

Efeito do ultra-som de baixa potência na expressão da FAK (*focal adhesion kinase*), ERK-2 (*extracellular signal-regulated kinase-2*) e IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) no osso *in vivo*

1.RESUMO

Os eventos moleculares desencadeados pela deformação mecânica do tecido ósseo provocada pelo ultra-som de baixa potência (USbp), resultando em neoformação óssea, são pouco conhecidos. Neste estudo, foi desenvolvido um modelo de estudo em rato para investigar o comportamento de FAK, ERK-2 e IRS-1 no tecido ósseo, após estímulo mecânico com USbp. Para tanto, tíbias e fíbulas de ratos foram estimuladas com o USbp durante 20 minutos uma vez ao dia, por 7, 14 ou 21 dias, ou não receberam estímulo. Após 15 horas do último estímulo, os ossos foram retirados para análise protéica por meio de *immunoblotting*. Verificou-se que o USbp aumenta a expressão de FAK, ERK-2 e IRS-1 de modo não dependente do tempo, sugerindo que o USbp não exerce efeito cumulativo sobre a síntese protéica. Apesar disso, a detecção da FAK fosforilada no grupo de 7 dias indica que o USbp favorece a permanência da FAK ativada por longo período, mantendo o estímulo para produção de osso por mais tempo. Além disso, a não detecção de FAK e IRS-1 no grupo controle indica que a expressão dessas proteínas é baixa, enquanto que a ERK-2 – identificada nesse grupo –, é bastante expressa, porque é ativada por várias proteínas. Os resultados, porém, não permitem afirmar que o IRS-1 responde diretamente à estimulação mecânica, pois essa proteína está envolvida com a entrada de glicose na célula e efeitos anabolizantes. Desse modo, seu aumento pode ser devido ao maior gasto energético

promovido pela síntese protéica e não necessariamente pela deformação celular.

2.INTRODUÇÃO

Está amplamente comprovado que a remodelação do tecido ósseo é influenciada pela deformação mecânica sofrida por este tecido, por meio da ativação e inativação de vias intracelulares ainda pouco conhecidas ^{1,2}. Uma dessas vias é a da FAK (*focal adhesion kinase*), mediada pelas integrinas, e que se tornou o grande foco das pesquisas atuais, por ser considerada uma proteína fundamental para a indução da neoformação óssea após deformação mecânica deste tecido ^{3,4}. Estudos sugerem que integrinas, em especial $\alpha 5\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, são deformadas após aplicação de carga mecânica sobre o tecido ósseo, com deformação subsequente da FAK, e autofosforilação desta proteína em Tyr-397. A partir dessa etapa, ocorre acoplamento da FAK com proteínas contendo o domínio SH₂/SH₃, incitando a ativação de uma complexa cascata de reações intracelulares que culminam na ativação de proteínas responsáveis pela proliferação de tecido ósseo, como a ERK-2 (*extracellular signal-regulated kinase-2*) ^{5,6,7}.

Além do estímulo mecânico, o estímulo hormonal também induz a neo-osteogênese pela ação da insulina, a qual se liga ao receptor de insulina, promovendo a ligação deste ao IRS-1 ou IRS-2 (*insulin receptor substrate-1 ou 2*, respectivamente) ^{8,9}. O IRS-1/2, então, sofre fosforilação, desencadeando uma cascata de reações intracelulares que, assim como na via da FAK, resultam na ativação de ERK-2 e outras proteínas responsáveis pela proliferação do tecido ósseo ¹⁰. No entanto, não se sabe se a ativação de IRS-1 e IRS-2 também é influenciada pelo estímulo mecânico.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo de estudo em rato que utiliza o ultra-som de baixa potência (30mW/cm²) ^{11,12} para avaliar a expressão tecidual da FAK, ERK-

2 e IRS-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

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

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 (PMSF), 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 e IRS-1 foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Os anticorpos secundários peroxidase conjugada anti-anticorpo de coelho, 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/cm²) modelo Exogem 2000⁺ (*Sonic Accelerated Fracture Healing System* (SAFHS) foi cedido pela Smith & Nephew Inc. (Memphis, TE, USA).

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 (USbp) durante 20 minutos uma vez ao dia. Os 28 ratos foram distribuídos igualmente em quatro grupos: 1- grupo sete dias: foram submetidos ao estímulo com o USbp durante sete dias; 2- grupo 14 dias: foram submetidos ao estímulo com o USbp durante 14 dias; 3- grupo 21 dias: foram submetidos ao estímulo com o USbp durante 21 dias; 4- grupo controle: não foram submetidos ao estímulo com o USbp.

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 USbp e estímulo simultâneo de ambos os membros (Figura 1).



Figura 1. Observa-se o rato mantido no tubo de PVC e cada transdutor de dois equipamentos de USbp em contato com cada uma das patas posteriores do animal.

Procedimentos com animais para a extração das proteínas teciduais

Quinze horas após o último estímulo (7º estímulo para o grupo “sete dias”, 14º estímulo para o grupo “14 dias” e 21º 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 (um par de tíbias e um par de fíbulas) retirados de cada rato foi submetido aos seguintes procedimentos:

Imediatamente após a retirada dos ossos, estes foram imersos em um cadinho contendo N₂ líquido e macerados. Os fragmentos resultantes foram imersos em cadinho contendo N₂ líquido e depois macerados no cadinho com a utilização de um soquete até obter-se um pó. Adicionou-se N₂ 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 protéica de cada amostra, através do método colorimétrico de Biureto.

Immunoblotting

Alíquotas contendo 250µg 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 40 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 e IRS-1 (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 três sessões de 8 minutos e incubadas com o anticorpo secundário peroxidase conjugada ao anti-anticorpo de coelho obtido em cabra (1:7500), por 2 horas à temperatura ambiente. Após o tempo, as membranas foram lavadas com solução basal por três 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 cassete. Cerca de 10 minutos depois, os filmes foram revelados na forma convencional.

Análise dos resultados

A intensidade das bandas foi determinada pela leitura das auto-radiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando-se um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation). Foram obtidas a média e o erro padrão da média dos valores da leitura das bandas. O teste estatístico ONE-WAY-ANOVA foi realizado para avaliar a diferença entre os grupos estudados.

4. RESULTADOS

Identificação da FAK

Realizou-se *immunoblotting* com anticorpos anti-FAK-N-terminal para detectar expressão de FAK nos ossos de ratos não estimulados com USbp e comparar com a expressão de FAK nos ossos dos ratos estimulados, bem como comparar a expressão da proteína entre os diferentes grupos. Esta proteína foi identificada apenas nos grupos estimulados por 7 e 21 dias, sendo que no grupo de 21 dias foi observada baixa expressão dessa proteína (Figuras 2 e 4).

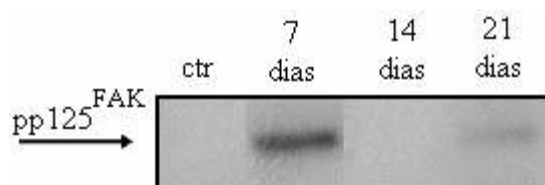


Figura 2. Identificação da FAK, no tecido ósseo, nos grupos de 7 e 21 dias. Nos grupos controle (ctr) e de 14 dias, esta proteína não foi detectada.

O *immunoblotting* com anticorpo 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. Observou-se P-FAK apenas no grupo de 7 dias de estímulo com o ultra-som de baixa potência (Figuras 3 e 4).

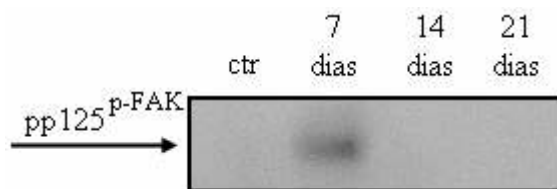


Figura 3. Identificação da P-FAK, no tecido ósseo, no grupo de 7 dias. Nos grupos controle (ctr), de 14 e de 21 dias, a P-FAK não foi detectada.

Identificação de ERK-2

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 os resultados entre os grupos. Foi possível identificar a expressão de ERK-2 em todos os grupos estudados (Figuras 5 e 7). O grupo de 14 dias apresentou a maior expressão (60% maior em relação ao grupo controle) em relação aos demais grupos. Os outros grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Identificação de IRS-1

O *immunoblotting* foi realizado objetivando-se detectar a expressão de IRS-1 nos ossos dos ratos de cada grupo estudado e comparar os achados entre os grupos. Para isso, utilizou-se anticorpo anti-IRS-1, sendo possível detectar a proteína apenas no grupo estimulado com o USbp durante 7 dias (Figuras 6 e 7).

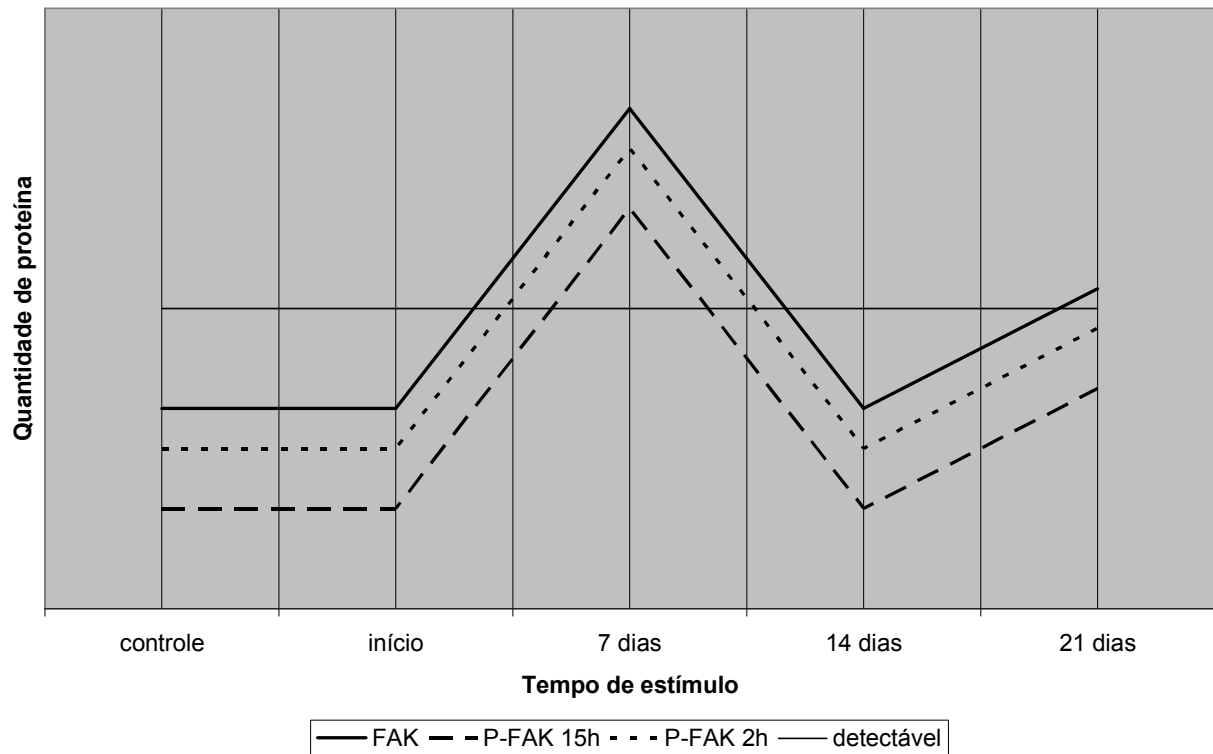


Figura 4. A linha denominada “detectável” representa o nível a partir do qual a quantidade de proteína é detectável pelo *immunoblotting*. Nota-se que as expressões de FAK e de P-FAK se comportam de maneira semelhante, atingindo o pico com 7 dias de estímulo. Por outro lado, a quantidade de FAK, P-FAK analisada 15 horas após estímulo (P-FAK 15h) e P-FAK analisada 2 horas após estímulo (P-FAK 2h) é diferente, o que determina a detecção ou não detecção das proteínas nos diferentes grupos estudados.

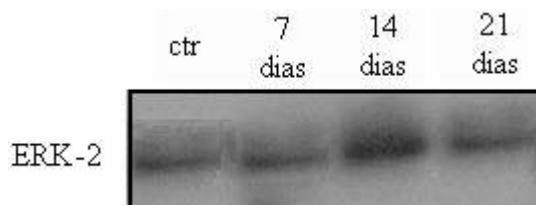


Figura 5. Identificação de ERK-2 no grupo controle e nos grupos submetidos ao estímulo com o ultra-som de baixa potência por 7, 14 e 21 dias.

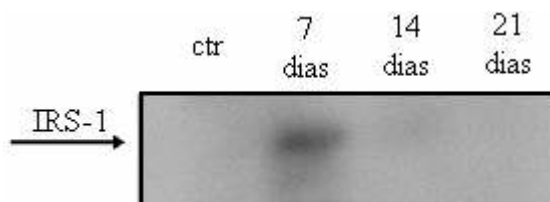


Figura 6. Identificação de IRS-1 no grupo de 7 dias.

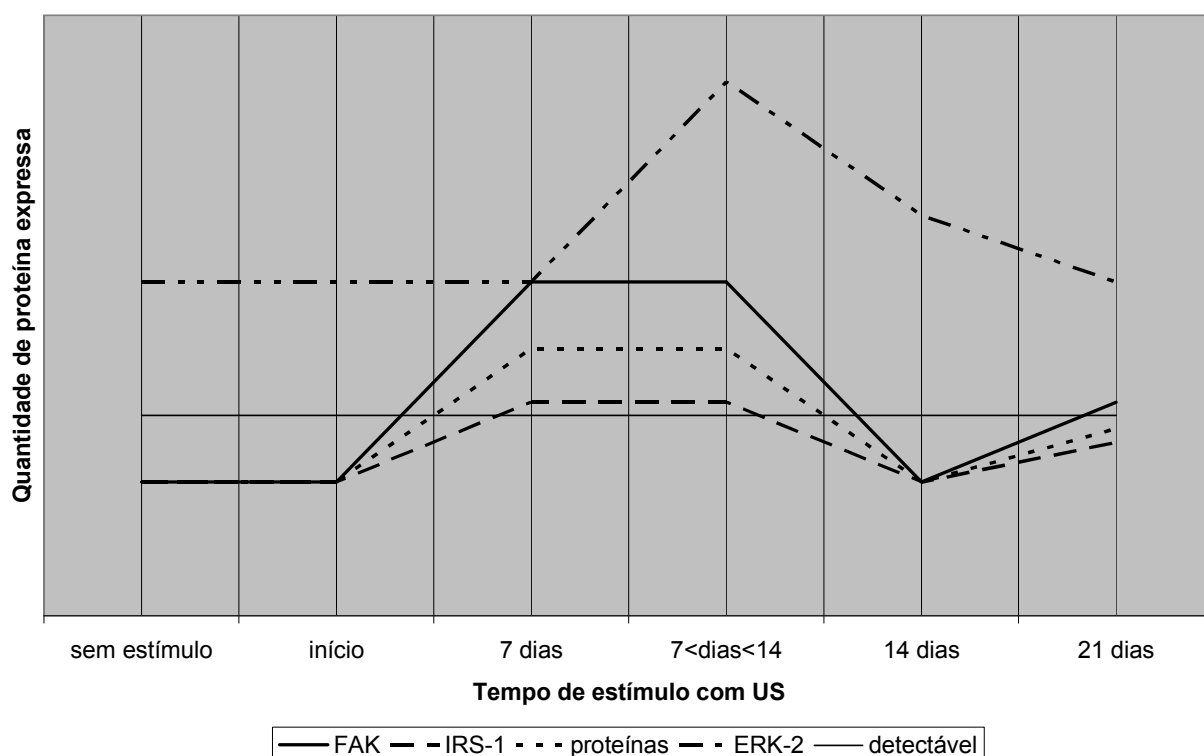


Figura 7. A linha denominada “detectável” representa o nível a partir do qual a quantidade de proteína é detectável pelo *immunoblotting*. Analisando o resultado obtido com a ERK-2, notou-se que o gráfico que representa o comportamento da FAK após estímulo com USbp por médio prazo não é como foi explicado na figura 6, mas do jeito que está nesta figura. FAK, IRS-1 e outras proteínas atingem seu pico de expressão por volta do sétimo dia de seguimento – e assim aumenta a quantidade de ERK-2 –, mantendo-se constante até um pouco antes do décimo quarto dia e depois diminui. Ao décimo quarto dia, a expressão de ERK-2 já está em declínio mas continua maior em relação ao grupo controle e aos outros grupos.

5. DISCUSSÃO

Aceita-se na literatura que o USbp provoca neoformação óssea tanto em animais ¹¹ como nos seres humanos ¹³ a partir da primeira semana do estímulo ^{12,14}. Considerando-se esse fato, foi colocado como hipótese que a expressão da FAK aumentaria com o tempo, após o estímulo produzido pelo USbp. Por conseguinte, a quantidade de FAK fosforilada também deveria aumentar de modo tempo-dependente. Assim, a expressão e a fosforilação da FAK deveriam ser maiores nos grupos estimulados quando comparados com o grupo controle, sendo que o grupo de 21 dias apresentaria as maiores expressão e fosforilação da FAK.

O *immunoblotting* é um método muito sensível para detectar proteínas. Sendo assim, a não detecção da FAK no grupo controle – o qual representa a expressão basal de FAK – pode ser devido à baixa expressão da proteína no osso ou à degradação parcial (ou total) do montante de proteína durante o procedimento de retirada dos ossos dos ratos. É mais provável que haja baixa expressão de FAK no tecido ósseo, porque a técnica desenvolvida para a extração e maceração dos ossos foi executada de forma padronizada em todos os grupos; e a FAK foi identificada nos grupos estimulados por sete e vinte e um dias, sendo que neste último, surpreendentemente, foi observada menor expressão da proteína em relação ao grupo de 7 dias, indicando que o USbp não possui efeito cumulativo sobre a síntese de FAK. Estes resultados, porém, não indicam se a quantidade de FAK no grupo de 14 dias é maior, menor ou igual ao grupo controle. Ela pode inclusive ter sido maior, mas não o suficiente para ser identificada.

Detectou-se P-FAK no grupo de 7 dias, o qual também apresentou a maior expressão de FAK, sugerindo que quanto maior a quantidade de FAK, maior a quantidade de P-FAK; e que esta proteína mantém-se ativa por pelo menos 15 horas após o estímulo com USbp quando o tecido ósseo é estimulado por 7 dias. Pode ser uma característica desta proteína manter-se ativa por um longo tempo, e/ou ela pode estar sendo mais ativada – provavelmente por mudanças na interação matriz extracelular-integrinas-FAK que facilitam a autofosforilação da FAK –, ou menos desfosforilada pela SHP-2^{15,16}. Isso fala a favor de que nos primeiros sete dias de estímulo ocorrem alterações nas células ósseas para torná-las mais responsivas à deformação mecânica, resultando em rápida produção de osso¹⁷. O que deve ter acontecido para que a P-FAK não fosse detectada no grupo de 21 dias é que mesmo com o aumento da quantidade de P-FAK, este não foi suficiente para atingir a quantidade mínima necessária para que o método de *immunoblotting* seja capaz de detectar a presença da proteína. Possivelmente, se a proteína fosse analisada antes de 15 horas após o estímulo, por

exemplo 2 horas após ³, a quantidade de P-FAK seria maior em todos os grupos, podendo até atingir o nível detectável (figura 4).

O IRS-1 deve ter comportamento semelhante ao da FAK em resposta ao estímulo mecânico, pois houve aumento de sua quantidade no grupo de sete dias em relação ao controle; mas sua expressão deve ser ainda menor, porque não foi identificado no grupo de 21 dias; ou então, não foi identificado no grupo de 21 dias porque a afinidade do anticorpo anti-IRS-1 ao IRS-1 é menor do que a do anti-FAK em relação a FAK. A não detecção do IRS-1 no grupo de 21 dias não significa que a quantidade dessa proteína no grupo de 21 dias é menor ou igual à dos grupos controle e de 14 dias. Se essa proteína se comportar como a FAK, a quantidade de IRS-1 no grupo de 21 dias foi maior, mas não suficientemente grande para atingir o nível detectável pelo *immuniblotting*.

Além disso, é difícil afirmar que o IRS-1 responde diretamente ao estímulo mecânico e que este causou aumento da expressão de IRS-1, porque essa proteína está envolvida com a via da insulina e, conseqüentemente, com a entrada de glicose na célula e com a proliferação celular e a produção de matriz extracelular óssea. O IRS-1 também está envolvido na manutenção do *turnover*, crescimento e reparo ósseos em resposta a estímulo hormonal ^{9,18}. Assim, o aumento na expressão de IRS-1 observado no grupo de 7 dias, em relação ao controle, deve ser reflexo do aumento do metabolismo celular – que requereu glicose – e da produção de matriz extracelular óssea induzidos pela deformação celular mecânica. Após sete dias, houve, provavelmente, aumento da matriz extracelular óssea, diminuindo a resposta ao estímulo mecânico; e/ou outros mecanismos intracelulares foram ativados para inibir a síntese de IRS-1. Desse modo, houve redução de sua expressão, não sendo detectado nos grupos de 14 e de 21 dias. Apesar de tudo que foi afirmado, não se pode excluir a possibilidade de que o IRS-1 tenha sido estimulado também – ou exclusivamente – diretamente pelo USbp.

Várias proteínas como a FAK¹⁹, IRS-1²⁰, PI3K²¹, PKC²² e canal de Ca²⁺²³ ativam a ERK-2, e esta é muito importante na manutenção da integridade do tecido ósseo, o qual sofre remodelação continuamente^{24,25}. A detecção da ERK-2 no grupo controle indica que a quantidade basal dessa proteína na célula óssea deve ser maior que a de outras proteínas, o que deve ser consequência da quantidade de proteínas – que são estímulos bioquímicos – que a ativam. Pensando dessa maneira, a expressão das proteínas que ativam a ERK-2 pode ser pequena porque a quantidade de estímulos (bioquímicos, mecânicos, entre outros) que ativa a ERK-2 é grande. Sendo assim, o aumento dos sinais ativadores dessas proteínas – como o provocado pelo USbp – induz aumento na síntese delas – conforme foi observado no presente estudo – e consequentemente aumenta a ativação de ERK-2. É curioso que, se os resultados da FAK e IRS-1 forem comparados com os da ERK-2, a quantidade de ERK-2 aumentou em relação ao grupo controle somente no grupo de 14 dias.

Analisando esses fatos, aventa-se a seguinte hipótese: a expressão basal de ERK-2 é naturalmente maior que a expressão das proteínas que a ativam. Nos primeiros sete dias, o estímulo mecânico ativou várias proteínas que ativam a ERK-2. Porém, a ativação aumentada da ERK-2 não foi suficiente para incitar aumento na sua síntese. Por outro lado, o estímulo que essas proteínas receberam foi suficiente para aumentar sua expressão, aumento este que atingiu pico somente no sétimo dia – o que foi observado com a FAK e IRS-1. Do mesmo modo que aumentava a expressão dessas proteínas, aumentou ainda mais o estímulo para a ERK-2, induzindo então o aumento da expressão desta. Para que isso faça sentido, o pico de expressão das outras proteínas deve ter se mantido além do sétimo dia até um pouco antes do décimo quarto dia, mantendo o estímulo para sintetizar ERK-2, cuja expressão deve ter aumentado entre o sétimo e o décimo quarto dia e já estava em declínio ao décimo quarto dia apesar da quantidade ainda ser maior que no grupo de 7 dias. Somando-se a isso, pode ter ocorrido diminuição ou inibição das fosfatases que inibem as proteínas que ativam a ERK-2 –

assim como se pensa com a FAK –, o que aumentou o tempo que as proteínas permaneceram ativas. Assim, o estímulo para ERK-2 se manteve elevado por tempo prolongado, incitando sua síntese (Figura 7).

Com isso, o comportamento da FAK esquematizado na figura 4 deve ser substituído pelo esquema da figura 7.

Observou-se nesse estudo que a quantidade de todas as proteínas avaliadas aumentou num determinado período de estímulo, seguido de queda dessa quantidade no grupo subsequente. E no caso da FAK, houve um pequeno aumento no último grupo, mas que continuou menor do que o grupo de 7 dias. Este fato revela que o efeito do USbp não é cumulativo. Pode-se entender isso de duas formas que se complementam. A primeira é que o tecido ósseo necessita de uma resposta rápida ao sinal mecânico – que é entendido como uma agressão porque se a deformação mecânica for muito elevada haverá fratura óssea –, e, por isso, aumenta exageradamente a quantidade de proteínas que convertem o sinal mecânico em bioquímico – ditas mecano-sensíveis –, otimizando o processo de aumento de massa óssea. Depois disso, o sistema percebe que há sinal suficiente para aumento de massa óssea, e inibe a síntese de proteínas mecano-sensíveis. Levando em consideração a curva desenhada para a FAK e extrapolando para as outras proteínas (figura 7), ocorre novamente um aumento na síntese dessas proteínas, o que deve significar que o sistema está atingindo um equilíbrio entre o estímulo mecânico e a resposta celular ao estímulo mecânico, para manter a quantidade de massa óssea suficiente para suportar determinada deformação mecânica. A segunda é que se o efeito fosse cumulativo a massa óssea aumentaria eternamente além do necessário para suportar determinada aplicação de carga, o que transformaria o tecido ósseo num grande tumor. Dessa maneira, o sistema celular inibe a síntese protéica, regulando-a até atingir o equilíbrio.

6. CONCLUSÃO

Em níveis basais, a quantidade de FAK, IRS-1 e outras proteínas ósseas que ativam a ERK-2 é pequena a ponto de não ser detectável pelo *immunoblotting*. Quando o tecido ósseo é submetido a estímulo com o USbp, a quantidade dessas proteínas aumenta rapidamente em sete dias, mantendo-se aumentada por alguns dias, para aumentar a massa óssea e proteger o tecido ósseo da agressão mecânica. A FAK, que tem grande importância na conversão do sinal mecânico em bioquímico, permanece fosforilada por pelo menos 15 horas para garantir um sinal bioquímico constante para ativar a ERK-2. Assim, a quantidade de ERK-2, que na situação basal já é alta em relação às demais proteínas mecano-sensíveis, aumenta também por volta do sétimo dia.

Entre o sétimo e o décimo quarto dias, ocorre diminuição da expressão dessas proteínas na tentativa de atingir um equilíbrio entre o estímulo mecânico e a resposta a esse estímulo para que não haja produção exagerada de massa óssea.

7. REFERÊNCIAS

- 1- DUNCAN, R.L., TURNER, C.H.: Mechanotransduction and the Functional Response of Bone to Mechanical Strain. *Calcified Tissue Int.*, v. 57, n. 5, pp. 344-358, Nov. 1995.
- 2- NOMURA, S., TAKANO-YAMAMOTO, T.: Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biology*, v. 19, n. 2, pp. 91-96, May 2000.
- 3- 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.
- 4- MOALLI, M.R., WANG, S., CALDWELL, N.J., *et al.*: Mechanical stimulation induces pp125^{FAK} and pp60^{src} activity in an in vivo model of trabecular bone formation. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, n. 2, pp. 912-918, Aug. 2001.

- 5- 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.
- 6- CHEN, K.D., LI, Y.S., KIM, M., *et al.*: Mechanotransduction in response to shear stress, Roles of receptor tyrosine kinases, integrins and Shc. *The Journal of Biological Biochemistry*, v. 274, n. 26, pp. 18393-18400, Jun. 1999.
- 7- SCHLAEPFER, D.D., JONES, K.C., 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. *Molecular and Cellular Biology*, v. 18, n. 15, pp. 2571-2585, May 1998.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10- SALTIEL, A.R., KAHN, C.R.: Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v. 414, n. 6865, pp. 799-806, Dec. 2001.
- 11- DUARTE L.R.: The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 101, n. 3, pp. 153-159, 1983.
- 12- WANG, S.J., LEWALLEN, D.G., BOLANDER, M.E., *et al.*: Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 12, n. 1, pp. 40-47, Jan. 1994.
- 13- HECKMAN, J.D., RYABY, J.P., McCABE, J., *et al.*: Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 76, n. 1, pp. 26-34, Jan 1994.
- 14- KRISTIANSEN, T.K., RYABY J.P., FREY, J.J., *et al.*: Accelerated Healing of Distal Radial Fractures with the Use of Specific, Low-Intensity Ultrasound. A Multicenter, Prospective, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *The Journal of Bone and Joint Surgery – American*, v. 79-A, n. 7, pp. 961-973, Jul 1997.
- 15- MAÑES, S., MIRA, E., GÓMEZ-MOUTON, C., *et al.*: Concerted Activity of Tyrosine Phosphatase SHP-2 an Focal Adhesion Kinase in Regulation of Cell Motility. *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, n. 4, pp. 3125-3135, Apr 1999.
- 16- RAFIQ, K., KOLPAKOV, M.A., ABDELFETTAH, M., *et al.*: Role of Protein-tyrosine Phosphatase SHP2 in Focal Adhesion Kinase Down-regulation during Neutrophil Cathepsin G-induced Cardiomyocytes Anoikis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 28, pp. 19781-19792, Jul 2006.
- 17- PLOTKIN, L.I., MATHOV, I., AGUIRRE, J.I., *et al.*: Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, v. 289, pp. 633-643, May 2005.
- 18- 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.

- 19- PALLU, S., BAREILLE, R., DARD, *et al.*: A cyclo peptide activates signaling events and promotes growth and the production of the bone matrix. *Peptides*, v. 24, n. 9, pp. 1349-1357, Sep 2003.
- 20- TIDBALL, J.G.: Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *Journal of Applied Physiology*, v. 98, pp. 1900-1908, May 2005.
- 21- GHOSH-CHOUDHURY, N., MANDAL, C.C., CHOUDHURY, G.G.: Statin-induced Ras Activation Integrates the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signal to Akt and MAPK for Bone Morphogenetic Protein-2 Expression in Osteoblast Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n.7, pp. 4983-4993, Feb 2007.
- 22- LIEDERT, A., KASPAR, D., BLAKYTNY, R., *et al.*: Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 349, pp. 1-5, Aug 2006.
- 23- DANCIU, T.E., ADAM, R.M., NARUSE, K., *et al.*: Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Letters*, v. 536, n. 1, pp. 193-197, Feb 2003.
- 24- 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.
- 25- SIKAVITSAS, V.I., TEMENOFF, J.S., MIKOS, A.G.: Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, v. 22, n. 19, pp. 2581-2593, Oct 2001.