

THAÍS FRANCHINI TORNATORE

**O PAPEL DA FAK (*FOCAL ADHESION KINASE*) NA
BIOGÊNESE MITOCONDRIAL CARDÍACA INDUZIDA POR
ESTRESSE MECÂNICO**

CAMPINAS

Unicamp

2011

THAÍS FRANCHINI TORNATORE

**O PAPEL DA FAK (*FOCAL ADHESION KINASE*) NA
BIOGÊNESE MITOCONDRIAL CARDÍACA INDUZIDA POR
ESTRESSE MECÂNICO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção de título de Doutor em
Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas

ORIENTADOR: PROF. DR. OTÁVIO RIZZI COELHO

**CAMPINAS
Unicamp
2011**

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

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso - CRB-8ª / 6652

Tornatore, Thaís Franchini

T632p

O papel da FAK (*Focal Adhesion Kinase*) na biogênese mitocondrial cardíaca induzida por estresse mecânico / Thaís Franchini Tornatore. - Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Otávio Rizzi Coelho.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Estresse mecânico. 2. Coração. 3. Transdução de sinal. 4. Mitocôndria. I. Coelho, Otávio Rizzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em Inglês: A role for Focal Adhesion Kinase in cardiac mitochondrial biogenesis induced by mechanical stress

Keywords:

- Mechanical stress
- Heart
- Signal transduction
- Mitochondria
- Hypertrophy

Titulação: Doutorado em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências básicas

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Otávio Rizzi Coelho

Prof^a. Dr^a. Marta Helena Krieger

Prof^a. Dr^a. Maria Lilian Sales

Prof^a. Dr^a. Raquel Fernanda Gerlach

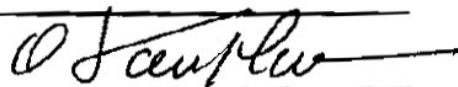
Prof^a. Dr^a. Diane Meyre Rassi

Data da defesa: 12.01.2011

Banca examinadora da tese de Doutorado

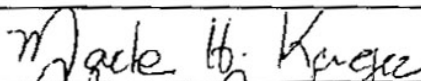
Tháís Franchini Tornatore

Orientador: Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho

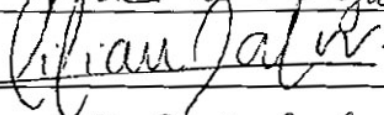


Membros:

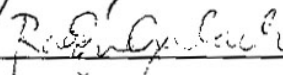
1. Prof. Dr. Marta Helena Krieger



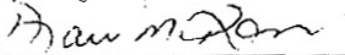
2. Prof. Dr. Maria Lilian Sales



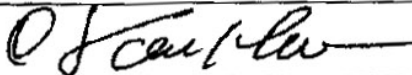
3. Prof. Dr. Raquel Fernanda Gerlach



4. Prof. Dr. Diane Meyre Rassi



5. Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho



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

Data: 12/01/2011

À minha grande família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Otávio Rizzi Coelho, e ao meu co-orientador Kleber Gomes Franchini, pelo auxílio e contribuição na minha formação profissional.

Aos meus pais, Alcyr e Kathya, aos meus avós maternos Oswaldo e Nita, aos meus tios maternos Éder e Tania, aos meus irmãos: Andrey, Isabella e Gabriel, ao meu filho Augusto, pela compreensão da distância e dos momentos difíceis. À minha prima Má (Marcela) por me fazer lembrar de como tudo era fácil e bom aos 16 anos.

Aos amigos do lab: Ana Helena Macedo, Ana Paula Dalla Costa, Thaís Holtz, Márcia Story, pela descontração, companheirismo e auxílio técnico.

Aos colegas do lab: Michele, João, Jamilson, Jackeline, Isabelle, Alisson, Michel, Leandro e Maruska pelo suporte técnico e por contribuírem pelo convívio harmônico.

Aos amigos: Laura e Nat, pelas conversas e café nos sábados à tarde em Igarapava. À minha amiga Taciana, a única quem faz meu telefone tocar sempre. À minha amiga Claudete, pelos conselhos e companhia...fora os super almoços!

*“Nunca andes pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente aonde outros já foram”*

(Alexander Graham Bell)



RESUMO

Estudamos o gene da FAK (*focal adhesion kinase*) na mitocôndriogênese cardíaca induzida por estresse mecânico. O estresse prolongado (2-12 hs) de miócitos do ventrículo esquerdo de ratos neonatos(NRVM) aumentou a expressão do regulador transcricional mitocondrial PGC-1 α (*peroxisome proliferator activated receptor coactivator-1*), NRF-1 (*nuclear respiratory factor*) e o Tfam (*mitochondrial transcription factor A*). A ativação da cascata transcricional mitocondrial em cardiomiócitos estirados foi acompanhada pelo aumento da mitocôndriogênese (aumento da densidade mitocondrial e número de cópias do DNA - mtDNA) e hipertrofia(tamanho da célula e transcrição do ANP). Estresse mecânico também aumentou a fosforilação da FAK, a localização nuclear e associação com PGC1- α . FAK C-terminal Recombinante, mas não a N-terminal ou domínio kinase, precipitaram PGC-1 α em extratos nucleares de NRVMs. Além disso, a inibição da expressão da FAK por RNA de interferência suprimiu a hiper regulação do PGC-1 α e NRF-1, e atenuou o aumento da mitocôndriogênese e hipertrofia em cardiomiócitos. Ao mesmo tempo, a inibição da FAK reduziu os níveis de ATP em cardiomiócitos estirados. Estudos complementares em ventrículos esquerdo de camundongos adultos revelaram aumento da expressão de PGC-1 α , NRF-1 e mtDNA em resposta à sobrecarga pressórica. *In vivo* o silenciamento da FAK atenuou a hiper regulação do PGC-1 α , NRF-1, mtDNA e a hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida por sobrecarga pressórica. A ativação da sinalização da FAK parece ter importante relação no aumento da mitocôndriogênese paralelamente à resposta do aumento hipertrófico relacionado ao estresse mecânico dos cardiomiócitos.

Palavras chaves: estresse mecânico, coração, transdução de sinal, mitocôndria.



ABSTRACT

We studied the implication of FAK (*focal adhesion kinase*) in cardiac mitochondriogenesis induced by mechanical stress. Prolonged stretching (2-12 hs) of neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) enhanced the expression of mitochondria transcriptional regulator PGC-1 α (*peroxisome proliferator activated receptor coactivator-1*), NRF-1 (*nuclear respiratory factor*) and transcripts of Tfam (*mitochondrial transcription factor A*). The activation of the mitochondria transcriptional cascade in stretched NRVM was accompanied by enhanced mitochondriogenesis (increases in mitochondrial density and DNA copy number - mtDNA) and hypertrophy (cell size and ANP transcripts). Cell stretching also enhanced FAK phosphorylation, nuclear localization and association with PGC1 α . Recombinant FAK C-terminal, but not the N-terminal or kinase domain, precipitated PGC-1 α from NRVM nuclear extracts. Moreover, depletion of FAK by RNA interference suppressed the upregulation of PGC-1 α and NRF-1, and markedly attenuated the enhanced mitochondriogenesis and hypertrophy of stretched NRVMs. Concomitantly, FAK depletion induced a marked reduction of ATP levels of stretched NRVM. Complementary studies in adult mice left ventricle revealed enhanced expression of PGC-1 α , NRF-1 and mtDNA in response to pressure overload. *In vivo* FAK silencing attenuated the upregulation of PGC-1 α , NRF-1, mtDNA and left ventricular hypertrophy induced by pressure overload. Activation of FAK signaling seems to be important for conferring enhanced mitochondriogenesis coupled to the hypertrophying growth response to mechanical stress in cardiomyocytes.

Keywords: mechanical stress, heart, signal transduction, mitochondria

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------------------|--|
| FAK- | focal adhesion kinase |
| NRVMs- | Neonatal Rat Ventricle Myocytes (MVRNs) |
| PGC-1α- | peroxisome proliferator activated receptor coactivator-1 |
| NRF-1- | nuclear respiratory factor |
| Tfam- | mitochondrial transcription factor A |
| ANP- | atrial natriuretic peptide |
| ATP- | adenosine trifosfato |
| mtDNA- | ácido desoxiribonucléico mitocondrial |
| nDNA- | ácido desoxiribonucléico nuclear |
| NE- | células não estiradas |
| GAPDH- | glyceraldeid 3-phosfate |
| QR- | quantidade relativa |
| RT-PCR- | real time polymerase chain reaction |
| QRT-PCR- | quantitative real time polymerase chain reaction |
| pFAK- | phosfo-FAK |
| siGFP- | silenciamento por siRNA Green Fluorescent Protein |
| siFAK- | silenciamento por siRNA Focal Adhesion Kinase |

| | |
|---------------------------------|--|
| SO- | sham operated |
| TAC- | toracic aorta constriction |
| ERRα- | receptor α relacionado ao estrogênio |
| PPARα- | ativador de proliferação de peroxissomos |
| PRC- | progesterone receptor protein |
| PKC- | proteína kinase C |
| mRNA- | ácido ribonucléico mensageiro(RNA _m) |
| COX- | citocromo c oxidase |
| Tyr- | tirosina |
| HPLC- | high pressure liquid chromatography |
| SiRNA- | RNA por interferência |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1- Esquema representativo da morfologia do ventrículo esquerdo, demonstrando as diferenças entre corações normal e hipertrófico..... | 45 |
| Figura 2- Representação esquemática da FAK com os respectivos domínios FERM, quinase e FAT..... | 46 |
| Figura 3- A enzima Dicer corta RNA de dupla fita, de modo a formar siRNA ou miRNA..... | 52 |
| Figura 4- Representação esquemática do aparato utilizado para estiramento mecânico em células cardíacas isoladas..... | 67 |
| Figura 5- Representação esquemática da coarctação da aorta em camundongos..... | 69 |
| Figura 6- Representação esquemática de ecocardiograma em camundongos..... | 71 |
| Figura 7- Gel denaturante representativo da integridade de RNA total..... | 75 |
| Figura 8- Gel denaturante representativo da integridade de DNA total..... | 76 |
| Figura 9- DNA mitocondrial mostrando a localização do gene D-loop.... | 77 |
| Figura 10- Reação de derivatização de adenil purina pelo 2-cloroacetaldeído [1]..... | 82 |

- Figura 11-** Cromatograma representativo de um extrato de coração contendo os derivados purínicos ATP, ADP, AMP e ADO..... 83
- Figura 12-** Estresse cíclico induz a biogênese mitocondrial em MVRNs. **(A)** Gráfico da expressão da proteína PGC-1 α em NE (células não estiradas) e células estiradas (2,4,6,12 horas). O gene GAPDH foi usado como controle. **(B)** Gráfico mostra a expressão da proteína NRF-1 em NE e células estiradas. **(C)** Gráfico mostra a quantidade relativa (RQ) do gene Tfam obtida por RT-PCR, transcrito GAPDH foi usado como gene calibrador. **(D)** Gráfico demonstra a localização do PGC-1 α nos extratos citosólicos e nuclear de cardiomiócitos não estirados comparados com estirados. **(E)** Dados mostram a associação entre PGC-1 α e NRF-1 no núcleo de cardiomiócitos estirados..... 88
- Figura 13-** **(A)** Gráfico mostra a quantidade relativa do gene Dloop em relação ao gene 18S transcrito como porcentagem da amostra calibradora (NE) obtida por q-real time-PCR. **(B)** Western Blotting COX IV **(C)** Dados mostram o número de mitocôndrias por cardiomiócitos estirados (12 horas) e células não estiradas (NE). **(D-F)** Exemplos representativos de cardiomiócitos não estirados e estirados marcados com Mitotracker. **(G)** Gráfico mostra a quantidade relativa (RQ) de ANP comparado com o gene GAPDH transcrito como porcentagem da amostra calibradora (NE) obtida por real time-PCR. **(H)** Área dos cardiomiócitos NE e estirados. **(I-J)** Exemplos representativos da área de cardiomiócitos não estirados e estirados corados com faloidina..... 92

Figura 14- FAK é ativada e interage com PGC-1 α no núcleo de cardiomiócitos. **(A)** Gráfico mostra a expressão protéica FAK/pFAK em NE(células não estiradas) e células estiradas (2,4,6,12 horas). **(B-E)** As imagens mostram que o estresse cíclico induz a FAK a se relocalizar no núcleo de cardiomiócitos. **(F)** Gráfico mostra a localização da FAK nos extratos citosólico e nuclear de cardiomiócitos não estirados comparados com estirados. **(G)** Co-imunoprecipitação da FAK associada ao PGC-1 α Ensaios feitos com extratos totais de cardiomiócitos estirados. **(H)** Precipitação da FAK com PGC-1 α de extratos nucleares de MVRNs..... 95

Figura 15- A FAK medeia hipertrofia induzida por estresse mecânico e a biogênese mitocondrial em NRVMs. **(A)** Gráfico mostra a expressão da proteína FAK em cardiomiócitos não estirados comparados com células estiradas, tratadas com siFAK comparadas com células tratadas com siGFP. **(B)** Gráfico mostra a expressão da proteína PGC-1 α em cardiomiócitos não estirados e estirados, tratados com siFAK comparados com células tratadas com siGFP. **(C)** Dados mostram a expressão da proteína NRF-1 em cardiomiócitos não estirados e estirados, tratados com siFAK comparados com células tratadas com siGFP. **(D)** Dados mostram a associação de PGC-1 α e NRF-1 induzida por estresse cíclico no núcleo dos MVRNs..... 98

Figura 16- (A-D) Exemplos representativos de cardiomiócitos não estirados e estirados tratados siFAK and siGFP corados com Mitotracker. (E) Gráfico de barras mostra a número de mitocôndria por cardiomiócito. (F) Gráfico mostra a quantidade relativa de (QR) mtDNA (mt-mitocondrial) comparada com nDNA (n-nuclear). (G) Western blotting da proteína COX IV. (H) Gráfico mostra a quantidade de ATP em cardiomiócitos não estirados e estirados, tratados com siFAK comparados com células tratadas com siGFP..... 101

Figura 17- (A) Gráfico mostra a quantidade relativa (QR) de ANP em relação ao transcrito do gene GAPDH em porcentagem com a amostra calibradora (siGFP NE) obtida por real time-PCR. (B) Gráfico mostra o tamanho das células de cardiomiócitos não estirados e estirados, tratados com siFAK comparados com células tratadas com siGFP. (C-F) Exemplos representativos de cardiomiócitos não estirados e estirados tratados com siFAK e siGFP corados com faloidina. (G) Análise de dispersão, por citometria de fluxo..... 104

Figura 18- A depleção da FAK atenua o aumento de PGC-1 α , NRF-1 e da mitocôndriogênese em camundongos submetidos à sobrecarga pressórica. Dados de animais submetidos à cirurgia fictícia (SO) e à coarctação da aorta (1 a 21 dias depois da coarctação da aorta - TAC). **(A)** Gráfico mostra a QR do transcrito da FAK em animais coarctados (TAC) e com cirurgia fictícia (SO) tratados com siRNA (FAK ou GFP). **(B)** Gráfico mostra a razão entre a massa corpórea e a massa do ventrículo esquerdo dos animais coarctados (TAC) e com cirurgia fictícia (SO) tratados com siRNA (FAK ou GFP). **(C)** Gráfico indica valores da espessura da parede posterior dos animais coarctados (TAC) e com cirurgia fictícia (SO) tratados com siRNA (FAK ou GFP), indicados por ecocardiografia. **(D)** Gráfico mostra quantidade relativa (QR) de ANP em relação ao transcrito do gene GAPDH como porcentagem da amostra calibradora (SOsiGFP) obtida por real time-PCR..... 106

Figura 19- **(A)** Expressão da proteína PGC-1 α . **(B)** Expressão da proteína NRF-1. A expressão da proteína GAPDH foi usada como controle. **(C)** Gráfico demonstra a quantidade relativa (QR) do gene Dloop em comparação o transcrito 18S como porcentagem da amostra calibradora (SOsiGFP) obtida por q-real time-PCR..... 109

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMO..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xvii |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 39 |
| 1.1-Insuficiência cardíaca..... | 41 |
| 1.2- Hipertrofia cardíaca..... | 43 |
| 1.3- FAK..... | 45 |
| 1.4- RNA de interferência..... | 50 |
| 1.5- Mecanismo de ação..... | 51 |
| 1.6- Ligação entre distúrbios no metabolismo energético mitocondrial e cardiomiopatia..... | 53 |
| 1.7- O papel do PGC-1α no controle fisiológico do metabolismo energético mitocondrial..... | 54 |
| 1.8- Interferências na sinalização do PGC-1α contribuem para a remodelação cardíaca patológica e a insuficiência cardíaca?..... | 55 |
| 1.9-Hipótese..... | 57 |
| 2- OBJETIVOS..... | 59 |

| | |
|---|------------|
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS..... | 63 |
| 4- RESULTADOS..... | 85 |
| 5- DISCUSSÃO..... | 113 |
| 6- CONCLUSÃO..... | 121 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 125 |
| 8- ANEXO..... | 145 |



1- INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca é associada à alta morbidade e mortalidade nas sociedades ocidentais modernas, e é vista como o estágio final de várias doenças do coração (1). O prognóstico para pacientes com insuficiência cardíaca é ruim e se agrava em pacientes que sofrem de várias outras malignidades (2,3). Em alguns estudos, a mortalidade anual encontrada em pacientes com sintomas leves foi de 10-20%, em pacientes moderados, que exigem internação hospitalar o número pode ser tão elevado quanto em pacientes com insuficiência cardíaca grave (de 40-60%) (4). O predito mais poderoso para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca é a presença de hipertrofia ventricular esquerda (5). Por esta razão, há vários esforços para desvendar os caminhos moleculares subjacentes a esta doença. Esses esforços são parte da investigação em curso para encontrar novas modalidades de tratamento para impedir ou mesmo reverter a parada cardíaca humana. A insuficiência cardíaca é uma das mais desafiadoras doenças do futuro, devido à heterogeneidade da resposta cardíaca, especialmente em suas fases finais. Além disso, são ainda sub-representadas em relação à atenção pública e política. Uma ferramenta poderosa nas mãos dos pesquisadores é a implementação de técnicas moleculares e abordagens biológicas para investigar o papel de genes modificadores no desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Assim, o número de transgênicos e modelos de *knockout* de hipertrofia tem crescido exponencialmente nos últimos anos, e isso tem fornecido novas pistas sobre a genética e etiologia dessa doença.

1.1- Insuficiência cardíaca

Insuficiência cardíaca em humanos é caracterizada por baixa no débito cardíaco devido à disfunção sistólica e/ou diastólica (6). Quando dependem de um aumento ventricular, por exemplo, durante o exercício físico, pacientes com insuficiência cardíaca típica, apresentam sintomas agudos de insuficiência cardíaca clínica, por exemplo, dispnéia, fadiga e, às vezes dor anginosa, e palpitações. Para o diagnóstico de insuficiência cardíaca, os critérios clínicos da Sociedade Européia de Cardiologia estão sendo utilizados (7). O diagnóstico da

insuficiência cardíaca é feito com a presença de múltiplos sintomas e sinais combinados com evidências objetivas de disfunção cardíaca, geralmente por meio de ecocardiograma. O ecocardiograma é essencial para se diagnosticar tanto a insuficiência sistólica quanto a diastólica (6). O grau de deficiência cardiovascular é distinguido pelo The New York Heart Association, Classificação Funcional (classes I-IV) ou a classificação dos sintomas em leve, moderada e grave. Ambos representam o grau de comprometimento funcional nos pacientes.

Do ponto de vista clínico, três grandes categorias de insuficiência cardíaca têm sido propostas. Nesta visão, insuficiência cardíaca pode se originar a partir de: **1-** maior sobrecarga hemodinâmica, de longe a causa mais comum, **2-** mutações herdadas em genes que codificam componentes estruturais que afetam contração e relaxamento, e **3-** antecessores que fazem com que episódios de insuficiência cardíaca ocorram (8).

Vários estudos têm descrito diversas alterações características encontradas no estágio final da insuficiência cardíaca. As melhores características intracelulares documentadas em nível de estroma ou do órgão são: **1-** reprogramação genética; diferentes graus de hipertrofia de cardiomiócitos e concomitante ativação da sinalização intracelular moléculas, disfunção mitocondrial, alterações ao nível do sarcômero e arquitetura do citoesqueleto, manipulação de cálcio intracelular, arquitetura miofibrilar desfavorável, **2-** maior vulnerabilidade na presença de necrose ou morte celular programada e excesso de formação da matriz extracelular, **3-** redução de capilarização do órgão e presença de isquemia regional miocárdio, prova de vulnerabilidade sistêmica e (neuro) humoral, estimulação para (supra) do ventrículo, disritmias e, principalmente, disfunção hemodinâmica a nível sistólico e/ou diastólico. Embora cada uma dessas alterações pareça formar disfunções independentes, a presença de qualquer das características mencionadas anteriormente é suficiente, pelo menos em modelos experimentais, para definir uma sequência de eventos que resulta invariavelmente na falência de órgãos, caracterizadas por um fenótipo abrangente, algumas anomalias anteriormente discutidas.

1.2- Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca representa não só um processo fundamental de adaptação, mas também uma das complicações clínicas mais influentes das doenças cardiovasculares (9). Este processo oferece vantagens mecânicas que permitem que os cardiomiócitos ajustem a capacidade contrátil ao aumento da demanda funcional. No entanto, em condições patológicas, como a hipertensão, doenças cardíacas valvulares e infarto do miocárdio, cardiomiócitos hipertróficos podem se degenerar, levando à disfunção cardíaca e insuficiência cardíaca (10). Alterações em cardiomiócitos hipertróficos ocorrem principalmente nos sarcômeros e mitocôndrias. No início do crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos é mantido um equilíbrio entre as mitocôndrias e o consumo de energia de algumas estruturas, assim como, miofibrilas e bombas de íons (11). Caso contrário, a ativação inapropriada da biogênese mitocondrial leva à capacidade oxidativa insuficiente que pode contribuir para a redução progressiva da atividade contrátil e degeneração dos cardiomiócitos hipertróficos em condições patológicas (12 13,14).

Os processos que levam à biogênese mitocondrial de cardiomiócitos envolvem um controle direto sobre a transcrição de codificação do núcleo e controle indireto da codificação das subunidades da cadeia respiratória do DNA mitocondrial por um número relativamente pequeno de fatores de transcrição nuclear, ou seja, fatores respiratórios nucleares (NRF1/2) receptor α relacionado ao estrogênio (ERR α) e receptor α ativador de proliferação de peroxissomos (PPAR α) (15). Estes fatores de transcrição são integrados a um programa da biogênese mitocondrial por membros do PGC-1 (receptor coativador da ativação de proliferação de peroxissomos-1) família de fatores coativadores transcricionais (PGC-1 α , PGC-1 β e PRC) (16). O membro, PGC-1 α é abundantemente expresso e é induzido no coração, em condições das quais uma maior demanda de produção de ATP no miocárdio é necessária (17).

A ativação do PGC-1 α e a expressão de NRF-1 e NRF-2, assim como a coativação direta do NRF-1, induz a expressão do fator mitocondrial de transcrição A, facilitando assim a replicação do DNA mitocondrial e coordenando a expressão de genes mitocondriais e nucleares importantes para a biogênese mitocondrial (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24).

Além disso, a superexpressão cardioespecífica do gene PGC-1 α durante os estágios neonatais mostraram liderar um aumento dramático no número e no tamanho de mitocôndrias, concomitantemente à aumento de genes associados à biogênese mitocondrial (25) enquanto que a superexpressão em adultos, leva à um modesto aumento do número de mitocôndrias, mas com modificações na ultraestrutura e desenvolvimento de cardiomiopatias (26). Por outro lado, a deficiência de PGC-1 α está associada com uma disfunção acelerada do ventrículo esquerdo e insuficiência cardíaca induzida por sobrecarga hemodinâmica, embora pareça não modificar a densidade mitocondrial no coração (27, 28) indicando que a diminuição na expressão de PGC-1 α pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (29).

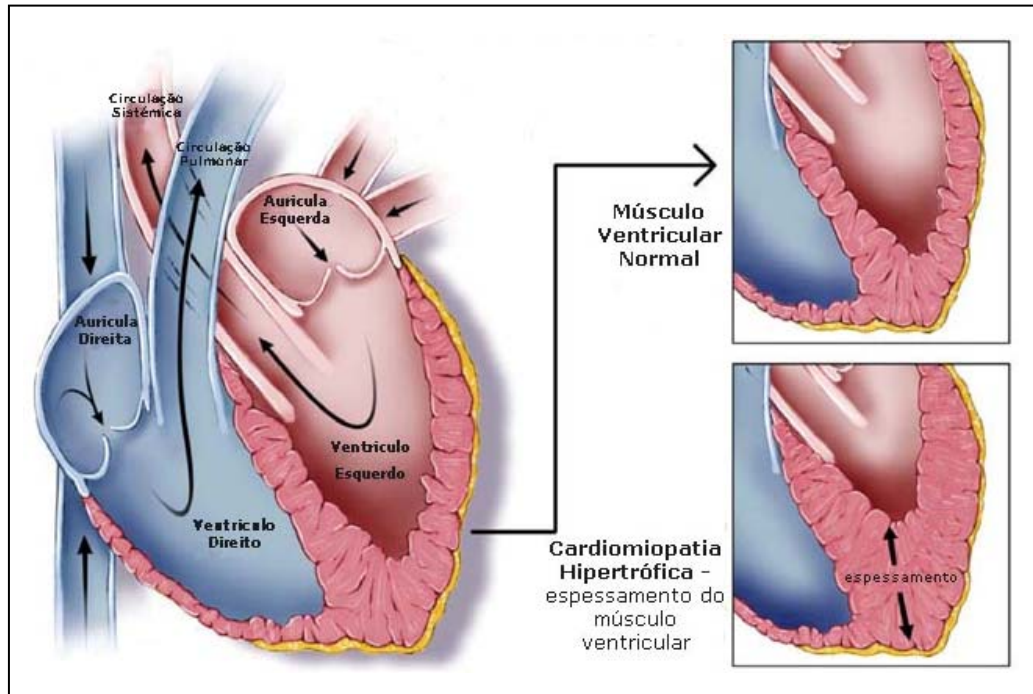


Figura 1- Esquema representativo da morfologia do ventrículo esquerdo, demonstrando as diferenças entre coração normal e hipertrofiado.

1.3- FAK (*Focal adhesion kinase*)

Há várias evidências que indicam ser a quinase de adesão focal (FAK) uma molécula de sinalização com papel importante no processo de hipertrofia dos miócitos cardíacos, particularmente no que tange à resposta deste tipo celular a estímulos mecânicos (17). Particularmente importantes são os fatos de esta enzima ser precocemente ativada e de ter função crítica na coordenação da expressão do programa gênico hipertrofiado em miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos. Mais recentemente, a importância da FAK para as alterações fenotípicas do ventrículo esquerdo desencadeadas por sobrecarga pressórica foram demonstradas em modelos de camundongo com deleção condicional ou depleção da FAK por RNA de interferência (12,26,68).

A estrutura da FAK apresenta três domínios: N-terminal, quinase e C-terminal (Figura 2). O domínio N-terminal é composto em sua maior parte pelo domínio FERM, capaz de interagir com a extremidade citoplasmática da subunidade da integrina beta (155) e interagir com a região central da FAK inibindo a atividade quinase (158).

O domínio C-terminal da FAK apresenta uma sequência chamada de FAT (*Focal Adhesion Targetting*), sendo responsável por direcionar a FAK à adesão focal (156) e pela associação às proteínas paxilina (156) e talina (23), além de outras proteínas sinalizadoras, como GRAF (GTPase associada à FAK) e pCas130 (26).

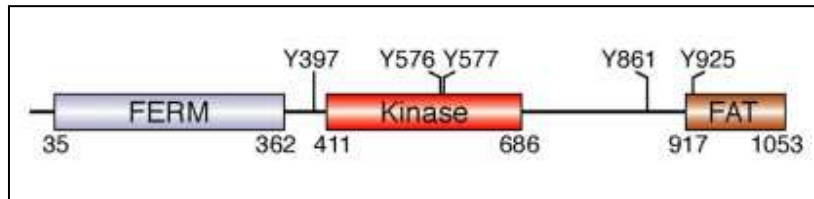


Figura 2- Representação esquemática da FAK com os respectivos domínios FERM, quinase e FAT. Resíduos contidos no domínio N-terminal (FERM) podem estar associados aos receptores de integrina e a cauda C-terminal (FAT) contém resíduos importantes interação com talina e paxilina. “Y” indicam os sítios de fosforilação de tirosina. Modificado de Lietha et al. (2007).

A sinalização via FAK requer que esta se torne fosforilada em seus resíduos de tirosina (Figura 2). O resíduo de tirosina 397 (Tyr-397) é ativado por mecanismos intra e intermoleculares de autofosforilação (155, 20), embora também possa ser fosforilado pela Src. A autofosforilação da FAK resulta na formação de um sítio de alta afinidade para domínios SH2 de tirosina quinases da família da Src (155) e leva ao recrutamento desta, resultando na formação do complexo FAK/Src.

Uma vez fosforilado, o resíduo Tyr-397 recruta e ativa Src. A interação entre Tyr-397 fosforilada e Src leva a uma cascata de fosforilação de tirosinas em múltiplos locais presentes na FAK (Tyr-576, Tyr-577, Tyr-925), assim como em outras moléculas de sinalização como a p130Cas e paxilina (156). FAK ativa pode também afetar a organização da actina via Rho, incluindo Ras e ERK1/2. Ainda mais, a fosforilação da Tyr-397 parece ser importante para o recrutamento da PI3K, capaz de ativar AKT, uma serina-quinase envolvida na regulação do metabolismo energético, crescimento celular e sobrevivência (23).

No miocárdio de ratos sem hipertrofia e também em miócitos cardíacos de ratos neonatos não-estirados a FAK foi encontrada predominantemente em estado não-fosforilado, representativo de sua baixa atividade em condições normais de carga mecânica (18,32). Por outro lado, na presença de estímulos mecânicos, foi descrita pronta fosforilação da FAK em resíduos de tirosina, incluindo os resíduos Tyr-397, 576/577, 846 e 925 (18,32). A fosforilação destes resíduos foi capaz de potencializar a atividade de quinase da FAK e habilita sítios específicos de ligação com proteínas e vias de sinalização envolvidas nos efeitos celulares da FAK.

Dados de estudos anteriores em miocárdio de ratos sugerem que a interação entre FAK e miosina sarcomérica tem influência inibitória na atividade da FAK (32). Nestes estudos, foi verificado que a associação FAK/miosina sarcomérica no ventrículo esquerdo de ratos apresentou redução significativa após a sobrecarga pressora. Esta redução da associação FAK/miosina foi acompanhada de aumento da fosforilação no sítio de autofosforilação da FAK (Tyr-397). Estes dados sugeriram que a associação FAK/miosina sarcomérica ocorre predominantemente entre a FAK desfosforilada (inativa) e a miosina. Foi verificado ainda, que a ativação da FAK é acompanhada pela formação de agregados dessa molécula (*clusters*) e pela translocação destes agregados, para outros sítios subcelulares como a linha Z, os costâmeros e, surpreendentemente, o núcleo.

Estímulos mecânicos relacionados como sobrecarga hemodinâmica constituem a maior classe de estímulo de crescimento hipertrófico e biogênese mitocondrial em cardiomiócitos (30). Neste contexto, foi atribuído à Focal Adhesion Kinase (FAK) um papel fundamental na ligação entre os eventos iniciados por estímulos mecânicos às respostas hipertróficas em miócitos cardíacos (31-36). A FAK regula a expressão de marcadores de hipertrofia em miócitos cardíacos em resposta ao estresse mecânico (37). O papel da FAK na hipertrofia cardíaca foi também confirmado por estudos em camundongos com a deleção da FAK estritamente em miócitos cardíacos (38-40). No entanto, ainda não foi elucidado se a sinalização mediada pela FAK está envolvida na regulação do controle da biogênese mitocondrial de cardiomiócitos.

No presente estudo inicialmente se investigou se a sinalização mediada pela FAK desempenha um papel de regulação da expressão do PGC-1 α e da biogênese mitocondrial ativadas pelo estresse mecânico em cardiomiócitos. Descobrimos que o estiramento cíclico induz a expressão de PGC1- α , NRF-1, em paralelo à biogênese mitocondrial em cardiomiócitos. Com a deleção do gene da FAK com um específico SiRNA demonstramos que os efeitos do estresse mecânico na biogênese mitocondrial são dependentes da ativação da cascata de sinalização da FAK induzida por sobrecarga. Este estudo foi complementado por experimentos em camundongos. Em células musculares, uma vez que a produção de ATP é capaz de se igualar ao consumo de ATP em ampla e sem variação do potencial de fosfato, a hipótese de que distúrbios no metabolismo energético, iniciados por depleção de ATP ou uma mudança no potencial de fosforilação, podem desencadear uma resposta compensatória, levando a um aumento mitocondrial (41), parece improvável. Entretanto, um aumento no “turnover” de ATP sem variação dos níveis de ATP celular pode levar a um aumento da biogênese mitocondrial. Ca²⁺ induz ao aumento dos níveis de mRNA citocromo c mediados pela ativação de isoformas da PKC(42). Entretanto, parece também que um aumento de Ca²⁺ não pode, por si só, levar a um aumento na biogênese mitocondrial em geral. De fato, estudos posteriores mostraram que, enquanto genes nucleares que codificam a expressão de subunidades mitocondriais são

aumentados, juntamente com citocromo c, uma série de outros genes que seriam críticos para a biogênese mitocondrial, como as subunidades COX IV, Vb, e Vic, não aumentam. Surgem duas interpretações: **1)** Ca^{2+} faz parte apenas de série de sinais que medeiam modificações na síntese de componentes mitocondriais ou **2)** estequiometria global da cadeia respiratória é modificada.

Sob condições de desacoplamento mitocondrial parcial, que mimetiza o exercício intenso, a produção de ATP é comparada ao consumo de ATP em um menor potencial de fosfato, e uma indução do fator nuclear respiratório 1 (NRF-1) é observada. Posteriormente a esta indução, um aumento na expressão de seus genes-alvo tem sido observado. Parece que o aumento da respiração mitocondrial ou o desequilíbrio entre ATP consumido e ATP produzido fornece um estímulo induzindo uma variedade de genes envolvidos na biogênese das organelas.

Um grande número de fatores de transcrição tem sido implicado na biogênese mitocondrial. Estão incluídos NRF-1 e NRF-2, PPAR $-\alpha$ e $-\gamma$, e Sp1 (43). PGC-1 alpha é um coativador transcricional que se liga ao PPAR- γ e regula sua atividade. Recentemente foi demonstrado que mRNA PGC-1 α aumenta aproximadamente de 1.5- e 7- para 10-vezes depois de uma única série de exercícios (44, 45). A atividade contrátil demonstrou induzir o aumento de mRNA e/ou níveis de proteínas, sendo que vários desses fatores de transcrição mostram ser coerente com as mudanças fenotípicas como resultado ao exercício (46). As regiões de regulação de genes que codificam proteínas mitocondriais são altamente variáveis em sua composição (47,48). Esta variabilidade sugere que uma regulação coordenada de transcrição de genes em resposta à atividade contrátil seria difícil de conseguir, a menos que múltiplos fatores de transcrição mencionados acima fossem eficazes na regulação da atividade transcricional de vários genes. A coordenação completa entre as respostas não é alcançada em nível de proteína (49) e não parece ser necessária para um aumento no conteúdo e atividade mitocondrial, isto é, funções fisiológicas.

Esses resultados mostram que, foi observado o mesmo em levedura, ou seja, que a produção de energia atende a demanda de energia, principalmente através de um ajuste no conteúdo enzimático mitocondrial. É óbvio que, em células musculares, esse ajuste no conteúdo da enzima mitocondrial não pode ser continuamente correlacionado à demanda de energia. Nestas células em particular, a demanda de energia varia rapidamente (com um intervalo de tempo muito diferente do volume mitocondrial) e, em grande medida. Assim, o fato de que, no início do exercício, um músculo abriga mais mitocôndrias implica um aumento do desperdício de energia (ciclos fúteis, atividade mitocondrial) em repouso.

No músculo, a resposta à demanda de energia mitocondrial envolve pelo menos dois mecanismos distintos. (50) Um evento de curto prazo consiste principalmente na sinalização através de redes metabólicas pela transferência de energia compartimentada e transmissão de sinal. Em tal mecanismo de regulação, a sinalização de Ca^{2+} participa da ativação de desidrogenases matriciais, bem como a ATP sintase mitocondrial (51). Uma adaptação à longo prazo implica em um reforço da biogênese mitocondrial.

1.4- RNA de interferência

RNAi (RNA interferente, ou RNA de interferência) é um mecanismo exercido por moléculas de RNA complementares a RNAs mensageiros, o qual inibe a expressão gênica na fase de tradução ou dificulta a transcrição de genes específicos.

Dois tipos de pequenas moléculas de RNA podem estar envolvidas em mecanismos de RNA interferente, são elas: miRNA (microRNA) e siRNA (do inglês, *small interfering RNA*). Os miRNA são produtos da transcrição de genes presentes em muitos eucariotos. Eles se originam de RNAs precursores, com cerca de 70 nucleotídeos de comprimento, que possuem regiões internas

autocomplementares, capazes de se parear e formas estruturas do tipo *hairpin* ("grampo de cabelo"). Os siRNA são derivados de longas moléculas de RNA dupla fita de origem exógena (como aquelas provenientes de vírus de RNA).

1.5- Mecanismo de ação

Mediante clivagem pela ação da enzima Dicer, estas pequenas moléculas de RNA dupla fita são geradas e se associam a um complexo protéico, formando um complexo ribonucleoprotéico conhecido como RISC (sigla do inglês: *RNA-induced silencing complex*). Após esta associação, uma das fitas do RNA é eliminada e a outra serve de guia para que o complexo RISC encontre fitas complementares de mRNA específicos, as quais serão alvo da ação de silenciamento gênico.

Quando o pareamento entre a fita guia e o mRNA envolve diversas bases, gerando um pareamento efetivo, este mRNA será degradado pela ação catalítica de uma das subunidades de RISC: a enzima denominada Argonauta. Quando o pareamento entre a fita guia e o mRNA alvo ocorre de maneira parcial, RISC não promove a clivagem do mRNA, mas atua inibindo o processo de tradução deste. Nesta condição, o mRNA desestabilizado pode ser conduzido aos chamados corpos de processamento (corpos-P), estruturas citossólicas responsáveis pela degradação de mRNA.

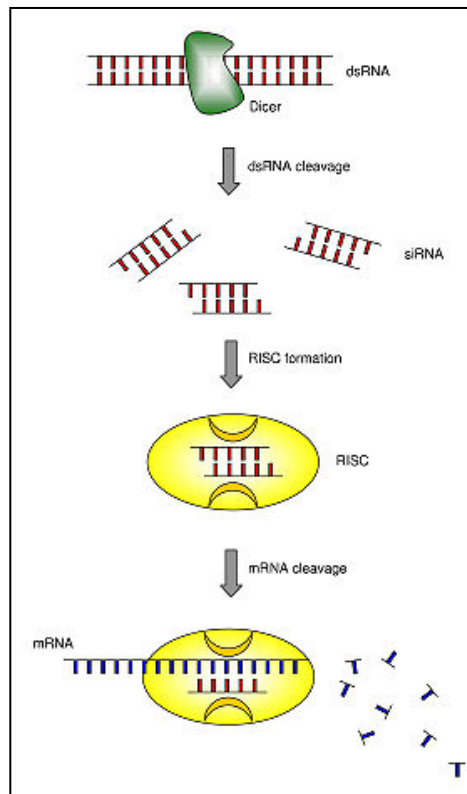
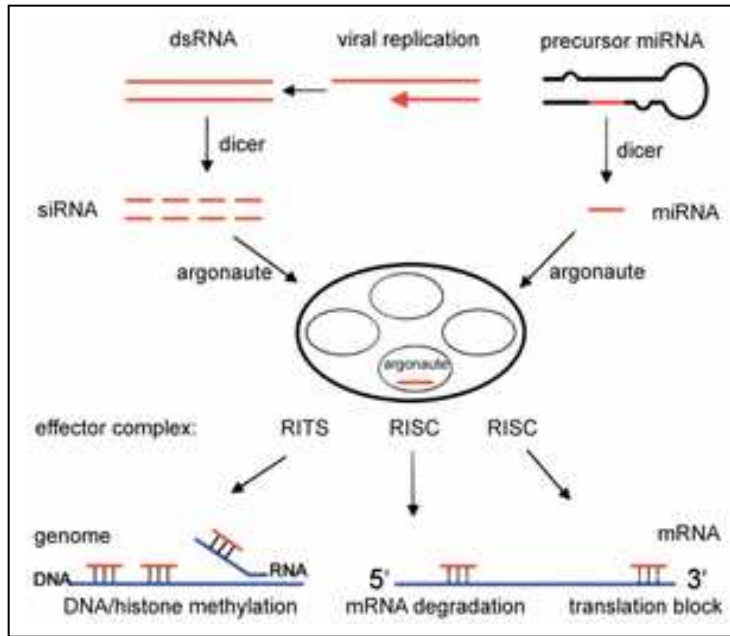


Figura 3- A enzima *Dicer* corta RNA de dupla fita, de modo a formar siRNA ou miRNA. Estes RNAs processados são incorporados no complexo RISC, o qual tem como alvo moléculas de RNA mensageiro, onde atuam impedindo o processo de tradução.

A RNA de interferência tem um papel importante na defesa do patrimônio genético celular contra genes parasíticos - vírus e transposões - mas também no desenvolvimento e expressão genética em geral

1.6- Ligação entre distúrbios no metabolismo energético mitocondrial e cardiomiopatia

Um ponto crítico à desativação do metabolismo mitocondrial na insuficiência cardíaca é saber se essas anormalidades metabólicas contribuem para a patologia, ou são secundárias à remodelação patológica na insuficiência cardíaca. O metabolismo alterado foi inicialmente considerado um subproduto destes estados patológicos. Contudo, algumas evidências incluindo a observação genética e a expressão fenotípica dos defeitos em modelos humanos e animais, mostram que distúrbios no metabolismo energético mitocondrial contribuem para disfunção cardíaca. Por exemplo, mutações no DNA mitocondrial de humanos resultam em prejuízo global causando disfunção respiratória mitocondrial e em consequência cardiomiopatia dilatada ou hipertrófica (52-54). Mutações em genes nucleares que codificam enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos mitocondriais também podem se manifestar como cardiomiopatia (55-58). Curiosamente, cardiomiopatias resultantes de erros inatos de enzimas de oxidação mitocondrial de ácidos graxos são muitas vezes provocados por condições fisiológicas ou fisiopatológicas que aumentam a dependência de oxidação de ácidos graxos para produção de ATP para o miocárdio, assim como quando há jejum ou exercício prolongado associados às doenças infecciosas (59-61).

A relação entre a disfunção mitocondrial e a cardiomiopatia é também evidenciada por vários modelos de camundongos mutados geneticamente.

A deleção do gene translocador de adenina um, que transporta o ATP gerado pela mitocôndria para o citosol, leva a uma disfunção mitocondrial e cardiomiopatia (62). Camundongos com deleção específica cardíaca do fator de

transcrição que ativa a mitocôndria, o qual controla a transcrição e replicação do genoma mitocondrial, mostra também deficiências marcantes no metabolismo mitocondrial, cardiomiopatia severa e mortalidade pré-matura(63). Cardiomiopatia e/ou defeitos de condução também são observados em vários modelos de camundongos com deleção específica de enzimas relacionadas à oxidação de ácidos graxos (64-66). Em resumo, o fenótipo cardíaco causado por defeitos genéticos relacionados à transdução de energia mitocondrial ou produção de ATP em humanos e camundongos é tido como prova de conceito para relações causais entre distúrbios no metabolismo energético mitocondrial e disfunção cardíaca.

1.7- O papel do PGC-1 α no controle fisiológico do metabolismo energético mitocondrial

O PGC-1 α é altamente induzível em resposta a condições fisiológicas que sinalizam o aumento da demanda de produção de ATP para o miocárdio, particularmente quando a dependência de ácidos graxos é aumentada (67,68). Por exemplo, PGC-1 α do miocárdio é induzido em resposta à privação aguda de alimento e diabetes, quando o miocárdio utiliza preferencialmente ácidos graxos. Além disso, a expressão do PGC-1 α no músculo esquelético e no miocárdio (A. Wende e D. Kelly, dados não publicados, 2005) é ativada por exercício físico, estímulo fisiológico o qual a utilização de ácidos graxos e glicose está aumentada para que aumente a síntese de ATP.

Abordagens sobre o ganho e perda de função genética em camundongos têm sido um meio de demonstrar importantes funções fisiológicas que o PGC-1 α possui na regulação do número de mitocôndrias e no metabolismo. Por exemplo, estudos em animais transgênicos, com superexpressão de PGC-1 α específica no miocárdio demonstraram que o PGC-1 α é suficiente para direcionar uma reposta de biogênese mitocondrial (69,132). O papel do PGC-1 α na regulação da função mitocondrial também foi visto em camundongos com deleção do gene alvo e dois modelos de camundongos com inativação do

PGC-1 α (134, 135). Curiosamente os camundongos que possuem deleção do gene PGC-1 α (-/-) demonstraram que este gene não é essencial no processo de biogênese mitocondrial; a densidade volumétrica mitocondrial do miocárdio não foi alterada com significância nestes animais (134, 136). Entretanto, estudos nestes camundongos forneceram informações importantes sobre a exigência do PGC-1 α na adaptação da energia metabólica em resposta fisiológica ao estresse em vários órgãos. O camundongo PGC-1 α -/- apresenta diminuição da capacidade de se exercitar, e as miofibras isoladas mostraram fadiga prematura (134). A deficiência do PGC-1 α também tem como resultado um defeito na homeostase da temperatura corporal (134, 135) e papel de coativador no coração. A expressão de vários genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos é diminuída no miocárdio destes animais (59,136). Estes dados em conjunto mostram que PGC-1 α é um fator crítico no controle da capacidade do sistema mitocondrial.

1.8- Interferências na sinalização do pgc-1 α contribuem para a remodelação cardíaca patológica e a insuficiência cardíaca?

A expressão do PGC-1 α e seus alvos, incluindo PPARs e ERRs é diminuída em formas patológicas de hipertrofia e insuficiência cardíaca (137, 138). Por outro lado, é hiper expresso o gene PGC-1 α nas formas fisiológicas de hipertrofia relatadas no crescimento pós natal e treinamento físico (A. Wende e D. Kelly, dados não publicados, 2005). Como mencionado antes, a hipoexpressão do PGC-1 α que ocorre nas formas patológicas de hipertrofia cardíaca está associada à distúrbios no metabolismo mitocondrial conhecidos por ocorrer em corações hipertrofiados e insuficientes. A resposta deste gene regulatório ocorre muito cedo na hipertrofia, sugerindo que este seja o primeiro evento, mesmo que seja indireto, da hipertrofia patológica. Esta conclusão é apoiada na observação de que a expressão e atividade do ERR α , PPAR α e PGC-1 α são hipo regulados no curto tratamento de cultura de cardiomiócitos com agonistas hipertróficos (21, 97, 108). O desenvolvimento de modelos de camundongos com a atividade

alterada do gene PGC-1 α tem demonstrado que a desativação deste gene do sistema regulatório é adaptativa ou maladaptativa sob condições patológicas. Camundongos com deleção do gene PGC-1 α , produzidos pelo Laboratório Spiegelman exibiu disfunção cardíaca moderada a níveis basais (138). Em contraste, o modelo produzido pelo laboratório de Kelly não exibiu disfunção cardíaca nas mesmas condições. Entretanto, a segunda linha de camundongos com deleção do gene, exibiu como característica um coração menos eficiente em resposta ao exercício e à estimulação adrenérgica (137). Similarmente, esses camundongos também exibiram comprometimento da resposta cronotrópica em resposta à estimulação de dobutamina (139). Estes camundongos desenvolvem traços típicos de falência cardíaca, incluindo uma diminuição acentuada da concentração de ATP, quando há a coarctação da aorta (107). A super expressão do gene impede a ciclina dependente de quinase 9, que medeia a desativação da expressão do gene mitocondrial e apoptose (108). Estes estudos sugerem que desarranjos mitocondriais são conhecidos por ocorrerem em corações em falência, em parte, com a hiporregulação do PGC-1 α na cascata regulatória. Camundongos com PGC-1 α super expresso (MHC-PGC) exibem ativação da biogênese mitocondrial em cardiomiócitos, levando por último à morte por falência cardíaca (21,22). Posteriormente, a indução específica do PGC-1 α por tetraciclina também foi estabelecida (tet-on PGC) (28). Nos dois modelos, a super expressão cardíaca prolongada do gene PGC-1 α causam uma resposta biogênica mitocondrial e cardiomiopatia associadas com anormalidades mitocondriais ultraestruturais. A base da cardiomiopatia após a ativação do PGC-1 α ainda é desconhecida, mas parece estar envolvida no metabolismo mitocondrial desregulado e/ou alterações das proteínas sarcoméricas. Interessante que alguns estágios das doenças do músculo esquelético humano, estão associadas com defeitos genéticos no genoma mitocondrial, ocorrendo uma segunda biogênese mitocondrial, levando as fibras à uma aparência irregular, pelo ponto de vista histológico (140). O papel desta proliferação mitocondrial na patogênese do músculo estriado ainda é desconhecida, mas há especulações que a resposta proliferativa esteja envolvida na ativação da cascata regulatória do PGC-1 α .

Muitas questões sobre os mecanismos básicos da disfunção cardíaca em relação às anormalidades do metabolismo energético relacionadas à alteração da atividade do gene PGC-1 α permanecem sem resposta.

1.9- Hipótese

Estímulos mecânicos hipertróficos levam à ativação de vias de sinalização mediadas pela FAK. A ativação da FAK por sua vez controla vias celulares envolvidas no crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos. Dado que o crescimento hipertrófico inclui mitocôndriogênese, é possível que a FAK influencie as vias de sinalização que controlam a mitocôndriogênese.



2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar se FAK influencia a mitocôndriogênese em cardiomiócitos durante o crescimento hipertrófico induzido por sobrecarga pressórica.

2.2- Objetivos específicos

- 1-** Avaliar os efeitos do silenciamento da FAK na resposta hipertrófica em cardiomiócitos de ratos neonatos e camundongos submetidos à sobrecarga pressórica.
- 2-** Avaliar os efeitos da sobrecarga pressórica e silenciamento da FAK na atividade de PGC-1 α e NRF-1.
- 3-** Avaliar os efeitos do silenciamento da FAK na biogênese das mitocôndrias e metabolismo energético em cardiomiócitos de ratos neonatos e camundongos submetidos à sobrecarga pressórica.



3- MATERIAIS E MÉTODOS

Anticorpos e reagentes: anticorpos policlonais anti FAK (sc558), pFAK(sc11765), GAPDH(sc25778), PGC-1 α (sc13067) e NRF-1 (sc33771), Santa Cruz Biotechnology (EUA), anti-pFAK 397 policlonal da BioSource International (USA). Colagenase tipo I A e tripsina Sigma (E.U.A.). Trizol, Fenol e Super Script II Invitrogen. Super Signal West Pico Cheluminescent Substract e Ampliscribe T7 high yield transcription da Epicentre, Sistema Envision da Dako Envision System.

Oligonucleotideos para síntese de siRNA: da IDT:

T7- Sequência: 5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'

FAK236s- Sequência: 5' GCG AAA TCC ATA GCA GGC CAC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

FAK236as- Sequência: 5' ACG TGG CCT GCT ATG GAT TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

GFPs- Sequência: 5' GTG TCT TGT AGT TCC CGT CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'

GFPas- Sequência: 5' ATG ACG GGA ACT ACA AGA CAC CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'

Oligonucleotideos para RT-PCR: da IDT:

GAPDH s- Sequência: 5' GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA 3'

GAPDH as- Sequência: 5' AGG GTG CAGH GGA ACT TTA TT 3'

FAKs- Sequência: 5' ATG TTC TGG TGT CCT CAA ATG 3'

FAK as- Sequência: 5' GAG GTA AAA CGT CGA AAA ATT G 3'

ANF sense 5' CCA TCA CCA AGG GCT TCT TC 3'

antisense 5' GTG TTG GAC ACC GCA CTG TAT AC 3'

Tfam (Rn00580051_m1)Applied Biosystems

SyBr Green Probes

D-Loop 5' GGTTCCTTACTTCAGGGCCATCA 3'

antisense 5'ATCTCGAGGTAACGGGTCTAA TC3'

18S sense 5'TAGAGGGACAAGTGGCGTTCT 3'

antisense 5' CGCTGAGC CAGTCAGTGT 3'

Animais

Camundongos Swiss machos de 6-8 semanas, pesando entre 20-30g, e ratos Wistar neonatos de 1-2 dias de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp.

Isolamento e estiramento de miócito ventricular de ratos neonatos

Detalhes da técnica de extração e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRN) foram descritos anteriormente (Torsoni et al., 2003 a; Nadruz et al., 2003 a). Os corações foram retirados de ratos neonatos Wistar (1-2 dias), cortados em 4 pedaços e submetidos à digestão branda em solução tampão de ADS (6,8g de NaCl, 4,76g de Hepes Salt, 0,12g de NaH₂PO₄, 1g de glicose, 0,4g de KCl e 0,10 MgSO₄, H₂O q.s.p 100ml p/ ADS 10X e 1000ml para ADS 1X, pH 7,35) com colagenase/pancreatina, centrifugação a 3000rpm, 37°C, por 5 minutos e pré-plaqueamento em placa de petri de vidro. Após 6 ciclos de digestão e pré-plaqueamento, os cardiomiócitos foram separados em gradiente

de Percoll por centrifugação, por 30 min, 3000rpm, 37°C. Após a separação, as células foram colocadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) enriquecido com 5% de soro fetal bovino e 10% de soro equino e acrescido de 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e 100uM de Bromodioxiuridina. As células foram plaqueadas em placas com base de silicone recoberta com colágeno tipo I (Bioflex) para estiramento à vácuo biaxial cíclico em Sistema Flexercell 3000T (Flexercell International, USA). Antes do estiramento, as células permaneceram em cultura com meio DMEM enriquecido com soros por 36- 40 horas. Após o meio de cultura foi trocado por DMEM sem adição de soro no qual as células permaneceram por, no mínimo, 24 horas antes de serem estiradas.

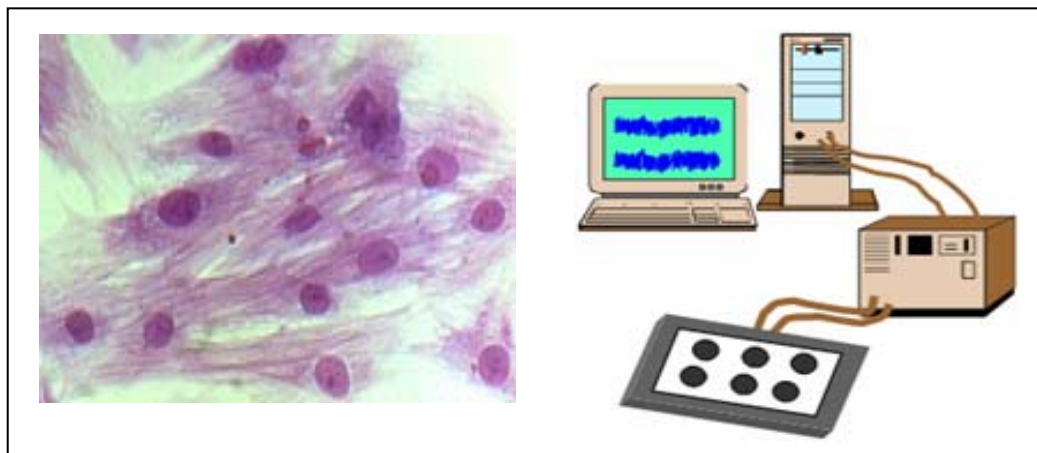


Figura 4- Representação esquemática do aparato utilizado para estiramento mecânico em células cardíacas isoladas.

Desenho de siRNA FAK

O siRNA contra o RNAm do gene da FAK de camundongos foi desenhado com a auxílio do software desenvolvido por Tiago Campos Pereira e Iscia Lopes-Cendes (FCM, Unicamp). Para gerar as sequências *in silico*, este software utiliza parâmetros de estabilidade interna, descritos originalmente por Khvorova et al. (2003). Desta maneira, as sequências foram selecionadas de

acordo com a tendência máxima de incorporação da fita antisense no complexo RISC. Uma vez que a eficiência de silenciamento de siRNAs é variável, diversas sequências de siRNAs foram obtidas tendo como alvo diferentes regiões do RNAm da FAK. Para os experimentos, a sequência com maior probabilidade de *knockdown* o gene da FAK de acordo com a análise *in silico* foi escolhida.

Síntese de siRNA *in vitro*

Para a síntese de siRNA FAK, foi utilizado um molde de DNA correspondente a posição 236 no RNAm do gene da FAK de camundongo (AB030035), cuja sequência é apresentada em Materiais (página 28). Como controle foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma sequência irrelevante (GFP), sem homologia com genes de camundongo. A síntese *in vitro* do siRNAFAK e siRNAGFP 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. 1µL dos RNAs e 1 e 3µg de T7, utilizados como padrão para a quantificação, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM tris-acetato, 2mM EDTA, pH 8,5), e visualizados com luz UV.

Modelo animal

Injeção na veia jugular de camundongos.

A solução de siRNA foi injetada na veia jugular de camundongos Swiss. Para tanto, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de quetamina e xilazina. Em seguida, a região do pescoço foi aberta, a veia jugular direita dissecada e introduziu-se uma cânula de polietileno (PE-50 estirada) por onde 300µL de solução com diferentes concentrações de siRNA foram infundidas lentamente (40µL, intervalo de 5 segundos, mais 40µL e

assim por diante) no animal. Uma segunda injeção foi feita com 80µL de PBS para lavagem da cânula. Ao final da injeção a cânula foi retirada, a jugular ligada e a região da ferida cirúrgica fechada. Após a recuperação anestésica os camundongos foram acomodados em gaiolas. Animais controles foram injetados com solução siRNA GFP.

Coarctação da aorta

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de quetamina e xilazina. Em seguida, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo, a croça da aorta foi dissecada e constricta com fio de sutura 7-0 (Dafilon, B. Braun Melsungen AG, Germany) tendo como guia uma agulha 27G. A cavidade torácica foi fechada e após a recuperação anestésica os camundongos foram acomodados em gaiolas. Os animais controle foram submetidos à cirurgia fictícia (sham), com abertura da cavidade torácica, porém sem constrição da croça da aorta.

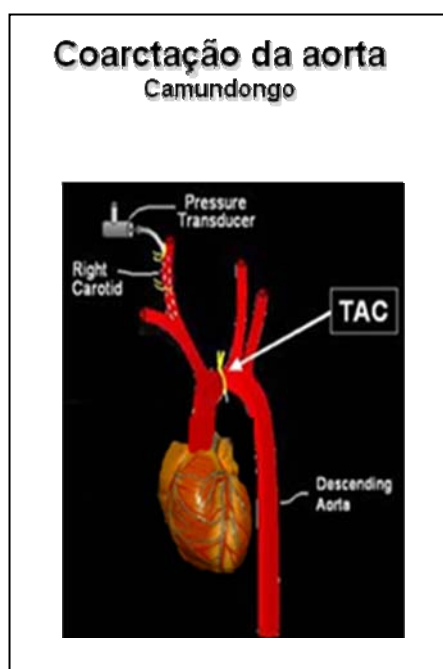


Figura 5- Representação esquemática da coarctação da aorta em camundongos.

Medida de pressão arterial

Antes da eutanásia, os camundongos foram anestesiados e submetidos à monitorização de pressão arterial e do gradiente trans-constricção da aorta através da inserção de cateteres de polietileno (PE-50 estirado) nas artérias carótida direita e femoral direita, os quais foram acoplados a transdutores de pressão COBE (Avarda, EUA). O sinal de pressão arterial foi amplificado por um amplificador GP4A Stemtech (Stemtech, USA), acoplado a um conversor analógico-digital, conectado a um computador contendo o programa WINDAQ-PRO (DATAQ Instruments, EUA) para a monitoração hemodinâmica contínua e gravação de dados. Os registros hemodinâmicos foram realizados 1,7,15 e 21 dias após a coarctação da aorta.

Ecocardiografia

Para avaliar a função do ventrículo esquerdo, camundongos foram submetidos à ecocardiografia modo 2D-M, utilizando o aparelho Toshiba PowerVision e o transdutor linear 12MHz. Para tanto, os animais foram anestesiados com a mistura de 5mg/kg de xilazina e 100mg/kg de quetamina, de acordo com Roth et al. (2002). O exame foi iniciado após 15 minutos da aplicação do anestésico. Cortes transversais do ventrículo esquerdo, na altura dos músculos papilares, foram feitos para medida do septo, parede posterior e diâmetro diastólico no final da diástole e diâmetro sistólico no pico da sístole. Cada medida foi repetida 3 vezes com arquivo fotográfico das mesmas.

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

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

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

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

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

$$SV = (DDVE3 - DSVE3) / DDVE3$$

Onde: DDVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo,

DSVE: diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

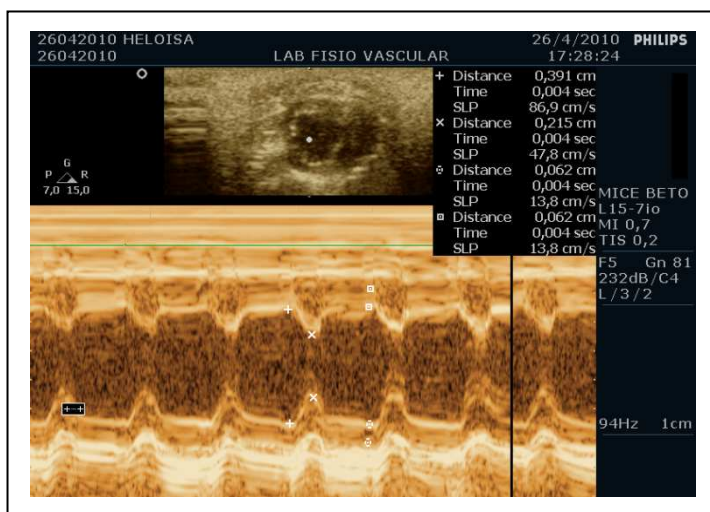


Figura 6- Representação esquemática de ecocardiograma em camundongos

Gravimetria do ventrículo esquerdo

Após a avaliação hemodinâmica, com 7 e 15 e 21 dias, os camundongos foram sacrificados e o coração foi retirado, lavado em solução fisiológica e seco delicadamente com uma gaze para a retirada do sangue intracavitário. O ventrículo direito, os átrios e a base do coração foram retirados

com a ajuda de uma tesoura de ponta fina e o ventrículo esquerdo foi pesado utilizando uma balança de alta precisão. A gravimetria foi calculada pela razão entre a massa do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final dos animais, multiplicado por um fator 10000.

Extrato total de proteínas

Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com tiopental, a cavidade torácica aberta e os corações foram rapidamente removidos e homogeneizados em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) a 4°C usando o homogeneizador tipo Polytron. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de biureto.

Determinação de proteínas pelo método de Lowry

Este método foi escolhido por ser mais sensível e preciso em amostras de baixa concentração protéica e cada amostra foi analisada em triplicata (este método foi utilizado para a dosagem de proteínas em cardiomiócitos de neonatos de ratos). Neste método, a cada 1mL de solução C foram adicionados 10µL de amostra e os tubos de ensaio foram incubados por 10 minutos protegidos da luz. Após este período, adicionaram-se 50µL *Folin Chateau (Folin-Ciocalteu)* e as amostras foram incubadas por mais 30 minutos protegidas da luz. Após esta última incubação, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660nm - Ultrospec 2100 pro Amersham Bioscience®. Para o cálculo da concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina bovina (Sigma), variando em

concentrações de 5,5µg/µL a 0,5µg/µL, e os valores de absorvância obtidos das amostras foram comparados para estimar a concentração de proteínas correspondente.

Solução A: 2% Na₂CO₃; 0,1N NaOH;

Solução B1: 1% CuSO₄;

Solução B2: 2% NaK tartarato;

Solução C: para cada 1mL de solução A, adicionar 100µL de solução B1 e 100µL de solução B2.

Após quantificação das proteínas, 400µL de amostra acrescida de 100µL de tampão de Laemmli (37,5g/L Tris-base; 2% SDS; 25% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

Western Blotting

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 8% em tampão de corrida (4X: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina). A membrana foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos e depois lavadas por 15 minutos em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20). Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos anti-FAK (diluição 1:1000), anti-pFAK 397 (diluição 1:2000), anti-NRF-1

(diluição 1:1000), anti-PGC-1 α (diluição 1:1000), em tampão de anticorpo (3% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante toda a noite, a 4°C.

Após serem lavadas por 15 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas com 10ml do kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate da Thermo Scientific por 5 minutos, em temperatura ambiente, para a imunodeteção. Após este período, as membranas foram fotografadas pelo sistema IMAGE QUANT 350 da GE. As bandas dos filmes foram quantificadas por densitometria óptica através do software Image J. Na análise de expressão de FAK, foi utilizado o valor lido de FAK normalizado pelo valor de GAPDH (padrão interno).

RT-PCR

RT-PCR foi realizado para avaliar a expressão de RNAm do gene da FAK e ANP em corações de camundongos após tratamento com siRNAFAK ou siRNAGFP, em diversos períodos experimentais.

Extração de RNA de tecido cardíaco

Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com tiopental, a cavidade torácica aberta e o coração rapidamente removido e congelado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando Trizol, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260nm.

Avaliação da integridade do RNA

Após a quantificação, 0,5 μ g de RNA total foi submetido à eletroforese em gel desnaturante (1,2% agarose, MOPS 1x, 2,2M formaldeído em água DEPC). Cada amostra teve seu volume elevado até 5 μ L com água DEPC e foram

adicionados 5µL de tampão de corrida MOPS 10X (0,4M ácido 3-N-morfolino-propanosulfônico pH 7; 0,1M acetato de sódio e 0,01M EDTA), 9µL de 12,3M formaldeído, 25µL de formamida deionizada e 10µL de tampão de aplicação (1mM EDTA, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenocianol, 50% glicerol, 0,2µg/mL brometo de etídeo). As amostras foram incubadas a 60°C por 15 minutos e aplicadas no gel. Após a corrida (5V/cm), o gel foi exposto à luz UV e fotografado.

A Figura 7 mostra um gel representativo de bandas de RNA que, quando íntegro, apresenta bandas de RNA ribossômico: 28S (4,7Kb), 18S (1,9Kb) e 4-5S (0,1-0,15Kb).

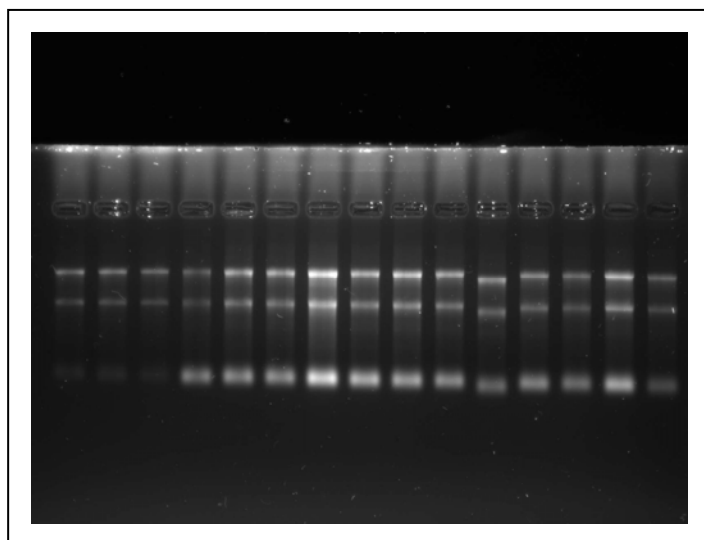


Figura 7- Gel denaturante representativo da integridade de RNA total.

Extração de DNA do tecido cardíaco

A extração do DNA foi realizada pelo padrão de fenol/clorofórmio DNA procedimento estava de acordo com método previamente publicados (Thomas Ried's Lab, NCI-www.protocol-online.org).

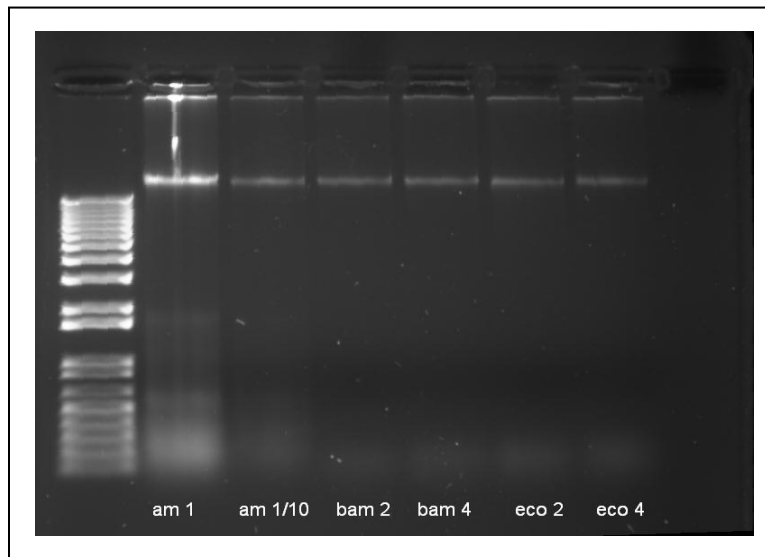


Figura 8- Gel denaturante representativo da integridade de DNA total.

Reação de RT-PCR multiplex em uma etapa

Foram feitas reações de RT-PCR multiplex, onde é possível utilizar mais de um par de primers específicos na mesma reação e, assim, minimizar erros devidos a reações de RT-PCR feitas em eppendorfs diferentes, erros de pipetagem, diferença na eficácia das enzimas nas reações, entre outros. Desta maneira, foi feita a reação multiplex de FAK, Tfam, ANP e GAPDH (controle interno). O gene de GAPDH foi escolhido para a normalização dos resultados (controle interno), uma vez que a literatura mostra que GAPDH é um gene *housekeeping* que tem sido utilizado extensivamente em estudos de expressão gênica em hipertrofia cardíaca (Winer et al., 1999), mantendo seus níveis de expressão constante durante os ensaios de sobrecarga pressórica. Assim, o protocolo envolveu a síntese de cDNA (transcrição reversa) a partir de RNA total, com o uso da enzima de transcrição reversa SuperScriptII e primers específicos, e a amplificação (PCR) em uma mesma reação.

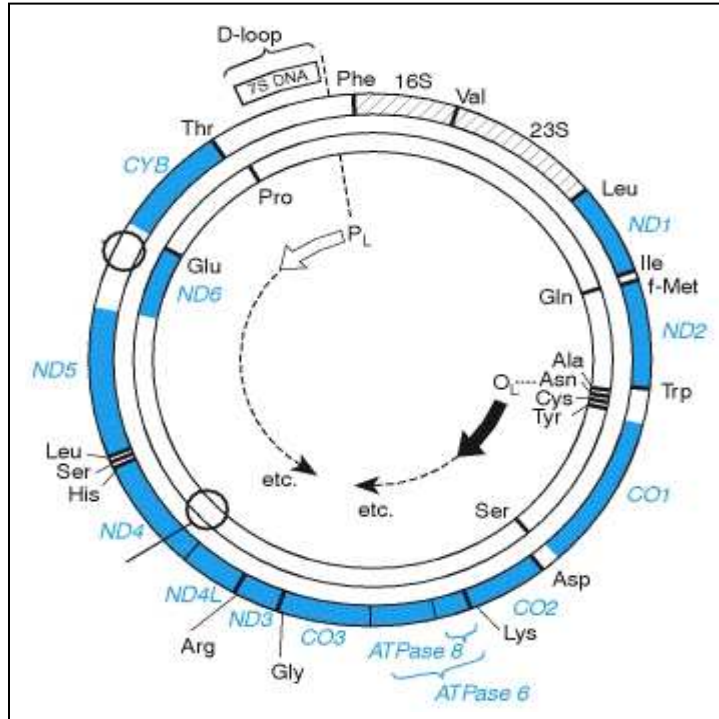


Figura 9- DNA mitocondrial mostrando a localização do gene D-loop.(Human Molecular Genetics 2; 1999).

Microscopia de Imunofluorescência

MVRNs em cultura foram lavados em tampão PBS 0,1M, pH 7,4, por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (p/v) durante 15 minutos à TA. Em seguida, este material foi submetido à reação de imunofluorescência. Após lavagem em PBS 0,1M, pH 7,4, MVRNs foram incubados com solução bloqueadora (0,8% Triton X-100, 3% leite em pó desnatado, diluído em PBS 0,1M, pH 7,4), por 1 hora, à TA, a fim de se evitar a ligação de proteínas não-específicas. A seguir, foram incubados com anticorpo secundário conjugado com *faloidina* conjugada com *isotiocianato de tetrametilrodamina* (diluição 1:100) em solução de anticorpo, por 2 horas, no escuro, à TA. As células foram montadas em Vectashield e examinadas pelo microscópio de fluorescência (LEICA LAS-AF). As imagens das

células foram usadas para a quantificação da área superficial dos cardiomiócitos através do programa LEICA QwinV3.

Mitotracker

MitoTracker Verde (MTG) é um marcador mitocondrial fluorescente seletivo comumente usado em microscopia confocal e citometria de fluxo. Espera-se que o corante se acumule seletivamente na matriz mitocondrial, onde se liga a proteínas covalentemente mitocondrial reagindo com grupos tióis livres de resíduos de cisteína. O kit foi utilizado de acordo com o fabricante.

Imunoprecipitação

Após determinação do conteúdo de proteínas totais, para a investigação da interação entre FAK/ PGC-1 α e PGC-1 α /NRF-1 cerca de 250 μ g de proteínas presentes no extrato total, nuclear e citosólico de MVRNs, submetidos ou não ao estiramento mecânico. Para isto os respectivos extratos foram utilizado para imunoprecipitação *overnight*, à 4°C. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A sepharose 6MB por 2 horas à 4°C. Após isso, as amostras foram centrifugadas (800 x *g*, 20 minutos, 4°C) e submetidas à lavagem com tampão de lavagem (100mM Trisma base, 10mM EDTA, 2mM Na₃VO₄ e 0.5% Triton X-100) por 5 vezes de 1 minuto cada (800 x *g*, 4°C). Em seguida, as proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli⁽⁷¹⁾ contendo 100mmol/l de DTT e aquecidas a 95°C em banho seco por 5 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 proteínas não-específicas 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 (150mM NaCl, 10mM Trisma base e 0.02% Tween 20). Após, a membrana foi incubada com 5 μ Ci de [¹²⁵I] 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. As bandas identificadas foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado o ImageQuant e o programa *ImageJ*.

Ensaio de precipitação (*Pull-down assay*)

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as proteínas recombinantes GST-FERM e GST-Cterminal, ligadas às pérolas de glutathione sefarose. Aproximadamente, 2 μ g de proteínas purificadas foram incubadas com 200 μ g de proteínas obtidas dos extratos nucleares de corações de ratos controle ou estirados por 1 hora. Como controle para ligação não-específica, 200 μ g de proteínas foram incubadas com 2 μ g de GST ligada a pérolas de glutathione. As amostras foram incubadas por 12 horas, 4°C, sob agitação constante. Em seguida, submetidos à centrifugação e o precipitado lavado três vezes com 400 μ L de tampão de lavagem (100mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio). Por fim, foram adicionados 30 μ L de tampão de Laemmli ao precipitado e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Para ensaio de precipitação entre GST-MEF2 e a proteína recombinante His-Cterminal, foram utilizados aproximadamente 1 μ g de cada proteína recombinante e incubadas com tampão de incubação (20mM Tris HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 10 μ g/mL de aprotinina; 1mM PMSF; 1mM DTT; 1% Triton X-100) volume final de 200 μ L por 12 horas. Em seguida, submetidas à

centrifugação e o precipitado lavado três vezes com 400µL de tampão de lavagem (100mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio). Por fim, foram adicionados 30µL de tampão de Laemmli ao precipitado e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Para ensaio de precipitação entre a FAK recombinante humana e o PGC-1 α foram utilizados 0,1µg de GST-PGC-1 α que foram incubados com 0,3µg de FAK com 5µL de tampão MOPS (4mM MgCl₂, 16mM MOPS, 0,4mM EDTA, Ph 7,5) com e sem 500µM de ATP. As reações foram incubadas a 37°C, por 2 horas, 200rpm. O precipitado foi submetido à 3 lavagens com 100µL de tampão MOPS. As reações foram inibidas pela adição de 30µL de tampão de Laemmli e fervura por 5 minutos. As amostras foram separadas em SDS-PAGE e submetidas a ensaio de Western Blotting.

Análise de ATP, ADP, AMP e ADO por cromatografia líquida

Tratamento das amostras de tecidos

Após serem anestesiados, os camundongos foram sacrificados, e o ventrículo esquerdo foi coletado, lavado com salina e imediatamente imerso em um gral com nitrogênio líquido para congelamento e homogeneização. Em seguida, deixou-se o nitrogênio do gral secar e, rapidamente, transferiu-se o homogenato de tecido para um tubo plástico (Eppendorfs) previamente congelado. Estas amostras de tecido foram mantidas a -80°C até o dia da análise, utilizando um método de cromatografia líquida. Antes da injeção no cromatógrafo, os nucleotídeos (ATP, ADP, AMP e ADO) foram extraídos dos tecidos de acordo com o procedimento seguinte: pesou-se entre 1,5 a 3,0mg do homogenato de corações em um tubo de ensaio que continha 1mL de solução de KH₂PO₄ (50mmol L⁻¹) e ácido cítrico (25mmol L⁻¹) em pH 4,5. A mistura foi colocada em banho-maria a 85°C durante 2 minutos para desativar qualquer processo biológico que pudesse degradar os nucleotídeos. Em seguida, foram adicionados mais 3mL de tampão fosfato-citrato. 1mL desta solução foi levado à centrifuga

(8000rpm, 5min.). Desta solução, retirou-se 200 μ L e a derivatização foi conduzida acrescentando-se 20 μ L de 2-cloroacetaldeído (agente de derivatização) (Katayama M, et al, 2001 e Kawamoto Y, et al, 1998). A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 80°C por 20 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, foram injetados 25 μ L para análise no cromatógrafo.

Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Alliance série Waters 2695 (Milford, Mass, USA), equipado com bomba quaternária, injetor e desgaseificador automáticos, e detector de fluorescência série Waters 2475. Os comprimentos de onda para a excitação e emissão foram 280/420nm para os derivados N^1, N^6 -etenopurínicos (ATP, ADP, AMP e ADO) após a derivatização com 2-cloroacetaldeído (Katayama M et al, 2001 e Kawamoto Y et al, 1998). A separação dos compostos foi realizada, à temperatura ambiente, em uma coluna cromatográfica de fase reversa Cosmosil 5C18-MS (150 x 4,6mm i.d.; 5 μ m de tamanho das partículas) protegida com uma pré-coluna (Cosmosil 5C18-MS 10 x 4,6mm) (ambas adquiridas da Phenomenex). A fase móvel usada para promover a separação cromatográfica foi composta por KH_2PO_4 (50mmol L^{-1}), ácido cítrico (25mmol L^{-1}) em pH 4,5 e de metanol, preparada diariamente e filtrada em um sistema a vácuo através de um filtro de 0,45 μ m (Millipore, Milford, Mass, USA). A coluna foi eluída com uma solução gradiente em um fluxo de 1.0mL/min. O gradiente foi o seguinte: fase isocrática em 2% de metanol por 4 minutos, 15% de metanol por 12 minutos e, finalmente, 2% de metanol por 4 minutos para voltar às condições iniciais. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 20 minutos. O controle do sistema, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados através de um computador PC-Pentium IV da Dell, que operou com o programa Microsoft Windows versão 2003 e com o programa cromatográfico Empower 2002.

Derivatização dos nucleosídeos purínicos

A reação da adenina e de seus compostos correlatos (ATP, ADP, AMP e ADO) com 2-cloroacetaldeído produziu os derivados N^1, N^6 -etenopurínicos (Figura 7) que são altamente fluorescentes (Katayama M et al, 2001 e Kawamoto Y et al, 1998). Para a obtenção de derivados N^1, N^6 -etenopurínicos, foram adicionados 10% da solução aquosa de 2-cloroacetaldeído às amostras que continham os nucleosídeos ATP, ADP, AMP e ADO. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 80°C por 20 minutos, sendo a reação bloqueada por imersão do frasco reacional em banho de gelo.

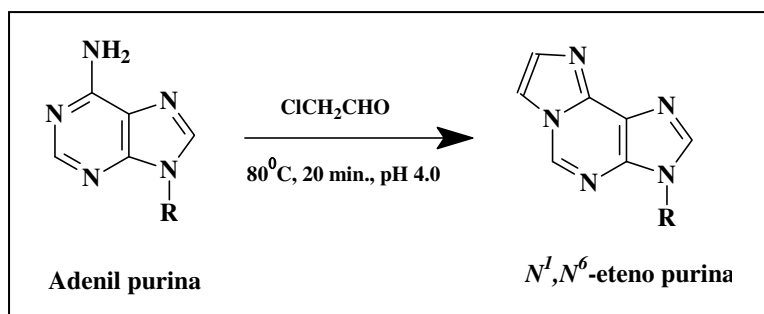


Figura 10- Reação de derivatização de adenil purina pelo 2-cloroacetaldeído [1].

Conforme as condições cromatográficas descritas no item acima, a Figura 9 apresenta um cromatograma representativo de um extrato de coração. Sendo assim, a seletividade entre os compostos pode ser verificada através da forma e resolução simétricas dos picos dos derivados N^1, N^6 -eteno adeninas. O tempo total de corrida cromatográfica foi relativamente curto (20 minutos) em comparação com uma média de tempo de 30 minutos reportado na literatura (Katayama, M. et al, 2001). Os tempos de retenção (t_R) dos derivados de ATP, ADP, AMP e ADO foram de aproximadamente 4,78, 6,29, 10,35 e 15,50 minutos, respectivamente. Esses tempos de retenção alteram-se com a variação da temperatura ambiente. Os valores de comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 280 e 420nm.

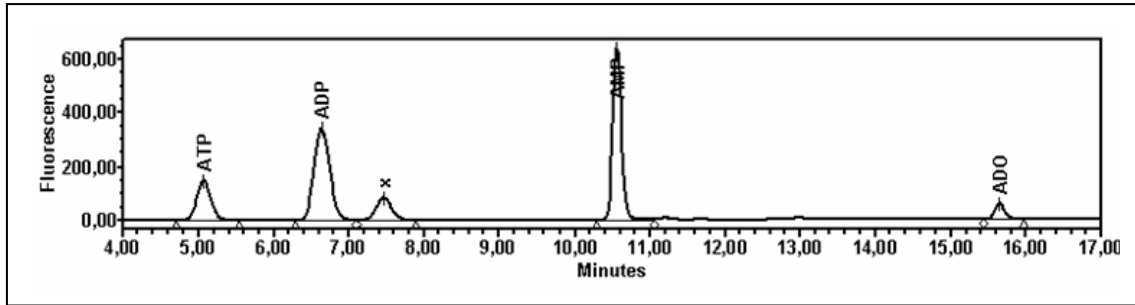


Figura 11- Cromatograma representativo de um extrato de coração contendo os derivados purínicos ATP, ADP, AMP e ADO.

Análise estatística

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



4- RESULTADOS

Estresse mecânico induz a biogênese mitocondrial em MVRNs

Para estabelecer se o estresse mecânico induz a biogênese mitocondrial em MVRNs, inicialmente examinamos a expressão das proteínas PGC-1 α e NRF-1 nas células expostas ao estiramento cíclico de 2 a 12 horas. Gráfico da Figura 12A indica que os níveis de PGC-1 α já estavam aumentados significativamente após 2 horas de estiramento e permaneceu aumentando até próximo das 12 horas. Concomitantemente a expressão da proteína NRF-1 (Figura 12B) também aumentou com o estiramento mecânico. GAPDH foi usado como controle interno. A transcrição do gene Tfam também foi aumentada após 6 horas e 12 horas de estiramento cíclico (Figura 12C).

Para obter maiores evidências da ativação de fatores regulatórios transcricionais relacionados à mitocôndria em cardiomiócitos estirados, examinamos a distribuição subcelular do PGC-1 α e a associação entre PGC-1 α e NRF-1 em extratos nucleares de cardiomiócitos não estirados comparados com células estiradas. PGC-1 α estava mais presente na fração nuclear tanto em MVRNs não estirados quanto estirados. Estresse cíclico durante 2 horas resultou em um grande aumento na quantidade de PGC-1 α no núcleo de MVRNs (Figura 12D). Dados da co-imunoprecipitação indicaram que o estresse mecânico aumenta a associação entre PGC-1 α e NRF-1 no núcleo de MVRNs (Figura 11E).

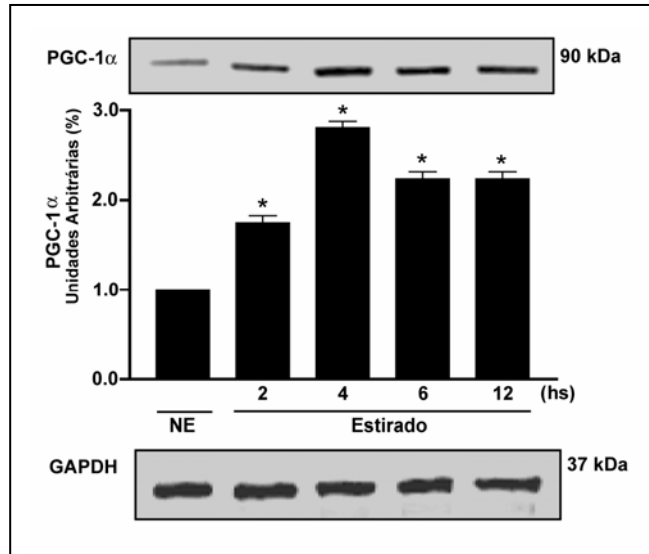


Figura 12A- Estresse cíclico induz a biogênese mitocondrial em MVRNs. **(A)** Gráfico da expressão da proteína PGC-1 α em NE (células não estiradas) e células estiradas (2,4,6,12horas). O gene GAPDH foi usado como controle.

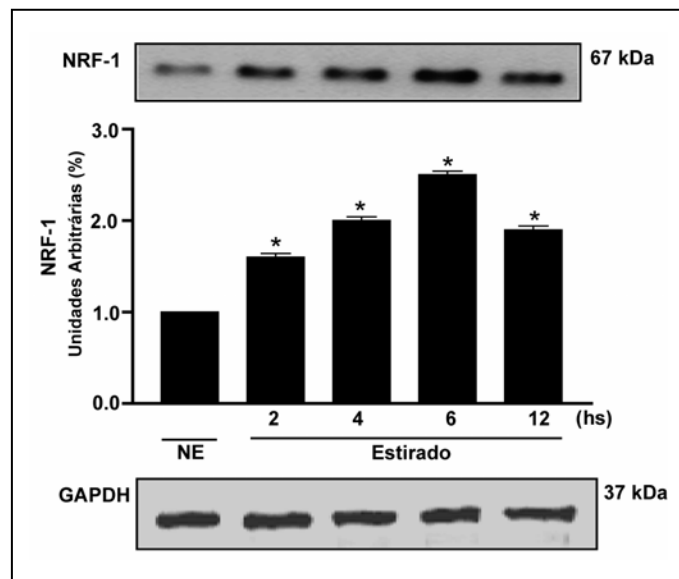


Figura 12B- Western Blotting da proteína NRF-1 em NE (células não estiradas) e células estiradas (2,4,6,12 horas). O gene GAPDH foi usado como controle interno.

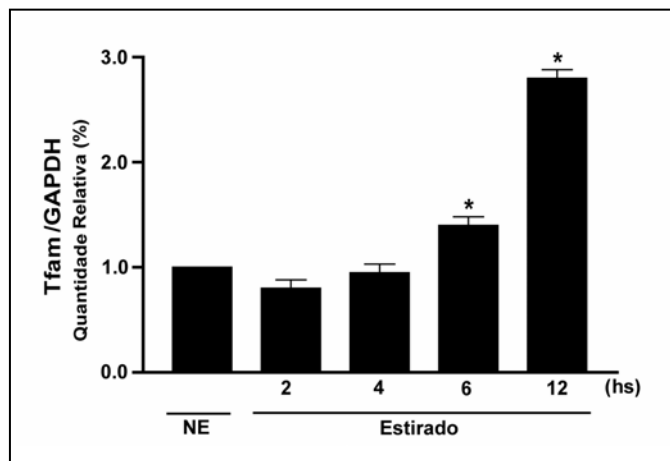


Figura 12C- Gráfico mostra a quantidade relativa (RQ) do gene Tfam obtida por RT-PCR, transcrito GAPDH foi usado como gene calibrador. A amostra de células não estiradas (NE) foi usada como amostra calibradora.

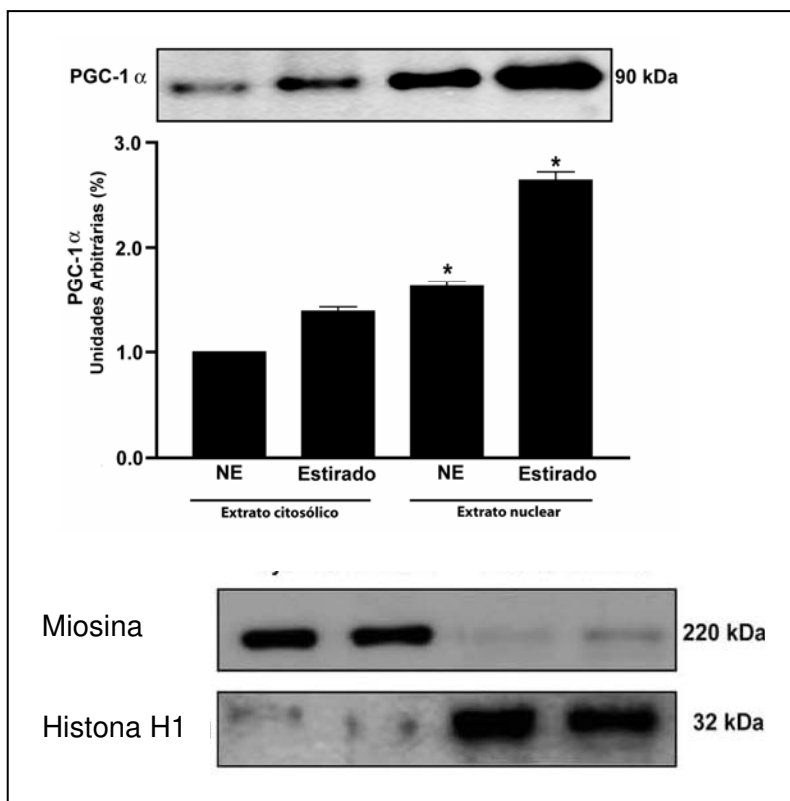


Figura 12D- Localização do PGC-1 α no extratos citosólico e nuclear de cardiomiócitos não estirados comparados com estirados. Imuno-blotting das proteínas histona e miosina foram usados como controle.

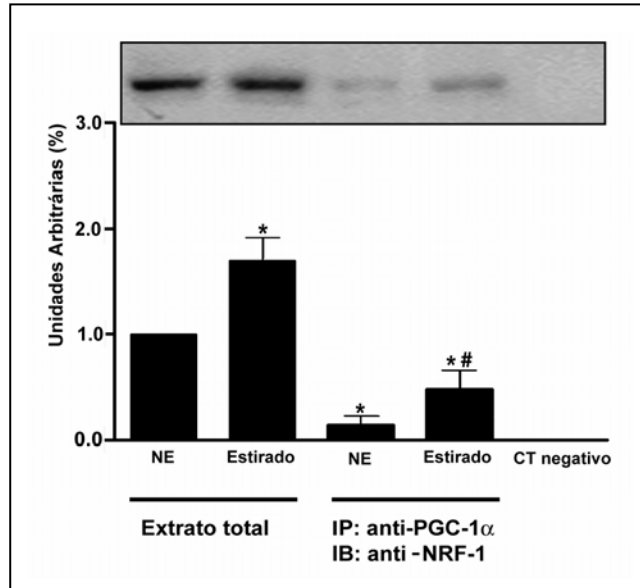


Figura 12E- Associação entre PGC-1 α e NRF-1 no núcleo de cardiomiócitos estirados (controle negativo- sem anticorpo). * $p < 0,05$ versus NE. Dados coletados de 6 culturas de MVRNs.

Para determinar se o aumento de proteínas pertencentes à cascata de biogênese mitocondrial está relacionado com o aumento da mitocôndriogênese, quantificamos o DNA mitocondrial em relação ao DNA genômico e a densidade das mitocôndrias coradas com Mito Tracker no estiramento, comparadas às células não estiradas. Dados mostraram (Figura 13A) que a quantidade relativa de DNA mitocondrial dobrou em células estiradas por 12 horas em relação às não estiradas. Paralelamente a quantidade de mitocôndrias por célula foi aumentada em MVRNs estirados assim como a expressão de COX IV (Figura 13B-C). Figura 11 D-F são exemplos de MVRNs estirados e não estirados corados com Mito Tracker.

Para confirmar que o estiramento mecânico prolongado induz o crescimento hipertrófico de MVRNs, quantificamos através de RT-PCR o gene ANP, marcador de hipertrofia e medimos o tamanho dos MVRNs. Como mostra os

estudos anteriores (16) o transcrito do gene ANP (Figura 13G) e a área celular (Figura 13H) foram aumentadas em MVRNs estirados. Figura 13I-J são exemplos de MVRNs não estirados e estirados corados com faloidina.

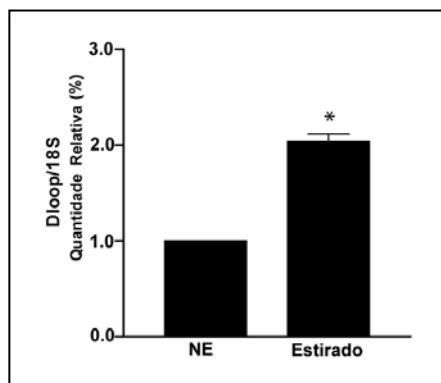


Figura 13A- Gráfico mostra a quantidade relativa do gene Dloop em relação ao gene 18S transcrito como porcentagem da amostra calibradora (NE) obtida por q- real time-PCR.

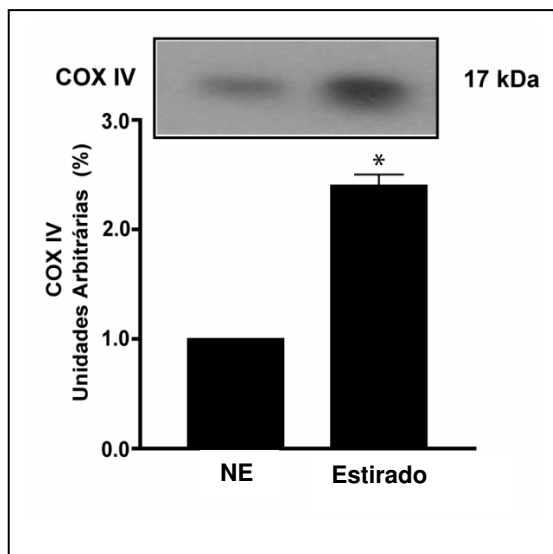


Figura 13B- Western Blotting COX IV.

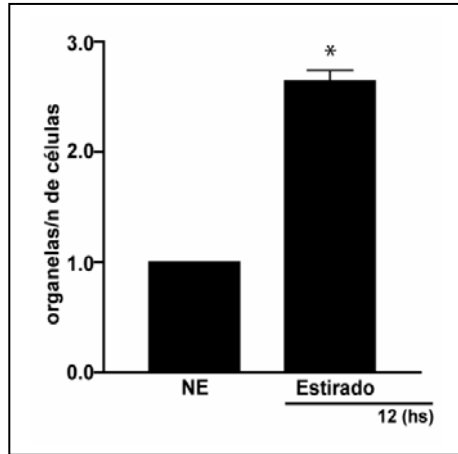


Figura 13C- Número de organelas por cardiomiócitos não estirados (NE) estirados (12 horas).

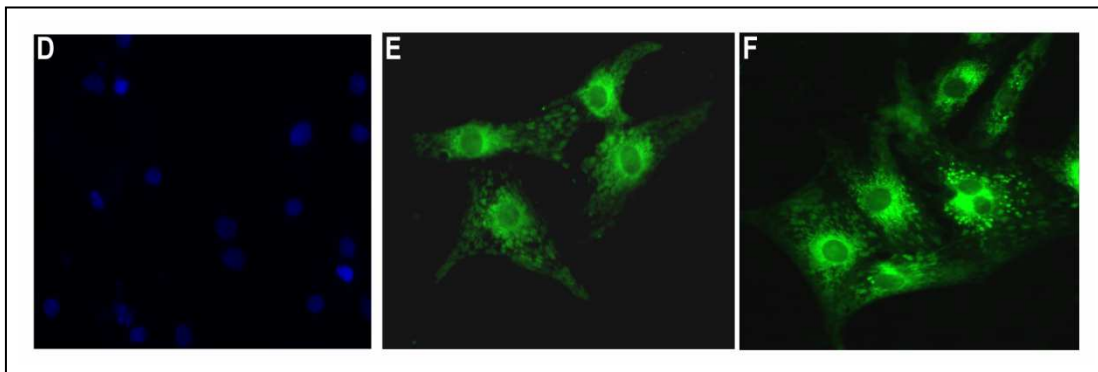


Figura 13D-F- Imagens representativas de fluorescência em cardiomiócitos não estirados(NE) e estirados marcados com Mito Tracker. D-controle Mito Tracker.

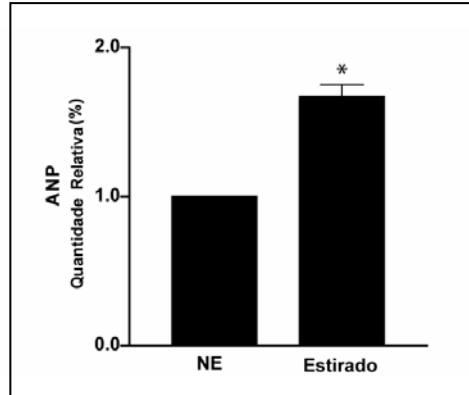


Figura 13G- Gráfico mostra a quantidade relativa (RQ) de ANP comparado com o gene GAPDH transcrito como porcentagem da amostra calibradora (NE) obtida por real time-PCR.

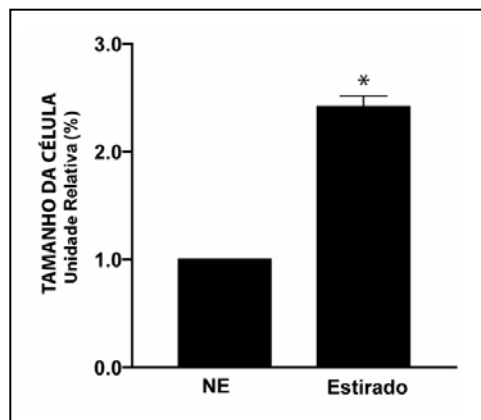


Figura 13H- Área dos cardiomiócitos NE e estirados.

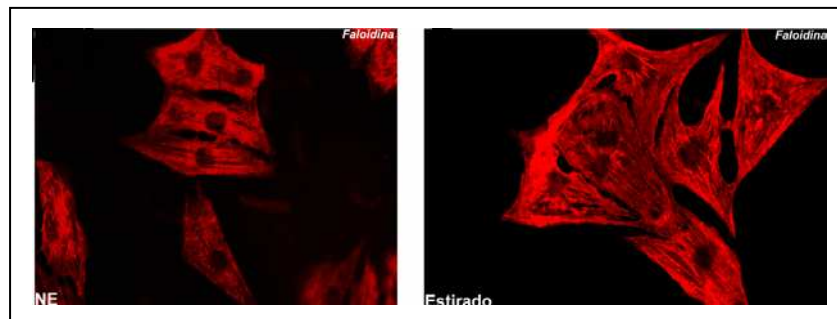


Figura 13 I-J- Exemplos representativos da área de cardiomiócitos não estirados e estirados corados com faloidina. * $p < 0,05$ versus NE. Dados coletados de 6 culturas de MVRNs.

FAK é ativada e interage com PGC-1 α no núcleo de MVRNs.

O papel da FAK tem sido descrito no crescimento hipertrófico de cardiomiócitos em resposta ao estresse mecânico (3, 16, 23). A Figura 14A mostra que o estiramento cíclico de 2 a 12 horas aumenta a fosforilação da FAK no resíduo Tyr397, mas não a expressão da FAK em MVRNs. Além disso, demonstramos que o estiramento cíclico induz a FAK a se realocar no núcleo de MVRNs como mostra a Figura 14B-E. As imagens são confirmadas pelos ensaios feitos com frações subcelulares de extratos celular. A quantidade de FAK foi bem reduzida no citosol, enquanto aumentou na fração nuclear de MVRNs estirados em comparação aos não estirados (Figura 14F). Ensaios de co-imunoprecipitação com extratos nucleares estabeleceram a associação entre FAK e PGC-1 α em MVRNs estirados (Figura 14G). Esta interação entre FAK e PGC-1 α é demonstrada pela imunoprecipitação de extratos nucleares de MVRNs mostrando que o domínio C-terminal da FAK, mas não o FERM ou domínio kinase estão interagindo (Figura 14H).

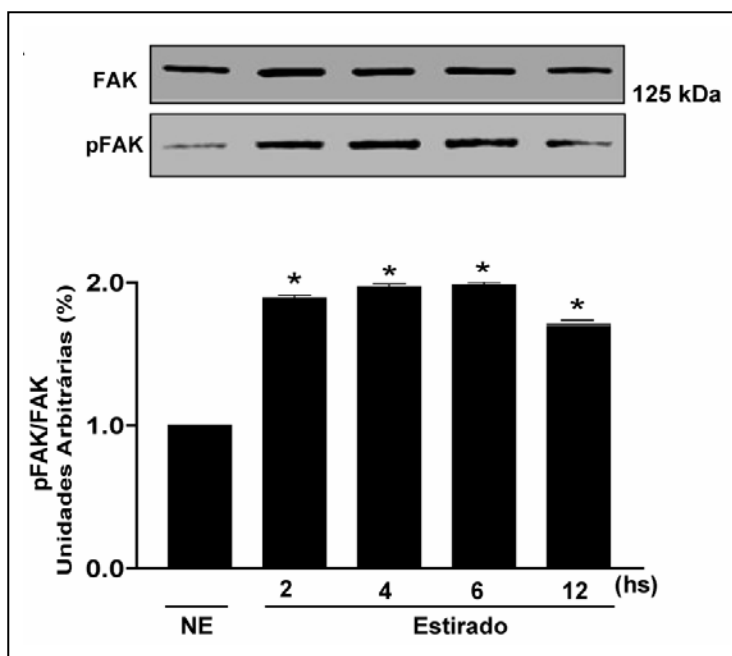


Figura 14A- Expressão protéica pFAK/FAK em NE(células não estiradas) e células estiradas (2,4,6,12 horas).

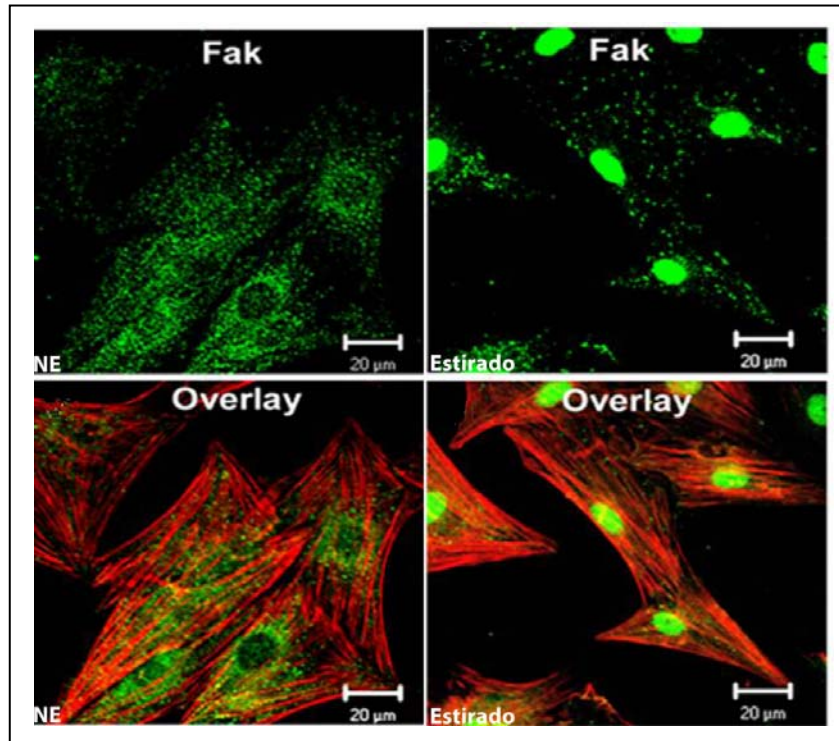


Figura 14B-E- Estresse cíclico induz a FAK a se realocar no núcleo de cardiomiócitos (vermelho-faloidina/verde- Alexa Green 488).

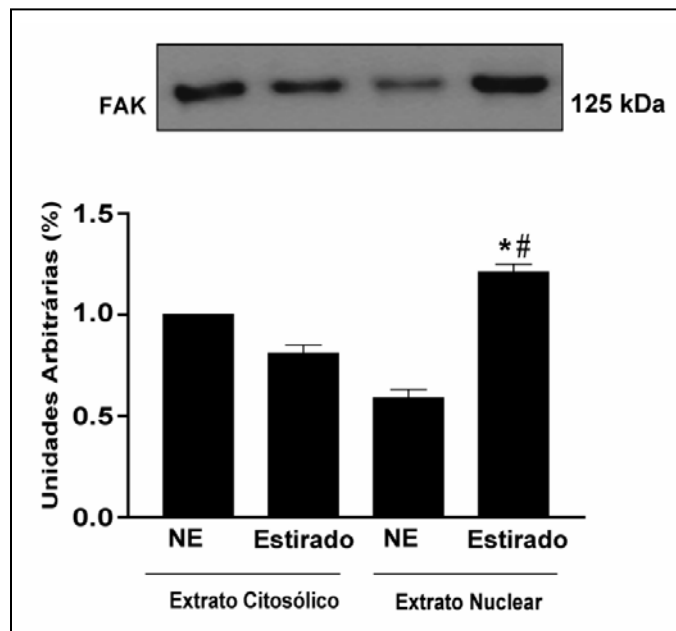


Figura 14F- Localização da FAK nos extratos citosólico e nuclear de cardiomiócitos não estirados comparados com estirados.

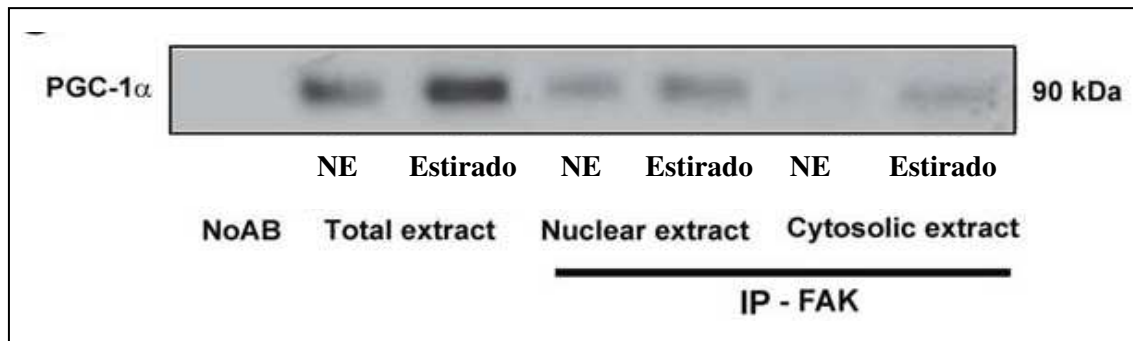


Figura 14G- Co-imunoprecipitação da FAK associada ao PGC-1 α . Ensaios feitos com extratos totais, nucleares e citosólicos de cardiomiócitos estirados e não estirados.

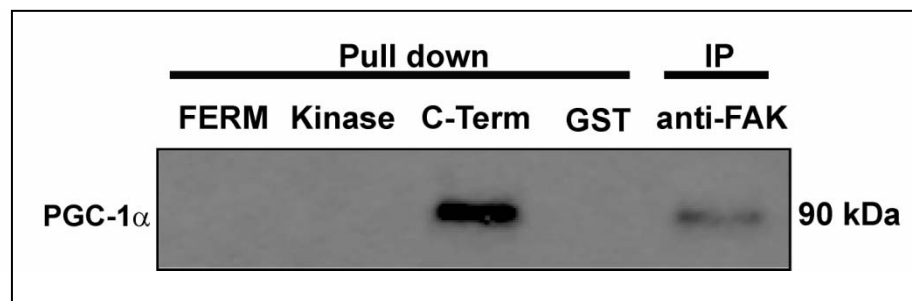


Figura 14H- Pull down da FAK com PGC-1 α de extratos nucleares de MVRNs. * $p < 0,05$ versus NE. # $p < 0,05$ versus NE de extrato nuclear. Dados coletados de 6 culturas de MVRNs.

FAK medeia a hipertrofia e a biogênese mitocondrial induzida pelo estresse em MVRNs

Para determinar se a sinalização mediada pela FAK é necessária na ativação da cascata regulatória mitocondrial em resposta ao estresse mecânico, MVRNs foram tratados silenciados para o gene da FAK com o RNA de interferência. Estudos anteriores mostraram que o tratamento de células com siFAK (16) apresentam uma redução acentuada da expressão da proteína FAK

em MVRNs tanto não estirados como estirados em relação às células tratadas com siGFP (Figura 15A). A depleção da FAK reduz os níveis basais de PGC-1 α e NRF-1 assim como aumenta estes níveis em MVRNs estirados (Figura 15B-C). Além disso, a deleção da FAK inibe o aumento da associação entre o PGC-1 α e NRF-1 no núcleo de MVRNs induzido pelo estresse mecânico (Figura 15D).

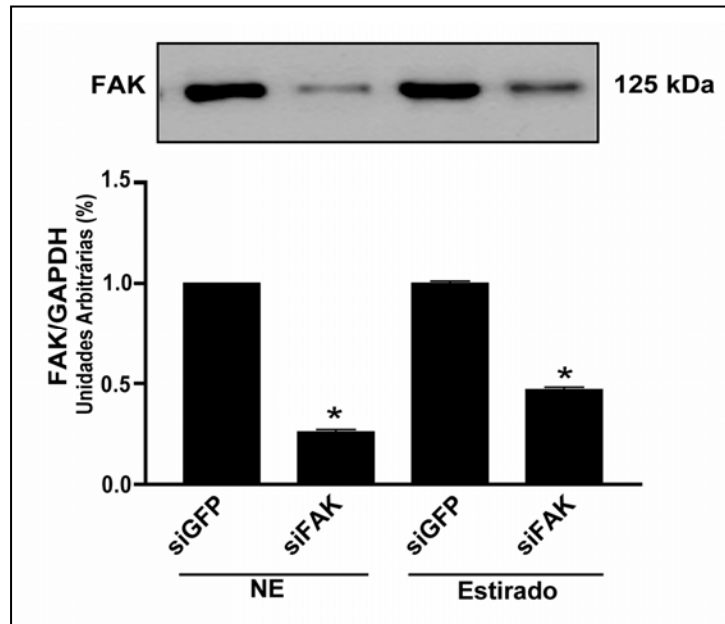


Figura 15A- Expressão da proteína FAK em cardiomiócitos não estirados comparados com células estiradas, tratadas com siFAK comparadas com células tratadas com siGFP.

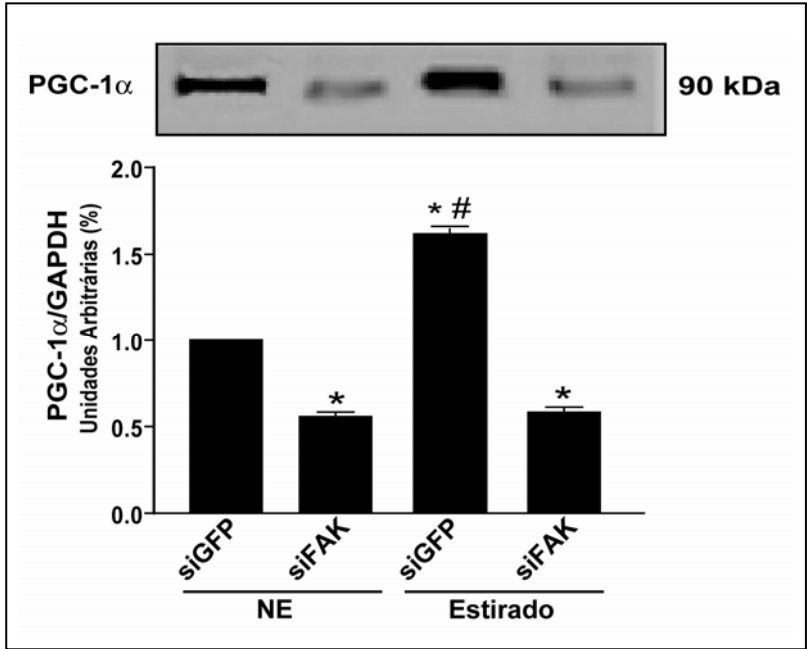


Figura 15B- Expressão da proteína PGC-1 α em cardiomiócitos não estirados e estirados, tratados com siFAK comparados com células tratadas com siGFP.

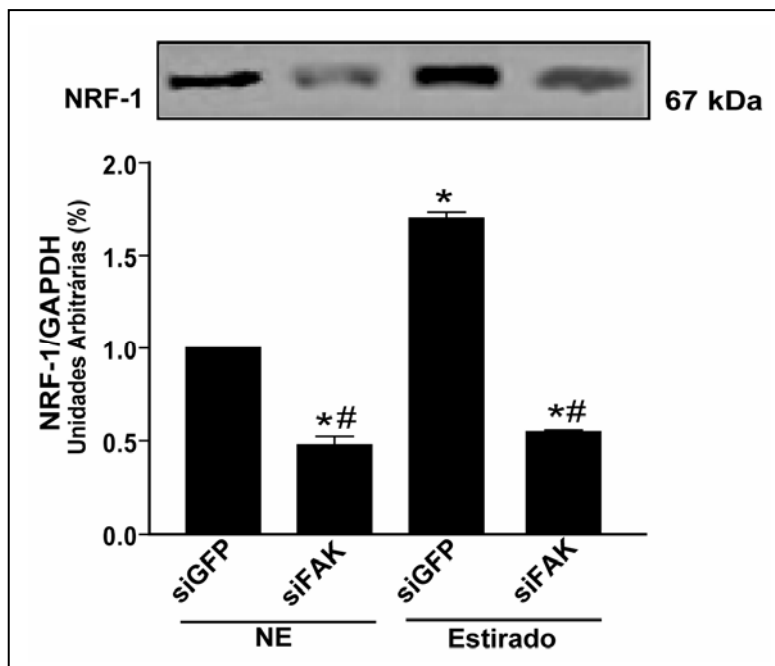


Figura 15C- Expressão da proteína NRF-1 em cardiomiócitos não estirados e estirados, tratados com siFAK comparados com células tratadas com siGFP.

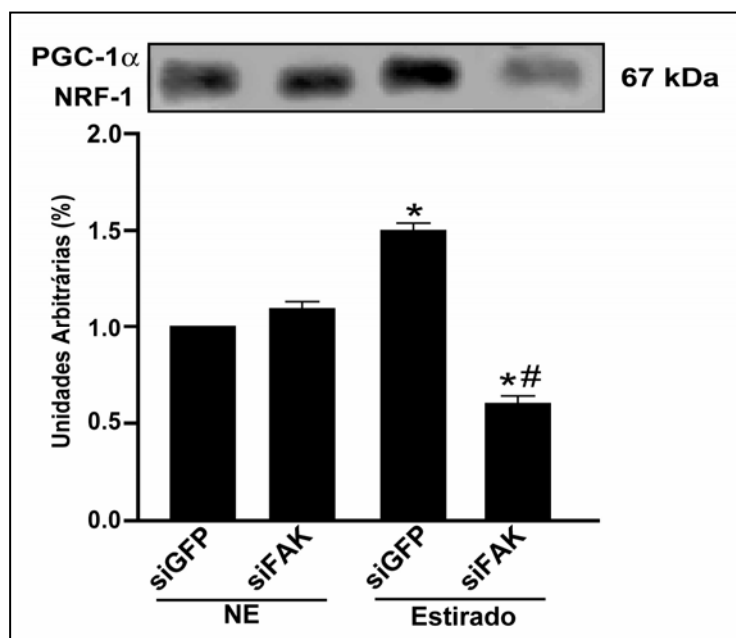


Figura 15D- Associação de PGC-1α e NRF-1 induzida por estresse cíclico no núcleo dos MVRNs. * $p < 0,05$ versus siGFP NE. # $p < 0,05$ versus siGFP estirados do extrato nuclear. Dados coletados de 6 culturas de MVRNs.

A deleção do gene da FAK não modificou os níveis basais do DNAm^t (Figura 16A-D) e o número de mitocôndrias por cardiomiócitos (Figura 16E-F), mas suprimiu o aumento destes em MVRNs estirados. Dado que a mitocôndria é a maior fonte de energia em cardiomiócitos, a seguir examinamos se a atenuação da biogênese mitocondrial induzida pela depleção da FAK era acompanhada por mudanças na quantidade de ATP em MVRNs. Dados (Figura 16H) indicam que o silenciamento da FAK não modifica a quantidade de ATP em MVRNs não estirados. Entretanto, reduz marcadamente a quantidade de ATP em células estiradas tratadas com siFAK.

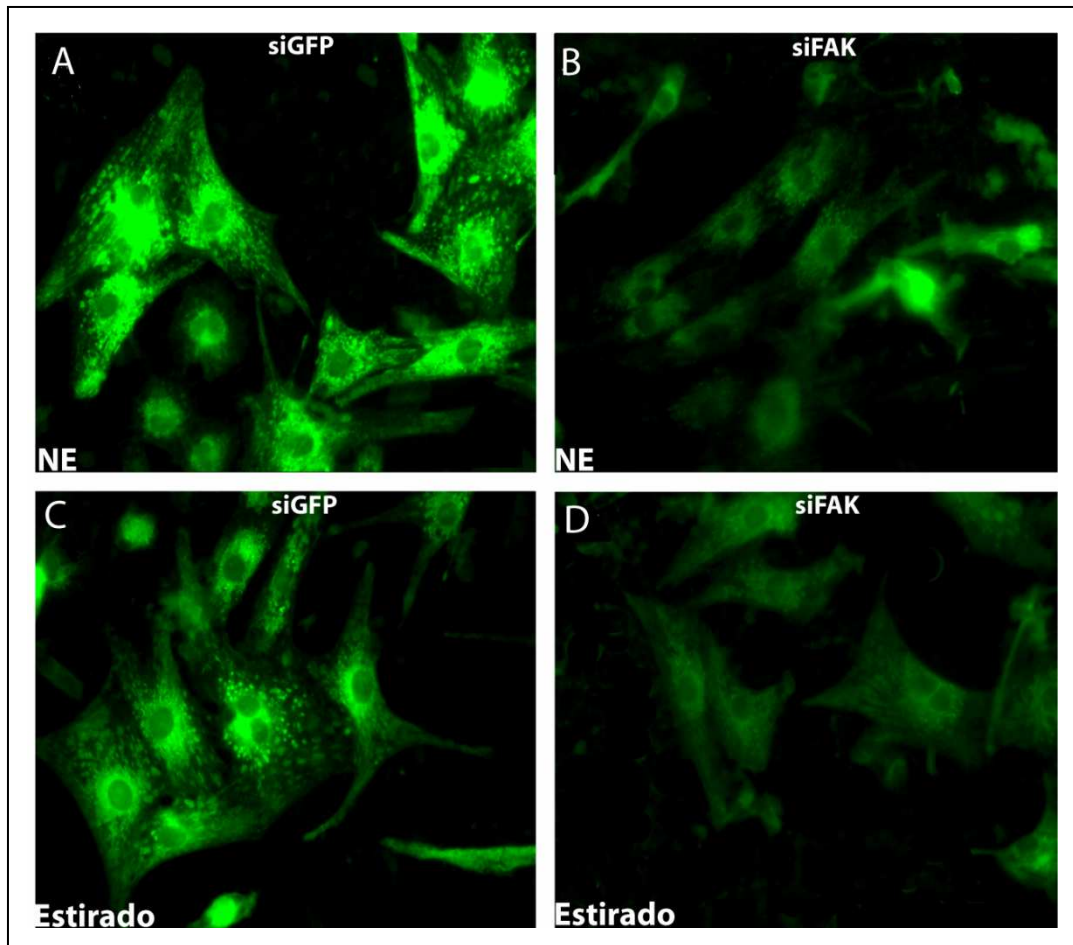


Figura 16A-D- Exemplos representativos de cardiomiócitos não estirados e estirados tratados siFAK and siGFP corados com Mitotracker.

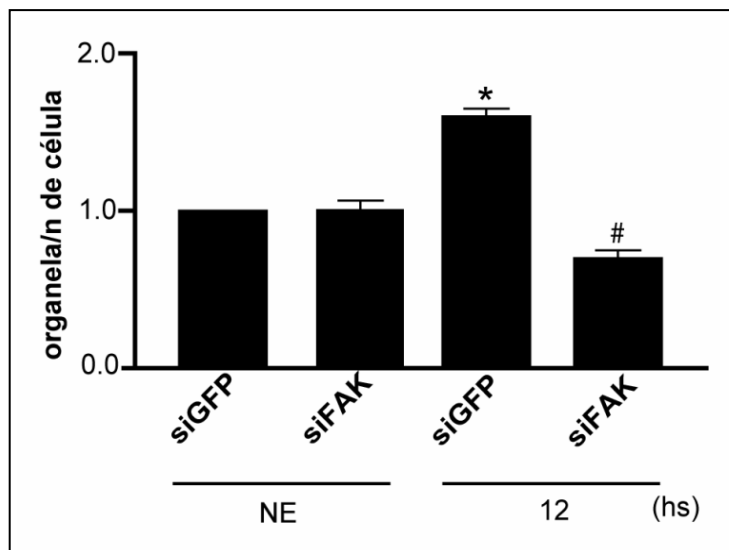


Figura 16E- Gráfico de barras mostra a quantidade de organelas por número de cardiomiócitos.

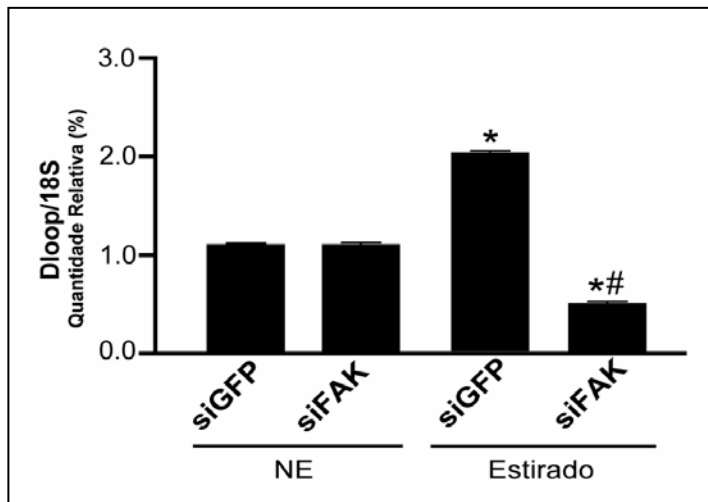


Figura 16F- Gráfico mostra a quantidade relativa de (QR) mtDNA (mt - mitocondrial) comparada com nDNA (n - nuclear).

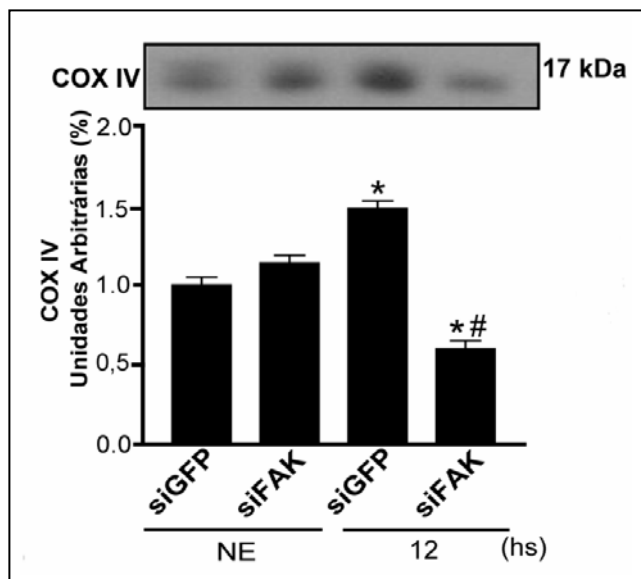


Figura 16G- Western Blotting da proteína COX IV

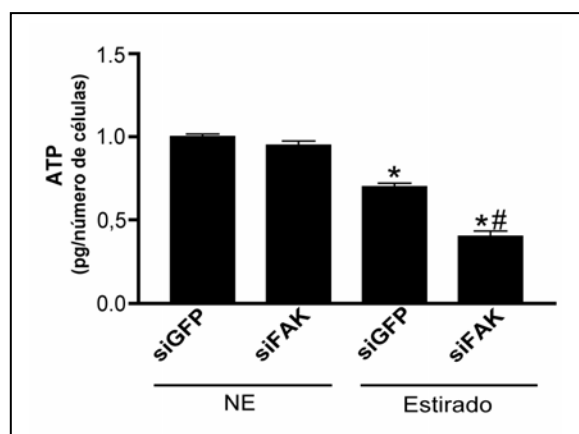


Figura 16H- Gráfico mostra a quantidade de ATP em cardiomiócitos NE e estirados através de análise por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão). * $p < 0,05$ versus siGFP NE. # $p < 0,05$ versus siGFP células estiradas de extrato nuclear. Dados coletados de 6 culturas de MVRNs.

Deleção da FAK mostrou atenuar o aumento da transcrição do gene ANP (Figura 17A) e o tamanho dos MVRNs (Figura 17B) induzidos por estiramento cíclico. A Figura 17C-F mostra exemplos representativos de MVRNs não estirados e estirados tratados com siFAK e GFP marcados com faloidina.

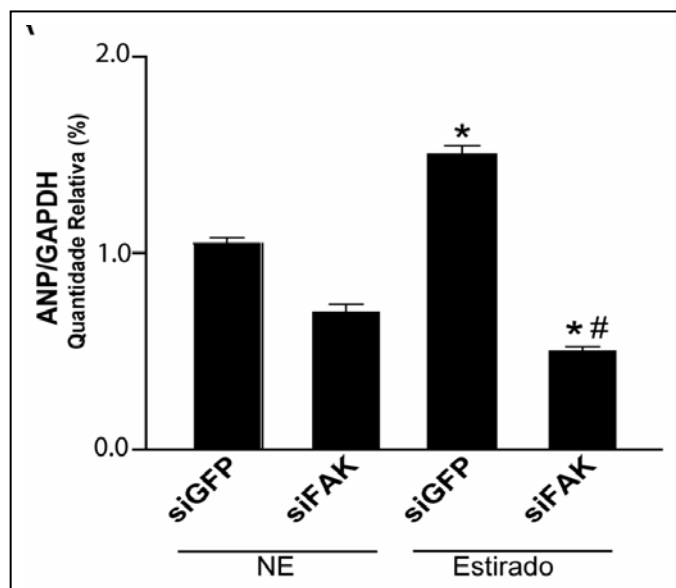


Figura 17A- Gráfico mostra a quantidade relativa (QR) de ANP em relação ao transcrito do gene GAPDH em porcentagem com a amostra calibradora (siGFP NE) obtida por real time-PCR.

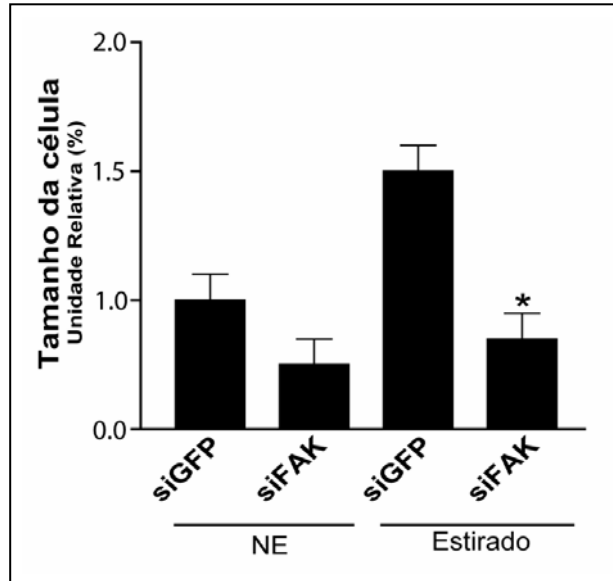


Figura 17B- Tamanho de cardiomiócitos NE e estirados, tratados com siFAK e com siGFP.

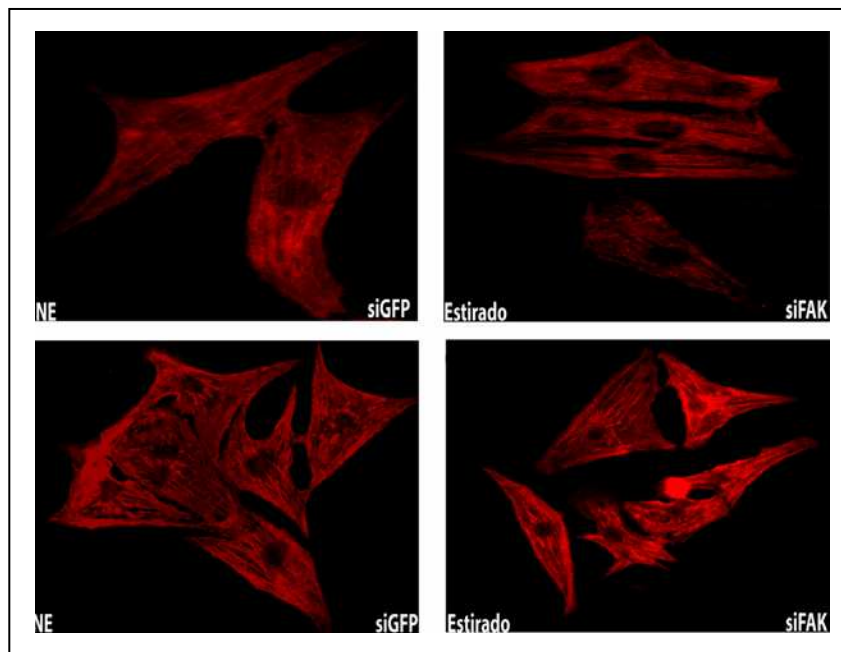


Figura 17C-F- Exemplos representativos de cardiomiócitos não estirados e estirados tratados com siFAK e siGFP corados com faloidina conjugada a rodamina. * $p < 0,05$ vs siGFP NE. # $p < 0,05$ vs siGFP células estiradas de extrato nuclear. Dados coletados de 6 culturas de MVRNs.

Depleção da FAK atenua o aumento da transcrição da cascata e biogênese mitocondrial em camundongos submetidos à coarctação da aorta

Para investigar se a sinalização mediada pela FAK podia afetar a transcrição da cascata e biogênese mitocondrial em camundongos submetidos à coarctação da aorta, o gene da FAK foi transientemente depletado nos ventrículos esquerdo de camundongos pela técnica de interferência por RNA previamente validada (3). Confirmamos a depleção da FAK (até 15 dias) induzida por siRNA no ventrículo esquerdo de camundongos submetidos à coarctação da aorta (Figura 18A). A depleção da FAK mostrou atenuar a hipertrofia no ventrículo esquerdo de animais submetidos à sobrecarga pressórica, como evidencia a gravimetria. (Figura 18B), ecocardiografia (Figura 18C) e a expressão do gene ANP do miocárdio (Figura 18D).

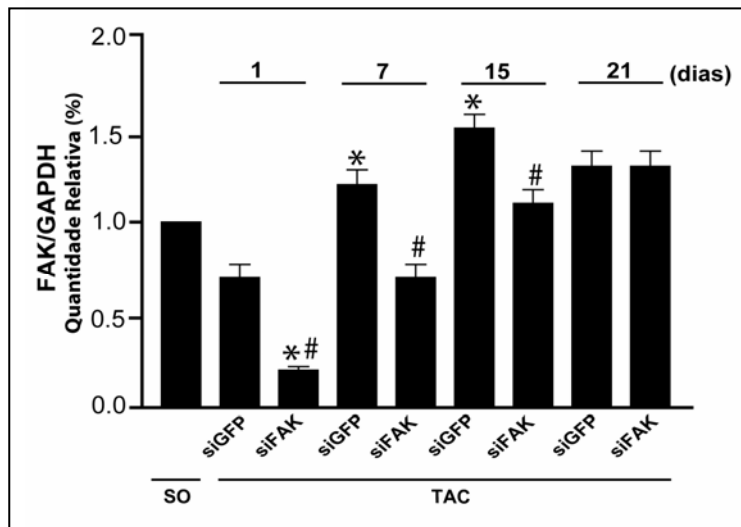


Figura 18A- A depleção da FAK atenua o aumento de PGC-1 α , NRF-1 e da mitocondriogênese em camundongos submetidos à sobrecarga pressórica. Dados de animais submetidos à cirurgia fictícia (SO) e à coarctação da aorta (1 a 21 dias depois da coarctação da aorta - TAC). **(A)** Gráfico mostra a QR do transcrito da FAK em animais coarctados (TAC) e com cirurgia fictícia (SO) tratados com siRNA (FAK ou GFP).

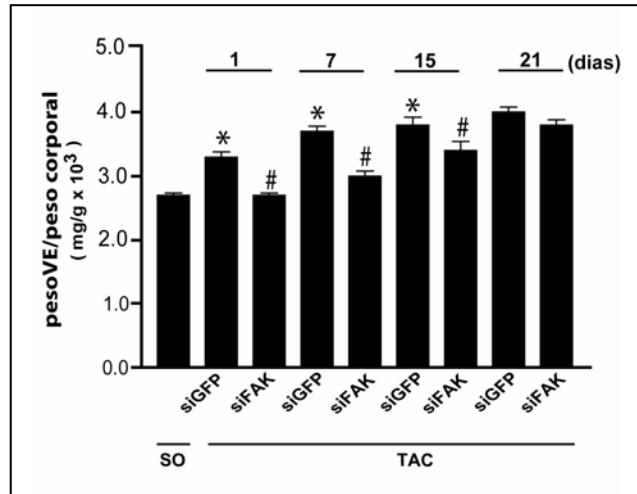


Figura 18B- Gráfico mostra a razão entre a massa corpórea e a massa do ventrículo esquerdo dos animais coarctados (TAC) e com cirurgia fictícia (SO) tratados com siRNA (FAK ou GFP).

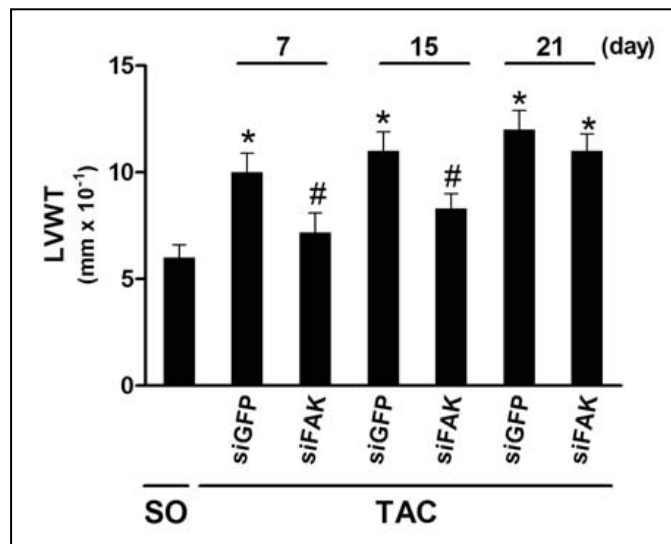


Figura 18C- Valores da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo dos animais coarctados (TAC) e com cirurgia fictícia (SO) tratados com siRNA (FAK ou GFP), conforme determinados por ecocardiografia .

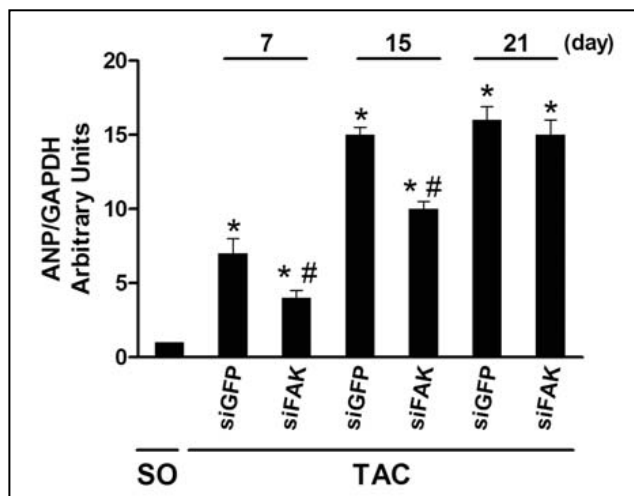


Figura 18D- Gráfico mostra quantidade relativa (QR) de ANP em relação ao transcrito do gene GAPDH como porcentagem da amostra calibradora (SOsiGFP) obtida por real time-PCR. * $p < 0,05$ vs SO. # $p < 0,05$ vs TACsiGFP do grupo correspondente. (n=9 camundongos em cada grupo).

O próximo passo tomado neste estudo foi definir os efeitos na cascata de transcrição mitocondrial do estresse mecânico no ventrículo esquerdo de camundongos. A expressão do PGC-1 α e NRF-1 foi determinada com extratos totais de ventrículos esquerdo de animais submetidos a sobrecarga pressora por coarctação da aorta. Como mostrado na Figura 18A, a quantidade de PGC-1 α mais que triplica em camundongos com 1 dia de coarctação da aorta em comparação ao controle sham, persistindo até 15 dias de coarctação retornando aos níveis basais depois de 21 dias de coarctação da aorta. Estas mudanças no perfil da proteína PGC-1 α ocorreram paralelamente às mudanças nos níveis da proteína NRF-1, indicando a ativação da cascata de transcrição mitocondrial em animais submetidos à sobrecarga pressora. O *knockdown* FAK suprimiu os efeitos da sobrecarga pressora em relação às proteínas PGC-1 α e NRF-1 no miocárdio de camundongos (Figura 19 A,B). Como mostrado na Figura 19C,

a coarctação da aorta aumentou o DNA mitocondrial nos ventrículos esquerdo de camundongos submetidos à TAC. A depleção da FAK, suprimiu o aumento da replicação do mtDNA no ventrículo esquerdo de camundongos do grupo de 15 dias.

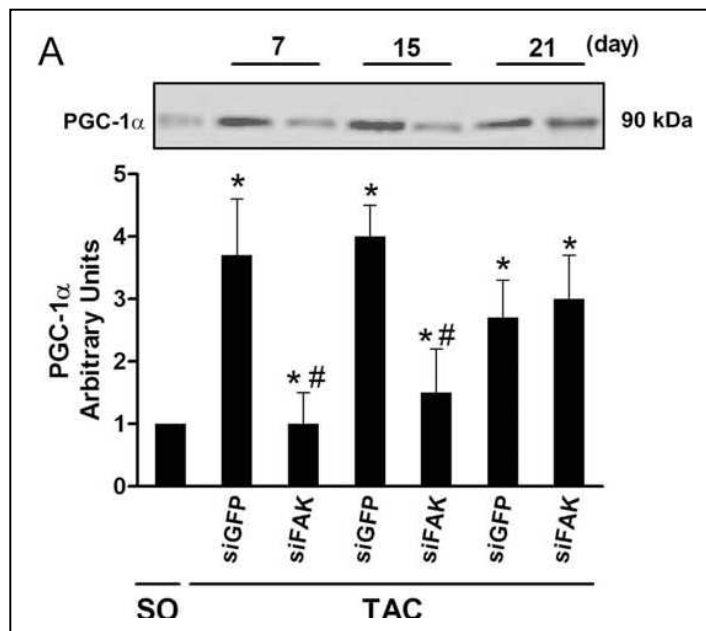


Figura 19A- Expressão da proteína PGC-1 α através de Western Blotting.

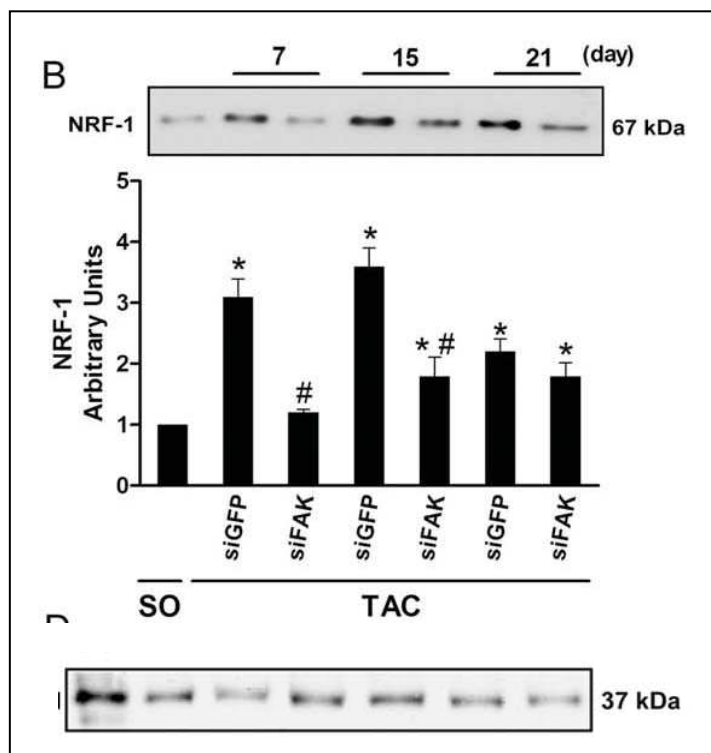


Figura 19B- Expressão da proteína NRF-1. A expressão da proteína GAPDH foi usada como controle.

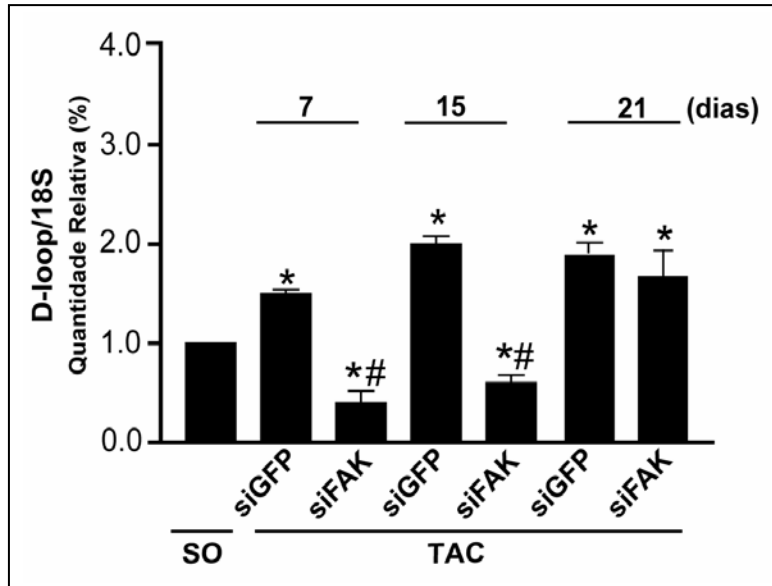


Figura 19C- Gráfico demonstra a quantidade relativa (QR) do gene Dloop em comparação o transcrito 18S como porcentagem da amostra calibradora (SOsiGFP) obtida por q- real time-PCR. * $p < 0,05$ vs SO. # $p < 0,05$ vs TACsiGFP do grupo correspondente. (n=9 camundongos em cada grupo).



5- DISCUSSÃO

Recentemente, houve um grande progresso no entendimento da função da FAK no crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo provocado por estímulos mecânicos. Esta é uma questão importante dada a sua relevância clínica, pois a presença da hipertrofia cardíaca em doenças, como hipertensão, é determinante de mal prognóstico. Porém, os dados atuais obtidos em camundongos com deleção condicional da FAK, dirigida pelo promotor da miosina de cadeia leve (26,68), para avaliar a importância da FAK na instalação da hipertrofia adaptativa cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica foram discrepantes e inconclusivos. A longo prazo, se a FAK é importante na prevenção ou contribui para a deterioração da função cardíaca ainda é um ponto a ser esclarecido (68,141). Assim, estes resultados conflitantes e as limitações impostas pela deleção de FAK restrita aos cardiomiócitos excluem um melhor entendimento da importância da sinalização da FAK na fisiopatologia complexa da hipertrofia e sua progressão para a insuficiência cardíaca decorrente da resposta à sobrecarga mecânica. A habilidade de siRNAs sintéticos administrados de modo sistêmico em reduzir eficientemente a expressão de proteínas alvo específicas foi demonstrada em alguns poucos modelos de doenças em pequenos roedores (142, 143). Nestes estudos, o silenciamento transiente do gene da FAK no miocárdio permitiu a definição de um papel para esta molécula de sinalização na fisiopatologia complexa da hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida por sobrecarga pressórica e seu progresso para o remodelamento maladaptativo.

Estudos anteriores em cardiomiócitos isolados e modelos animais de doenças cardíacas tiveram como resultado que a FAK é um importante mediador da resposta ao estresse mecânico no cardiomiócito (3, 9, 16, 17, 23). Novos resultados do presente estudo indicam que cardiomiócitos com a deleção da FAK, mostraram uma acentuada atenuação da biogênese mitocondrial em resposta ao estresse mecânico. Dados de estudos bioquímicos revelaram que a FAK se associa ao coactivador PGC-1 α no núcleo de células estiradas e a depleção da FAK bloqueia a hiper regulação do PGC-1 α e NRF-1 em cardiomiócitos submetidos ao estresse mecânico, indicando que a FAK pode

controlar a capacidade que o PGC-1 α possui de regular a maquinaria de transcrição mitocondrial em resposta ao estresse mecânico em cardiomiócitos.

Silenciamento do gene da FAK *in vivo* por iRNA

A injeção hidrodinâmica em camundongos foi o método pioneiro empregado na administração sistêmica de siRNA não modificado *in vivo* (149). Neste método, é feita uma injeção rápida e de grande volume de solução de siRNA na veia caudal de camundongos. Com o fluxo dinâmico, há o desenvolvimento de uma pressão hidrostática alta na veia cava inferior, forçando o fluxo da solução de siRNA para tecidos como fígado e rim, que são diretamente ligados a veia cava inferior. Como o fígado é o maior órgão e com uma estrutura expansível, uma grande quantidade de siRNA é forçada no fígado em uma direção oposta à circulação normal, resultando na exposição direta das moléculas de siRNA nas células do fígado antes da sua distribuição para os outros tecidos (150).

Desta maneira, este método visa a entrega de siRNA preferencialmente ao fígado, rim, baço e pâncreas; com menor eficiência nos outros órgãos (151). Em outro estudo do nosso laboratório foi demonstrado que a injeção de siRNAFAK na veia caudal não alterou a expressão da FAK no VE de camundongos. Desta maneira, a principal barreira para o uso de iRNA em mamíferos é a dificuldade de absorção de siRNA no tecido desejado(12).

Atualmente, tem se demonstrado que a absorção de siRNAs pode ser alcançada através da injeção na vasculatura local do tecido de interesse (152; 153; 154). Em outro estudo do laboratório (12), foi desenvolvido um método eficaz de administração de siRNA não modificado no coração através da injeção na veia jugular direita de camundongos adultos.

FAK e a biogênese mitocondrial em cardiomiócitos

A deleção do gene da FAK mostrou atenuar respostas hipertróficas nos cardiomiócitos em cultura e no ventrículo esquerdo de camundongos submetidos ao estresse mecânico, como citado anteriormente (3, 16, 17). Este efeito tem sido atribuído à ativação “defeituosa” da cascata de sinalização Erk1/2, PI3 Kinase/AKT e mTOR/S6K em resposta ao estresse mecânico (8, 9). Demonstramos também que o bloqueio do gene da FAK em cardiomiócitos atenua o aumento do número de mitocôndrias por célula e também o número de cópias do DNA mitocondrial em resposta ao estresse cíclico, aludindo à sinalização mediada pela FAK como um papel crítico na ativação da biogênese mitocondrial que ocorre em resposta ao estresse mecânico. De acordo com estes dados que mostraram que a depleção da FAK inibiu a hiper regulação do PGC-1 α e NRF-1 em cardiomiócitos estirados, apóiam que a sinalização mediada pela FAK modula a cascata transcricional em resposta ao estresse mecânico. Outra evidência apoiada pelos ensaios da co-imunoprecipitação e “*pull-down*” indicaram que a FAK pode se complexar com o PGC1 α no núcleo dos cardiomiócitos estirados, implicando na influência direta da FAK em eventos transcricionais modulados pelo PGC-1 α em cardiomiócitos estirados. Concomitante à isso, a FAK demonstrou se recolocalizar no núcleo de cardiomiócitos estirados e regular o remodelamento da cromatina e transcrição nas células musculares (7, 15). Tendo em conta que os níveis de PGC-1 α são submetidos à um ciclo positivo autoregulatório, é tentador especular que a falta da hiper regulação do PGC-1 α em cardiomiócitos com deleção da FAK poderia refletir no rompimento do complexo nuclear envolvendo FAK e PGC-1 α . Entretanto, nossos dados não excluem a possibilidade de eventos de sinalização intermediários contribuírem na regulação do PGC-1 α pela FAK.

Efeitos da deleção da FAK em ventrículos esquerdos hipertrofiados por sobrecarga pressórica

Apesar da falta adequada de resposta hipertrófica, a função foi preservada no ventrículo esquerdo dos animais que foram tratados com siRNA da FAK e que sofreu sobrecarga pressórica, como foi demonstrado (12). Isso sugere que a deleção da FAK pode atenuar efeitos adversos da função do ventrículo esquerdo com sobrecarga pressórica. Os efeitos benéficos da deleção da FAK podem ser parcialmente mediados pela atenuação da fibrose intersticial no miocárdio sobrecarregado (12). Portanto, a sinalização mediada pela FAK desempenha um papel na fibrogênese do miocárdio (13). Entretanto, modificações na estrutura e funções dos cardiomiócitos podem estar envolvidas. Os dados do presente estudo revelam que a depleção da FAK atenua a biogênese mitocondrial nos ventrículos dos animais que sofreram sobrecarga pressórica. Isto implica que a modulação da biogênese mitocondrial na sobrecarga induzida pode contribuir com os efeitos benéficos da deleção da FAK no miocárdio sobrecarregado. Por outro lado, sugere que a ativação da biogênese mitocondrial na resposta hipertrófica precoce seria prejudicial ao ventrículo esquerdo sobrecarregado. Portanto, o aumento da massa mitocondrial poderia induzir de forma anormal um alto estresse oxidativo no miocárdio que por sua vez poderia induzir uma perda celular nos períodos iniciais de sobrecarga mecânica (30).

O aumento da biogênese mitocondrial é um fenômeno bem conhecido em disordens mitocondriais (144). No músculo esquelético, a proliferação mitocondrial tem se mostrado parcialmente compensada pela disfunção respiratória através da manutenção da produção global de ATP (145); a marca histopatológica deste fenômeno é a presença de um aumentado número de mitocôndrias, a maioria na região do subsarcolema.

Entretanto, no músculo cardíaco, a indução da biogênese mitocondrial tem sido analisada como uma resposta mal adaptativa. De fato, a indução cardíaca específica de PGC-1 α em camundongos resulta características

morfológicas de disfunção cardíaca da proliferação mitocondrial do miócito e desorganização e perda das miofibrilas.

Curiosamente, a proliferação mitocondrial e a cardiomiopatia são reversíveis após a cessação da expressão transgênica (146). Outros achados paralelos à estas características reportaram um modelo experimental, sugerindo que a proliferação mitocondrial está ligada à uma disfunção cardíaca progressiva, também em humanos (30).

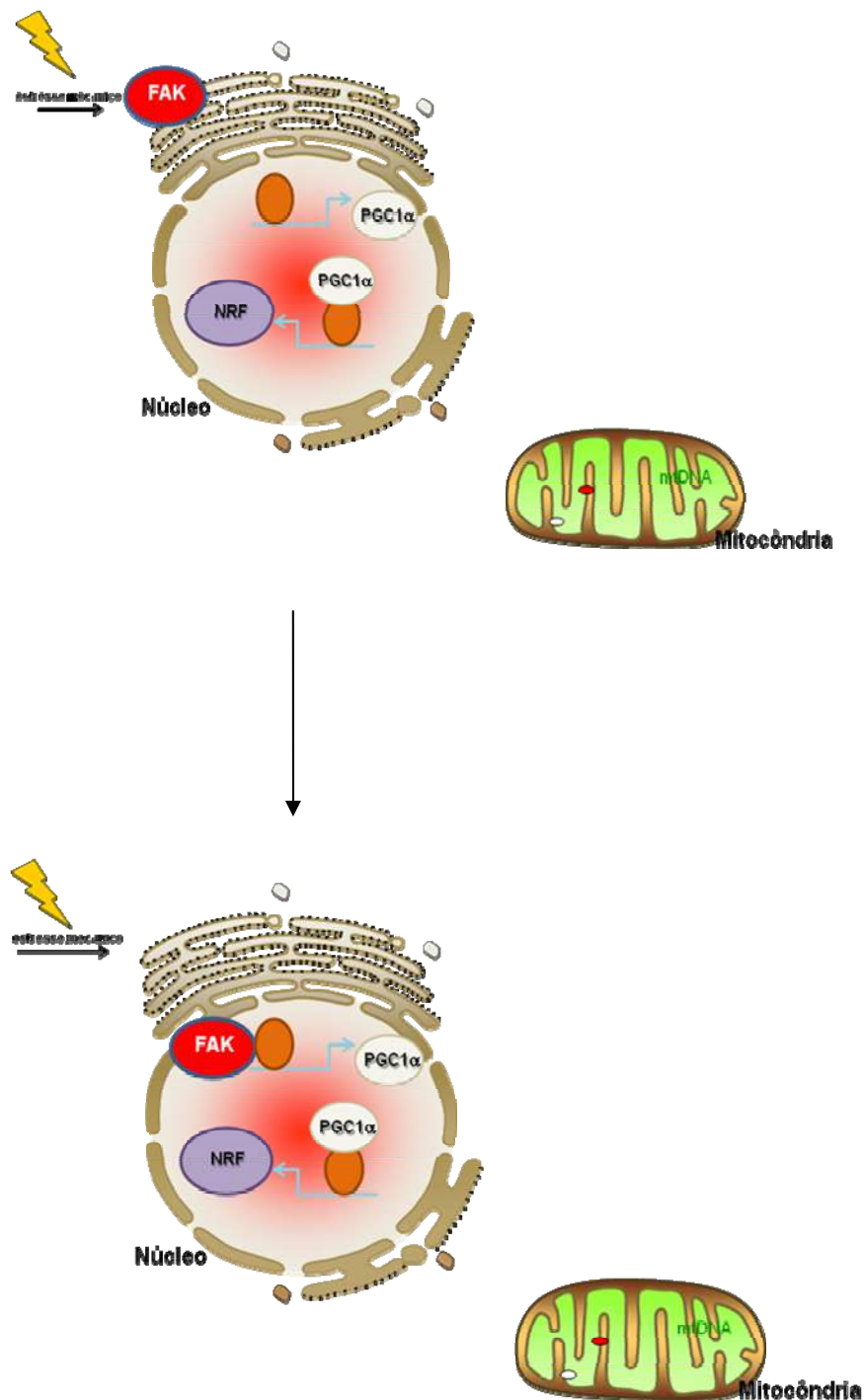
Características ultraestruturais de alinhamento alterado de sarcômeros sugerem que a proliferação mitocondrial *per se* possibilita a interferência da função contrátil; este fenômeno é limitado aos cardiomiócitos: De fato, em pacientes, o músculo esquelético, alta evidências morfológicas de proliferação mitocondrial correlacionadas com a função do músculo normal (147). Esta observação abre novas perspectivas sobre a questão complexa da especificidade de mutações mitocondriais do tecido homoplásmico (somente um tipo de genótipo mitocondrial) (148). Assim, é concebível que diminuir os níveis de FAK, modulando a biogênese mitocondrial do miocárdio sobrecarregado, contribui na diminuição da degeneração celular neste miocárdio. Entretanto, este assunto ainda precisa ser estudado.

Concluindo, os resultados deste estudo fornecem uma base racional para uma função distinta da FAK na mediação da ativação da cascata de transcrição mitocondrial, em resposta ao estresse mecânico. Notavelmente, estes dados dão suporte de que a modulação negativa da biogênese mitocondrial pela deleção da FAK pode ser dependente da ruptura do complexo nuclear que envolve a FAK e o PGC-1 α . Estudos futuros podem estabelecer se a modulação da massa mitocondrial resulta em efeitos benéficos ao ventrículo esquerdo que sofreu sobrecarga mecânica.



6- CONCLUSÃO

A sinalização mediada pela FAK controla a biogênese mitocondrial em cardiomiócitos em resposta ao stress mecânico pela regulação da expressão do PGC-1 α e NRF-1. A FAK pode estar envolvida na fisiopatologia da hipertrofia cardíaca através da regulação do metabolismo energético.





7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 1999;20:447–55.
- 2- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study[see comments]. *Lancet* 1997; 349:1436-42.
- 3- Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study [see comments].*Lancet* 1997;349:1269-76.
- 4- Dargie HJ, McMurray JJ, McDonagh TA. Heart failure—implications of the true size of the problem. *J Intern Med*1996;239:309-15.
- 5- Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy [published erratum appears in *Lancet* 1997 Nov 1;350(9087):1330]. *Lancet* 1997;350:127-33.
- 6- Van Kraaij D, Van Pol P, Ruiters AW et al. Diagnosing diastolic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2002;4:419-30.
- 7- Remme WJ, Swedberg K. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001;22:1527-60.
- 8- Braunwald E. Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 5th ed.Philadelphia: WB Saunders, 1997.
- 9- Lips DJ et al. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *European Heart Journal* (2003) 24, 883-896
- 10- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O et al. Transcriptional coactivator PGC-1alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1: 259-271, 2005.
- 11- Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, and Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10086-10091, 2006.

- 12- Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Gendes I et al. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res* 101: 1339-1348, 2007.
- 13- Dalla Costa AP, Clemente CF, Carvalho HF, Carvalheira JB, Nadruz W Jr and Franchini KG. FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex. *Cardiovasc Res*.
- 14- Diwan A and Dorn GW, 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* 22: 56-64, 2007.
- 15- Finck BN and Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 115: 2540-2548, 2007.
- 16- Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J and Franchini KG. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ Res* 96: 73-81, 2005.
- 17- Franchini KG, Clemente CF and Marin TM. Focal adhesion kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. *Braz J Med Biol Res* 42: 44-52, 2009.
- 18- Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH and Saad MJ. 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.
- 19- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V and Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551: 491-501, 2003.
- 20- Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med* 121: 363-371, 1994.

- 21- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM and Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 106: 847-856, 2000.
- 22- Lehman JJ, Boudina S, Banke NH, Sambandam N, Han X, Young DM et al. The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H185-196, 2008.
- 23- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3: e101, 2005.
- 24- Luo SW, Zhang C, Zhang B, Kim CH, Qiu YZ, Du QS et al. Regulation of heterochromatin remodelling and myogenin expression during muscle differentiation by FAK interaction with MBD2. *EMBO J* 28: 2568-2582, 2009.
- 25- Marin TM, Clemente CF, Santos AM, Picardi PK, Pascoal VD, Lopes-Cendes I et al. Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res* 103: 813-824, 2008.
- 26- Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A et al. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 116: 217-227, 2006.
- 27- Rabinowitz M and Zak R. Mitochondria and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 36: 367-376, 1975.
- 28- Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* 94: 525-533, 2004.

- 29- Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286: 81-89, 2002.
- 30- Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchini E, Zani M et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* 50: 1362-1369, 2007.
- 31- Seddon M, Looi YH and Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93: 903-907, 2007.
- 32- Torsoni AS, Fonseca PM, Crosara-Alberto DP and Franchini KG. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1411-1419, 2003.
- 33- Tsutsui H, Kinugawa S and Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 81: 449-456, 2009.
- 34- Ventura-Clapier R, Garnier A and Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79: 208-217, 2008.
- 35- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124, 1999.
- 36- Artham S, Lavie C, Milani R, Patel D, Verma A, Ventura H (2009). Clinical Impact of Left Ventricular Hypertrophy and Implications for Regression Progress in Cardiovascular Diseases. *Prog Cardiovasc Dis.* 52, Issue 2, 153-167.
- 37- Diwan A and Dorn GW, 2nd. (2007). Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* 22, 56-64.
- 38- Dorn GW 2nd. (2007). The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 49, 962-70.

- 39- van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA and van der Vusse GJ. (2009). Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 81, 420-8.
- 40- Stanley WC, Recchia FA and Lopaschuk GD. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85, 1093-129.
- 41- Ventura-Clapier R, Garnier A and Veksler V. (2004). Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555, 1-13.
- 42- Piantadosi CA, Suliman HB. (2008). Transcriptional Regulation of SDHa flavoprotein by nuclear respiratory factor-1 prevents pseudo-hypoxia in aerobic cardiac cells. *J Biol Chem.* 283(16): 10967-10977.
- 43- Wu ZD, Puigserver P, Andersson U, Zhang CY, Adelmant G, Mootha V et al. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115-124.
- 44- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* Apr;1(4):259-71.
- 45- Neubauer S. (2007). The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356, 1140-51.
- 46- Puigserver P et al. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8, 971-82.
- 47- Knutti D, Kressler D and Kralli A. (2001). Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9713-8.
- 48- Fan M et al. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev* 18, 278-89.

- 49- Lehman JJ, Boudina S, Hausler BN, Sambandam N, Han X, Young MD et al. The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H185-H196.
- 50- Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA (1992). DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem* 267:3358-3367.
- 51- Garesse R, Vallejo CG. (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263: 1-16.
- 52- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18: 231-236.
- 53- Scarpulla RC. (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576: 1-14.
- 54- Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC 1993. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev* 7: 380-392.
- 55- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124.
- 56- Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE et al. 2004) Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* (94:525-533.
- 57- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S et al. (2005) PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3:e101.

- 58- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O et al. (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1:259-271.
- 59- Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. (2006) Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10086-10091.
- 60- Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL and Samarel AM. (2000). Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1695-707.
- 61- Taylor JM, Rovin JD and Parsons JT. (2000). A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275, 19250-7.
- 62- Kovacic-Milivojevic B, Roediger F, Almeida EA, Damsky CH, Gardner DG and Ilic D. (2001). Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell* 12, 2290-307.
- 63- Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W, Jr Hanks SK and Franchini KG. (2003). Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res* 93, 140-7.
- 64- Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA and Franchini KG. (2005). RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1488-96.
- 65- Nadruz W, Jr Corat MA, Marin TM, Guimaraes Pereira GA and Franchini KG. (2005). Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. *Cardiovasc Res* 68, 87-97.

- 66- Pham GC, Harpf EA, Keller SR et al. (2000) Striated muscle-specific β 1D-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2916-H2926.
- 67- Peng X et al. (2006). Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 116, 217-27.
- 68- DiMichele LA, Doherty JT, Rojas M, Beggs HE, Reichardt LF, Mack CP et al. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ Res* 99, 636-45.
69. Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I et al. Targeting Focal Adhesion Kinase With Small Interfering RNA Prevents and Reverses Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Circ Res* 101, 1339-1348.
- 70- Rabinowitz M, Zak R. (1975) Mitochondria and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 36: 367-376.
- 71- Freyssenet D, Di Carlo M, Hood DA. (1999). Calcium-dependent regulation of cytochrome c gene expression in skeletal muscle cells. Identification of a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 274: 9305-9311.
- 72- Lenka N, Vijayasathy C, Mullick J, Avadhani NG. (1998) Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 309-344.
- 73- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 16: 1879-1886.
- 74- Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546: 851-858.

- 75- Hood DA. (2001). Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 1137-1157. Review.
- 76- Lenka N, Vijayasarathy C, Mullick J, Avadhani NG. (1998). Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 309-344.
- 77- Nelson BD, Luciakova K, Li R, Betina S. (1995). The role of thyroid hormone and promoter diversity in the regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins. *Biochim Biophys Acta* 1271: 85-91.
- 78- Henriksson J, Chi MM, Hintz CS, Young DA, Kaiser KK, Salmons S et al. Chronic stimulation of mammalian muscle: changes in enzymes of six metabolic pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 251: C614-C632.
- 79- Brian N, Finck PhD, Daniel P, Kelly MD. Peroxisome Proliferator–Activated Receptor _ Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease. *Basic Science for Clinicians. Circulation* May 15, 2007
- 80- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet.* 2001;106:18-26.
- 81- Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet.* 2001;106:37-45.
- 82- Vallance HD, Jeven G, Wallace DC, Brown MD. A case of sporadic infantile histiocytoid cardiomyopathy caused by the A8344G (MERRF) mitochondrial DNA mutation. *Pediatr Cardiol.* 2004;25:538-540.
- 83- Strauss AW, Powell CK, Hale DE, Anderson MM, Ahuja A, Brackett JC et al. Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10496-10500.

- 84- Kelly DP, Strauss AW. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med.* 1994; 330:913-919.
- 85- Bennett MJ, Rinaldo P, Millington DS, Tanaka K, Yokota I, Coates PM. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: postmortem diagnosis in a case of sudden infant death and neonatal diagnosis of an affected sibling. *Pediatr Pathol.* 1991;11:889-895.
- 86- Bennett MJ, Rinaldo P, Strauss AW. Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2000;37:1- 44.
- 87- Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet.* 1997;16:226 -234.
- 88- Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I et al. cDNA cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 350-354.
- 89- Wang X, Oka T, Chow LF, Cooper BS et al (2009). Tumor Necrosis Factor- α -Converting Enzyme Is a Key Regulator of Agonist-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. *Hypertension* 54:575-582.
- 90- Murray J, Oquendo EC, Willis HJ, Marusich FM, Capaldi AR. (2008). Monitoring oxidative and nitrative modification of cellular proteins; a paradigm for identifying key disease related markers of oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume 60, Issues 13-14.
- 91- Maloyan A, Osinska H, Lammerding J, Lee RT, Cingolani OH, Kass DA et al. Biochemical and mechanical dysfunction in a mouse model of desmin-related myopathy. *Circ Res.* 2009 Apr 24;104(8):1021-8.
- 92- Kurtz DM, Rinaldo P, Rhead WJ, Tian L, Millington DS, Vockley J et al. Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:15592-15597.

- 93- Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 2006;116:615-622.
- 94- Soyak S, Krempler F, Oberkofler H, Patsch W. PGC-1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2006;49:1477-1488.
- 95- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005;1: 361-370.
- 96- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92:829-839.
- 97- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 2000;106: 847-856.
- 98- Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem.* 2002;277:1645-1648.
- 99- Andersson U, Scarpulla RC. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3738-3749.
- 100 Larrouy D, Vidal H, Andreelli F, Laville M, Langin D. Cloning and mRNA tissue distribution of human PPARgamma coactivator-1. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23:1327-1332.
- 101- Boss O, Bachman E, Vidal-Puig A, Zhang CY, Peroni O, Lowell BB. Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)- adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261:870-876.

- 102- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98:115-124.
- 103- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*. 2002;16: 1879-1886.
- 104- Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 Mrna expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296:350-354.
- 105- Goto M, Terada S, Kato M, Kato M, Yokozeki T, Tabata I et al. cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274:350-354.
- 106- Wallberg AE, Yamamura S, Malik S, Spiegelman BM, Roeder RG. Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol Cell*. 2003;12: 1137-1149.
- 107- Roeder RG. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett*. 2005;579:909 –915. 62. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*. 1999;286:1368-1371.
- 108- Sano M, Izumi Y, Helenius K, Asakura M, Rossi DJ, Xie M et al. Menage-a-trois 1 is critical for the transcriptional function of PPARgamma coactivator 1. *Cell Metab*. 2007;5:129-142.
- 109- Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell*. 2000;6:307-316.
- 110- Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*. 2000;20:1868-1876.

111- Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113:159-170.

112- Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*. 2003;17:2477-2493.

113- Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res*. 2003;92:518-524.

114- Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem*. 2002;277:4098-4103.

115- Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A et al. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2002;109:121-130.

116- Sambandam N, Morabito D, Wagg C, Finck BN, Kelly DP, Lopaschuk GD. Chronic activation of PPARalpha is detrimental to cardiac recovery after ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H87-H95.

117- Panagia M, Gibbons GF, Radda GK, Clarke K. PPAR-alpha activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288: H2677-H2683.

118- Cheng L, Ding G, Qin Q, Xiao Y, Woods D, Chen YE et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:277-286.

119- Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N et al. Cardiomyocyterestricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med.* 2004;10:1245-1250.

120- Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* 2005; 97:372-379.

121- Hentschke M, Susens U, Borgmeyer U. PGC-1 and PERC, coactivators of the estrogen receptor-related receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299:872-879.

122- Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiacenriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma: identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem.* 2002; 277: 40265- 40274.

123- Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N et al. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12378-12383.

124- Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem.* 2003;278:9013-9018.

- 125- Kallen J, Schlaeppli JM, Bitsch F, Filipuzzi I, Schilb A, Riou V et al. Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem*. 2004;279:49330-49337.
- 126- Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 2004;24:9079-9091.
- 127- Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol*. 2005;25:10684-10694.
- 128- Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*. 2006;97:673-683.
- 129- Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*. 2004;18:357-368.
- 130- Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1576:1-14.
- 131- Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*. 2005;25:1354-1366.
- 132- Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Kelly DP. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway. *Circulation*. 2007;115:909-917.

- 133- Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res.* 2004;94:525-533.
- 134- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 2005;3:e101.
- 135- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell.* 2004;119:121-135.
- 136- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* 2005;1:259-271.
- 137- Lehman JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29:339-345.
- 138- van den Bosch BJ, van den Burg CM, Schoonderwoerd K, Lindsey PJ, Scholte HR, de Coo RF et al. Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2005;65:411-418.
- 139- Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, Bjursell M et al. Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biol.* 2006;4:e369.

140- Wallace DC. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J*. 2000;139:S70-S85.

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

142- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):38-9.

143- Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7797-802.

144- Heddi A, Stepien G, Benke PJ, Wallace DC. Coordinate induction of energy gene expression in tissue of mitochondrial disease patients. *J Biol Chem* 1999;274:22968-76.

145- Wredenberg A, Wibom R, Wilhelmsson H et al. Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15066-71.

146- Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* 2004;94:525-33.

147- Taylor RW, Giordano C, Davidson MD et al. A homoplasmic mitochondrial tRNA mutation as a cause of maternally-inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1786-96.

148- Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Homoplasmic mtDNA mutations may be pathogenic only by a complex nuclear/mitochondrial interaction. *Trends Genet* 2003;19:257-262.

- 149- McCaffrey A, Meuse T, Pham D, Conklin D, Hannon G, Kay M. "RNA interference in adult mice". *Nature*, 2002; 418: 38-9.
- 150- Lewis D, Wolff J. "Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection". *Adv Drug Deliv Rev*, 2007; 59: 115-23.
- 151- Liu F, Song Y, Liu D. "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA". *Gene Ther*, 1999; 6: 1258-66.
- 152- Zhang G, Budker V, Williams P, Hanson J, Wolff J. "Surgical procedures for intravascular delivery of plasmid DNA to organs". *Methods Enzymol*, 2002; 346: 125-33.
- 153- Contreras J, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Thompsom A, Eckhoff D. "Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver mouse". *Surgery*, 2004;136(2): 390-400.
- 154- Hagstrom J, Hegge J, Zhang G, Noble M, Budker D, Lewis D et al. "A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs". *Molec Ther*, 2004; 10(2): 386-98.
- 155- Schaller MD. (2010) Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science* 123(Pt 7): 1007-1013.
- 156- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Molecular and cellular biology* 14(3): 1680-1688.
- 157- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology* 130(5): 1181-1187.
- 158- Lietha DX, Cai DF, Ceccarelli Y, Li MD, Schaller MJ. Eck (2007)Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 129(6): 1177-1187.



8- ANEXO

Articles in PresS. Am J Physiol Heart Circ Physiol (December 10, 2010).
doi:10.1152/ajpheart.00319.2010

**A Role for Focal Adhesion Kinase in Cardiac Mitochondrial Biogenesis
Induced by Mechanical Stress**

Thais F. Tornatore, Ana Paula Dalla Costa, Carolina F. M. Z. Clemente, Carla Judice, Silvana A. Rocco, Vivian C. Calegari, Leandro Cardoso, Alisson C. Cardoso, Anderson Gonçalves Jr, Kleber G. Franchini*

Department of Internal Medicine, School of Medicine State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Address for correspondence:

Kleber G. Franchini, MD, Ph.D.

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Ciências Médicas,

Universidade Estadual de Campinas

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

13081-970 - Campinas, SP - Brasil.

Phone: (55) (19) 3521 8023

FAX: (55) (19) 3521 8023

E-mail: franchin@unicamp.br

Running head: FAK signaling and cardiac mitochondrial biogenesis.

Copyright © 2010 by the American Physiological Society

ABSTRACT

We studied the implication of FAK (*focal adhesion kinase*) in cardiac mitochondrial biogenesis induced by mechanical stress. Prolonged stretching (2-12h) of neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) up-regulated the main components of mitochondrial transcription cascade (PGC-1 α - *peroxisome proliferator activated receptor coactivator-1*; NRF-1 - *nuclear respiratory factor* and Tfam - *mitochondrial transcription factor A*). Concomitantly, prolonged stretching enhanced mitochondrial biogenesis (copy number of mitochondrial DNA - mtDNA, content of the subunit IV of cytochrome oxidase and mitochondrial staining - green fluorescence intensity of Mitotracker green) and induced the hypertrophic growth (cell size and ANP transcripts) of NRVM. Furthermore, the stretching of NRVM enhanced phosphorylation, nuclear localization and association of FAK with PGC-1 α . Recombinant FAK C-terminal, but not the N-terminal or kinase domain, precipitated PGC-1 α from nuclear extracts of NRVM. Depletion of FAK by RNA interference suppressed the upregulation of PGC-1 α and NRF-1, and markedly attenuated the enhanced mitochondrial biogenesis and hypertrophic growth of stretched NRVM. In the context of energy metabolism FAK depletion became manifest by a reduction of ATP levels in stretched NRVM. Complementary studies in adult mice left ventricle demonstrated that pressure overload up-regulated PGC-1 α , NRF-1 and mtDNA. *In vivo* FAK silencing transiently attenuated the up-regulation of PGC-1 α , NRF-1 and mtDNA, as well as the left ventricular hypertrophy induced by pressure overload. In conclusion, activation of FAK signaling seems to be important for conferring enhanced mitochondrial biogenesis

coupled to the hypertrophic growth of cardiomyocytes in response to mechanical stress, via control of mitochondrial transcription cascade.

Keywords: mechanical stress, heart, signal transduction, mitochondria, hypertrophy.

INTRODUCTION

Mechanical stress induced by hemodynamic overload plays a prominent role in the development of left ventricular (LV) hypertrophy and in the transition from functional and clinical compensated state to heart failure in common forms of cardiac disease (12). At the cellular level, the hypertrophic growth of cardiomyocytes is the initial dominant response to hemodynamic overload while the progression to dysfunction and clinical heart failure are related to degeneration and loss of cardiomyocytes as well as myocardial fibrosis (5). Increases in the number and activity of mitochondria provide the energy indispensable for the anabolic effect of hypertrophic growth, but in the settings of chronic overload changes of mitochondria function can be detrimental, contributing to degeneration of hypertrophic cardiomyocytes (14, 25, 27, 28).

Several studies have implicated the transcriptional coactivator PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor coactivator*) as a regulator of genes responsible for the maintenance of mitochondrial oxidative capacity and energy transduction either at baseline or in response to increased energy demand in adult hearts (1, 7, 28). Accordingly, the levels of PGC-1 α gene expression correlate to the mitochondrial oxidative capacity in both healthy and failing rat hearts subjected to chronic pressure overload (11). As a result of cardiac-specific overexpression of PGC-1 α the number and size of mitochondria are increased in mice cardiomyocytes, concomitant with upregulation of genes associated with mitochondrial biogenesis.

However, cardiac-specific overexpression of PGC-1 α in adult mice is associated with abnormalities in the mitochondria ultrastructure and cardiomyopathy (13, 22). Interestingly, deficiency in PGC-1 α is also associated with accelerated dysfunction of the mechanically overloaded mice left ventricle, despite the lack of changes in the number of cardiac mitochondria (1, 2, 15). PGC-1 α exerts control over nuclear and mitochondria transcription factors, including Nuclear Respiratory Factors (NRF-1, NRF-2) and mitochondrial transcription factor A (Tfam) (29). PGC-1 α activation of NRF-1 and NRF-2 expression, as well as its direct coactivation of NRF-1 induces the expression of mitochondrial and nuclear genes central to mitochondrial biogenesis (23).

However, there is no clear understanding of the upstream signaling mechanisms involved in the activation of mitochondria transcriptional cascade in response to the many conditions associated with increased energy demand.

Sustained mechanical stress, as other stimuli that increase energy demand, enhances the functional mass of mitochondria in cardiomyocytes (20). However, the mechanisms linking mechanical stress to the enhanced mitochondrial biogenesis of cardiomyocytes are yet unclear. Evidence has emerged that focal adhesion kinase (FAK) plays a critical role in linking events initiated by mechanical stress to the hypertrophic responses in cardiomyocytes (3, 18, 26). Accordingly, depletion of FAK has been shown to prevent the left ventricular hypertrophy induced by pressure overloaded in mice (3, 19). In particular, several ultrastructural abnormalities were found in cardiac mitochondria of FAK conditional knockout mice model, suggesting a possible coupling between signaling mediated by FAK and mitochondrial biogenesis (19). Furthermore, marked up-regulation of proteins of mitochondrial respiration and the content of contractile proteins can be induced by FAK overexpression in rat soleus muscle (6), supporting its involvement in the mechanisms that control mitochondrial biogenesis in skeletal muscle fibers. Given these results we hypothesized that a coupling between FAK and the PGC-1 α /NRF cascade might connect mechanical stimuli and mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes.

To test this hypothesis, we examined whether FAK depletion induced by RNAi would interfere in the mitochondrial biogenesis of cardiomyocytes undergoing prolonged cyclic stretch. This was assessed in a neonatal rat ventricular myocyte model cultured in silicone plates as well as in the left ventricle of mice subjected to mechanical stress induced by transverse aortic constriction.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and Chemicals

Bioflex (Flex I) collagen (type I) culture plates were from Flexcell International; Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), OPTI-MEM®, fetal bovine serum were from GIBCO BRL; pancreatin and collagenase type II were from Worthington. Polyclonal rabbit antibodies against FAK (sc558), pFAK(sc11765), GAPDH(sc25778), PGC-1 α (sc13067), NRF-1 (sc33771) and COX-IV (cytochrome oxidase subunit IV, sc58348) were from Santa Cruz Biotechnology. Trizol, Phenol and Super Script II were from Invitrogen. Super Signal west Pico Cheluminescent Substract and Ampliscribe T7 high yield transcription were from Epicentre. HEPES, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin, dithiotreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) secondary antibodies and rhodamine-conjugated phalloidin and BSA (fraction V) were from Sigma.

Lipofectamine Plus was from Life Technologies. Nitrocellulose membrane (Hybond ECL, 0.45 μ m) was from Amersham; protein A Sepharose 6 MB was from Pharmacia; primers for GAPDH, ANF, Tfam, D-loop and 18S and the TaqMan reagents kit were from Applied Biosystems and SyBr Green Reagents Kit and Mito Tracker were from Invitrogen.

Transverse aortic constriction in mice

Housing, handling, and experimental procedures in mice and neonatal rats followed the recommendations written in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health [DHEW Publication No. 127 (NIH) 85-23, Revised 1996, Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD] and were approved by the Animal Care and Use Committee of the State University of Campinas. Swiss mice (6-8 week old) were subjected to procedures such as jugular vein catheterization, aortic banding and echocardiographic examination under anesthesia with a mixture of ketamine (100mg/Kg) and xylazine (5mg/Kg). For the injections of siRNA, the jugular vein was cannulated with a flame stretched PE50 polyethylene tube. Aortic banding was performed by transverse aortic constriction (TAC) by tying a 7-0 nylon thread against a 27-gauge needle. Transconstriction systolic gradient was assessed by blood pressure monitoring in the right carotid and the right femoral arteries through intra-arterial catheters. The blood pressure recordings were obtained from COBE transducers 138 (Arvada, USA), connected to a GP4A Stemtech amplifier (Stemtech, USA). The amplifier output was connected to an analog-to-digital board and this to a computer loaded with WINDAQ-PRO Data Acquisition software (DATAQ Instruments, USA).

Pulsatile blood pressure from carotid and femoral catheters were recorded in individual channels and sampled at 100-Hz.

Echocardiography

2D and M-mode echocardiography were performed in anesthetized mice with a 12-MHz probe connected to a Toshiba Power Vision system by a blinded observer at 15 minutes after the induction of anesthesia, as previously published(3).

Short axis measurements were taken at the level of the midpapillary muscle. Three measurements were taken at end-systole and end-diastole to determine left ventricular diastolic and systolic diameter and wall thickness.

Gravimetry

The left ventricle was removed, cleansed and weighed to determine the relative left ventricle weight to body weight ratio (mg/g).

Cardiomyocytes culture

Primary 152 cultures of neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) were prepared from 1-to 2-day-old Wistar rats, as previously reported(26).

Each culture used about 70 neonatal rat hearts. The myocytes were isolated by digestion with pancreatin and type 2 collagenase, purified on a discontinuous Percoll gradient, suspended in plating medium containing 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 0.5% penicillin-streptomycin and plated in type I collagen Bioflex plates at 5×10^5 cells/well. After 48 h, the medium was replaced with serum-free DMEM and incubated for 24 h under 95% air-5% CO₂ before the experimental procedure.

Cell stretching

NRVM cultured in Bioflex were changed to serum-free medium and stretched in a Flexcell FX-3000 strain unit by 10% above the initial length at a frequency of 1 Hz (0.5 s of stretch and 0.5 s of relaxation) for up to 12 hours. Control non-stretched NRVM were cultured in Bioflex in serum-free medium. At the conclusion of the experimental protocols, cells were scraped from

membranes, lysed and used as total extracts or cellular fractions for immunoblotting, immunoprecipitation or pull down assays. Some cell cultures were fixed for analysis by fluorescence microscopy.

Subcellular fractionation

NRVM were washed in 0.5µl of buffer A (10mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.05% NP40, 1mM PMSF, and 0.1mg/ml aprotinin pH 7.9), scrapped thoroughly and left on ice for 10 min. The extracts were centrifuged at 3000rpm for 10 min 40°C to obtain the precipitates containing the nuclear fraction. The supernatant, which was enriched with soluble proteins, was saved as cytosolic fraction at -700C. The pellet containing the nuclear fraction was resuspended in 188µl of buffer B (5mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 26% glycerol (v/v), 1mM PMSF, and 0.1mg/ml aprotinin, pH 7.9.) and 12µl of 5M NaCl to give 300mM NaCl. This suspension was homogenized with 20 full strokes in Dounce and left on ice for 30 min before centrifugation at 24,000 x g for 20 min at 40°C and the supernatant was saved as nuclear extracts. Protein concentrations of the cytosolic and nuclear extracts were obtained by Bradford assay.

Protein analyses by immunoblotting

Extracts of NRVM or mice left ventricle were harvested in buffer (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM NaHPO₄; 100mM sodium fluoride; 10mM EDTA; 10mM Na₃VO₄; 2mM PMSF; 0,2mg/ml aprotinin, 10% Triton-X 100) and cleared by centrifugation at 11.000rpm, 4°C. Extracts containing equal amounts of total protein (50µg) were resolved in 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking with 5% nonfat milk solution for 30 minutes, the membranes were incubated with primary antibodies in 3% nonfat milk solution overnight at 4°C. Proteins were detected using ECL. Quantification of bands was

performed using ImageJ (NIH). Signals from phosphoproteins were normalized to the total protein obtained from blots with specific antibody. Blots were striped and probed with GAPDH antibody to confirm equal loading.

Immunoprecipitation

Aliquots of NRVM nuclear extracts containing 50 μ g protein were used for immunoprecipitation with specific antibody (2 μ g/ μ L) at 4°C overnight, followed by the addition of protein A-Sepharose 6MB for 2h. The pellets were washed three times in ice-cold buffer (0.5% Triton X-100, 100mM Tris (pH 7.4), 10mM EDTA, and 2.0mM sodium vanadate). After washing, the pellet was resuspended in Laemmli's sample buffer (25) containing 10mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 minutes. The samples were subjected to SDS-PAGE (10% bis acrylamide) followed by electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membrane which were preincubated in blocking buffer (5% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl, and 0.02% Tween 20 for 2h. and incubated with the appropriate antibody diluted in blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk), overnight at 4°C and washed for 15 min with the blocking buffer without BSA.

siRNA Synthesis and Treatment

Protocols for the synthesis of siRNA targeted to mouse and rat FAK gene, transfection of NRVM and injections in adult mice were performed as previously reported (3, 19).

Immunofluorescence staining of NRVM

Cultured cardiomyocytes were fixed in a solution containing 4% paraformaldehyde (pH 7.4). After washing with 100mM glycine solution (pH 7.4), cardiomyocytes were permeabilized with 1% Triton X-100 and rinsed with PBS containing 3% wt/vol BSA. Primary antibody against FAK was used in a dilution of

1:100 and incubated overnight at 4°C. After being washed, cells were incubated with secondary antibody labeled with FITC for 2h at room temperature, washed and mounted onto glass slides. The cardiomyocytes were analyzed by fluorescence microscopy (Leica DMI4000B). For the analysis of cell surface area cultures were fixed and immunostained with phalloidin and the nuclei were identified using DAPI. Cell surface area was obtained by the analysis of individual cardiomyocytes with the software Leica Q Win. At least 250 cells were counted for each treatment. To examine the effects of prolonged stretch in the morphology of cardiomyocytes, cells underwent continuous cyclic stretched (10%) for 12h.

Mitochondria labeling

NRVM were plated at 1x10⁵ cells/well and allowed to attach for 3 days prior to cyclic stretch protocol (10%, 12h). At the end of cell stretching protocol NRVM were exposed for 30 min to live cell staining solution containing mitochondrial membrane potential dye (Mito Tracker Green) prior to formaldehyde fixation. 250 cells for each group were analyzed using a 40X objective using the QWin Pro version 3.41. Leica. We then estimated the relative area occupied by mitochondria by assessing the green fluorescence intensity in respect to cell surface area of individual cardiomyocytes.

RNA and DNA extraction

DNA extraction was performed by standard phenol/chloroform procedure. For gene expression quantification, total RNA (2µg) was treated with DNase I (RNase-free), and reverse-transcribed with random hexamers using SuperScript II reverse transcriptase to generate cDNA.

Real time PCR

Aliquots (4µg) of total RNA were used for cDNA synthesis with the Superscript pre amplification system according to the manufacturer's instructions. Probes for ANF were - sense 5' CCATCACCAAGGGCTTCTTC 3', antisense 5' GTGTTGGACACCGCACTGTATAC 3'; GAPDH - sense 5' GGCATTGCTCTCAATGACAA 3', antisense 5'AGGGTGCAGHGGAACCTTTAT3'; D-Loop - sense 5' GGTTCTTACTTCAGGGCCATCA 3', antisense 5' ATCTCGAGGTAACGGGTCTAATC3'; 18S - sense 5' TAGAGGGACAAGTGGCGTTCT 3', antisense 5' CGCTGAGC CAGTCAGTGT 3'. The primers and probes for GAPDH, 18S, TaqMan Reagents kit and SyBr Green Reagents kit were used according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out in 96-well plates with the ABI Prism 7700 sequence detection system (Perkin-Elmer Applied Bio-Systems), and the results were analyzed with a *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems). Samples were analyzed in triplicate, and mRNA quantities were normalized against GAPDH (primer-probe mix from Applied Biosystems) or GAPDH/18S (primer-probe mix from Invitrogen). Reactions were carried out using the following conditions: an initial step of 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C.

Determination of ATP levels of NRVM

Cultured cardiomyocytes were washed with cold saline and ground to a powder under liquid nitrogen. ATP was extracted from powdered cell suspended in 1mL of extraction buffer (50mmol L⁻¹ K₂HPO₄ and 25mmol L⁻¹citric acid; pH 4.5). The mixture was placed in a water bath (80°C) during 2 minutes to deactivate any biological process that could degrade the ATP. After vortex mixing, samples were added with additional 3mL of extraction buffer and then 1mL of the suspension was centrifuged (8000rpm, 4 minutes). Samples of 200µL of this suspension were mixed with 20µl of 2-chloroacetaldehyde solution and heated at 80°C for

20 minutes. Aliquots of 25µl of the reaction mixture were then resolved by high performance liquid chromatography (HPLC). The fluorescence of derivatized ATP was detected with excitation and emission wavelengths set at 280 and 420nm, respectively.

Chromatographic separation of ATP was achieved at room temperature, using a reversed-phase Cosmosil 5C18-MS column (150x4.6mm i.d.; 5µm particle size) with a Cosmosil guard column (5C18-MS 10x4.6mm). The column was equilibrated and eluted under gradient conditions using a flow rate of 1.0ml/min. The standards and samples were separated using a gradient mobile phase consisting of methanol (**A**) and extraction buffer (**B**), which was prepared immediately before passing through a 0.45µm filter. The gradient condition was: 0-4 minutes 2% A; 4-12 minutes linear gradient 2-15% A; 17-18 minutes reconditioning step of the column was 2% A isocratic for 2 minutes. The chromatographic run time for each analysis was 20 minutes. Aliquots of 25µl were injected into HPLC system.

Statistical analysis

The statistical analysis of the immunoblottings, quantitative real time PCR and immunofluorescence staining were performed with the actual reading values (i.e. densitometric readings, relative quantity in respect to GAPDH transcripts and immunofluorescence intensity, respectively). Differences among the mean \pm SE values were tested with ANOVA and Bonferroni's multiple-range test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Data are presented as the relative changes in respect to values of non-stretched NRVM which were considered to be 1 for the various experimental data.

RESULTS

Cyclic stretch induces mitochondrial biogenesis in NRVM To establish whether cell stretching might induce mitochondrial transcription cascade in NRVM, we initially examined the expression of PGC-1 α and NRF-1 in cells exposed to cyclic stretch over 2 to 12h. Data shown in Figure 1A indicate that the levels of PGC-1 α were already significantly increased 2h following cell stretching and remained increased over the next 12h. The level of NRF-1 increased in a manner consistent with its induction by PGC-1 α (Figure 1B). Western blotting with antibody targeted to GAPDH was used as loading control for immunoblottings of PGC-1 α and NRF-1. Furthermore, we measured the transcripts of Tfam which were found to be increased after 6 and 12h following cell stretching (Figure 1C). To obtain further evidence regarding the activation of the transcriptional regulatory pathways of mitochondria in stretched NRVM we examined the subcellular distribution of PGC-1 α and the association between PGC-1 α and NRF-1 in the nuclear extracts of stretched as compared to non-stretched NRVM. PGC-1 α was most present in the nuclear fraction of both non-stretched and stretched NRVM (Figure 1D). Cyclic stretch lasting for 2h resulted in marked increases of PGC-1 α in the nuclei of NRVM. Immunoblots performed with antibodies targeted to myosin and histone H-1 were used as controls to confirm the extracts enrichment of cytosolic and nuclear proteins, respectively. Data from co-immunoprecipitation experiments indicated that cyclic stretch enhanced the association between PGC-1 α and NRF-1 in the nuclei of NRVM (Figure 1E). Comparisons with the amount of NRF-1 expressed in the whole extracts of NRVM, indicated that the fraction of NRF-1 associated with PGC-1 α is markedly increased in the nuclei of stretched as compared to non-stretched NRVM. Moreover, comparisons of the amount of 300 NRF-1 in anti-PGC-1 α precipitates with the amount NRF-1 in total extracts indicate that ~60% of total NRF-1 is associated with PGC-1 α in stretched cardiomyocytes. The specificity of the NRF-1/PGC-1 α co immunoprecipitation was confirmed in assays with beads only. To determine whether the upregulation of the mitochondrial transcription cascade is reflected in an increased mitochondrial

biogenesis, we quantified the relative mtDNA versus genomic DNA, the expression of mitochondrial component of cytochrome oxidase subunit IV (COX-IV) and the relative area occupied by mitochondria in stretched as compared to non-stretched cells. Data shown in Figure 2A indicate that cell stretching (12 h) induced the relative amount of mtDNA to double over the baseline values. Parallel increases occurred in the amount of COX-IV (Figure 2B) and in the relative area occupied by stained mitochondria in stretched NRVM (Figure 2C). Panels D and E of Figure 2 show representative examples of Mito Tracker labeled non-stretched and stretched NRVM, respectively. Next, we confirmed previous demonstration (18) that prolonged cell stretching induces hypertrophic growth of NRVM, as assessed biochemically by quantitation of ANP and morphologically by quantitation of NRVM surface area. Consistent with previous studies, ANP transcripts (Figure 2F) and the cell surface area (Figure 2G) were enhanced in response to cyclic stretch in NRVM. Panels H and J of Figure 2 show representative examples of phalloidin stained non-stretched and stretched NRVM, respectively.

FAK is activated and interacts with PGC-1 α in the nuclei of NRVM.

A role for FAK has been reported in the hypertrophic growth of cardiomyocytes in response to mechanical stress (3, 18, 26). Figure 3A shows that cyclic stretch lasting from 2 to 12h enhanced FAK phosphorylation at Tyr397 but not FAK expression in NRVM. Supplemental Figure 1S shows validation data for the anti-FAK antibody used in this study. Furthermore, we show that cyclic stretch induced FAK to relocate to the nuclei of NRVM, as indicated in the imaging data shown in Figure 3 B-E. These data were confirmed by assays performed with subcellular fractions of cell extracts. Data shown in Figure 3F indicate that the amount of FAK was increased in the nuclear fraction of stretched over the non-stretched NRVM. By using co-immunoprecipitation assays we demonstrated that PGC-1 α associates with FAK and that cyclic stretch markedly enhanced this association in parallel with the increases in PGC-1 α expression in NRVM (Figure 3G). The specificity of the FAK/PGC-1 α co-immunoprecipitation assay was

confirmed by assays with beads only. Comparisons of the amounts of nuclear and cytosolic PGC-1 α precipitated by anti-FAK antibody with those found in total NRVM extracts indicate that a minor fraction (~30%) of total PGC-1 α associated with FAK either in non-stretched or stretched NRVMs.

The interaction between FAK and PGC-1 α was further suggested by the demonstration here that the C-terminal domain of FAK, but not the FERM or the kinase 340 domains is precipitated by PGC-1 α from nuclear extracts of NRVM. Comparison of the amount of PGC-1 α precipitated by FAK C-terminal domain with that immunoprecipitated by anti-FAK antibody is shown in Figure 3H.

FAK mediates the stretch-induced hypertrophy and mitochondrial biogenesis in NRVM. To determine whether signaling mediated by FAK is required to the activation of mitochondrial transcription cascade in response to cyclic stretch, NRVM were depleted of FAK by RNA interference. Consistent with previous studies(18), treatment of cells with siRNA targeted to FAK markedly reduced FAK protein expression in non stretched and stretched NRVM, compared with cells treated with siRNA targeted to GFP (Figure 4A). FAK depletion reduced the basal levels of PGC-1 α and NRF-1 as well as their upregulation in stretched NRVM (Figure 4B-C). In addition, FAK depletion inhibited the increases in PGC-1 α and NRF-1 association induced by cyclic stretch in the nucleus of NRVM (Figure 4D).

FAK depletion did not change the basal levels of mtDNA (Figure 5A), COX-IV expression (Figure 5B) and the relative area occupied by stained mitochondria in NRVM (Figure 5C-G), but suppressed their increases in stretched NRVM. Given that mitochondria are the major source of energy in cardiomyocytes, we next examined whether the attenuation of mitochondrial biogenesis induced by FAK depletion was accompanied by changes in the amount of ATP in NRVM. Data shown in Figure 5H indicate that cyclic stretch reduces the levels of ATP in NRVM in culture by ~20%. FAK silencing did not change the amount of ATP in non-stretched NRVM. However, FAK depletion added to the effect of cell stretching by further reducing the ATP levels in stretched NRVM.

Depletion of FAK was shown to attenuate the increases in the amount of ANP transcripts (Figure 5I) and in the size (Figure 5J) of NRVM induced by cyclic stretch.

FAK depletion attenuates the increases of mitochondrial transcription cascade and biogenesis in overloaded left ventricle of mice.

To investigate if signaling mediated by FAK can affect mitochondrial transcription cascade and biogenesis in the overloaded left ventricle, FAK was transiently depleted in mice left ventricle by a previously validated (3) *in vivo* RNA interference-based approach. We confirmed the transient depletion of FAK induced by siRNA in the left ventricle of TAC mice by quantitating the transcripts of FAK in mice left ventricle (Figure 6A). FAK depletion was shown to transiently attenuate the load induced left ventricular hypertrophy while FAK was depleted, as evidenced by gravimetry (Figure 6B), M-mode echocardiography (Figure 6C) and the expression of myocardial ANP (Figure 6D), as previously demonstrated (3).

Next we examined if PGC-1 α and NRF-1 can be regulated by pressure overload in mice left ventricle and if FAK signaling mediates these changes. As shown in Figure 7A, the amount of PGC-1 α increased 3.5-fold in the left ventricle of 7 day-TAC over the control mice. Upregulation of PGC-1 α persisted over 21 days after TAC. The level of NRF-1 also increased in a manner consistent with its induction by PGC-1 α (Figure 7B) after TAC, indicating the activation of mitochondrial transcription cascade in overloaded left ventricle. Data in Figures 7A-B also indicate that FAK knockdown transiently suppressed the load-induced upregulation of PGC-1 α and NRF-1 in mice left ventricle. Western blotting with antibody targeted to GAPDH (Figure 7C) was used as loading control for immunoblottings of PGC-1 α and NRF-1. We then examined whether mechanical stress can affect mtDNA replication in mice left ventricle. As shown in Figure 7D, pressure overload progressively increased mtDNA in mice left ventricle up to 21 days following TAC. Depletion of FAK, transiently suppressed the load-induced increases in mtDNA replication in the left ventricle up to 15 days after TAC.

DISCUSSION

Previous studies in isolated cardiomyocytes and in animal models of heart diseases have yielded evidence of FAK as an important mediator of cardiomyocyte response to mechanical stress (3, 10, 18, 19, 26). New findings of the present study indicate a role for FAK in the signaling mechanisms that regulate the mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes in response to mechanical stress.

FAK and mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes

Depletion of FAK was shown here to attenuate the hypertrophic responses of NRVM and mice left ventricle to mechanical stress, as reported previously (3, 18, 19).

This effect has been attributed to defective activation of Erk1/2, PI3 Kinase/AKT and mTOR/S6K signaling systems in response to mechanical stress (9, 10). Apart from mediating the hypertrophic response, FAK was shown here to mediate the increases in the mitochondrial biogenesis in response to cyclic stretch. Moreover, data from biochemical studies led us to conclude that FAK stimulates the stretch-induced mitochondrial biogenesis by upregulating the mitochondria transcription cascade namely PGC-1 α , NRF and Tfam. In line with this conclusion, depletion of FAK potentiated the reduction of the ATP levels induced by cyclic stretch in the model system of cultured NRVM. Notably, comparable reductions in cardiomyocyte ATP levels were reported in cardiomyocytes that lack PGC-1 α (1, 14).

Evidence supported by data from co-immunoprecipitation and pull-down assays indicated that FAK may complex with PGC-1 α in the nuclei of stretched cardiomyocytes, implying a direct influence of FAK in the transcriptional events modulated by PGC-1 α in stretched cardiomyocytes. Consistent with this, FAK has been shown to re-locate to the nucleus of stretched cardiomyocytes and to regulate chromatin remodeling and transcription in muscle cells (8, 17). Given that

the levels of PGC-1 α are subjected to a positive autoregulatory loop, it is tempting to speculate that the lack of PGC-1 α upregulation in cardiomyocytes depleted of FAK would reflect the disruption of a nuclear complex involving FAK and PGC-1 α . However, our present data do not 18 exclude the possibility that intermediate signaling events contribute to the regulation of PGC-1 α downstream to FAK.

Effects of FAK depletion in overloaded left ventricle

Despite the lack of appropriate hypertrophic response, function was found to be preserved in the overloaded left ventricle transiently depleted of FAK, as previously demonstrated (3). This would suggest that depletion of FAK may attenuate the adverse effects of pressure overload on LV function. The beneficial effects of FAK depletion may be partially mediated by an attenuation in the interstitial fibrosis in overloaded myocardium (3). Accordingly, signaling mediated by FAK has been shown to play a critical role in the myocardial fibrogenesis that occurs in response to mechanical overload (4, 16). However, depletion of FAK may also attenuate intrinsic abnormalities of overloaded cardiomyocytes. In line with this, FAK depletion has been demonstrated to attenuate the hypertrophic growth induced by mechanical stress without affecting cell viability or contractile function of overloaded cardiomyocytes (3, 18). Our findings here that depletion of FAK did not affect the function of overloaded left ventricle, despite the attenuation in mitochondrial biogenesis may suggest that modulation of load-induced mitochondrial biogenesis would contribute to the beneficial effects of FAK depletion in overloaded left ventricle. Indeed, available data imply massive activation of mitochondrial biogenesis as a mechanism that is detrimental to cardiac function (13).

Increased mitochondrial mass could reduce the contractile efficiency by displacing sarcomeres, but it may also lead to myocardial oxidative stress, which would induce cell loss in the early period of pressure overload (22, 24, 28).

Conceivably, FAK depletion may contribute to mitigate those functional and structural abnormalities of overloaded cardiomyocytes by modulating the excessive mitochondrial biogenesis. Intriguingly, however, cardiomyocytes depleted of FAK were shown here to be unable to sustain the ATP levels when subjected to mechanical stress, which is expected to be detrimental rather than beneficial to contractile function and cell viability. We speculate that the reductions of ATP levels in response to cyclic stretch might be related to peculiarities of cultured cardiomyocyte system model which may be susceptible to stimuli that enhances the energy demand. To date, hypertrophying cardiomyocytes have a high oxygen demand that may not be met by cell culture techniques (21). However, this issue will need to be explored in intact left ventricle to confirm whether the attenuation in mitochondrial biogenesis after FAK depletion is sufficient to reduce the ATP levels of mechanically stimulated cardiomyocytes.

In conclusion, the data from this study provide a rationale for a distinct role of FAK in mediating the activation of mitochondrial transcription cascade in response to mechanical stress. Notably, our data support the notion that the negative modulation of mitochondrial biogenesis by FAK depletion may be dependent on a disruption of a nuclear complex involving FAK and PGC-1 α . Future studies should establish if the modulation of mitochondrial mass results in beneficial effects to overloaded left ventricle.

REFERENCES

- 1- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, and Spiegelman BM. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1:259-271, 2005.
- 2- Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, and Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR470 gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10086-10091, 2006.
- 3- Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I, Souza JR, and 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.
- 4- Dalla Costa AP, Clemente CF, Carvalho HF, Carvalheira JB, Nadruz W Jr and Franchini KG. FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex. *Cardiovasc Res* 86:421-431, 2010.
- 5- Diwan A and Dorn GW, 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* 22: 56-64, 2007.
- 6- Durieux AC, D'Antona G, Desplanches D, Freyssenet D, Klossner S, Bottinelli R, and Fluck M. Focal adhesion kinase is a load-dependent governor of the slow contractile and oxidative muscle phenotype. *J Physiol* 587: 3703-3717, 2009.
- 7- Finck BN and Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 115: 2540-2548, 2007.

- 8- Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J and Franchini KG. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ Res* 96:73-81, 2005.
- 9- Franchini KG, Clemente CF and Marin TM. Focal adhesion kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. *Braz J Med Biol Res* 42: 44-52, 2009.
- 10- Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH and Saad MJ. 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.
- 11- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V and Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551: 491-501, 2003.
- 12- Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med* 121: 363-371, 1994.
- 13- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM and Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 106: 847-856, 2000.
- 14- Lehman JJ, Boudina S, Banke NH, Sambandam N, Han X, Young DM, Leone TC, Gross RW, Lewandowski ED, Abel ED, and Kelly DP. The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H185-196, 2008.
- 15- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, and Kelly DP. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3: e101, 2005.

- 16- Lopes MM, Ribeiro GC, Tornatore TF, Clemente CF, Teixeira VP and Franchini KG. Increased expression and phosphorylation of focal adhesion kinase correlates with dysfunction in the volume-overloaded human heart. *Clin Sci (Lond)* 113:195-204, 2007.
- 17- Luo SW, Zhang C, Zhang B, Kim CH, Qiu YZ, Du QS, Mei L and Xiong WC. Regulation of heterochromatin remodelling and myogenin expression during muscle differentiation by FAK interaction with MBD2. *EMBO J* 28:2568-2582, 2009.
- 18- Marin TM, Clemente CF, Santos AM, Picardi PK, Pascoal VD, Lopes-Cendes I, Saad MJ, and Franchini KG. Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res* 103: 813-824, 2008.
- 19- Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A, Ji G, Cheng L, Yang Q, Kotlikoff MI, Chen J, Chien K, Gu H, and Guan JL. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 116: 217-227, 2006.
- 20- Rabinowitz M and Zak R. Mitochondria and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 36:367-376, 1975.
- 21- Radisic M, Malda J, Epping E, Geng W, Langer R and Vunjak-Novakovic G. Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol Bioeng* 93: 332-343, 2006.
- 22- Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, Medeiros DM, Valencik ML, McDonald JA and Kelly DP. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* 94: 525-533, 2004.

- 23- Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286: 81-89, 2002.
- 24- Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchi E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW, and d'Amati G. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* 50: 1362-1369, 2007.
- 25- Seddon M, Looi YH and Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93: 903-907, 2007.
- 26- Torsoni AS, Fonseca PM, Crosara-Alberto DP and Franchini KG. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1411-1419, 2003.
- 27- Tsutsui H, Kinugawa S and Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 81: 449-456, 2009.
- 28- Ventura-Clapier R, Garnier A and Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79: 208-217, 2008.
- 29- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, and Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124, 1999.

LEGENDS

Figure 1- Cyclic stretch activates mitochondrial transcription cascade in NRVMs

(A) Immunoblots and graphs (n=5 cultures for each time point) showing relative changes in PGC-1 α and NRF-1 (B) induced by cyclic stretch (2-12hs) in respect to values of non-stretched (NS) cells. Anti-GAPDH immunoblots for the same samples demonstrate equal protein loading. (C) Graph (n=5 cultures each time point) shows the relative changes of Tfam normalized by GAPDH transcripts (RQ) from samples of stretched as compared to non-stretched NRVM. (D) Representative immunoblot and average (5 cultures) changes of PGC-1 α protein in the cytosolic and nuclear extracts of stretched (ST) as compared to NS NRVM. (E) Representative anti-NRF-1 immunoblot from samples of total extract and anti-PGC-1 α precipitates from NS and ST NRVM (pool of 3 cultures). Assay performed with beads only was used as control for the co immunoprecipitation assay. *p<0.05 vs NS.

Figure 2- Cyclic stretch induces mitochondrial biogenesis in NRVMs

(A) Graph shows the changes in D-loop normalized by 18S transcripts of ST as compared to NS NRVM (n=6 cultures each experimental group). (B) Representative immunoblot and graph indicating the change in the expression of subunit IV of cytochrome oxidase in NS and ST NRVM (n=3 cultures each experimental group); (C) Graph indicating change in the area of Mito Tracker green stained mitochondria in ST, as compared to NS NRVM (n=250 cells each experimental group). (D, E) Fluorescence images of NS and ST (12h) NRVM loaded with Mito Tracker green. (F) Changes of the relative quantity (RQ) of ANP in respect to GAPDH transcripts in ST as compared to NS NRVM (n=5 cultures each experimental group). (H) Graph indicates changes in the average surface area in ST as compared to NS NRVM (n=250 cells each experimental group).

(I-J) Representative examples of NS and ST NRVM stained with rhodamine conjugated phalloidin. *p<0.05 vs NS.

Figure 3- FAK is activated and interacts with PGC-1 α in the nuclei of NRVM

(A) Representative examples of immunoblots performed with antibodies targeted to FAK and pFAK. Graph indicate the changes in the values of FAK/pFAK ratio in ST (2-12hs) as compared to NS NRVM (n=6 cultures each time point). (B-E) Imaging data of NS and ST (2h) NRVM double-labeled with anti-FAK antibody and phalloidin. (F) Representative immunoblots of anti-FAK antibody and changes of FAK protein levels in the cytosol and nuclear extracts of NRVM (n=4 cultures each experimental group). (G) Representative anti-NRF-1 immunoblot from samples of total extract and anti-FAK precipitates from nuclear and cytosolic extracts of NS and ST NRVM (pool of 4 cultures). Control for the immunoprecipitation assay was obtained with beads only. (H) Anti-PGC-1 α immunoblotting from pull-down assays performed with recombinant C terminal FAK and NRVM nuclear extracts as compared with immunoprecipitates of anti-FAK antibody (pool of 4 cultures). *p<0.05 vs NS. #p< 0.05 vs NS.

Figure 4- FAK mediates the stretch-induced hypertrophy and mitochondrial biogenesis in NRVM

(A) FAK protein expression in NS and ST NRVM, treated with siFAK as compared with cells treated with siGFP (n=6 cultures each experimental group). (B) PGC-1 α protein expression in NS and ST NRVM treated with siFAK, as compared with cells treated with siGFP (n=6 cultures each experimental group). (C) NRF-1 protein expression in NS and ST NRVM, treated with siFAK compared with cells treated with siGFP (n=6 cultures each experimental group). (D) Co immunoprecipitation assays of PGC-1 α and NRF-1 performed with nuclear extract of NS and ST NRVM treated with siFAK or siGFP (n=6 cultures each experimental group). *p<0.05 vs siGFP NS. #p<0.05 vs siGFP ST.

Figure 5- Depletion of FAK attenuates the stretch-induced mitochondrial biogenesis and hypertrophy in NRVM

(A) Graph shows the changes in D-loop normalized by 18S transcripts of ST as compared to NS NRVM treated with siRNA targeted to FAK or GFP (n=6 cultures each experimental group); (B) Representative immunoblot and graph indicating the changes in the expression of subunit IV of cytochrome oxidase in NS and ST NRVM treated with siRNA targeted to FAK or GFP (n=3 cultures each experimental group); (C-F) Representative examples of NS and ST NRVM treated with siFAK and siGFP labeled with Mito Tracker. (G) Graph indicating change in the area of Mito Tracker green stained mitochondria in ST, as compared to NS NRVM treated with siRNA targeted to FAK or GFP (n=250 cells each experimental group). (H) Amount of ATP in NS and ST NRVM treated with siFAK or siGFP (n=6 cultures each experimental group). (I) Changes of the relative quantity (RQ) of ANP in respect to GAPDH transcripts in ST as compared to NS NRVM treated with siRNA targeted to FAK or GFP (n=6 cultures each experimental group). (J) Graph indicates changes in the average surface area in ST as compared to NS NRVM treated with siRNA targeted to FAK or GFP (n=250 cells each experimental group). *p<0.05 vs siGFP NS.#p<0.05 vs siGFP.

Figure 6- FAK depletion attenuates load-induced left ventricular hypertrophy

Data from sham operated (SO) and aortic banded mice (1 to 21 days after transverse aortic constriction - TAC). (A) RQ of FAK transcript in the left ventricle of aortic banded (TAC) and sham-operated (SO) mice treated with siFAK or siGFP (n=9 hearts each experimental group). (B) Bar graph shows the average values left ventricle /body mass ratio from TAC and SO mice treated with siRNA targeted to FAK or GFP (n=9 hearts each experimental group). (C) Echocardiographic values of posterior wall thickness (LVWT) from the groups of mice showed in B. (D) RQ of ANP in respect to transcripts of GAPDH as a relative change compared to calibrator sample (SO, siGFP) obtained by real

time-PCR. Groups are the same as the ones of B. *p<0.05 vs SO. #p<0.05 vs TAC siGFP with the corresponding group.

Figure 7- FAK depletion attenuates the activation of mitochondrial transcription cascade in the left ventricle of TAC mice

(A) Immunoblots and graphs showing relative changes in PGC-1 α and NRF-1. **(B)** induced by TAC in the left ventricle of mice treated with siRNA targeted to FAK or siRNA targeted to GFP. **(C)** Anti-GAPDH immunoblots used as loading controls for the immunoblots shown in A and B. **(D)** Graph shows the changes in D-loop normalized by 18S transcripts of left ventricles from TAC mice treated with siRNA targeted to FAK or siRNA targeted to GFP. These data were obtained with samples from 9 hearts each experimental group. *p<0.05 vs SO. #p<0.05 vs TAC siGFP with the corresponding group.

