10% de alongamento, por 4 horas contínuas) em B e D.

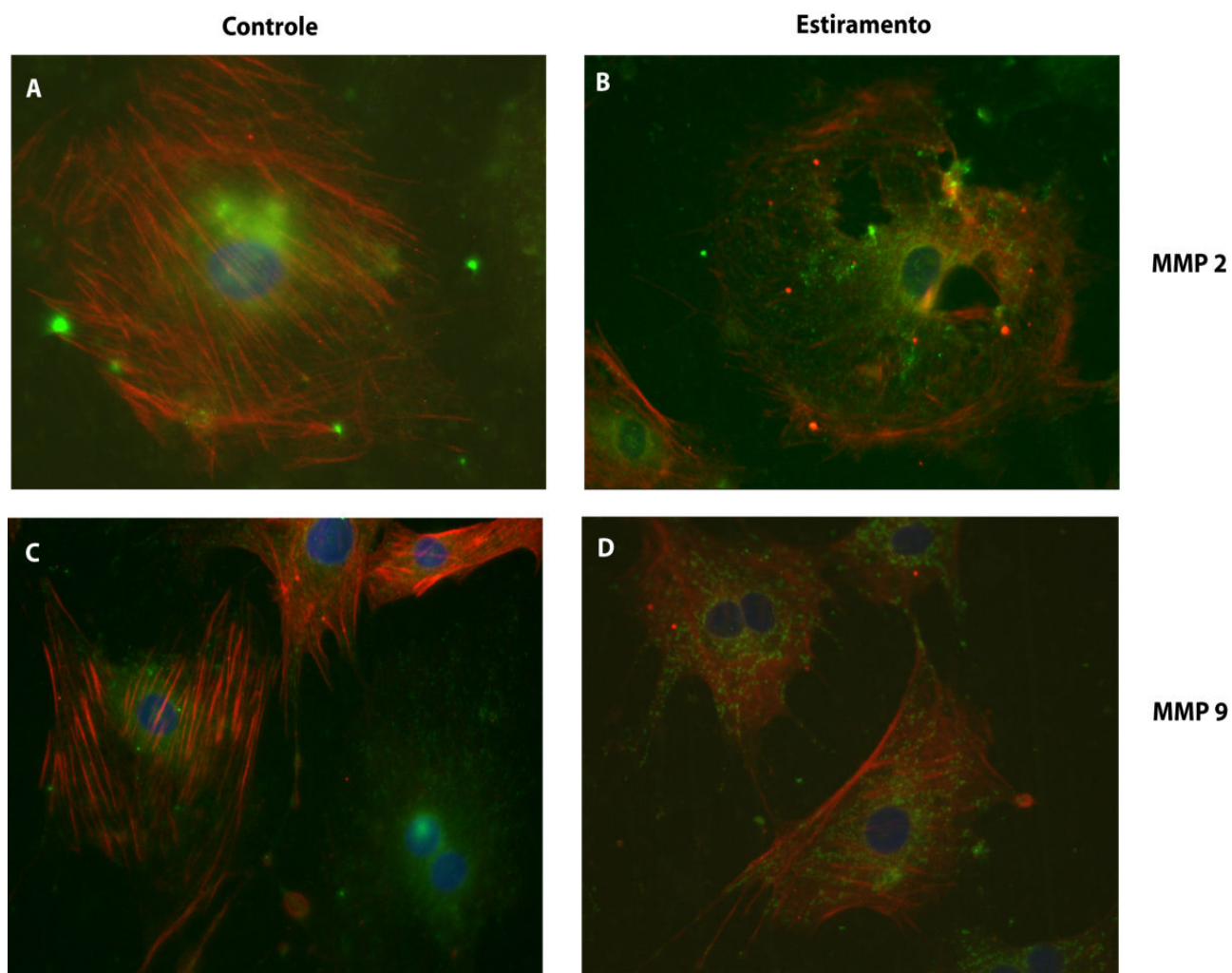


Figura 14-Distribuição das MMP2 e MMP9 e da α -SMA em FCRNs submetido ou não ao estiramento mecânico. Imagens de microscopia de fluorescência, em que A e B, FCRNs controle marcado anti-MMP2 e anti-MMP9 respectivamente. C e D, FCRNs, submetidos a estiramento cíclico marcados com anti-MMP2 e anti-MMP9, respectivamente., MMPs 2 e 9 marcadas em verde e α -SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 400X.

4.7- Silenciamento gênico da FAK nos FCRNs mantidos em cultura por iRNA

A interferência por RNA (RNAi) é uma técnica de silenciamento gênico, em que há inibição da expressão gênica na fase de tradução ou por dificultar a transcrição de genes específicos. Primeiramente descrita por TUSCHL (2001), esta técnica tem sido amplamente aplicada para explorar a função de gene de mamíferos,

bem como uma ferramenta de terapia genética (BUTTICAZ C et al, 2003; DING H et al, 2003; GILADI H ET AL, 2003; PAN D et al., 2005; WU Y et al, 2005).

A interferência por RNA (iRNA) implica na introdução de uma fita dupla de RNA na célula e tem sido usada como ferramenta eficiente para a determinação da função gênica. Esta técnica induz a diminuição da expressão pós-transcricional de maneira específica e, em alguns casos, a níveis não detectáveis (THUSCHL e BORKHARDT, 2002; DYKXHOORN et al., 2003; PEDERSON, 2003). Foram realizados experimentos de padronização do modelo de interferência por RNA para o silenciamento gênico da FAK em FCRNs. Para isso, experimentos preliminares com os fibroblastos em cultura foram realizados para a avaliação da eficiência do silenciamento em resposta a diferentes doses de siRNA.

4.7.1. Ensaio dose-resposta

Ensaio do tipo dose-resposta foram realizados para estimar a dose adequada de siRNA_{FAK} capaz de silenciar eficientemente a FAK nos FCRNs. Para tanto, os fibroblastos cardíacos em cultura foram tratados/transfectados com 10 e/ou 40 nM siRNA_{FAK} complexado com 30 µl de lipofectamina (Lipofectamina 2000, Life Technologies). Este método de transfecção é mediado por lipossomo. Os procedimentos foram realizados de acordo com as especificações do fabricante. As células foram incubadas com o meio de transfecção por 24 horas a 37°C, atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Então os FCRNs foram extraídos e as amostras analisadas por *Western Blot*, utilizando anticorpo específico anti-FAK. A Figura 15 mostra os resultados de dose resposta de siRNA_{FAK} no silenciamento da gênica da

FAK. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de GAPDH. Observa-se que em relação aos FCRNs controles, o grupo tratado com concentração de 10nM de siRNA_{FAK} apresentou silenciamento da FAK de 45% , enquanto o grupo transfectado com 40nM de siRNA_{FAK} mostrou 67% de silenciamento da FAK. Com base nestes dados, os experimentos com os FCRNs foram conduzidos com a dose de 40nM de siRNA_{FAK} e 30 µl de lipofectamina em 3 ml de meio de transfecção.

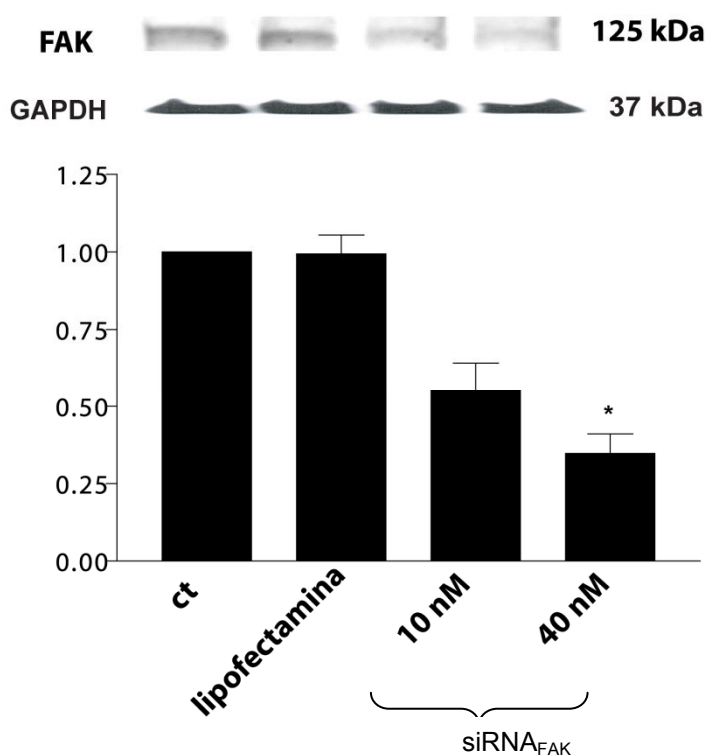


Figura 15- Avaliação da expressão de FAK em ensaio de dose resposta para siRNA_{FAK} nos FCRNs mantidos em cultura. Exemplos representativos de *immunoblottings* realizados com homogenatos de FCRNs em cultura e anticorpos anti-FAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios das quantidades de proteína marcada com anti-FAK normalizada pela quantidade de GAPDH em FCRNs, controle, lipofectamina e, transfectado com 10 e 40 nM de siRNA_{FAK} . Valores percentuais médios (n=4). * p<0,05, em relação ao controle e a lipofectamina.

4.7.2- Especificidade da transfecção com siRNA_{FAK}

Para analisar a especificidade do siRNA_{FAK}, também foi avaliada uma sequência irrelevante de GFP. Neste caso foi utilizado um siRNA com sequência complementar a nenhuma proteína expressa nas células de mamíferos. A mesma dose de 40 nM para ambos siRNAs e 30 µl de lipofectamina, seguindo as instruções do fabricante. Esta dose foi escolhida por apresentar maior efeito de silenciamento, no teste de dose-resposta, do item anterior. Os FCRNs foram incubados com o meio de transfecção por 24 horas a 37°C, atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Então os FCRNs foram extraídos e as amostras analisadas por *Western Blot*, utilizando anticorpo específico anti-FAK. A Figura 16 indica os resultados do silenciamento gênico da FAK pelo siRNA_{FAK}, o que não se repete no grupo transfectado com o siRNA_{GFP}, demonstrando que a sequência desenhada para o siRNA_{FAK} é específica e funcional. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de GAPDH. A informação obtida neste ensaio permite mostrar que o silenciamento gênico da FAK por siRNA_{FAK} ocorre de maneira sequência-específica e não apenas por incorporação/absorção celular de um siRNA.

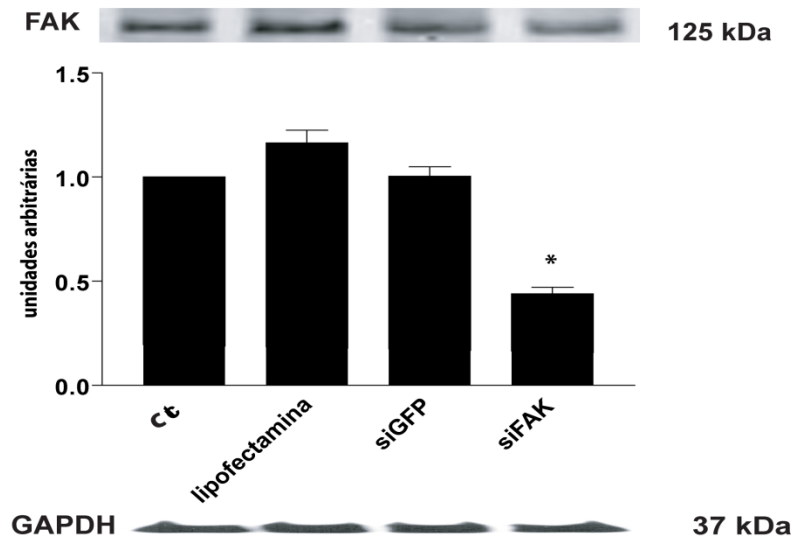


Figura 16- Avaliação da expressão de FAK em ensaio de especificidade do siRNA_{FAK} nos FCRNs mantidos em cultura. Exemplos representativos de *immunoblottings* realizados com homogenatos de FCRNs em cultura e anticorpos anti-FAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios das quantidades de proteína marcada com anti-FAK normalizada pela quantidade de GAPDH em FCRNs, controle, lipofectamina e, transfectado com 40 nM de siRNA_{GFP} e siRNA_{FAK}. Valores percentuais médios (n=4).
* $p < 0,05$, em relação ao siRNA_{GFP}.

4.8- Efeito do silenciamento gênico da FAK em FCRNs submetidos ao estímulo mecânico

A FAK é importante para o crescimento hipertrófico do miocárdio em resposta a estímulos mecânicos. O estiramento cíclico aumenta a fosforilação da FAK nos resíduos tirosina 576 e 577 em adição a fosforilação de tirosina 397. Em outra via, a técnica de iRNA para o silenciamento gênico da FAK mostrou-se específica, entretanto não se conhece a sua eficiência. Para avaliar isto, os FCRNS foram

tratados com siRNA_{FAK} e siRNA_{GFP} (40nM) por 24 horas e após este período foram submetidos ou não ao estiramento cíclico. Subsequente foi analisado o quanto robusto é o silenciamento da FAK e se ele realmente permanece mesmo após estimulação por reconhecido ativador como a estímulo mecânico desta via de sinalização.

Na Figura 17, são apresentados os resultados de *western blot*. As amostras foram normalizadas pelos valores desintométricos de GAPDH. O estiramento mecânico induziu o aumento da expressão em 42%, da pFAK no grupo siRNA_{GFP} quando submetido ao estiramento cíclico bi-equiaxial em relação ao grupo controle não estirado. A transfecção com o siRNA_{FAK} por 24 horas em cultura de FCRNs e adicionalmente, submetidos ao estiramento mecânico, foi capaz de reduzir a expressão de pFAK nestas células em cerca de 32%. Os níveis de expressão da pFAK foram similares aos demais grupos.

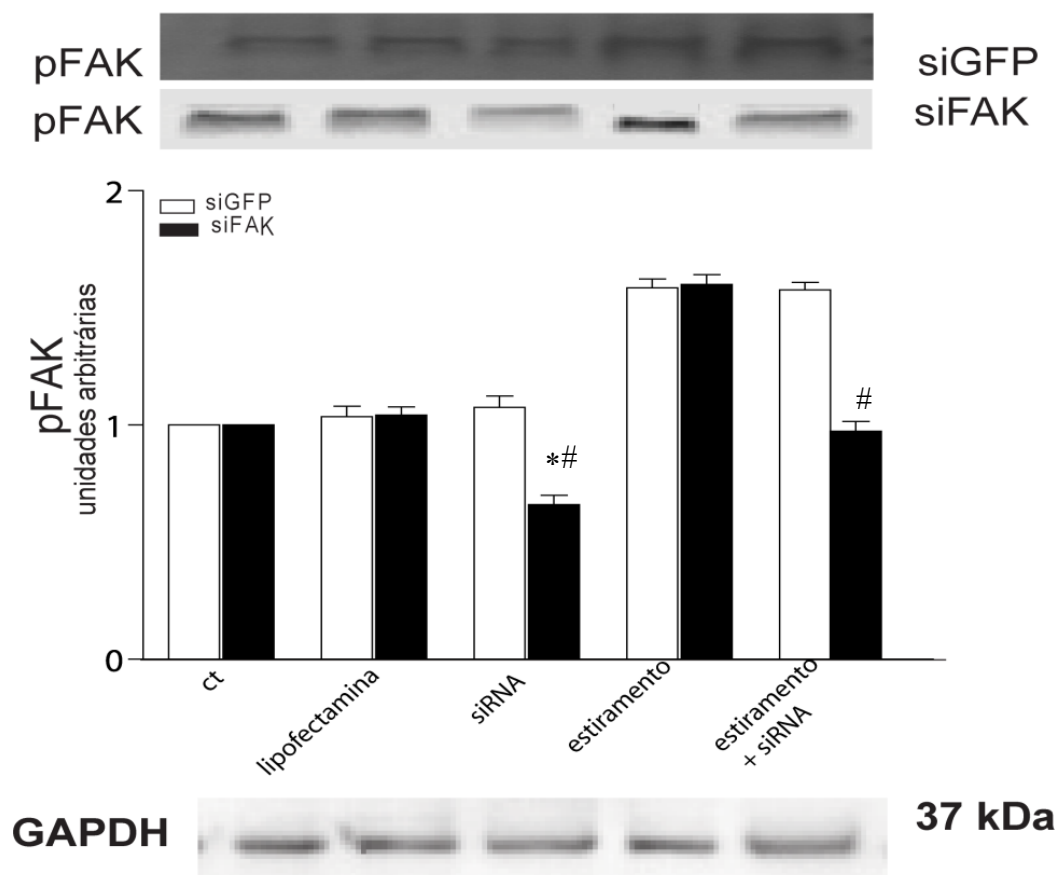


Figura 17- Avaliação do silenciamento do gene da FAK nos FCRNs tratados com siRNA_{FAK} anterior ao estiramento cíclico. Exemplos representativos de *immunoblottings* com homogenatos de FCRNs anti-pFAK e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios de proteínas marcada com anti-pFAK normalizada pela quantidade de GAPDH. (n=4).

* p<0,05, em relação ao controle e a lipofectamina, e # p<0,05, em relação ao estiramento de 4 hs não transfectado com siRNA_{FAK}.

4.9- Avaliação da proliferação de FCRNs silenciados para FAK por iRNA

Através da técnica de microscopia de imunofluorescência foram empregados os anticorpo anti-Ki67 (1:50) para detecção das células em proliferação. A marcação positiva caracteriza células em proliferação. Foram utilizados 4 experimentos distintos e independentes, contando 500 células para cada uma das condições

propostas, e estes resultados indicam a média da contagem. (Figura 18). Este resultado caracterizou que a cultura de FCRNs controle não submetidos ao estiramento mecânico possui $31\% \pm 0,84$ células positivas para Ki67, FCRNs controle estão em proliferação, mais especificamente entre as fases G1 a M do ciclo celular. Entretanto, quando os FCRNs foram submetidos ao protocolo de estimulação mecânica por estiramento cíclico (10% de alongamento e 1 Hz) por 4 horas contínuas, observou-se que $57\% \pm 0,92$ células apresentavam-se positivas para Ki67. O tratamento com siRNA_{FAK} reduziu o número de FCRNs proliferativos para aproximadamente $9\% \pm 1,18$. E quando submetido a estiramento cíclico de 4 hs observou que $34\% \pm 1,09$ eram positivas para Ki67. A Figura 18 demonstra graficamente em barras o que nota-se significativamente estatisticamente diferenças entre as deferidas condições.

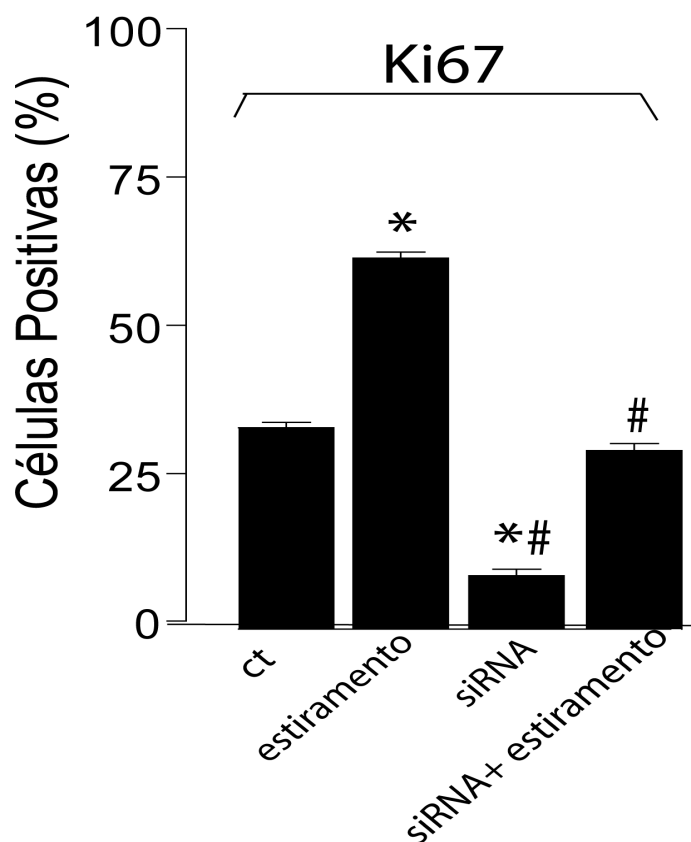


Figura 18- Efeito do silenciamento gênico da FAK sobre a proliferação dos FCRNs. Gráfico representativo da contagem de células positivas para Ki67. Valores percentuais médios (n=4). * $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle, e #, em relação a condição estiramento.

4.10- Avaliação da diferenciação de FCRNs silenciados para FAK por iRNA

A diferenciação de miofibroblasto por TGF- β 1 é dependente da sinalização mediada através da FAK (THANNICKAL VJ et al, 2003). A fibrose miocárdica é um dos mais importantes mecanismos envolvidos na HVE, resultante da mudança fenotípica de fibroblasto cardíaco para miofibroblasto. A proliferação e a estimulação dos miofibroblastos aumentam a produção de proteínas da matriz extracelular, como

fibronectina, laminina e colágeno tipo I e III, resultando em fibrose progressiva. A fibrose cardíaca é um dos principais determinantes do remodelamento miocárdico responsável pela progressão para a disfunção sistólica do VE por diminuição da contratilidade do miócito e piora da oxigenação e do metabolismo.

Para determinar se a FAK desempenha papel na regulação da diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, o estiramento cíclico e o silenciamento gênico da FAK por siRNA foram avaliados, por *western blot* e imunofluorescência. Para investigar esta possibilidade, as células foram tratadas com um siRNA direcionado para FAK ou um siRNA orientado para uma sequência irrelevante- controle .

Como ilustrado na Figura 19, a expressão de α -SMA aumenta em FCRNS submetidos a estiramento cíclico cerca de 100%. Todavia, quando transfectados com o siRNA_{FAK} verificou-se a redução de aproximadamente 60% na expressão de α -SMA. Ainda, nota-se os FCRNs que foram previamente tratados com o siRNA_{FAK} (40nM) e submetidos ao estiramento cíclico demonstrar-se uma redução da expressão de α -SMA por volta de 20% em relação ao controle. GAPDH foi utilizado como controle interno.

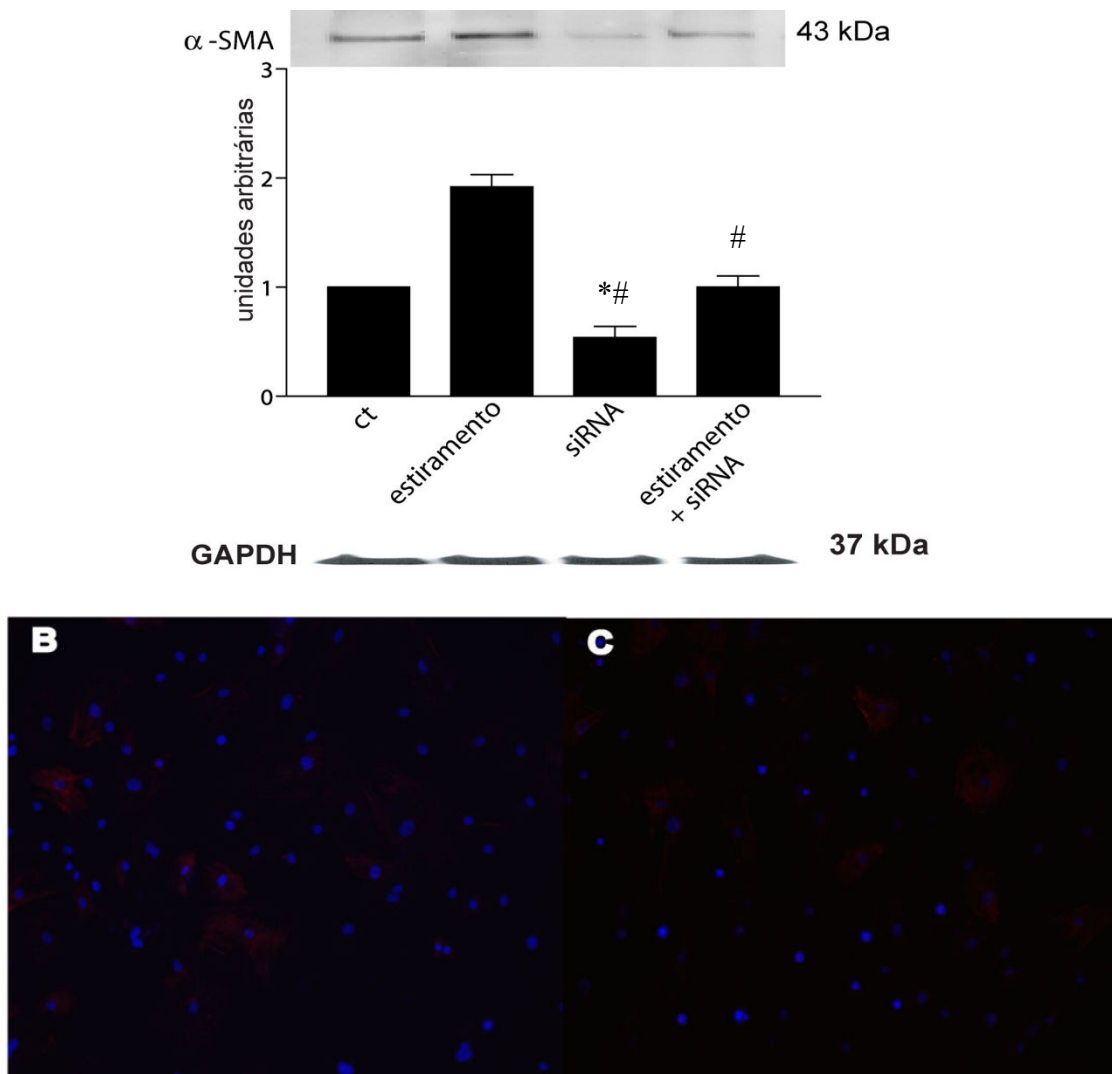


Figura 19- Avaliação da diferenciação de FCRNs silenciados para FAK por siRNA.

A-Exemplos representativos de *immunoblottings* com homogenatos de FCRNs anti-α-SMA e anti-GAPDH. Gráfico dos valores percentuais médios de proteínas marcada com anti-α-SMA normalizada pela quantidade de GAPDH .(n=4). * p<0,05, em relação ao controle, e # p<0,05, em relação ao estiramento de 4 hs não transfectado com siRNA_{FAK}.

B- Distribuição de α-SMA em FCRNs transfectados com siRNA_{FAK}.Imagem de microscopia de fluorescência, 100x aumento. Imagem de microscopia de fluorescência, α-SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 100X

C- Distribuição de α-SMA em FCRNs transfectados com siRNA_{FAK} e submetidos ao estiramento mecânico. Imagem de microscopia de fluorescência, α-SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 100X.

4.11- Avaliação do efeito do silenciamento gênico da FAK por iRNA na expressão, atividade e distribuição das MMPs 2 e 9 em FCRNs.

Os fibroblastos são as principais células secretoras de MMPs e envolvidas na fibrose. CLEMENTE e colaboradores (2007) demonstraram que o silenciamento da FAK atenua o aumento da fibrose, o conteúdo de colágeno, e a atividade de metaloproteinase matriz 2 de fibroblastos isolados de VE submetidos à sobrecarga hemodinâmica por coarctação da aorta.

4.11.1 Avaliação do efeito do silenciamento gênico da FAK por iRNA na expressão de MMPs 2 e 9

Para assim verificar se a FAK atua na regulação da expressão de MMP 2 e 9, após o silenciamento dos FCRNs mantido em cultura, foram então extraídos para análise por técnica de *western blot.*, utilizando anticorpos específicos para MMP 2 e MMP 9. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de vimentina.

Na Figura 20, observa-se que os homogenatos dos FCRNs tratados com siRNA_{FAK} apresentou uma pequena redução na expressão de (28%) MMP 2 e de (23%) MMP 9. Quando submetidos ao silenciamento e posteriormente submetidos ao estiramento mecânico, praticamente a expressão de ambas gelatinases retornaram aos níveis basais, próximo aos do controle, mas significativamente menores quando comparado aos FCRNs estirados.

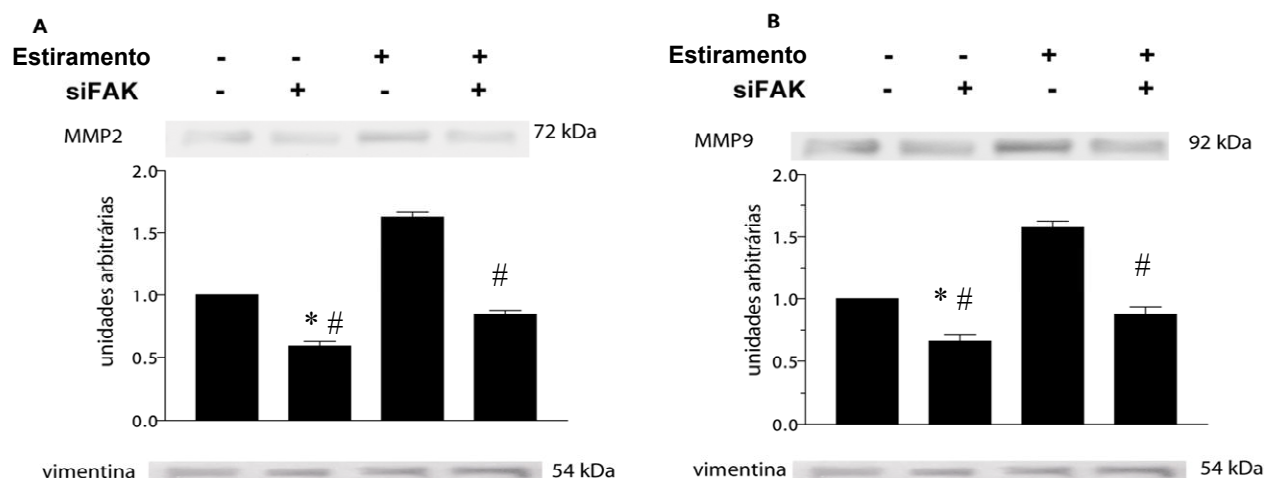


Figura 20- Avaliação da expressão de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetido ou não a transfecção de siRNA_{FAK} (40nM).

A-Imunoblotting representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 2 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4).

B-Imunoblotting representativo realizado com o meio de cultura e anticorpo específico para MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da quantidade de proteína marcada com MMP 9 normalizada pela quantidade de vimentina nos FCRNs. (N=4).

* $p < 0,05$, em relação ao controle, e # $p < 0,05$, em relação ao FCRN estiramento de 4 hs não transfectado com siRNAFAK.

4.11.2 Avaliação do efeito do silenciamento gênico da FAK por iRNA na atividade de MMPs 2 e 9 em FCRNs

Para avaliar a atividade das gelatinases, MMPs 2 e 9, após o silenciamento gênico da FAK nos FCRNs, as amostras de meio de cultura respectivos foram analisados por técnica de zimografia.

De acordo com a Figura 21, os FCRNs controle não estirados não demonstram mudanças significativas na atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9. O

estiramento cíclico induziu um aumento na razão de duas (2) ou mais vezes na atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 intermediárias, as quais têm variação no tamanho molecular devido à clivagem submetida na ocasião da ativação dessas enzimas. Verifica-se também que há uma variação desta atividade dependente do intervalo de estiramento e da gelatinase avaliada, sendo a duração de 4 horas de estiramento aquela em que ambas têm sua atividade aumentada em mesma proporção.

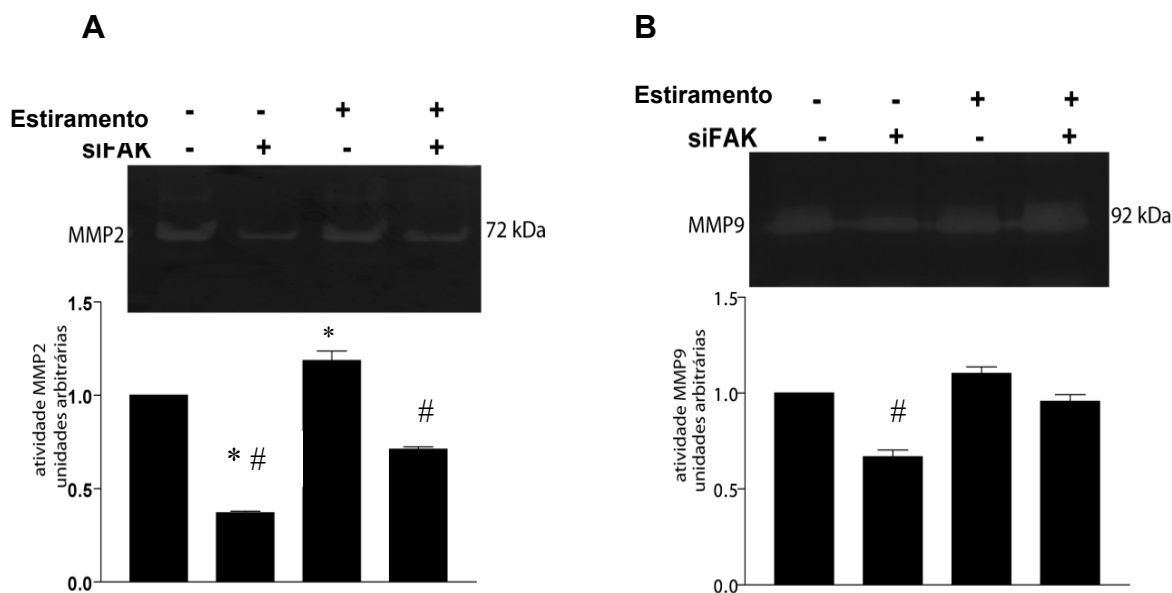


Figura 21- Avaliação da atividade de MMP 2 e 9 nos FCRNs mantidos em cultura submetido ou não a transfecção de siRNA_{FAK} (40nM).

A-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP2. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 2. (N=4)

B-Zimograma representativo realizado com o meio de cultura de MMP9. Gráfico dos valores médios percentuais da atividade gelatinolítica de MMP 9. (N=4)

* $p < 0,05$, em relação ao controle, e # $p < 0,05$, em relação ao FCRN estiramento de 4 hs não transfectado com siRNAFAK.

4.11.3 Avaliação do efeito do silenciamento gênico da FAK por iRNA na distribuição de MMPs 2 e 9 em FCRNs

A distribuição das MMPs 2 e 9 e da α -SMA nos FCRNs submetidos ao silenciamento gênico da FAK foi avaliado por imunofluorescência. Sendo assim as células após 24 horas de transfecção com siRNA_{FAK} foram fixados em paraformaldeído 4% e marcados com anti-MMP 2 (1:100) e MMP 9 (1:100) anticorpo secundário marcado com Alexa Green ₄₈₈ (verde) e; anti α -SMA (1:100) e anticorpo secundário marcado com Alexa Red ₅₆₈ (vermelho). O resultado deste protocolo permite a definição da localização sub-celular de MMP 2 e MMP 9 e a sua relação com a α -SMA, o núcleo marcado com DAPI. Na Figura 22, estão representadas a dupla-marcação, ou seja, as localizações simultâneas das MMP 2 e MMP 9 com a α -SMA nos FCRNs controle (A e C) e transfectados com siRNA_{FAK} (40 nM, 24 horas) em B e D.

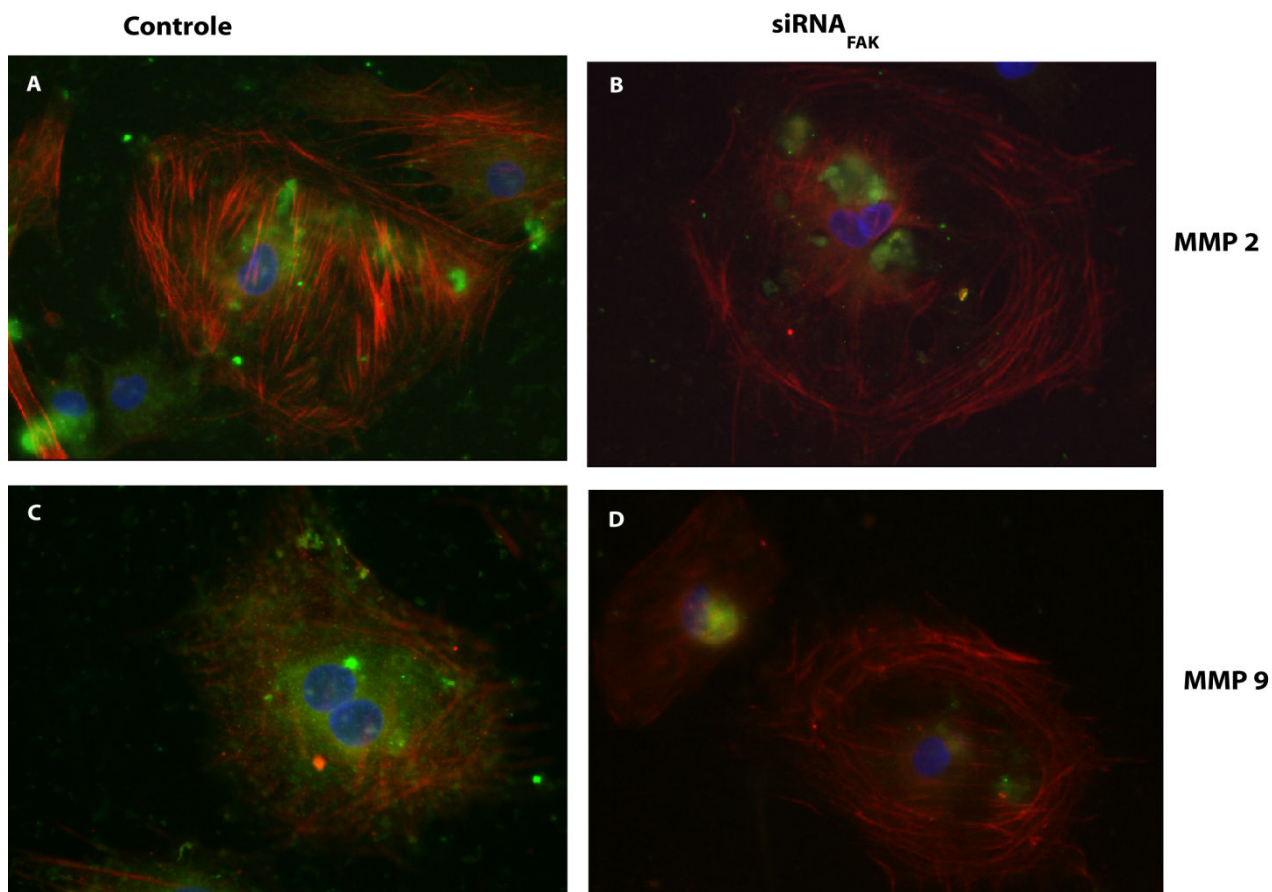


Figura 22-Distribuição das MMP2 e MMP9 e da α -SMA em FCRNs submetido ou não a transfecção de siRNA_{FAK} (40nM). Imagens de microscopia de fluorescência, MMPs 2 e 9 marcadas em verde e α -SMA em vermelho, núcleo com DAPI. Aumento 400X.

4.12-Complexo mTOR medeia os efeitos da FAK na ativação de fibroblastos induzida por estiramento mecânico.

Complexos AKT e mTOR têm sido relacionados aos efeitos da FAK em diversos tipos de células (DEL RE DP, MIYAMOTO S, e BROWN JH., 2008; GAYER CP, et al, 2009.). Para avaliar a importância dessa via nos efeitos da FAK em FCRNs estirados na diferenciação e proliferação, que inicialmente foi examinado pela ativação dos complexos AKT e mTOR, através da análise do estado de fosforilação

da AKT, TSC-2 e S6K . Como mostrado na fig. 22, o estiramento cíclico aumentou a quantidade de AKT Ser473, TSC-2 Thr1462, e S6K Thr389 fosforiladas (Figura 23). A depleção da FAK por siRNA cancelou a fosforilação da AKT, TSC-2 e S6K promovida pelo estiramento cíclico. A expressão da proteína mTOR nãoapresentou alteração em não estirados e/ou em de células alongadas depletadas de FAK.

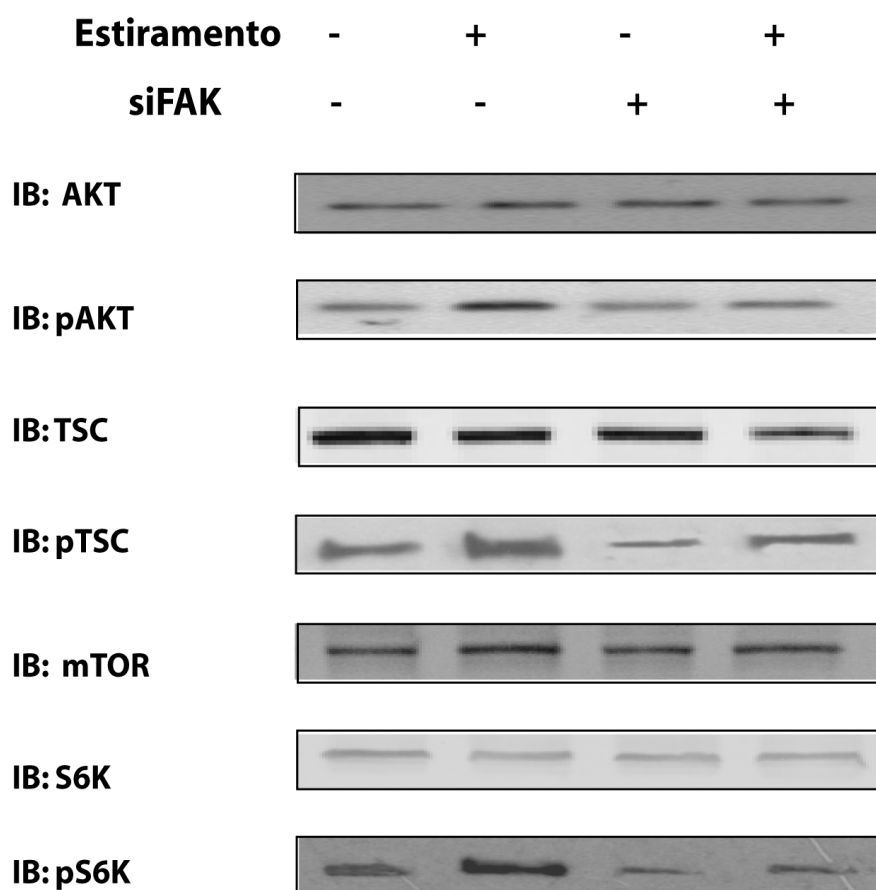


Figura 23. Estiramento cíclico aumenta a fosforilação de AKT Ser473, TSC2 Thr1462, and S6K Thr389, e a depleção da FAK por técnica de siRNA diminui a fosforilação de AKT Ser473, TSC2 Thr1462, e S6K Thr389 em FCRNs estirados e não estirados. O siRNA_{GFP} não alterou a expressão e a fosforilação destas proteínas. Os *immunoblottings* correspondem a pool de amostras de 3 culturas de FCRNS.

4.13. Tratamento de rapamicina, inibidor de mTOR, atena a diferenciação e a proliferação de FCRNs.

Para confirmar a importância desta via mTOR nas alterações induzidas pelo estiramento mecânico em FCRNs, as células foram tratadas com o inibidor farmacológico da mTOR, a rapamicina.

A rapamicina atua na tradução global de proteínas, visto que dois dos alvos conhecidos da rapamicina - o eIF-4E e a p70S6K - promovem a tradução protéica - através da facilitação do início deste processo - especialmente no caso de mRNAs com estruturas secundárias complexas na região 5' não traduzida (5' untranslated region - 5'UTR) - promovendo a biogênese dos ribossomos. Ao formar-se o complexo rapamicina-FKBP12, ocorre a inibição da atividade do Alvo da Rapamicina em Mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin - mTOR*), que pertence à família dos fosfatidil-inositol quinases (PI3K), que também possui atividade de serina-treonina proteína quinase. A mTOR participa da ativação da p70S6K e, consequentemente, da biogênese de ribossomos, através da fosforilação da subunidade ribossomal S6, assim como promove a tradução de mensagens que contém uma sequência de 7 a 14 pirimidinas justaposta à metionina. De maneira mais direta, a mTOR fosforila a proteína inibidora da iniciação de tradução protéica 4E-BP1/PHAS-1, impedindo que este iniba o início da tradução protéica através do acoplamento com a extremidade CAP dos mRNAs. Como mostrado na Figura 24, a rapamicina inibe a proliferação e diferenciação de FCRNs basal, bem como na resposta ao alongamento cíclico como avaliado pela quantidade de células coradas positivamente para Ki-67 e α -SMA, respectivamente.

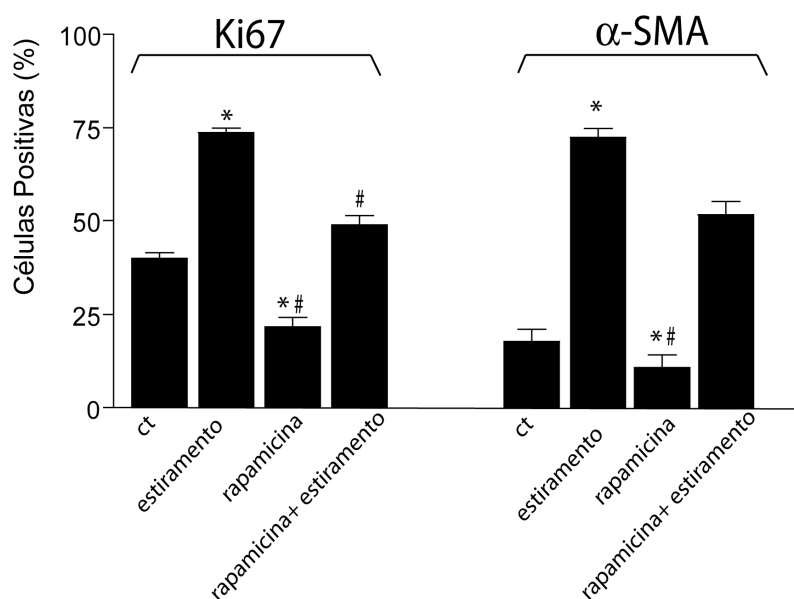
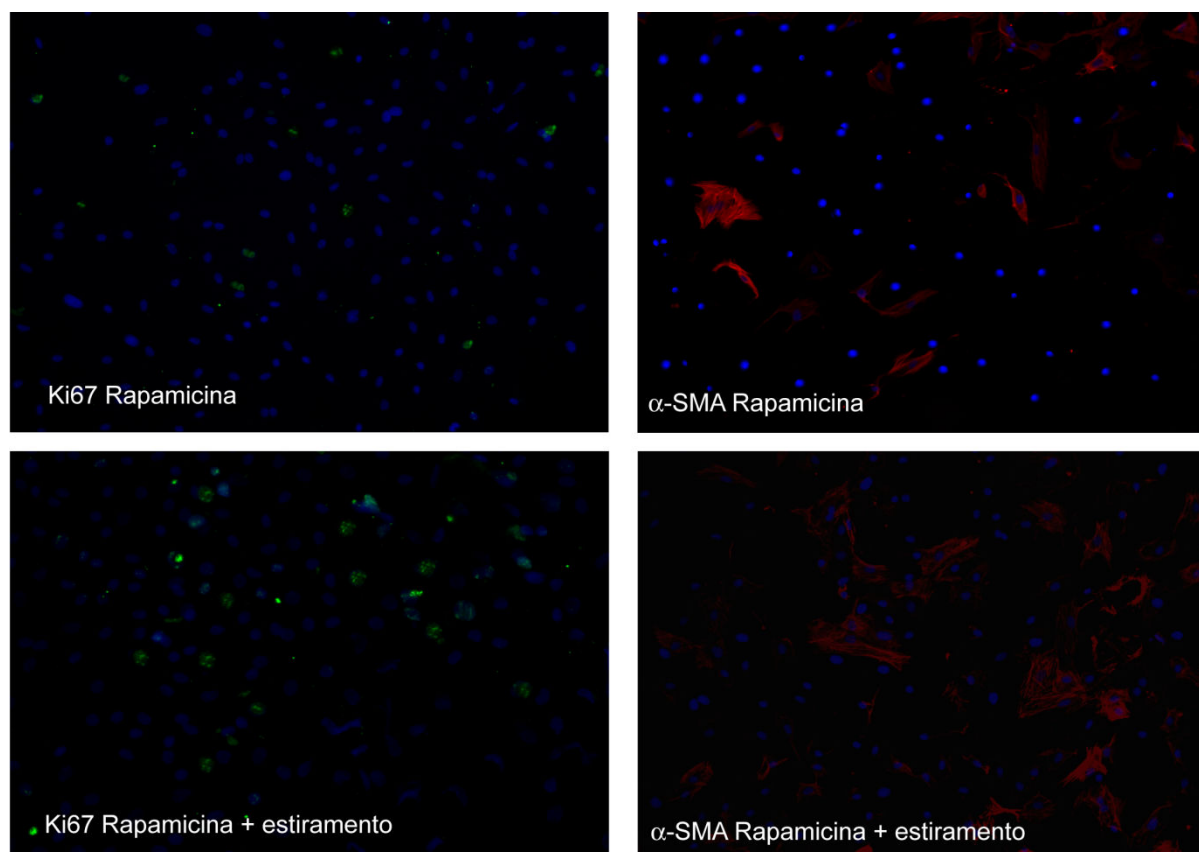


Figura 24- Efeito do tratamento farmacológico com rapamicina sobre a proliferação e a diferenciação dos FCRNs.

Imagens de microscopia de fluorescência anti-Ki67e anti- α SMA, nas condições: controle e estiradas e tratados com rapamicina e gráfico representativo da contagem de células positivas para Ki67 e - α SMA. Valores percentuais médios (n=4).

* $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle, #, em relação ao estiramento.

5 – DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos o papel da FAK na regulação da diferenciação celular e ativação das Metaloproteinases de Matriz 2 e 9, em fibroblastos cardíacos de ratos neonatos, induzidas por estiramento mecânico. Para tanto, realizamos experimentos com cultura primária de fibroblastos cardíacos de ratos neonatos (FCRNs) em terceira passagem (6-8 dias em cultura). Nesta cultura predominavam células positivas para vimentina (98,7%), sendo que cerca de 30% das células encontravam-se em proliferação (avaliada por incorporação de BrdU e identificação imunocitofluorescência e Ki67) e 14% de células diferenciadas em miofibroblastos (α -SMA positivas). Demonstramos que: 1) o estiramento cíclico mantido por 4 horas promoveu o aumento marcante da proliferação e da diferenciação celular de FCRNs em miofibroblasto; 2) o estiramento induziu a fosforilação da FAK em tirosina 397 nos FCRNs; 3) a expressão e a atividade das MMPs 2 e 9 foram aumentadas pelo estiramento cíclico; 4) o silenciamento gênico da FAK em FCRNs atenuou a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, e reprimiu o aumento da expressão e atividade das MMPs 2 e 9 induzidas pelo estiramento. Em conjunto, os dados do presente estudo indicam que a ativação da FAK induzida pelo estiramento tem papel crítico na ativação de FCRNs estimulados mecanicamente. Este mecanismo pode ser relevante para a patogênese da fibrose miocárdica que acompanha doenças cardíacas.

O modelo experimental *in vitro* da cultura primária de fibroblastos cardíacos (FCRNs) foi escolhido por excluir os efeitos, tanto parácrinos quanto mecânicos, decorrentes da interação dos fibroblastos com os cardiomiócitos e demais células no miocárdio. Ademais, os ensaios *in vitro* mostram-se vantajosos em relação aos testes *in vivo*, uma vez que fornecem melhor controle sobre as condições

experimentais, permitindo reprodutibilidade dos ensaios e dos resultados, diminuição dos custos efetivos e redução do uso de animais de experimentação (CHU, 1995). Dentro deste contexto, é importante ressaltar que para exclusão da influência de alguns fatores/variáveis, todos os experimentos foram executados com células de cultura primária em terceira passagem, com número fixo de células e na ausência de soro.

A caracterização da cultura de FCRNs deu-se pela avaliação de marcadores citoplasmáticos deste tipo celular: vimentina e desmina. Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo de origem mesenquimal e, por isto expressam a proteína vimentina, como filamento intermediário. (FUCHS E. e WEBER K, 1994; GOLDMAN R. et al., 1996). Por este motivo, esta proteína foi utilizada como marcador positivo para distinguir a prevalência deste tipo celular nas culturas utilizadas no estudo. De fato, quase a totalidade das células em cultura era marcada positivamente para vimentina. Outra estratégia empregada para a caracterização da cultura foi a marcação negativa para a proteína desmina, a qual é específica dos filamentos intermediários de células musculares lisas e estriadas (BAR, H; et al, 2004). Verificou-se a completa negatividade para desmina, nos FCRNS de terceira passagem. Portanto nossos resultados sobre a caracterização dos FCRNS isolados indicam que a cultura era constituída predominantemente por fibroblastos e não por outro tipo celular.

No presente estudo também caracterizou-se o estado de proliferação e de diferenciação das células em cultura em condição basal. A proliferação celular foi detectada através da técnica de microscopia de imunofluorescência, em que foram empregados os anticorpos anti-BrdU e anti-Ki67, reconhecidos marcadores de proliferação celular (FONATSCH C, DUCHROW M, RIEDER MH. et al, 1991). O Ki67

é codificado pelo gene situado no locus 10q25 e expresso no núcleo no final da fase G1, em S, G2 e M (FONATSCH C, DUCHROW M, RIEDER MH. et al, 1991), enquanto células positivas para anti-BrdU encontram-se na fase S do ciclo celular (KROBOTH et al, 2007). Demonstramos que os FCRNs cultivados em DMEM apresentavam 27% de células positivas para anti-BrdU e 31% para anti-Ki67, do que se conclui que pouco menos de um terço das células estavam nas fases G1, S, G2 ou M do ciclo celular.

O estado de diferenciação dos FCRNs em condições basais também por técnica de microscopia de imunofluorescência foi avaliada a diferenciação basal dos FCRNs com anticorpo anti- α -SMA. Nesta situação cerca de 14% das células foram consideradas α -SMA positivas. Deste modo, ficou caracterizado que no presente estudo, os FCRNs apresentavam aproximadamente 30% de células em proliferação e 14% de protomiofibroblastos ou miofibroblastos. Estes valores são concordantes com os de outros estudos prévios, realizados com fibroblastos isolados de diferentes tecidos (AGARWAL et al, 2006; GILBERT et al, 2007; PHO M, et al, 2008).

Ainda na análise das imagens obtidas por microscopia de fluorescência dos miofibroblastos do presente estudo, verificou-se a distribuição da α -SMA coincidente ao citoesqueleto de actina e também em áreas de expansão/protusões da membrana plasmática, os lamelipódios. Esta localização é compatível com a função contrátil desta proteína e seu papel na função dos miofibroblastos (LANGEVIN et al, 2006).

O estiramento cíclico representa um modelo *in vitro* adequado para a análise, mais detalhada e específica, da reação de células em cultura frente ao estímulo mecânico. No caso específico do presente estudo mimetizando a sobrecarga

hemodinâmica do coração em nível celular. (KAMKIN A, et al, 2003; FUSELER JW et al, 2007; WIPFF PJ et al, 2008).

No presente estudo, o estiramento cíclico (equibiaxial, 10% de alongamento e 1 Hz), promoveu o aumento de aproximadamente 1,8 vezes o número de FCRNs em proliferação celular. Este resultado remete a estudos anteriores que caracterizaram a indução da proliferação celular de fibroblastos de rato 3Y1 após o estiramento mecânico via MAP quinase (*mitogen-activated protein kinase*) (WANG, JG et al., 2001; HU B, 2005), no entanto, vale ressaltar que o estiramento empregado era do tipo uni-axial. As evidências disponíveis indicam as MAP quinases como as principais vias celulares ativadas pelo estiramento mecânico em fibroblastos (VELARDE V et al, 1999; LI W et al, 2001). Além disso, dados anteriores indicam que o complexo integrina-FAK como o mais relevante mecanismo responsável pela transdução do sinal mecânico para a ativação da via de sinalização de progressão do ciclo celular mediada por MAPKs (VELARDE V et al, 1999; LI W et al, 2001; PARSONS JT., 2003; WANG JG et al, 2005; KOOK SH et al., 2008).

Neste estudo também demonstramos que o estiramento cíclico bi-equiaxial induziu a diferenciação de fibroblastos em miofibroblasto. Estas células diferenciadas se destacam por apresentar atividade secretora e contratilidade maior que em fibroblastos e expressar a α -SMA, o principal marcador positivo, além de ser elemento crítico para as vias de mecanotransdução (DUGINA et al., 1998; HINZ et al., 2001; WANG et al., 2005).

Em nosso resultado, o número de FCRNS positivos para α -SMA quanto submetidos ao estiramento por 4 horas era de aproximadamente 4 vezes maior, quando comparado aos FCRNS controles (14% para 56%). No contexto de doenças

cardíacas, sabe-se que a expressão de α -actina está aumentada em miofibroblastos encontrados corações hipertróficos e fibróticos e em locais de infarto do miocárdio (CAMPBELL SE e KATWA LC, 1997; KATWA LC, et al, 1997; SUURMEIJER AJ et al, 2003).

É válido ressaltar que pelo menos três eventos locais são descritos como regulatórios da expressão de α -SMA em fibroblastos diferenciados: 1) o acúmulo de TGF- β 1 biologicamente ativo, (ARORA PD, e McCULLOCH CA, 1999; VAUGHAN MB, HOWARD EW, e TOMASEK JJ, 2000; TOMASEK JJ et al., 2002; CARACI F et al, 2008); 2) a presença de proteínas especializadas da MEC como o ED-A variante de fibronectina (LYGOE KA et al, 2007; SUZUKI T et al, 2008); 3) estresse mecânico extracelular, decorrentes das propriedades mecânicas da MEC e da atividade de remodelamento celular (WANG J, ZOHAR R, MCCULLOCH CA, 2006; GOFFIN JM et al, 2006; CHEN J et al, 2007).

Destes mecanismos envolvidos com a diferenciação de fibroblastos, destaca-se a via do TGF- β 1 (*Transforming growth factor- β*), por ser o mais bem conhecido. Sabe-se que o TGF- β induz a expressão de α -SMA em miofibroblasto, para isso requer a mobilização de fatores de transcrição da família SMAD e que sua plena atuação depende da ativação tardia da FAK. No entanto, a sinalização mecânica sob a diferenciação de fibroblastos ainda permanece pouco explorada. Principalmente, sobre como estímulos mecânicos são convertidos em sinais intracelulares, os quais são capazes de estimular a expressão de α -SMA em fibroblastos cardíacos.

Sobre o aspecto da diferenciação celular de fibroblastos, vem sendo esclarecido o papel da FAK neste processo celular, reconhece-se que os mecanismos pela qual a força mecânica regula a expressão gênica são considerados

de importância biomédica. Sabe-se que, apesar de haver demonstrações de que a FAK é necessária para a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos em resposta ao TGF- β 1, nosso estudo é o primeiro a revelar sua importância na resposta ao estímulo mecânico.

Além de aumentar a proliferação e a diferenciação de FCRNs, demonstramos que no presente estudo, o estiramento cíclico induz o aumento da expressão e atividade de MMPs 2 e 9. Uma vez que a MEC está integrada ao compartimento intracelular através de integrinas, é provável que as mudanças na tensão mecânica ao que o miocárdio é submetido, são capazes de alterar as vias de sinalização intracelulares envolvidas na atividade transcricional de MMPs (SHEETZ MP, FELSENFELD DP, GALBRAITH CG, 1998; RUWHOF C, VAN DER LAARSE, 2000; ROSS RS., 2002; TRUTER SL ET AL, 2004). Além disso, reconhece-se que em cultura de fibroblatos de diferentes tecidos, quando submetidos ao estiramento mecânico há a indução de MMPs (TYAGI SC et al., 1998; HUSSE B et al., 2007; SHELTON L, RADA JS, 2007).

Alguns estudos revelaram que em resposta ao estiramento há modulação da composição e organização da MEC (ATANCE J, YOST M, e CARVER W, 2004), como na análise de diferentes padrões de tensão. LEE A. et al, (1999) mostraram que a cultura de fibroblastos de rato adulto apresenta distintas respostas dependentes dos vários tipos de cargas mecânicas.

Sendo assim, neste estudo, verificamos que o estiramento cíclico promoveu o aumento tanto da atividade quanto da expressão das MMPs 2 e 9 em FCRNs, em período de 2 a 8 hs contínuas de estímulo mecânico. Neste estudo, foram avaliadas apenas as MMPs 2 e 9 (gelatinase A e B, respectivamente), uma vez que estas são

importantes nas doenças cardíacas em resposta a sobrecarga hemodinâmica (CREEMERS et al., 2003).

Nossos resultados relacionam-se com outro estudo, o qual descreveu, em cultura celular de fibro-condrócitos, a indução do aumento dos níveis de mRNA de várias de MMPs por estiramento cíclico, o que parece ser tempo-dependente (DESCHNER J, RATH-DESCHNER B, AGARWAL S. 2006). No entanto, nosso estudo é o primeiro a descrever o aumento tanto da expressão quanto da atividade de MMPs 2 e 9 nos fibroblastos cardíacos induzidos por estiramento mecânico. De maneira geral, este resultado sobre indução das gelatinases de FCRNs após estimulação mecânica relaciona-se aspectos deletérios, os quais como já esclarecidos que a partir das condições alteradas da MEC por mudanças na força, influencia por fim a arquitetura do VE e conseqüentemente, pode causar a disfunção cardíaca (BAUDINO T. et al, 2006).

O principal achado do presente estudo, é que a sinalização pela FAK é crítica tanto para a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, como para o aumento de MMP 2 e 9, induzida por estiramento mecânico em FCRNs. Sobre o aspecto da estimulação mecânica, sabe-se que a FAK é considerada uma molécula candidata para a mecanotransdução em células cardíacas, como os miócitos cardíacos e em outros tipos celulares (TORSONI et al, 2003; YAMADA K et al, 2005). A ativação da FAK por estímulos mecânicos apresenta pronta fosforilação em tirosina, o que desencadeia uma série de cascatas de sinalização relacionadas na proliferação, diferenciação, migração, crescimento celular e recrutamento do programa gênico hipertrófico (SCHWARTZ et al., 1995; PARSONS, 1996; SCHLAEPFER et al., 1998,

FRANCHINI et al. 2000; DOMINGOS et al. 2002; TORSONI et al., 2003; NADRUZ et al., 2005)

De acordo com isto, nossos dados indicam que o estiramento cíclico de FCRNs induz a ativação da FAK. Primeiramente, verificamos que os FCRNs quando estirados tanto rapidamente quanto prolongadamente apresentaram aumento de aproximadamente 2 vezes a quantidade de FAK fosforilada em Tyr397 (i.e. ativaram), e ainda mudança na sua distribuição celular após a estimulação mecânica de 4 horas de duração.

Neste aspecto, especificamente em fibroblastos, há evidências da participação da FAK nos diversos processos celulares fisiológicos e patológicos. Recentemente, LOPES et al, (2007), demonstraram em amostras de pacientes com regurgitação mitral (RM), a co-existência do aumento da expressão e fosforilação da FAK, e o aumento da fibrose intersticial em corações humanos sobrecarregados cronicamente. Neste estudo verificou-se que em ensaios de imunomarcção dos cortes de miocárdio de pacientes RM, a FAK se distribuiu nas áreas ocupadas por miócitos, mas predominantemente em fibroblatos, no interstício cardíaco. Neste mesmo ano, CLEMENTE et al, (2007), constataram que o silenciamento da FAK no miocárdio de camundongos cancela os aumentos da expressão e da atividade de MMP-2 induzidos por sobrecarga pressórica, o que indica que a ativação da FAK contribui para o aumento da expressão e atividade de MMPs no miocárdio hipertrófico.

Uma vez avaliado o papel do estiramento sobre a proliferação, a diferenciação, a expressão e atividade de MMPs 2 e 9, utilizamos o silenciamento gênico da FAK por técnica de siRNA, para verificar os possíveis efeitos dessa

quinase sobre a diferenciação e a expressão e a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9.

Portanto neste estudo, o silenciamento gênico da FAK por técnica de siRNA atenuou a expressão desta proteína em 67% (eficiência), de modo que o modelo empregado foi *knockdown* para FAK nos FCRNs, por isto observou-se uma expressão residual de FAK, a qual foi necessária para a manutenção da viabilidade celular e da morfologia. Esta técnica, então se prestou para a investigação do papel da FAK, primeiramente, no controle da diferenciação dos FCRNs em miofibroblastos, na dependência do estímulo mecânico. Assim indicamos que o silenciamento gênico da FAK atenuou a expressão de α -SMA, indicando o impedimento da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Em conformidade, MIMURA Y et al, (2005) demonstraram que a expressão de α -SMA era significativamente reduzida em fibroblastos de escleroderma transfectado com mutante deficiente para FAK. Recentemente, há uma controvérsia sobre a relação da FAK e α -SMA. Neste aspecto, a FAK tem sido mostrada como mediadora da supra-regulação da expressão de α -SMA, em resposta ao TGF- β 1 (THANNICKAL, V. J et al, 2003; THOMAS, P. E et al, 2007), e na inibição de α -SMA em resposta a FGF (GREENBERG, R. S et al, 2006).

Este resultado permite uma extrapolação no que diz respeito à função da FAK na diferenciação de fibroblastos induzida por estímulo mecânico. Observa-se que associação da FAK nesta via de diferenciação se difere daquela estimulada por TGF- β 1, no que se trata da ativação desta quinase. Pelo o que se apresenta, neste estudo, o estímulo mecânico ativa prontamente (15 minutos) e continuamente (até 8 horas) a FAK, o que leva em consequente a ativação da expressão de α -SMA.

Ainda, como efeito do silenciamento gênico da FAK nos FCRNs, mostramos que o siRNA_{FAK} 40nM atenuou a expressão e aboliu o aumento da atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 em FCRNs, quando submetidos ou não ao estímulo mecânico, o qual verificado neste mesmo estudo, ser capaz de promover a ativação das gelatinases.

Deste modo, verificamos a existência de uma relação entre a FAK e as gelatinases, ambas envolvidas no processo de remodelamento hipertrófico. Sobre este aspecto, é importante reconhecer-se que a MMP 2 é a molécula determinante para o processo de remodelamento da matriz extracelular no miocárdio em sobrecarga hemodinâmica (IWANAGA et al., 2002; BERGMAN et al., 2007). Estudos anteriores já demonstraram que o silenciamento da FAK por técnica de siRNA alvo leva a diminuição da fibrose e atenuação do conteúdo de colágeno e de MMP 2 (CLEMENTE et al., 2007).

Em suma, estudos são ainda necessários para a elucidação do papel da FAK em mecanismos que determinam a induz da diferenciação dos fibroblastos, e quais são as vias e os elementos precisos na promoção da expressão e a atividade das gelatinases.

A identificação de eventos moleculares de sinalização celular responsáveis pelo controle da diferenciação dos FCRNs e da expressão e atividade de metaloproteinases contribuirá para o entendimento dos mecanismos básicos responsáveis pelas alterações estruturais observadas no miocárdio hipertrófico e pela deterioração estrutural e funcional, cujo resultado é a insuficiência cardíaca. Espera-se que este conhecimento estabeleça as bases para o desenvolvimento de

novas ferramentas farmacológicas voltadas para o controle da hipertrofia e prevenção da insuficiência cardíaca.

Os resultados do presente estudos utilizando iRNA e inibição farmacológica com rapamicina suportam que a inibição do complexo mTOR como uma característica central dos efeitos da depleção de FAK fibroblastos cardíacos como a proliferação e diferenciação estimulados pelo estresse mecânico. O estiramento mecânico elevou a fosforilação da AKT, TSC-2, e S6K por um mecanismo dependente da ativação da FAK, tal como sugerido pela ausência de fosforilação das proteínas sinalizadoras em fibroblastos cardíacos depletados de FAK. O pré-tratamento com rapamicina aboliu a proliferação e a transição para miofibroblastos dos FCRNs. Assim, estes dados são consistentes com uma relação de FAK para com a via constituída por AKT, TSC-2, no controle de S6K induzida por estiramento na ativação de fibroblastos cardíacos. Em consonância com estes dados, a ativação fibroblástica de β 1-integrina foi previamente demonstrada que induzida através do engajamento envolvem sinalização através PI3K/Akt, TSC-2 e S6K1. Além disso, a FAK controla AKT p85 através da interação com a subunidade da phosphatidylinositol 3-quinase e AKT regulamenta mTOR principalmente através da fosforilação da TSC-2 em Thr1462 (MANNING BD,et al, 2002). A FAK também interage diretamente com e inibe TSC-2, podendo influenciar a proliferação celular e diferenciação através da regulamentação dos complexos mTOR (GAN B, et al, 2006). Além disso, nossos resultados sugerem que AKT medeia os efeitos da Fak sinalização sobre mTOR. No entanto, não podemos excluir a existência de outros mediadores entre as Fak e mTOR vias, tais como ERK família de cinases MAP, por exemplo. ERK pode, portanto, agir sinergicamente com AKT/ mTOR para ativar e

para mediar a ativação da FCRNs em resposta ao estresse mecânico.

Em conclusão, este estudo mostra que o estresse mecânico induz ativação de fibroblastos cardíacos através da mediação da via de sinalização da FAK. Os dados ainda enfatizam a importância do complexo mTOR para determinar ativação de fibroblastos cardíacos induzida por estresse mecânico. Estas considerações têm implicações importantes para a nossa compreensão do processo de remodelamento patológico da MEC e insuficiência cardíaca.

6 – CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a sinalização da FAK possui papel regulatório para a ativação das metaloproteinases de matriz 2 e 9 (gelatinases), além de ser determinante para a proliferação e diferenciação em fibroblastos cardíacos, quando submetidos ao estiramento cíclico. Os dados ainda enfatizam a importância do complexo mTOR para determinar ativação de fibroblastos cardíacos induzida por estresse mecânico. Indicando a participação desta quinase nos processos de fibrose intersticial e remodelamento cardíaco devido ao estímulo mecânico.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL C, BRITTON ZT, ALASEIRLIS DA, LI Y, WANG JH. Healing and normal fibroblasts exhibit differential proliferation, collagen production, alpha-SMA expression, and contraction. **Ann Biomed Eng.** Apr;34(4):653-9, 2006.

ARMSTRONG PW, MOE GW, HOWARD RJ, GRIMA EA, CRUZ TF. Structural remodelling in heart failure: gelatinase induction. **Can J Cardiol** 10: 214–220, 1994.

ARORA PD, NARANI N, e McCULLOCH CA. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor- β induction of α -smooth muscle actin in fibroblasts. **Am J Pathol** 154: 871–882, 1999.

ARORA PD., e McCOLLOCH CAJ. Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. **Cell. Physiol.** 159, 161–175, 1994.

ATANCE J, YOST M, CARVER W. Influence of the extracellular matrix on the regulation of cardiac fibroblast behavior by mechanical stretch. **J Cell Physiol** 200: 377–386, 2004.

BAKIRI L, MATSUO K, WISNIEWSKA M, WAGNER EF, YANIV M. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. **Mol Cell Biol.**; 22: 4952–4964, 2002.

BANERJEE I., FUSELER J. W., PRICE R. L., BORG T. K, E BAUDINO T. A.Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 293: H1883-H1891, 2007.

BAR, H; STRELKOV, S., SJÖBERG, G., AEBI, U., AND H. HERRMANN . The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organization? **Journal of Structural Biology** 148: 137–152, 2004.

BASHEY R, DONNELLY M, INSINGA F, JIMENEZ S. Growth Properties and biochemical characterization of collagens synthesized by adult rat heart fibroblasts in culture. **J Mol Cell Cardiol** 24: 691–700, 1992.

BAUDINO T, CARVER W, GILES W, BORG T. Cardiac fibroblasts: friend or foe? **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 291: H1015–H1026, 2006.

BERENJI K, MARK HD., BEVERLY AR, JOSEPH AH. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 289: H8-H16, 2005.

BORG TK, RANSON WF, MOSLEHY FA, AND CAULFIELD JB. Structural basis of ventricular stiffness. **Lab Invest** 44: 49–54, 1981.

BOSMAN FT, STAMENKOVIC I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J. Pathol.** 200:423–28, 2003.

BRADHAM. WS; BOZKURT, B; GUNASINGHE, H; MANN, D e SPINALE, FG. Tumor necrosis factor-alpha and remodeling in progression focal the heart failure a current perspective. **Cardiovasc Res.**: 53, 822-830, 2002.

BRILLA CG, ZHOU G, RUPP H, MAISCH B, WEBER KT. Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. **Am J Cardiol** 76: 8D–13D, 1995.

BRITTAN M, HUNT T, JEFFERY R, POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K, ET AL. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. **Gut**;50(6):752–757, 2002.

BROWN E E DEJANA E. Cell-to-cell contract e the extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol** 15: 505–508, 2003.

BUCALA R, SPIEGEL LA, CHESNEY J, HOGAN M, CERAMI A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Mol Med** 1(1):71–81, 1994.

BURGESS ML, TERRACIO L, HIROZANE T, e BORG TK. Differential integrin expression by cardiac fibroblasts from hypertensive and exercise-trained rat hearts. **Cardiovasc Pathol** 11: 78–87, 2002.

BUTT RP, LAURENT GJ, e BISHOP JE. Mechanical load and polypeptide growth factors stimulate cardiac fibroblast activity. **Ann NY Acad Sci** 752: 387–393, 1995.

BUTTICAZ C, CIUFFI A, MUNˆOZ M, THOMAS J, BRIDGE A, PEBERNARD S, IGGO R, MEYLAN P, TELENTI A. Protection from HIV-1 infection of primary CD4 T cells by CCR5 silencing is effective for the full spectrum of CCR5 expression. **Antivir Ther**, 8(5): 373–3772003.

CALALB MB, POLTE TR, HANKS SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases **Mol Cell Biol.**; 15: 954–963,1995.

CAMELLITI P, BORG T, KOHL P. Structural and functional characterisation of Cardiac fibroblasts. **Cardiovasc Res.** 65: 40–51, 2005.

CAMPBELL SE e KATWA LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor- β_1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. **J Mol Cell Cardiol** 29: 1947–1958, 1997.

CARACI F, GILI E, CALAFIORE M, FAILLA M, LA ROSA C, CRIMI N, SORTINO MA, NICOLETTI F, COPANI A, VANCHERI C. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. **Pharmacol Res**;57(4):274-82, 2008.

CARVER W, NAGPAL M, NACHTIGAL M, BORG T, TERRACIO L. Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts. **Circ Res** 69: 116–122, 1991.

CARY LA, GUAN JL. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling **Front Biosci.**; 15: 102-13, 1999.

CECCARELLI DFJ, SONG HK, POY F, SCHALLER MD, ECK MJ. Crystal Structure of the FERM Domain of Focal Adhesion Kinase. **J. Biol. Chem.**; 281: 252 – 259, 2006.

CHEN CH, APPEDDU AP, PARSONS JT, HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, GUAN JL. Interaction of Focal Adhesion Kinase with Cytoskeletal Protein Talin. **American Society for Biochemistry and Molecular Biology**; 270: . 16995-16999, 1995.

CHEN J, LI H, SUNDARRAJ N, WANG JH. Alpha-smooth muscle actin expression enhances cell traction force. **Cell Motil Cytoskeleton**. 64(4):248-57, 2007.

CHEN LC, NOELKEN ME, NAGASE H. Disruption of the cysteine-75 and zinc ion coordination is not sufficient to activate the precursor of human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). **Biochemistry** 32: 10289–10295, 1993.

CHESLER NC, KU DN, GALIS ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 277: H2002–H2009, 1999.

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

CICCIMARO E, HEVKO J, BLAIR I. Analysis of phosphorylation sites on focal adhesion kinase using nanospray liquid chromatography/multiple reaction monitoring mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom.**, 20: 3681-3692, 2006.

CLEMENTE CFMZ, TORNATORE TF, THEIZEN TH, DECKMANN AC, PEREIRA TC, LOPES-CENDES I, SOUZA JRM, FRANCHINI KG Targeting Focal Adhesion Kinase With Small Interfering RNA Prevents and Reverses Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice **Circ. Res.**; 101: 1339 – 1348, 2007.

CLEUTJENS JP, KANDALA JC, GUARDA E, GUNTAKA RV, WEBER KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. **J Mol Cell Cardiol** 27: 1281–1292, 1995.

COHEN LA, GUAN JL Residues within the First Subdomain of the FERM-like Domain in Focal Adhesion Kinase Are Important in Its Regulation **J. Biol. Chem.**; 280: 8197 – 8207, 2005.

COOPER LA, SHEN LT, GUAN JL. Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction. **Mol Cell Biol.**; 23: 8030-8041, 2003.

CORDA S, SAMUEL JL, E RAPPAPORT L. Extracellular matrix e growth factors during heart growth. **Heart Fail Rev** 5: 119–130, 2000.

CREEMERS EE, DAVIS JN, PARKHURST AM, LEENDERS P, DOWDY KB, HAPKE E, HAUET AM, ESCOBAR PG, CLEUTJENS JP, SMITS JF, DAEMEN MJ, ZILE MR, SPINALE FG. Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 284: H364–H371, 2003.

D'ADDARIO M, ARORA PD, ELLEN RP, e MCCULLOCH CA. Interaction of p38 and Sp1 in a mechanical force-induced, β_1 integrin-mediated transcriptional circuit that regulates the actin-binding protein filamin-A. **J Biol Chem** 277: 47541–47550, 2002.

DASH R, SCHMIDT AG, PATHAK A, GERST MJ, BINIAKIEWICZ D, KADAMBI VJ, et al. Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. **Cardiovasc Res.**; 57: 704-14, 2003.

De WEVER O, MAREEL M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **J Pathol**; 200: 429-47, 2003.

DESCHNER J, RATH-DESCHNER B, AGARWAL S. Regulation of matrix metalloproteinase expression by dynamic tensile strain in rat fibrochondrocytes. **Osteoarthritis Cartil** 14: 264–272, 2006.

DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI F, e GABBIANI G. Transforming growth factor- β_1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **J Cell Biol** 122: 103–111, 1993.

DEL RE DP, MIYAMOTO S, e BROWN JH. Focal adhesion kinase as a RhoA-activable signaling scaffold mediating Akt activation and cardiomyocyte protection. **J Biol Chem** 283: 35622-35629, 2008.

DIMICHELE LA, DOHERTY LT, ROJAS M, BEGGS HE, REICHARDT LF, MACK CP, TAYLOR JM Myocyte-Restricted Focal Adhesion Kinase Deletion Attenuates Pressure Overload–Induced Hypertrophy. **Circ Res.**;99:636-645, 2006.

DING H, SCHWARZ D S, KEENE A, AFFAR EL B, FENTON L, XIA X, SHI Y, ZAMORE P D, XU Z. Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. **Aging Cell**, 2(4): 209–217, 2003.

DIREKZE NC, FORBES SJ, BRITTAN M, HUNT T, JEFFERY R, PRESTON SL, ET AL. Multiple organ engraftment by bone-marrowderived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrowtransplanted mice. **Stem Cells**;21(5):514–520, 2003.

DJ SIEG, CR HAUCK AND DD SCHLAEPFER,. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. **Journal of Cell Science**, Vol 112, Issue 16 2677-2691, 1999)

DOMINGOS PP, FONSECA PM, NADRUIZ WJR, FRANCHINI KG. 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.

DUGINA V, ALEXANDROVA A, CHAPONNIER C, VASILIEV J, GABBIANI G. Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in alpha-smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern, and adhesive structure organization. **Exp Cell Res.** Feb 1;238(2):481-90, 1998.

EBIHARA Y, MASUYA M, LARUE AC, FLEMING PA, VISCONTI RP, MINAMIGUCHI H, ET AL. Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. **Exp Hematol**;34(2):219–229, 2006.

EGHBALI-WEBB M. **Molecular Biology Intelligence Unit Molecular Biology of Collagen Matrix in the Heart.** Austin, TX: Lees, 1994.

ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, TUSCHL T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, 2001.

EYDEN, B. P. Brief review of the fibronexus and its significance for myofibroblastic differentiation and tumor diagnosis. **Ultrastruct. Pathol.** 17: 611–622, 1993.

FONATSCH C, DUCHROW M, RIEDER MH et al. Assignment of the human Ki67 genes (MK 167) to 10q25-qter. **Genomics**; 11:476-477, 1991.

FONSECA PM, INOUE RY, KOBARG CB, CROSARA-ALBERTO DP, KOBARG J, FRANCHINI KG. Targeting to C-Terminal Myosin Heavy Chain May Explain Mechanotransduction Involving Focal Adhesion Kinase in Cardiac Myocytes. **Circ. Res.**, Jan; 96: 73 – 81, 2005.

FORBES SJ, RUSSO FP, REY V, BURRA P, RUGGE M, WRIGHT NA, ET AL. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. **Gastroenterology**;126(4):955–963, 2004.

FRANCHINI KG, TORSONI AS, SOARES PHA, SAAD MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ Res**; 87: 558-565, 2000.

FRESHNEY RI. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. ed. New York : Wiley-Liss, 2001.

FUCHS E., WEBER K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. **Annu Rev Biochem** 63: pp. 345–82, 1994.

FURUTA Y, ILIC D, KANAZAWA S, TAKEDA N, YAMAMOTO T, AIZAWA S. Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. **Oncogene**; 16: 1989-1995, 1995.

FUSELER JW, MILLETTE CF, DAVIS JM, CARVER W Fractal and image analysis of morphological changes in the actin cytoskeleton of neonatal cardiac fibroblasts in response to mechanical stretch. **Microsc Microanal**. Apr;13(2):133-43, 2007.

GAYER CP, CHATURVEDI LS, WANG S, CRAIG DH, FLANIGAN T, e BASSON MD. Strain-induced proliferation requires the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase pathway. **J Biol Chem** 284: 2001-2011, 2009.

GAN B, YOO Y, e GUAN JL. Association of focal adhesion kinase with tuberous sclerosis complex 2 in the regulation of s6 kinase activation and cell growth. **J Biol Chem** 281: 37321-37329, 2006.

GIANNONE, G; SHEETZ, MP. Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. **Trends Cell Biol.**;16:213–223, 2006.

GILADI H, KETZINEL-GILAD M, RIVKIN L, FELIG Y, NUSSBAUM O, GALUN E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. **Mol Ther**, 8(5): 769–776, 2003.

GILBERT SJ, WOTTON PR, TARLTON JF, DUANCE VC, BAILEY AJ. Increased expression of promatrix metalloproteinase-9 and neutrophil elastase in canine dilated cardiomyopathy. **Cardiovasc Res** 2: 377–383, 1997.

GILBERT TW, STEWART-AKERS AM, SYDESKI J, NGUYEN TD, BADYLAK SF, WOO SL. Gene expression by fibroblasts seeded on small intestinal submucosa and subjected to cyclic stretching. **Tissue Eng.** Jun;13(6):1313-23, 2007.

GOFFIN JM, PITTET P, CSUCS G, LUSSI JW, MEISTER JJ, HINZ B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. **J Cell Biol.** 16;172(2):259-68, 2006.

GOFFIN, JM; PITTET, P; CSUCS, G; LUSSI, JW; MEISTER, JJ; HINZ, B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. **J Cell Biol.**;172:259–268, 2006.

GOLDMAN R. D., KHUON S., CHOU Y., OPAL P., STEINERT P. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. **J Cell Biol** 134 (4): pp. 971–83, 1996.

GOLDSMITH EC, HOFFMAN A, MORALES MO, POTTS JD, PRICE RL, MCFADDEN A, RICE M, E BORG TK. Organization of fibroblasts in the heart. **Dev Dyn** 230: 787–794, 2004.

GREENBERG RS, BERNSTEIN AM, BENEZRA M, GELMAN IH, TALIANA L, MASUR SK FAK-dependent regulation of myofibroblast differentiation.**FASEB J.** May;20(7):1006-8, 2006.

GRINNELL, FJ. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. **Cell Biol.** 124, 401–404, 1994.

GROSS J, NAGAI Y. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA** 54: 1197–1204, 1965.

GROVE D, ZAK R, NAIR KG, e ASCCHENBBRENNER V. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. IV. Observations on the cellular organization of growth during myocardial hypertrophy in the rat. **Circ Res** 25: 473–485, 1969.

HAMILTON A, BAULCOMBE D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science** 286 (5441): 950–2, 1999.

HAUCK, CR; HSIA, DA; PUENTE, XS; CHERESH, DA e SCHALAEPFER, DD. FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. **EMBOJ**; 21: 6289-302, 2002.

HAUDEK SB, XIA Y, HUEBENER P, LEE JM, CARLSON S, CRAWFORD JR, ET AL. Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**;103(48):18284–18289, 2006.

HAUTMANN MB, MADSEN CS, MACK CP, OWENS GK, Substitution of the degenerate smooth muscle (SM) alpha-actin CC(A/T-rich)6GG elements with c-fos serum response elements results in increased basal expression but relaxed SM cell specificity and reduced angiotensin II inducibility. **J. Biol. Chem.** 273, 8398–8406, 1998.

HERMAN MP, SUKHOVA GK, LIBBY P, GERDES N, TANG N, HORTON DB, KILBRIDE M, BREITBART RE, CHUN M, SCHONBECK U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. **Circulation** 104: 1899–1904, 2001.

HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, PARSONS JT Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase **Mol. Biol. Cell**, 6: 637, 1995.

HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, PARSONS JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions **J. Cell Biol**; 123: 993. 1993.

HINZ B, CELETTA G, TOMASEK JJ, GABBIANI G, e CHAPONNIER C. α -Smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Mol Biol Cell** 12: 2730–2741, 2001.

HINZ B, GABBIANNI G, e CHAPONNIER C. The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. **J. Cell Biol**. 157, 657–663, 2002.

HINZ B, PHAN SH, THANNICKAL VJ, GALLI A, PIALLAT MLB, E GABBIANI G. The Myofibroblast :One Function, Multiple Origins. **Am J Pathol**. June; 170(6): 1807–1816, 2007.

HINZ B., MASTRANGELO D., ISELIN C. E., CHAPONNIER C., e GABBIANNI G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am. J. Pathol**. 159, 1009–1020, 2001.

HINZ, B. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. **Eur J Cell Biol**.;85:175–181, 2006.

HOLMES JW, BORG TK, e COVELL JW., 2005 Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. **Annu Rev Biomed Eng** 7: 223–253, 2005.

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

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

HSIA, DA; MITRA, SK; HAUCK, CR; STREBLOW, DN; NELSON, JA; ILIC, D; HUANG, S; LI, E; NEMEROW, GR; LENG, J; SPENCER, KS; CHERESH, DA e SCHLAEPFER, DD. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. **J Cell Biol.**: 160: 735-67, 2003.

HU, B; JARZYNSKA, MJ; GUO, P; IMANISHI, Y; SCHLAEPFER, DD e CHENG, SY. Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the α v β 1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. **Cancer Res.**: 66(2): 775-83, 2006.

HU.BS, LANDEEN LK, AROONSAKOOL N, GILES WR An analysis of the effects of stretch on IGF-I secretion from rat ventricular fibroblasts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** Jul;293(1):H677-83, 2007.

HUANG H, KAMM RD, LEE RT, Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. **Am. J. Physiol.: Cell Physiol.** 287, C1–C11, 2004.

HUSSE B, BRIEST W, HOMAGK L, ISENBERG G, GEKLE M. Cyclical mechanical stretch modulates expression of collagen I and collagen III by PKC and tyrosine kinase in cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** ;293(5):R1898-907, 2007.

ILIC D, FURUTA Y, KANAZAWA S, TAKEDA N, SOBUE K, NAKATSUJI N, NOMURA S, FUJIMOTO J, OKADA M, YAMAMOTO T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. **Nature**; 377: 539-544, 1995.

JANMEY PA,. WEITZ DA. Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells. **Trends Biochem. Sci.** 29, 364–370, 2004.

JUGDUTT BL.. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.** 3:1–30, 2003.

KALLURI R, NEILSON EG. Epithelial–mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**;112(12):1776–1784, 2003.

KAMKIN A, KISELEVA I, ISENBERG G, WAGNER KD, GÜNTHER J, THERES H, SCHOLZ H Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. **Prog Biophys Mol Biol.** 82(1-3):111-20, 2003.

KANEKAR S, HIROZANNE T, TERRACIO L, E BORG TK. Cardiac fibroblasts: form e function. **Cardiovasc Pathol** 7: 127–133, 1998.

KATWA LC, CAMPBELL SE, TYAGI SC, LEE SJ, CICILA GT, e WEBER KT. Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. **J Mol Cell Cardiol** 29: 1375–1386, 1997.

KHAITLINA S.Y., Functional specificity of actin isoforms, **Int. Rev. Cytol.** 202, 35–98, 2001.

KLEIN G, SCHAEFER T, HILFIKER-KLEINER D, OPPERMAN D, SHUKA P, QUINT A, PODEWSKI E, HILFIKER A, SCHÖEDER F, LEITGES M, DREXLER H. Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial

hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKC ϵ . **Cardiovasc. Res.** 96:748-755, 2005.

KOHL P., NOBLE D. Mechanosensitive connective tissue: potential influence on heart arrhythm. **Cardiovasc. Res.** 32:62–68, 1996.

KOOK SH, LEE HJ, CHUNG WT, HWANG IH, LEE SA, KIM BS, LEE JC. Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK. **Mol Cells.** 30;25(4):479-86, 2008.

KROBOTH K, NEWTON IP, KITA K, DIKOVSKAYA D, ZUMBRUNN J, WATERMAN-STORER CM, NÄTHKE IS. Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. **Mol Biol Cell** 18:910-8, 2007.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. **Pathologic Basis of Disease**, Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds). Elsevier Saunders:Philadelphia, PA,; 87–118, 2005.

LANGEVIN HM, STORCH KN, CIPOLLA MJ, WHITE SL, BUTTOLPH TR, TAATJES DJ. Fibroblast spreading induced by connective tissue stretch involves intracellular redistribution of alpha- and beta-actin. **Histochem Cell Biol.** 125(5):487-95, 2006

LESLIE KO, TAATJES DJ, SCHWARZ J, VONTURKOVICH M, e LOW RB. Cardiac myofibroblasts express alpha smooth muscle actin during right ventricular pressure overload in the rabbit. **Am J Pathol** 139: 207–216, 1991.

LEW AM, GLOGAUER M, e MCULLOCH CA. Specific inhibition of skeletal α -actin gene transcription by applied mechanical forces through integrins and actin. **Biochem J** 341: 647–653, 1999.

LI W, DUZGUN A, SUMPIO BE, BASSON MD. Integrin and FAK-mediated MAPK activation is required for cyclic strain mitogenic effects in Caco-2 cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** Jan;280(1):G75-87, 2001.

LIETHA D, CAI X, CECCARELLI DFJ, LI Y, SCHALLER MD, ECK MJ. Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase **Cell**; 129: 1177-1187, 2007.

LIM TA, CHEN XL, LIM Y, HANSON DA, VO TT, HOWERTON K, LAROCQUE N, FISHER SJ, SCHLAEPFER DD, ILIC D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-Enhanced p53 degradation. **Mol Cell**; 29: 9-22, 2008.

LOFTIS MJ, SEXTON D, CARVER W. Effects of collagen density on cardiac fibroblast behavior and gene expression. **J Cell Physiol.** Sep;196(3):504-11, 2003.

LOPES MM, RIBEIRO GC, TORNATORE TF, CLEMENTE CF, TEIXEIRA VP, FRANCHINI KG. Increased expression and phosphorylation of focal adhesion kinase correlates with dysfunction in the volume-overloaded human heart. **Clinical Science** 113, 195–204, 2007.

LYGOE KA, WALL I, STEPHENS P, LEWIS MP Role of vitronectin and fibronectin receptors in oral mucosal and dermal myofibroblast differentiation. **Biol Cell.** 99(11):601-14, 2007.

MAA MC, LEU TH Vanadate-dependent FAK activation is accomplished by the sustained FAK Tyr-576/577 phosphorylation **Biochem Biophys Res Commun**,; 251(1): 344-9, 1998.

MACKENNA D, SUMMEROUR SR, VILLARREAL FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. **Cardiovasc Res** 46: 257–263, 2000.

MACKENNA DA, DOLFI F, VUORI K, e RUOSLAHTI E. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. **J Clin Invest** 101: 301–310, 1998.

MANNING BD, TEE AR, LOGSDON MN, BLENIS J, AND CANTLEY LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. **Mol Cell** 10: 151-162, 2002..

MAÑES S, MIRA E, GÓMEZ-MOUTON C, ZHAO ZJ, LACALLE RA, MARTÍNEZ AC. Concerted Activity of Tyrosine Phosphatase SHP-2 and Focal Adhesion Kinase in Regulation of Cell Motility. **Mol. Cell. Biol.**; 19: 3125 – 3135, 1999.

MARIN TM, CLEMENTE CFMZ, PICARDI PK, PASCOAL VDB, LOPES-CENDES IT, SAAD MJA, FRANCHINI KG. Shp2 Negatively Regulates Growth in Cardiac Myocytes by Controlling Focal Adhesion Kinase and the mTOR/S6 Kinase Pathways **Circ Res.** Oct 10;103(8):813-24. 2008.

McHUGH KM, CRAWFORD K, LESSARD JL., A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. **Dev. Biol.** 148 442–458, 1991.

MITRA, SK; HANSON, DA e SCHLAEPEFER, DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nat Rev Mol Cell Biol.**: 6, 56-68, 2005.

MOALLI MR, WANG S, CALDWELL NJ, PAIL PV, e MAYNARD CR. Mechanical stimulation induces pp125(FAK) e pp60(src) activity in an in vivo model of trabecular bone formation. **J Appl Physiol** 91: 912–918, 2001.

MONTIEL M, DE LA BLANCA EP, E JIMINEZ E. Angiotensin II induces focal adhesion kinase/paxillin phosphorylation e cell migration in human umbilical vein endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 327: 971–978, 2005.

MOORE BB, KOLODSICK JE, THANNICKAL VJ, COOKE K, MOORE TA, HOGABOAM C, ET AL. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. **Am J Pathol**;166(3):675–684, 2005.

MORGAN HE, GORDON EE, KIRA Y, CHUA BHL, RUSSO LA, PETERSON CI, et al. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. **Ann Rev Physiol.**; 49: 533-43, 1987.

MORGUNOVA E, TUUTTILA A, BERGMANN U, ISUPOV M, LINDQVIST Y, SCHNEIDER G, TRYGGVASON K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. **Science** 284: 1667–1670, 1999.

NADRUZ JR W, KOBARG CB, CONSTANCIO SS, CORAT PD, FRANCHINI KG. Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. **Circ Res**; 92: 243-251, 2003.

NADRUZ JRW, CORAT MA, MARIN TM, GUIMARAES PEREIRA GA, FRANCHINI KG. Focal Adhesion Kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. **Cardiovascular Research**; 68: 87-97, 2005.

NAGASE H, VISSE R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res** 69: 562–573, 2006.

NAKAMURA TY, GODA K, OKAMOTO T, KISHI T, NAKAMURA T, GOSHIMA K. Contractile and morphological impairment of cultured fetal mouse myocytes induced by oxygen radicals and oxidants. Correlation with intracellular Ca²⁺ concentration **Circ Res** 73: 758-770, 1993.

OECKLER RA, KAMINSKI PM, e WOLIN MS. Stretch enhances contraction of bovine coronary arteries via an NAD(P)H oxidasemediated activation of the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade. **Circ Res** 92: 23–31, 2003.

PAN D N, WEI L, YAO M, WAN D F, GU J R. Down-regulation of CT120A by RNA interference suppresses lung cancer cells growth. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, 85(23): 1601–1604, 2005.

PARK AJ, MATRISIAN LM, KELLS AF, PEARSON R, YUAN ZY, NAVRE M. Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the “cysteine switch.” **J Biol Chem** 266: 1584–1590, 1991.

PARSONS JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. **J Cell Sci** 116.38: 1409–1416, 2003.

PARSONS JT. Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins.**Curr Opin Cell Biol**; 8: 146–152, 1996.

PENG X, WU X, DRUSO JE, WEI H, PARK AYJ, KRAUS MS, ALCARAZ A, CHEN J, CHIEN S, CERIONE RA, GUAN JL Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice **PNAS**; 105: 6638 – 6643, 2008.

PHILLIPS RJ, BURDICK MD, HONG K, LUTZ MA, MURRAY LA, XUE YY, ET AL. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. **J Clin Invest**;114(3):438–446, 2004.

PHO M, LEE W, WATT DR, LASCHINGER C, SIMMONS CA, MCCULLOCH CA. Cofilin is a marker of myofibroblast differentiation in cells from porcine aortic cardiac valves. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** Apr;294(4):H1767-78. 2008.

PIPER C, SHULTHEISS HP, AKDEMIR D, RUDOLF J, HORSTKOTTE D, PAUSCHINGER M. Remodeling of the cardiac extracellular matrix differs between volume and pressure overload ventricles and is specific for each heart valve lesion. **J Heart Valve Disease.** 12 592-600, 2003.

POLAYAKOVA, V; HEIN, S; KOSTIN, S; ZIEGELHOEFFER, T e SCHAPER, J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. **J Am Coll Cardiol.:** 44, 1609-18, 2004.

QUAN TE, COWPER SE, BUCALA R. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. **Curr Rheumatol Rep;**8(2):145–150, 2006.

RHEE S, JIANG H, HO CH, GRINNELL F. Microtubule function in fibroblast spreading is modulated according to the tension state of cell-matrix interactions. **Proc Natl Acad Sci USA.** Mar 27;104(13):5425-30, 2007.)

RIDLEY AJ, SCHWARTZ MA, BURRIDGE K, FIRTEL RA, GINSBERG MH, BORISY G, PARSONS JT, HORWITZ AR. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science** 302: 1704–1709, 2003.

RONNOV-JESSEN, L., e PETERSEN, OW. A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts. **J. Cell Biol.** 134, 67–80, 1996.

ROSS RS. Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. **Cardiovasc Res** 63: 381–390, 2004.

RUSSO FP, ALISON MR, BIGGER BW, AMOFAH E, FLOROU A, AMIN F, ET AL. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. **Gastroenterology** 130(6):1807–1821, 2006;.

RUWHOF C, VAN DER LAARSE A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. **Cardiovasc Res** 47: 23–37, 2000.

SADOSHIMA J, JAHN L, TAKAHASHI T, KULIK TJ, e IZUMO S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. **J Biol Chem** 267: 10551–10560, 1992.

SAMAREL AM. Costameres, focal adhesions, e cardiomyocyte mechanotransduction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 289: 2291–2301, 2005.

SCHALLER MD, OTEY CA, HILDEBRAND JD, PARSONS JT. Focal Adhesion Kinase and Paxillin Bind to Peptides Mimicking Integrin Cytoplasmic Domains. **The Journal of Cell Biology**; 130: 1181-1185, 1995.

SCHLAEPFER DD, JONES KC, HUNTER T Multiple Grb2-Mediated Integrin-Stimulated Signaling Pathways to ERK2/Mitogen-Activated Protein Kinase: Summation of Both c-Src- and Focal Adhesion Kinase-Initiated Tyrosine Phosphorylation Events **Mol. Cell. Biol**; 18: 2571 – 2585, 1998.

SCHWARTZ MA, SCHALLER MD, GINSBERG MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Annu Rev Cell Dev Biol** ; 11: 549-599, 1995.

SERINI, G., e GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity e phenotypic modulation. **Exp. Cell Res.** 250, 273–283, 1999.

SHEETZ MP, FELSENFELD DP, GALBRAITH CG. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. **Trends Cell Biol** 8: 51–54, 1998.

SHELTON L, RADA JS. Effects of cyclic mechanical stretch on extracellular matrix synthesis by human scleral fibroblasts. **Exp Eye Res.** Feb;84(2):314-22, 2007

SHIKATA Y, RIOS A, KAWKITINARONG K, DEPAOLA N, GARCIA JG, E BIROKOV KG. Differential effects of shear stress e cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. **Exp Cell Res** 304: 40–49, 2005.

STREETER DD. Gross morphology e fiber geometry of the heart. In: Hebook of Physiology. The Cardiovascular System. The Heart. Bethesda, MD: **Am. Physiol. Soc., Sect. 2**, vol. I, chapt. 4, p. 61–112, 1979.

SUN Y, RAMIRES FJ, ZHOU G, GANJAM VK, e WEBER KT. Fibrous tissue and angiotensin II. **J Mol Cell Cardiol** 29: 2001–2012, 1997.

SUN Y, WEBER KT. Infarct scar: a dynamic tissue. **Cardiovasc Res.** May;46(2):250-6, 2000.

SUN Y., KIANI M.F., POSTLETHWAITE A.E., WEBER K.T., et al. Infarct scar as living tissue. **Basic Res. Cardiol.**97:343–347, 2002.

SUSSMAN A, MCCULLOCH A, BORG TK. Dancebandontheitanic:biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. **Circ Res.**; 91: 888-98.13, 2002.

SUURMEIJER AJ, CLÉMENT S, FRANCESCONI A, BOCCHI L, ANGELINI A, VAN VELDHUISEN DJ, SPAGNOLI LG, GABBIANI G, ORLANDI A. Alpha-actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study.**J Pathol.** 199(3):387-97, 2003.

SUZUKI T, AKASAKA Y, NAMIKI A, ITO K, ISHIKAWA Y, YAMAZAKI J, ISHII T. Basic fibroblast growth factor inhibits ventricular remodeling in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. **J Hypertens.** 26(12):2436-44, 2008.

THANNICKALVL, LEE DY, WHITE ES, CUI Z, LAIROS JM, CHACON R, HOROWITZ JC, DAY RM, THOMAS PE. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. **J. Biol. Chem.:** 278(14)12384- , 2003.

THOMAS, P. E., PETERS-GOLDEN, M., WHITE, E. S., THANNICKAL, V. J., AND MOORE, B. B. PGE₂ inhibition of TGF-β1-induced myofibroblast differentiation is Smad-independent but involves cell shape and adhesion-dependent signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 293, L417–L428, 2007.

TOMASEK JJ, GABBIANI G, HINZ B, CHAPONNIER C, BROWN RA: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol,** 3:349–363, 2002.

TORSONI AS, CONSTANCIO SS, NADRUZ. JRW, HANKS SK, FRANCHINI KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. **Circ Res;** 93: 140 – 147, 2003.

TOUTANT M, COSTA A, STUDLER JM, KADARÉ G, CARNAUD M, GIRAULT JA Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. **Mol. Cell. Biol;** 22: 7731 – 7743, 2002.

TRUTER SL, DUMLAO TF, LEE JA, LEE E, SUPINO PG, BORER JS. Vesnarinone-mediated alterations of gene expression in cardiac fibroblasts from aortic regurgitant hearts. **Am J Ther** 11: 328–336, 2004.

TYAGI SC, KUMAR S, GLOVER G. Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase by serum in human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells. **J Cell Biochem** 58: 360–371, 1995.

TYAGI SC, LEWIS K, PIKES D, MARCELLO A, MUJUMDAR VS, SMILEY LM, MOORE CK Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. **J Cell Physiol.**;176(2):374-82, 1998.

TYAGI SC, MATSUBARA L, WEBER KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. **Clin Biochem** 3: 191–198, 1993.

TYAGI SC, RATAJSKA A, WEBER KT. Myocardial matrix metalloproteinase(s): localization and activation. **Mol Cell Biochem** 126: 49–59, 1993.

van WAMEL JE, RUWHOF C, VAN DER VALK-KOKSHOORN EJ, SCHRIER PI, VAN DER LAARSE A. Rapid gene transcription induced by stretch in cardiac myocytes and fibroblasts and their paracrine influence on stationary myocytes and fibroblasts. **Pflugers Arch.**; 439: 781–788, 2000.

VAUGHAN MB., HOWARD EW., e TOMASEK JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast **Exp. Cell Res.** 257, 180–189, 2000.

VELARDE V, ULLIAN ME, MORINELLI TA, MAYFIELD RK, JAFFA AA. Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol.** 277(2 Pt 1):C253-61, 1999.

VILLARREAL FJ, KIM NN, UNGAB GD. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. **Circulation**; 88:2849–2861, 1993.

VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, biochemistry. **Circ Res** 92: 827–839, 2003.

VON HARSDORF R, KANG RE, FULLERTON M, WOODCOCK EA. Myocardial stretch stimulates phosphatidyl-inositol turnover. **Circ Res.**; 65: 494-501.12, 1989.

WANG J, LUKSE E, SETH A, MCCULLOCH CA. Use of conditionally immortalized mouse cardiac fibroblasts to examine the effect of mechanical stretch on alpha-smooth muscle actin. **Tissue Cell.**;33(1):86-96., 2001.

WANG J, SETH A, e MCCULLOCH CA. Force regulates smooth muscle actin in cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 279: H2776–H2785, 2000.

WANG J, ZOHAR R, MCCULLOCH CA. Multiple roles of α -smooth muscle actin in mechanotransduction. **Exp Cell Res.** 1;312(3):205-14, 2006.

WANG JG, MIYAZU M, MATSUSHITA E, SOKABE M, e NARUSE K. Uniaxial cyclic stretch induces focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation followed by mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. **Biochem Biophys Res Commun** 288: 356–361, 2001.

WANG JG, MIYAZU M, XIANG P, LI SN, SOKABE M, NARUSE K. Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway. **Life Sci.** Apr 29;76(24):2817-25, 2005.

WEBER K, JANICKI J, SCHROFF S, PICKR, CHEN R, BASHEY R. Collagen remodeling of the pressure-overload, hypertrophied nonhuman primate myocardium. **Circ Res** 62: 757-765, 1998.

WILLIS BC, DU BOIS RM, BOROK Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. **Proc Am Thorac Soc**;3(4):377–382, 2006.

WILSON CL, MATRISIAN LM. MATRILYSIN. **Matrix Metalloproteinases** 149–184, 1998.

WIPFF PJ, MAJD H, ACHARYA C, BUSCEMI L, MEISTER JJ, HINZ B The covalent attachment of adhesion molecules to silicone membranes for cell stretching applications. **Biomaterials**. Dec 26, 2008.

WOESSNER JF JR, NAGASE H. MMP sequences. **Matrix Metalloproteinases TIMPs** 11–41, 2000.

WU Y, HUANG A L, TANG N, ZHANG B Q, LU N F. RNA interference inhibits replication and expression of hepatitis B virus in mice. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, 85(9): 630–634 2005.

YAMADA K, GREEN KG, SAMAREL AM, SAFFITZ JE. Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch. **Circ Res**. 19;97(4):346-53, 2005.

YAO SUN e KARL T. WEBER. The RAS and connective tissue in the heart. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 35 919–931, 2003.

YOUNG AA, LEGRICE IJ, YOUNG MA, SMAILL BH Extended confocal microscopy of myocardial laminae and collagen network. **J Microsc**:.192:139-50, 1998.

YU DH, QU CK, HENEGARIU O, LU X, FENG GS Protein-tyrosine Phosphatase Shp-2 Regulates Cell Spreading, Migration, and Focal Adhesion **J. Biol. Chem.**; 273: 21125, 1998.

ZEISBERG EM, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, DORFMAN AL, MCMULLEN JR, GUSTAFSSON E, ET AL. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. **Nat Med** ;13(8):952–961, 2007.