

A influência do estímulo mecânico na expressão da quinase de adesão focal no osso *in vivo*

Gusmão, C.V.B.^I; Pauli, J.R.^{II}; Alves, J.M.^{III}; Velloso, L.A.^{II}; Saad, M.J.A.^{II}; Belangero, W.D.^I;

^ILaboratório de Biomecânica Ortopédica - LABIMO – DOT/FCM/UNICAMP

CP: 61111. Cidade Universitária, Campinas, SP. CEP: 13083-970

e-mail: vigusmao@yahoo.com, belanger@sigmanet.com.br

^{II}Laboratório de Biologia Molecular – DCM/FCM/UNICAMP

CP: 61111. Cidade Universitária, Campinas, SP. CEP: 13083-970

e-mail: msaad@fcm.unicamp.br, lavelloso@fcm.unicamp.br, rodrigose@fcm.unicamp.br

^{III}Escola de Engenharia de São Carlos – SEL/EESC/USP

São Carlos, SP. CEP: 13566-590

e-mail: jomalves@sc.usp.br

RESUMO

O estímulo mecânico sabidamente provoca deformação de proteínas da matriz extracelular e da célula óssea, as quais se tornam ativas e sinalizam reações intracelulares que determinam o aumento da massa óssea. Estudos apontam a quinase de adesão focal (FAK) como uma proteína fundamental na sinalização da deformação celular causada pelo estímulo mecânico no osso, mas há necessidade de estudos *in vivo* que comprovem esse papel.

Objetivos – Com o ultra-som de baixa potência, investigar a influência do estímulo mecânico na expressão da FAK no osso, e a possibilidade de detectar proteínas envolvidas com a proliferação celular óssea e muscular esquelética.

Material e Métodos – Tíbias e fíbulas de ratos foram estimuladas com ultra-som de baixa potência durante 20 min/uma vez ao dia, por períodos de 7, 14 e 21 dias. O grupo controle não foi estimulado. Cada grupo continha 7 ratos. Quinze horas após o último estímulo, a tíbia e a fíbula foram retiradas para realização de *immunoblotting*, utilizando anticorpos específicos para identificar FAK, FAK-Tyr(P)-397, *extracellular signal-regulated kinase-2* (ERK-2), ERK-1/2-Tyr(P)-204, *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) e IRS-2. O músculo esquelético da região estimulada foi extraído e submetido ao mesmo procedimento.

Resultados – Analisando-se os resultados de *immunoblotting* comparativamente com o grupo controle, não foram detectadas FAK e FAK-Tyr(P)-397 no tecido ósseo, enquanto ERK-2, ERK-1/2-Tyr(P)-204, IRS-1 e IRS-2 foram identificados. No músculo esquelético, todas as proteínas estudadas foram identificadas, exceto IRS-2.

Discussão e Conclusão: Os resultados sugerem que não deve haver quantidade suficiente de FAK no osso detectável pelo método utilizado. Por outro lado, observou-se que ERK-2, IRS-1 e IRS-2 são detectáveis no osso e devem responder ao estímulo mecânico. Além disso, o encontro dessas proteínas no tecido muscular abre novas perspectivas no estudo da influência das partes moles no processo de reparação do tecido ósseo.

Palavras chaves: Quinase de adesão focal, ultra-som, osteogênese, mecanotransdução, integrinas.

The influence of the mechanical loading on the expression of focal adhesion kinase in bone

ABSTRACT

It's widely known that mechanical deformation of bone promotes activation of some proteins in the extracellular matrix and bone cells. These proteins are responsible for signaling intracellular reactions that determine bone mass growth. Studies indicate focal adhesion kinase (FAK) as a crucial protein to signal mechanical deformation caused by mechanical loading on bone, but evidences *in vivo* are required to prove this role.

Objectives – Using a low-intensity ultrasound, investigate the influence of the mechanical loading on the expression of FAK in bone, and the possibility of detecting proteins involved on cellular proliferation of bone and skeletal muscle.

Material and methods – Tibiae and fibulae of 12-weeks-rats were stimulated by low-intensity ultrasound during 20 minutes/once a day for periods of 7, 14 and 21 days. There were 4 groups, each one containing 7 rats. The control group was not stimulated. Fifteen hours after the last stimulation, the tibia and fibula were extracted for immunoblotting procedures with specific antibodies in order to evaluate FAK, FAK-Tyr(P)-397, extracellular signal-regulated kinase-2 (ERK-2), ERK-1/2-Tyr(P)-204, insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and IRS-2. The skeletal muscle of the stimulated area was subjected to the same procedures.

Results – Comparing the results of the different groups, both FAK and FAK-Tyr(P)-397 were not detected in bone. However, ERK-2, ERK-1/2-Tyr(P)-204, IRS-1 and IRS-2 were identified. Moreover, all the proteins studied were detected in skeletal muscle except for IRS-2.

Discussion and conclusion – The results suggest there are no significant quantities of FAK in bone detectable by the methods used. In other hand, it was noted that ERK-2, ERK-1/2-Tyr(P)-204, IRS-1 and IRS-2 are detectable in bone and may be responsive to mechanical stimulation. In addition, the detection of these proteins in skeletal muscle, including FAK, opens up new perspectives on the study of the influence of this tissue on bone repair.

Keywords: Focal adhesion kinase, ultrasound, osteogenesis, mechanotransduction, integrins.

1 INTRODUÇÃO

O estímulo mecânico comprovadamente exerce papel fundamental na remodelação óssea [17]. Os osteoblastos e osteócitos contêm um arsenal de proteínas mecano-sensíveis capazes de realizar a mecanotransdução do estímulo mecânico, culminando em uma resposta celular que resultará em produção ou reabsorção ósseas [10]. Estudos apontam as integrinas e a quinase de adesão focal (FAK, do inglês *focal adhesion kinase*) como os principais candidatos a proteínas responsáveis pelas etapas iniciais da mecanotransdução do estímulo mecânico [2, 16]. A interação entre as integrinas e a FAK deve desencadear a ativação de vias de sinalização intracelular que estimulam a produção de osso e a manutenção da integridade deste tecido [7].

A porção extracelular das integrinas se conecta com proteínas da matriz extracelular (MEC), enquanto que a porção intracelular da subunidade β das integrinas se fixa ao citoesqueleto através de proteínas associadas à actina, como α -actinina, vinculina, paxilina e talina [4]. Esta interação MEC-integrinas-citoesqueleto deve formar um verdadeiro sistema de alavancas capaz de transmitir a deformação mecânica sofrida pelo osso até o citoplasma dos osteoblastos e dos osteócitos (Figura 1). Somando-se a isso, as integrinas formam verdadeiras adesões focais, que, quando são deformadas, organizam-se formando *clusters* e transmitem a deformação mecânica para as proteínas citoplasmáticas [12].

A molécula conectada à porção intracelular da subunidade β da integrina também pode ser a FAK. Assim, ou as proteínas do citoesqueleto, ou as integrinas, devem transmitir a deformação para a FAK, a qual é deformada mecanicamente, resultando na criação de um sítio – no resíduo de tirosina 397 – que possui alta afinidade para autofosforilação. A quantidade de FAK autofosforilada aumenta de modo tempo-dependente em resposta ao estímulo mecânico, voltando aos níveis de repouso depois de determinado intervalo de tempo. Estudos recentes mostram outro provável mecanismo de fosforilação da FAK, causada pela PYK2 (do inglês, *proline-rich tyrosine kinase 2*), a qual deve fosforilar diretamente a FAK em resposta ao estímulo mecânico. Esta molécula, presente na adesão focal é homóloga à FAK, tendo uma semelhança de 45% em relação à estrutura. Com a fosforilação da FAK, há a criação de um sítio de ligação de alta afinidade para os domínios de homologia 2 de Src (do inglês *Src homology 2*), da subunidade p85 da quinase fosfatidilinositol 3 (PI3K, do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*), uma quinase da família Src [13]. A fosforilação da subunidade p85 da PI3K, por sua vez, deve ativar a subunidade catalítica p110 da PI3K, ativando a via de sinalização PI3K/Akt, que ativa proteínas cuja atividade resulta na produção de osso [14]. Experimentos demonstram que a via PI3K/Akt, no entanto, não deve ativar a ERK-1/2 (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase-1/2*) [16].

Há evidências de que a ERK-1/2 controle a proliferação celular de vários tipos celulares incluindo os osteoblastos [9]. Um estudo provou que a isoforma ERK-2 é fosforilada de modo tempo-dependente em resposta à deformação mecânica do osso, em contraste com a isoforma ERK-1, cuja fosforilação foi muito fraca. O mesmo estudo demonstrou que tanto a inibição da PYK2 quanto a inibição da FAK causam forte diminuição da expressão da ERK-2 após estímulo mecânico, indicando que FAK e PYK2 devem ativar a ERK-2 [2]. Além disso, a ERK-1/2 deve ativar a expressão da enzima induzível *cox-2*, cuja expressão aumenta de maneira tempo-dependente após estímulo mecânico [16].

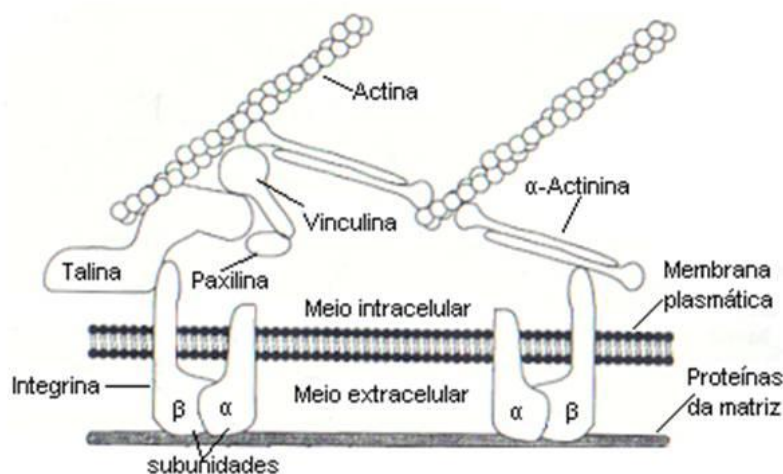


Figura 1: As integrinas interagem com as proteínas da MEC e do citoesqueleto, formando um sistema de alavancas que transmite o estímulo mecânico extracelular para dentro da célula. Talina, paxilina, vinculina, α -actinina e actina são proteínas do citoesqueleto das células ósseas. (traduzida de [4]).

Um meio utilizado para estimular mecanicamente as células ósseas, seja *in vitro*, ou *in vivo*, é o ultra-som (US) de baixa potência. Ele gera no interior do tecido ósseo tensões que não só se utilizam das propriedades piezoelétricas desse tecido como também devem produzir ondas mecânicas de choque [3] que estimulam as proteínas responsáveis pela transdução dessas tensões em estímulos elétricos e químicos que alteram favoravelmente o processo de neoformação óssea. Ademais, é amplamente comprovado em estudos com animais [3] e estudos clínicos [5] que o US de baixa potência acelera a regeneração óssea.

Outras moléculas envolvidas na proliferação e na manutenção da integridade do tecido ósseo são *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) e *insulin receptor substrate-2* (IRS-2). Essas moléculas são importantes para sinalização intracelular do IGF-1 (*insulin growth-like factor-1*) e da insulina, que são potentes reguladores anabólicos do metabolismo ósseo [11, 15]. O IRS-1 possui função anabólica [18] e está associado com a indução da formação do calo ósseo. Especula-se que ele mantém a remodelação óssea, estimulando tanto a formação quanto a reabsorção do osso [1]. O IRS-2, por sua vez, deve manter o predomínio da formação de osso em relação à reabsorção óssea [1].

No músculo esquelético, FAK, ERK-2 e IRS-1 têm funções bastante conhecidas e são objetos de inúmeras pesquisas, devido à relação dessas proteínas entre si e com as vias de sinalização intracelular desencadeadas pela insulina e que incitam a proliferação celular. Porém, a relação dessas proteínas com o estímulo mecânico é pouco estudada nesse tecido, assim como pouco se sabe sobre a influência das partes moles na reparação do osso [6, 8].

Apesar do avanço das pesquisas, o conhecimento sobre o comportamento da FAK em resposta à deformação mecânica do tecido ósseo permanece incompleto e não foram encontrados estudos com a finalidade de avaliar o comportamento desta proteína *in vivo*. Além disso, a semelhança das vias da FAK, ERK-2 e IRS-1/2 sugere uma relação entre essas moléculas que pode influenciar a resposta celular ao estímulo mecânico. Em virtude desses fatos, o presente estudo tem como objetivos investigar, com base em um modelo de estudo *in vivo* e utilizando o ultra-som de baixa potência, a resposta da FAK ao estímulo mecânico no osso, e investigar a possibilidade de detecção de outras proteínas envolvidas na proliferação dos tecidos ósseo e muscular esquelético.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 28 ratos *Wistar* machos com 12 semanas de idade, que foram mantidos em ambiente a 25°C, com ciclos escuro-claro fixos (12/12 horas), recebendo água potável e dieta padrão à vontade.

2.2 Material Utilizado

Foram utilizados reagentes e aparelhos para eletroforese em dodecil sulfato de sódio e gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) adquiridos da Bio-rad (Richmond, CA, USA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20 e glicerol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 μm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O quimio-reagente (solução de quimiluminescência) foi obtido da Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL). Os anticorpos policlonais de coelhos, específicos para FAK-N-Terminal, FAK-Tyr(P)-397, IRS-1 e IRS-2 foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). O anticorpo monoclonal de camundongo específico para ERK-1/2-Tyr(P)-204 foi obtido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Os anticorpos secundários peroxidase conjugada anti-anticorpo de coelho e peroxidase conjugada anti-anticorpo de camundongo, ambos provenientes de cabras, foram obtidos da Invitrogen Brasil Ltda. (SP, BRA). O equipamento de ultra-som de baixa potência (pulso de 200 ms de ondas senoidais na frequência de 1,5 MHz, repetindo-se na frequência de 1 KHz e potência de 30 mW/cm^2) modelo Exogem 2000⁺ (*Sonic Accelerated Fracture Healing System* (SAFHS) foi cedido pela Smith & Nephew Inc. (Memphis, TE, USA).

2.3 Estímulo com Ultra-som de Baixa Potência

Os pares de tíbias e de fíbulas dos animais foram estimulados ao mesmo tempo com o ultra-som de baixa potência durante 20 minutos uma vez ao dia. Os 28 ratos foram distribuídos igualmente em quatro grupos: 1- grupo 7 dias: foram submetidos ao estímulo com o ultra-som (US) de baixa potência durante sete dias; 2- grupo 14 dias: foram submetidos ao estímulo com o US de baixa potência durante 14 dias; 3- grupo 21 dias: foram submetidos ao estímulo com o US de baixa potência durante 21 dias; 4- grupo controle: não foram submetidos ao estímulo com o US de baixa potência.

Para as sessões de estímulo, os animais foram mantidos dentro de um tubo de PVC fechado em uma de suas extremidades simulando um abrigo para atrair e acalmar o animal, além de contê-lo. Foram feitos vários furos no tubo para permitir a respiração do animal. O tamanho do tubo foi planejado de modo que somente os membros posteriores dos ratos ficassem expostos, possibilitando o contato com o transdutor do equipamento emissor de US e estímulo simultâneo de ambos os membros (Figura 2).

2.4 Procedimentos com Animais para Extração das Proteínas Teciduais

Quinze horas após o último estímulo (7^o estímulo para o grupo 7, 14^o estímulo para o grupo 14 dias e 21^o estímulo para o grupo 21 dias), os animais foram anestesiados por via peritoneal com tiopental sódico (50 mg/kg) para a extração das tíbias e das fíbulas e em seguida sacrificados. Cada conjunto de quatro ossos (1 par de tíbias e 1 par de fíbulas) retirados de cada rato foi submetido aos seguintes procedimentos:

O grupo de ossos foi, logo em seguida à extração do material, imerso em um cadinho contendo N_2 líquido, colocado sobre uma placa metálica e coberto com um plástico resistente para ser macerado. Os fragmentos resultantes foram imersos em cadinho contendo N_2 líquido e depois macerados no cadinho com a utilização de um soquete até obter um pó ósseo. Adicionou-se N_2 líquido novamente ao cadinho contendo o pó, que foi macerado com o soquete para deixar o pó mais fino. Este foi introduzido em um tubo de ensaio contendo “Tampão de Imunoprecipitado” (trisma base a 100 mM, EDTA a 10 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, ortovanadato de sódio a 10 mM, PMSF a 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X-100 a 1% e 0,1 mg/mL de aprotinina).

Em seguida, o material foi homogeneizado com o *Polytron* PTA 20S (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) durante 30 segundos, operado em velocidade máxima. Durante e após a homogeneização, o tubo de ensaio foi mantido em gelo para evitar a degradação das proteínas. Ao final da extração, adicionou-se Triton X-100 1% em todas as amostras, mantidas em gelo. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação, em velocidade de 11.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel. O sobrenadante foi estocado em tampão de Laemmli, contendo 200mM de DTT em uma proporção de 4:1 (uma parte de Laemmli para quatro de material extraído), até a fase seguinte. Outra pequena porção do sobrenadante foi utilizada para quantificação da concentração proteica de cada amostra, através do método colorimétrico de Biuret.

Além disso, o músculo esquelético da região onde o complexo tíbia-fíbula foi estimulado com ultra-som de baixa potência – correspondente no ser humano aos músculos cabeça lateral do gastrocnêmio, fibular longo e sóleo – foi retirado e introduzido em um tubo de ensaio contendo “Tampão de Imunoprecipitado” para ser submetido ao mesmo procedimento do conjunto de quatro ossos correspondente. O músculo esquelético foi utilizado para se certificar de que o processo de *immunoblotting*, os reagentes e os anticorpos utilizados funcionaram corretamente.



Figura 2: Observa-se o rato mantido no tubo de PVC e cada transdutor de dois equipamentos de US em contato com cada uma das patas posteriores do animal.

2.5 “Immunoblotting”

Alíquotas contendo 250 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), feito em concentração de 12% e com 1,5 mm de espessura. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese (trisma base a 200 mM, glicina a 1,52 M, EDTA a 7,18 mM, SDS a 0,4%), previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*), quando então foi submetido a 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad* e a solução tampão para transferência (trisma base a 25 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20% e SDS a 0,02%) mantidos em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram bloqueadas com leite em pó desnatado (Molico®) a 5% por 2 horas, à temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução basal (cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, Tween 20 a 0,02%) por 3 sessões de 10 minutos e incubadas com anticorpos para FAK, ERK-2, ERK-1/2-Tyr(P)-204, IRS-1, IRS-2 (todos na proporção 1:1000) e FAK-Tyr(P)-397 (1:3000) sob agitação constante por 12 horas a 4°C. Depois, as membranas foram novamente lavadas com solução basal por 3 sessões de 8 minutos e incubadas com o anticorpo secundário peroxidase conjugada anti-anticorpo de coelho obtido em cabra (1:7500), ou peroxidase conjugada anti-anticorpo de camundongo obtido em cabra, por 3 horas à temperatura ambiente. Após o tempo, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos. Em seguida, adicionou-se solução de quimiluminescência em cada membrana por 3 minutos. Então, as membranas foram expostas ao filme de R-X (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassette. Cerca de 10 minutos depois, os filmes foram revelados na forma convencional.

3 RESULTADOS

3.1 Identificação da FAK e de FAK Fosforilada em Tirosina 397 (P-FAK) após Estímulo Ultra-sônico

Realizou-se *immunoblotting* com anticorpos anti-FAK-N-terminal para detectar expressão de FAK nos ossos de ratos não estimulados com US de baixa potência e comparar com a expressão de FAK nos ossos dos ratos estimulados, bem como comparar a expressão da proteína entre os diferentes grupos. Os mesmos anticorpos foram utilizados na detecção da expressão de FAK no músculo esquelético dos ratos de cada grupo estudado, para atestar o funcionamento correto do método. Essa proteína não foi identificada nos ossos dos grupos estudados, bem como do grupo controle. Por outro lado, observou-se forte expressão de FAK no tecido muscular em todos os grupos (Figura 3).

O *immunoblotting* com anticorpos anti-FAK-Tyr(P)-397 foi realizado para detectar a expressão de FAK fosforilada em tirosina 397 nos ossos dos animais e comparar os resultados entre os grupos estudados. Do mesmo modo, este procedimento foi realizado visando detectar P-FAK no músculo esquelético, utilizando esse tecido como indicador do funcionamento correto do método. No tecido ósseo, não foi observada P-FAK em nenhum dos grupos. Em contrapartida, detectou-se P-FAK no tecido muscular esquelético, em todos os grupos estudados (Figura 4).

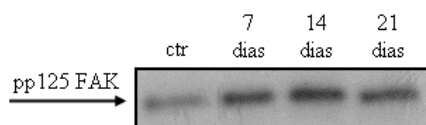


Figura 3: Identificação da FAK no tecido muscular esquelético da região estimulada com o ultra-som de baixa potência, nos grupos controle (ctr), de 7 dias, de 14 dias e de 21 dias.

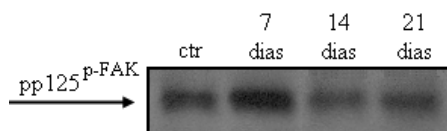


Figura 4: Identificação da P-FAK no tecido muscular esquelético da região estimulada com o ultra-som de baixa potência, nos grupos controle (ctr), de 7 dias, de 14 dias e de 21 dias.

3.2 Identificação de ERK-2 e ERK-1/2 Fosforilada após Estímulo Ultra-sônico

Foi feito *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para ERK-2, com o intuito de detectar a expressão dessa proteína em ossos dos ratos de cada grupo estudado e comparar com os resultados obtidos para a FAK. O tecido muscular esquelético foi utilizado como indicador do funcionamento correto do método, sendo submetido ao mesmo procedimento do tecido ósseo. Identificou-se expressão de ERK-2 em todos os grupos estudados em ambos os tecidos (Figuras 5 e 6).

Para detectar fosforilação da ERK-1/2 nos ossos dos ratos de cada grupo estudado e comparar com os resultados da P-FAK, executou-se *immunoblotting* com anticorpos anti-ERK-1/2-Tyr(P)-204. O tecido muscular esquelético foi utilizado como indicador do funcionamento correto do método. Notou-se a presença de ERK-1/2 fosforilada em ambos os tecidos para todos os grupos avaliados (Figuras 7 e 8).

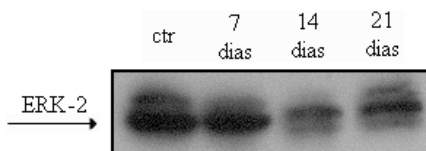


Figura 5: Identificação de ERK-2 no tecido ósseo do grupo controle (ctr) e dos grupos submetidos ao estímulo com o ultra-som de baixa potência por 7, 14 e 21 dias.

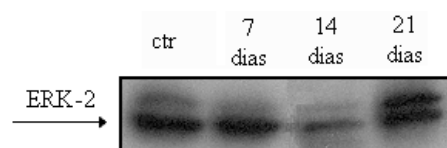


Figura 6: Identificação de ERK-2, no tecido muscular esquelético da região estimulada com o ultra-som de baixa potência, nos grupos controle (ctr), de 7 dias, de 14 dias e de 21 dias.

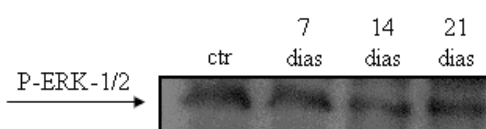


Figura 7: Identificação de P-ERK-1/2, no tecido ósseo, no grupo controle (ctr) e nos grupos submetidos ao estímulo com o ultra-som de baixa potência por 7, 14 e 21 dias.

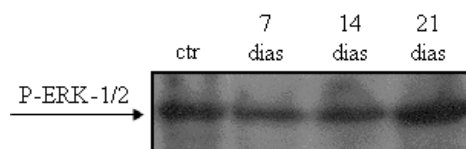


Figura 8: Identificação de P-ERK-1/2, no tecido muscular esquelético da região estimulada com o ultra-som de baixa potência, nos grupos controle (ctr), de 7 dias, de 14 dias e de 21 dias.

3.3 Identificação de IRS-1 e IRS-2 após Estímulo Ultra-sônico

O *immunoblotting* foi realizado para detectar a expressão de IRS-1 e IRS-2 nos ossos dos ratos de cada grupo estudado e comparar com os achados da FAK, utilizando-se, respectivamente, anticorpos anti-IRS-1 e anti-IRS-2. O tecido muscular foi utilizado como marcador da função correta do método. Detectou-se IRS-1 no tecido ósseo apenas no grupo de sete dias (Figura 9), enquanto que no músculo esquelético esta proteína foi detectada em todos os grupos (Figura 10). Já o IRS-2 foi encontrado no tecido ósseo em todos os grupos avaliados, enquanto que no tecido muscular não foi observado (Figura 11).

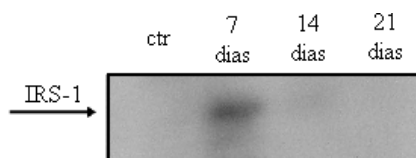


Figura 9: Identificação de IRS-1 ósseo apenas no grupo de 7 dias.

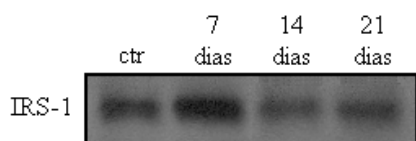


Figura 10: Identificação de IRS-1, no tecido muscular esquelético da região estimulada com o ultra-som de baixa potência, nos grupos controle (ctr), de 7 dias, de 14 dias e de 21 dias.

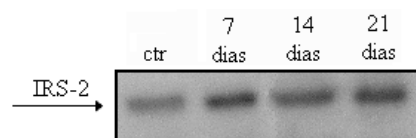


Figura 11: Identificação de IRS-2, no tecido ósseo, no grupo controle e nos grupos submetidos ao estímulo com o ultra-som de baixa potência por 7, 14 e 21 dias.

4 DISCUSSÃO

O ultra-som de baixa potência gera no interior do tecido ósseo tensões que devem produzir ondas mecânicas de choque que deformam a MEC óssea [3]. As proteínas da MEC, quando deformadas, atuam como um sistema de alavancas que transmite a sua deformação para as integrinas dos osteoblastos e osteócitos. Através do mesmo sistema de alavancas, as integrinas transmitem a deformação sofrida pela MEC para os constituintes do citoesqueleto (actina, α -actinina, paxilina, talina, vinculina), constituindo a interação matriz-integrina-citoesqueleto (Figura 1). Acredita-se que a FAK se liga à subunidade β da integrina ou a alguma proteína do citoesqueleto. Portanto, a deformação desse sistema levaria à deformação da estrutura molecular da FAK, criando nesta molécula um sítio em tirosina 397 de alta afinidade para autofosforilação. A partir daí, ela deve ativar vias de sinalização intracelular, uma das quais resultará na ativação da ERK-2, que quando ativada induz favoravelmente o processo de neoformação óssea.

A literatura atualmente disponível sobre as vias de sinalização no campo da mecanobiologia óssea é fundamentada em estudos *in vitro*, que são capazes de detectar a FAK e a ERK-2 – e outras proteínas ósseas –, bem como suas formas ativadas. Mesmo assim, suas funções remanescem parcialmente desconhecidas.

Além disso, o estudo *in vitro* pode mascarar os reais efeitos do estímulo mecânico no osso, por uma série de fatores, como a falta de interação com a vasculatura do osso, fatores hormonais (p.ex. a glândula paratireóide) e a própria arquitetura tridimensional do osso. Por isso, este estudo, pioneiro na investigação *in vivo* dos mecanismos moleculares que estão envolvidos na mecanobiologia óssea, foi desenvolvido.

A primeira hipótese desse estudo era de que a FAK possui papel fundamental na mecanotransdução do estímulo mecânico no osso, isto é, na transformação da deformação celular mecânica produzida pelo estímulo mecânico em sinal bioquímico capaz de ativar cascatas de reações celulares. Sendo assim, a FAK deveria existir em abundância na célula óssea, sendo facilmente detectável, e deveria aumentar em quantidade conforme aumentasse a duração do estímulo para neoformação óssea. Em adição, ela deveria ser fortemente ativada após uma sessão de 20 min de estímulo ultra-sônico, permitindo a detecção de P-FAK.

Em segundo lugar, após estimulação mecânica suprafisiológica de longa duração, i.é., por períodos de 7, 14 e 21 dias, as células ósseas deveriam sofrer uma adaptação fisiológica que resultasse na otimização da resposta celular ao estímulo mecânico e, então, a produção óssea seria “facilitada”, tornando-se mais rápida. Consequentemente, após estímulo com ultra-som de longa duração, um estímulo mecânico mais “fraco” que o suprafisiológico seria eficiente para ativar intensamente a FAK, mais que se não tivesse ocorrido essa adaptação fisiológica. Desse modo, mesmo 15 horas após a última sessão de 20 min de estímulo ultra-sônico, tempo este que vai além do tempo de 4 horas necessário para a FAK atingir seu pico de ativação [2], seria possível observar fosforilação da FAK em tirosina 397. Tal fenômeno deveria ser melhor observado nos grupos de 7 e 14 dias de estímulo, porque é quando a quantidade de osso começa a aumentar significativamente [3]. Por outro lado, esse fenômeno não deveria ocorrer na terceira semana, pois a quantidade de osso neoformado seria maior que o necessário para suportar o estímulo mecânico suprafisiológico, o que possivelmente acionaria de maneira mais eficaz os mecanismos de reabsorção óssea que poderiam inibir a autofosforilação da FAK; e/ou a maior quantidade de osso poderia causar menor deformação do sistema matriz-integrina-citoesqueleto, o que resultaria em menor ativação da FAK.

Contudo, o método utilizado não foi capaz de detectar a FAK nas tíbias e fíbulas dos animais do grupo controle, nem dos animais estimulados. As possíveis explicações para esse resultado são:

- 1- O osso é um material difícil para trabalhar, sendo preciso elaborar uma estratégia para a extração do osso e desenvolver equipamentos para conseguir a maceração do osso até o estado de pó. Foi preciso aperfeiçoar várias vezes essa estratégia, pois é necessário relativamente muito tempo para obter o pó ósseo, o que pode resultar em degradação das proteínas ósseas e a perda desse material, mesmo com os cuidados tomados de utilizar N₂ líquido – para frear a degradação protéica – e “tampão de imunoprecipitado” – para inibir as proteases. Depois da obtenção do pó, este deve ser homogeneizado com o uso de *Polytron PTA 20S*, cuja função é triturar ainda mais o osso, e para que o *Polytron* consiga triturar bem o osso, é necessário que o pó esteja bem feito. Um erro em qualquer dessas etapas e/ou no *immunoblotting* prejudicaria todo o experimento.
- 2- Deve haver baixa expressão de FAK no osso, o suficiente para não haver detecção dessa proteína pelo método empregado. Se isso for verdadeiro, pode-se inferir que a FAK não é o único mecanotransdutor em nível celular e não deve exercer papel fundamental na mecanotransdução, mas isso não quer dizer que a FAK não seja importante para a célula. Isso quer dizer que deve haver outros mecanismos pelos quais a célula detecta o estímulo mecânico e o converte em sinal bioquímico celular. Esses mecanismos devem se somar e o resultado disso determina os rumos da remodelação óssea, demonstrando que o tecido ósseo é finamente regulado. Essa explicação é coerente porque um tecido tão complexo quanto o ósseo não deve ser regulado apenas por um mecanotransdutor intracelular, caso contrário o osso seria sujeito a freqüentes displasias.

Sabe-se que o músculo esquelético expressa marcadamente a FAK [6, 8], e, por ser um tecido mole, é mais fácil de ser analisado. Sendo assim, junto com o osso extraiu-se músculo esquelético da região onde o complexo tíbia-fíbula foi estimulado, que corresponde no ser humano aos músculos cabeça lateral do gastrocnêmio, fibular longo e sóleo. Essa porção de músculo esquelético foi utilizada como um controle e submetida ao *immunoblotting* junto com o osso, pois se especulou que se a etapa de *immunoblotting* fosse bem sucedida, as bandas protéicas correspondentes ao tecido muscular esquelético seriam visíveis. Os resultados do presente estudo revelaram forte expressão da FAK, bem como sua fosforilação, no músculo esquelético, demonstrando que os reagentes utilizados para inibir a degradação protéica na extração dos tecidos e que todo o *immunoblotting* funcionaram corretamente. Além disso, a fosforilação da FAK significa que esta proteína mantém-se ativada 15 horas após o último estímulo com US, mas não necessariamente por conta desse estímulo, pois o grupo controle também revelou ativação da FAK. Um posterior estudo que analise a diferença de densidade das bandas protéicas poderá informar se o US de baixa potência é responsável por uma ativação prolongada da FAK no músculo esquelético após estimulação a longo prazo,

além de revelar se a expressão da FAK aumenta nos músculos dos ratos estimulados em relação ao grupo controle.

Somando-se a isso, foram analisadas as proteínas ERK-2, ERK-1/2 fosforilada, IRS-1 e IRS-2, em ambos os tecidos. Sugeriu-se que sendo possível detectar pelo menos uma delas no osso significa que o método elaborado para extração de osso foi bem sucedido e fornece um argumento a favor da hipótese de que há baixa expressão de FAK neste tecido. Os resultados revelaram expressão de ERK-2, IRS-1 e IRS-2, bem como a ativação de ERK-1/2, no osso, abrindo novas perspectivas de estudo *in vivo* para esse tecido, pois um estudo que investigue as diferenças de expressão dessas proteínas em cada grupo poderá indicar se tais proteínas sofrem influência do estímulo mecânico provocado pelo US. Em adição, é interessante notar a detecção da ERK-2 e de ERK-1/2 fosforilada, porque a literatura aponta que essa proteína é ativada pela FAK [2]. A detecção da ERK-2 e de ERK-1/2 fosforilada enquanto que a FAK e P-FAK não foram detectadas sugere que a ERK-2 também é ativada por outras proteínas e deve ter grande importância na neoformação do tecido ósseo. Resultados de outros estudos sustentam essa hipótese, pois demonstraram que a FAK e IRS-1/2 promovem ativação da ERK-1/2, a qual incita a proliferação celular [6, 8]. Além disso, propõe-se que a isoforma da ERK fosforilada identificada neste experimento seja a isoforma ERK-2, pois a literatura tem apontado sua maior importância na resposta à deformação mecânica do osso em relação à ERK-1 [2]. Um estudo pormenorizado poderá identificar qual das isoformas estava ativada. Em adição, é provável que o IRS-2 seja mais expresso no tecido ósseo que o IRS-1, pois foi detectado em todos os grupos, enquanto que o IRS-1 foi identificado apenas no grupo de sete dias. A confirmação dessa hipótese indica que a isoforma IRS-2 é mais importante que a isoforma IRS-1 para o tecido ósseo.

No músculo esquelético, com exceção do IRS-2, todas as proteínas foram detectadas, algo que não surpreende em vista dos dados da literatura [6, 8]. Um estudo que compare a expressão e a ativação de cada proteína ao estímulo mecânico em cada grupo estudado poderá demonstrar se elas são influenciadas pelo estímulo mecânico. Aventa-se que se isso for verdadeiro para pelo menos uma das proteínas avaliadas nesse estudo, provavelmente é porque elas respondem diretamente à deformação mecânica e/ou interação bioquimicamente com o tecido ósseo. Sendo ambas as hipóteses verdadeiras, pode-se inferir que o músculo esquelético exerce influência no reparo do osso bem como na manutenção da integridade deste tecido, o que é muito intrigante e levanta novas perspectivas para estudos da interação das partes moles com o tecido ósseo.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que o método utilizado não é sensível o suficiente para detectar a FAK mesmo com estimulação mecânica com US de baixa potência, em virtude de sua baixa expressão no osso, e provavelmente também não é sensível para detectar outras proteínas pouco expressas neste tecido. Por outro lado, os resultados obtidos analisando ERK-2, ERK-1/2 fosforilada, IRS-1, IRS-2 revelaram que o método foi realizado corretamente e é capaz de detectar certas proteínas no tecido ósseo, abrindo novas perspectivas de estudo *in vivo* para ERK-2, IRS-1 e IRS-2 no campo da mecanobiologia óssea. Somando-se a isso, este estudo questiona se o estímulo mecânico influencia a expressão das proteínas do músculo esquelético e se este tecido exerce influência na remodelação óssea, além de demonstrar a facilidade de analisar o músculo esquelético. O estudo *in vivo* retrata com fidelidade os fenômenos que ocorrem nos tecidos biológicos, e esta pesquisa deve ser a primeira de várias pesquisas futuras para investigar tais fenômenos.

6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Antônio Ramos Calixto, técnico do Laboratório de Fisiopatologia Cardíaca da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas por ter cedido os anticorpos anti-FAK-N-terminal, anti-FAK-Tyr(P)-397 e anti-ERK-2; e à agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de iniciação científica concedida.

7 BIBLIOGRAFIA

- [1] AKUNE, T., OGATA, N., HOSHI, K., *et al*, “Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts”, *The Journal of Cell Biology*, v. 159, n. 1, pp. 147-156, Oct. 2002.
- [2] BOUTAHAR, N., GUIGNANDON, A., VICO, L., *et al*, “Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of Focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 29, pp. 30588-30599, Jul. 2004.

- [3] DUARTE, L.R., “The stimulation of bone growth by ultrasound”, *The new face of Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 101, n. 3, pp. 153-159, 1983.
- [4] DUNCAN, R.L., TURNER, C.H., “Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain”, *Calcified Tissue International*, v. 57, pp. 344-358, Nov. 1995.
- [5] HECKMAN, J.D., RYABY, J. P., McCABE, J.M., *et al*, “Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound”, *Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 76, n. 1, pp. 26-34, Jan. 1994.
- [6] HUANG, D., KHOE, M., ILIC, D., *et al*, “Reduced expression of focal adhesion kinase disrupts insulin action in skeletal muscle cells”, *Endocrinology*, Mar. 2006.
- [7] HUGHES-FULFORD, M., “The role of signaling pathways in osteoblast gravity perception”, *Journal of Gravitational Physiology*, v. 9, n. 1, pp. 257-260, Jul. 2002.
- [8] KUMAR, A., MURPHY, R., ROBINSON, P., *et al*, “Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, Rac-1 GTPase, and NF-kappaB transcription factor”, *FASEB Journal*, v. 18, n. 13, pp. 1524-1535, Oct. 2004.
- [9] LAI, C.F., CLAUDHARY, L., FAUSTO, A., *et al*, “Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 17, pp. 14443-14450, Apr. 2001.
- [10] NOMURA, S., TAKANO-YAMAMOTO, T., “Molecular events caused by mechanical stress in bone”, *Matrix Biology*, v. 19, pp. 91-96, May. 2000.
- [11] OGATA, N., CHIKAZU, D., KUBOTA, N., *et al*, “Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone”, *The Journal of Clinical Investigation*, v. 105, n. 7, pp. 935-943, Apr. 2000.
- [12] PLOPPER, G.E., MCNAMEE, H.P., DIKE, L.E., *et al*, “Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex”, *Molecular Biology of the Cell*, v. 6, pp. 1349-1365, Oct. 1995.
- [13] SCHLAEPFER, D.D., HAUCK, C.R., SIEG, D.J., “Signaling through focal adhesion kinase”, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 71, n. 3-4, pp. 435-478, 1999.
- [14] SCHLAEPFER, D.D., HUNTER, T., “Integrin signaling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?”, *Trends Cell Biology*, v. 8, n. 4, pp. 151-157, Apr. 1998.
- [15] SHIMOAKA, T., KAMEKURA, S., CHIKUDA, H., *et al*, “Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 15, pp. 15314-15322, Apr. 2004.
- [16] TANG, C.H., YANG, R.S., HUANG, T.H., *et al*, “Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, FAK, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway in osteoblasts”, *Molecular Pharmacology*, v. 69, n. 6, pp. 2047-2057, Jun. 2006.
- [17] TURNER, C.H., FORWOOD, M.R., OTTER, M.W., “Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow?”, *FASEB Journal*, v. 8, n. 11, pp. 875-878, Aug. 1994.
- [18] YAMAGUCHI, M., OGATA, N., SHINODA, Y., *et al*, “Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice”, *Endocrinology*, v. 146, n. 6, pp. 2620-8, Jun. 2005.