

MARUSKA DO ROCIO NEUFERT FERNANDES

**QUINASE DE ADESÃO FOCAL É CRÍTICA
PARA A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS PRÓ-
ATEROGÊNICAS EM CÉLULAS VASCULARES
SUBMETIDAS A ESTRESSE MECÂNICO**

Campinas, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**QUINASE DE ADESÃO FOCAL É CRÍTICA
PARA A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS PRÓ-
ATEROGÊNICAS EM CÉLULAS VASCULARES
SUBMETIDAS A ESTRESSE MECÂNICO**

Maruska do Rocio Neufert Fernandes

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do Título de

Doutor em Clínica Médica.

Na área de concentração Ciências Básicas.

Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F391q

Fernandes, Maruska do Rocio Neufert, 1980
Quinase de adesão focal é crítica para a expressão
de moléculas pró-aterogênicas em células vasculares
submetidas a estresse mecânico. / Maruska do Rocio
Neufert Fernandes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Wilson Nadruz Júnior
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aterosclerose. 2. Moléculas de Adesão Celular. 3.
Quinase 1 de Adesão Focal. 4. Receptores Toll-Like. 5.
Integrinas. I. Nadruz Junior, Wilson. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Focal Adhesion Kinase is critical for the expression of pro-atherogenic molecules in vascular cells subjected to mechanical stress

Palavras-chave em inglês:

Atherosclerosis

Cell Adhesion Molecules

Focal Adhesion Kinase 1

Toll-Like Receptors

Integrins

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Wilson Nadruz Júnior [Orientador]

Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Sandra Martha Gomes Dias

Carla Cristina Júdice Maria

Daniela Miti Lemos Tsukumo

Data da defesa: 06-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da tese de Doutorado

Maruska do Rocio Neufert Fernandes

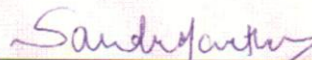
Orientador: Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior

Membros:

1. Prof. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff



2. Prof^a. Dr^a. Sandra Martha Gomes Dias



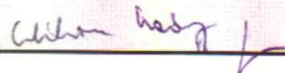
3. Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Júdice Maria



4. Prof^a. Dr^a. Daniela Miti Lemos Tsukumo



5. Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior



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

Data: 06/07/2011

DEDICATÓRIA

À minha mãe Yara Regina,
ao meu irmão Gudryan Neufert e
ao meu marido Carlos Roberto

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda sabedoria adquirida ao concretizar este trabalho.

Ao professor Doutor Wilson Nadruz Júnior pela orientação, confiança, estímulo científico e exemplo profissional.

Ao professor Doutor Kleber Gomes Franchini pela oportunidade de realizar grande parte deste trabalho em seu laboratório.

Ao professor Doutor Lício Veloso e sua equipe pela colaboração em diversos momentos fundamentais da realização deste trabalho.

Às amigas Ana Helena Macedo, Ana Paula Dalla Costa, Carolina Clemente, Jackeline Zanella, Maria Carolina S. F. Sae, Thaís Holtz, por toda a ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos amigos e colegas do laboratório de Biologia Cardiovascular e Fisiopatologia Cardiovascular por todo apoio e amizade.

A minha família que sempre me incentivou a seguir esta carreira com muita alegria.

Em especial, ao meu marido, Carlos, que também participou em muitos momentos desse trabalho, nos finais de semana, me ajudando a limpar os animais, confeccionar pôsteres e, claro, pelo companheirismo e amor.

À FAPESP pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram o meu eterno agradecimento. Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossa vida é única. Muito obrigada!

Diga-me, e eu ouço. Mostre-me, e eu vejo.

Deixe-me fazer, e eu entendo.

(Confúcio)

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	xvii
Lista de Figuras.....	xxi
Resumo.....	xxiii
Abstract.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Aterosclerose.....	28
1.1.1. Incidência.....	28
1.1.2. Patologia.....	28
1.2. Endotélio, Hipertensão e Aterosclerose.....	30
1.3. Forças hemodinâmicas.....	32
1.4. Mecanismos de mecanotransdução vascular: Complexo de adesão focal.....	34
1.5. Quinase de adesão focal – FAK.....	36
1.6. Moléculas pró-inflamatórias.....	39
1.6.1. Moléculas de adesão.....	39
1.6.2. Toll like receptor – TLR.....	41
1.6.3. Metaloproteinases.....	43
2. OBJETIVOS.....	47
2.1. Objetivo Geral.....	48
2.2. Objetivos Específicos.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Animais.....	50
3.2. Cultura de células.....	50

3.3. Anticorpos, reagentes e sais.....	50
3.4. Esquemas ilustrativos das metodologias utilizadas.....	52
3.4.1. Esquema ilustrativo da metodologia <i>in vitro</i>	52
3.4.2. Esquema ilustrativo da metodologia <i>in vivo</i>	53
3.4.3. Esquema ilustrativo da avaliação da expressão e ativação de metaloproteinases.....	53
3.5. Estiramento pulsátil contínuo.....	54
3.6. Preparação dos extratos totais.....	55
3.7. Análise das proteínas por immunoblotting.....	56
3.8. Transfecção do oligodeoxinucleotídeo nas RAEC.....	58
3.9. Microscopia de Imunofluorescência.....	59
3.9.1. Fixação do material.....	59
3.9.2 Reação de Imunofluorescência.....	60
3.10. Ensaio de adesão leucocitária.....	60
3.11. Coloração das lamínulas pela técnica Hematoxilina-Eosina – HE.....	61
3.12. Silenciamento da FAK na aorta de ratos.....	62
3.12.1. Síntese dos small interference RNA (siRNA).....	62
3.12.2. Injeção na veia jugular dos ratos.....	63
3.12.3. Coarctação da aorta.....	64
3.12.4. Medida da pressão arterial.....	64
3.13. Zimografia.....	65
3.14. Análise de <i>RT-PCR</i>	66
3.14.1. Extração do RNA.....	66
3.14.2. Avaliação da integridade do RNA.....	67

3.14.3. Síntese de <i>cDNA</i>	68
3.14.4. <i>PCR</i> em tempo real.....	68
3.15. Metodologia do ensaio de adesão <i>ex vivo</i>	69
3.16. Análise Estatística.....	70
4. Capítulo 1.....	71
Artigo: Focal adhesion kinase mediates stretch-induced pro-atherogenic response in vascular cells	
5. Discussão.....	101
6. Conclusão.....	111
7. Colaborações em atividades de pesquisa durante o doutorado.....	113
8. Referências Bibliografias.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT - serina/ treonina proteína quinase

ANS – fita antisense

ATCC – *American Type Culture Collection*

BSA – albumina de soro bovino

CEMIB – Biotério Central da Unicamp

CIPED – Centro de Investigação em Pediatria

CMLH – células musculares lisas de humanos

CaCl₂ – cloreto de cálcio

cDNA – DNA complementar

CoAo – coarctação da aorta

CT – controle

DAPI – 4'-6-diamino-2-fenilindol

DEPC - *diethyl pyrocarbonate*

DMEM – meio *Eagle* modificado por *Dulbelcco*

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTT - ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ERK – *extracellular signal- regulated kinase*

F-12 – meio de cultura de tecido animal desidratado

FAK – quinase de adesão focal

FAT - *focal adhesion targeting*

FERM - *ezrin-radixin-moesin homology*

GAPDH – gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase

GFP – proteína fluorescente verde

Grb - *growth factor receptor-bound protein*

HCl – ácido clorídrico

ICAM – molécula de adesão intracelular

IDT – *Integrated DNA Technologies*

kDa – quilodalton

Kg - quilograma

MAP kinase – proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1 – proteína quimioatrativa para monócitos 1

MEC – matriz extracelular

µg – micrograma

µl - microlitro

mg – miligrama

mL – mililitro

mM - milimolar

MMP – família das metaloproteinases

MMP2 - metaloproteinase de matriz 2/ gelatinase A

MMP9 - metaloproteinase de matriz 9/ gelatinase B

M - molar

MOPS – ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

mRNA – RNA mensageiro

MYD88 – fator mielóide de diferenciação

NaCl – cloreto de sódio

NaN₃ – azida sódio

ng – nanograma

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

ODN - oligodeoxinucleotídeo

pb – pares de base

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PCR - reação de polimerização em cadeia

p-FAK – quinase de adesão focal fosforilada

pH – potencial hidrogeniônico

PI3 kinase - *phosphoinositide-3-kinase*

PMSF – *phenylmethanesulphonyl fluoride*

PP2 – *4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine*

P60 –Src - v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) oncogene viral homólogo

RAEC – célula endotelial de aorta de coelho

RhoA - *ras homolog gene family, member A*

RISC - *multiprotein RNA induced-silencing complex*

RNA - ácido ribonucléico

RNAi - ácido ribonucléico de interferência

rpm – rotações por minuto

RPMI – meio de cultura de tecido animal desidratado desenvolvido pelo *Instituto*

Roswell Park Memorial

RT-PCR – reação de transcrição reversa com amplificação por PCR

S - fita sense

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

SFB – Soro Fetal Bovino

Sham – cirurgia fictícia

SH₂- *Src homology 2x*

SHP₂ - *Src homology 2-containing tyrosine phosphatase*

siRNA-FAK – *small interference* RNA direcionado contra a FAK

siRNA-GFP – *small interference* RNA controle

siRNA – *small interference* RNA

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

THP1 – linhagem de células leucêmicas humanas

TIR – domínio conservado

TLR – receptores Toll like

Tris –HCl - tampão tris-hidroximetilaminometano e ácido clorídrico

Tyr - tirosina

VCAM – molécula de adesão celular vascular

WINDAQ-PRO - *Multitasking Data Acquisition Software* para Windows

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de uma artéria normal.....	29
Figura 2. Potenciais vias de sinalização emergindo da FAK.....	36
Figura 3. Esquema representativo da estrutura linear da FAK.....	37
Figura 4. Sistema <i>Flexercell Tension Plus</i> que controla o estiramento mecânico.....	55
Figura 5. Esquema de aplicação de força de tensão em cultura de células no equipamento <i>Flexercell Tension Plus</i>	55
Figura 6. Técnica de Imunoblotting.....	57
Figura 7. Esquema representativo de transfecção de oligodeoxinucleotídeos.....	59
Figura 8. Esquema representativo do mecanismo de interferência por RNA.....	63
Figura 9. Ilustração do local onde foi realizada a coarctação da aorta e os aparelhos utilizados para a obtenção da pressão arterial dos animais.....	65
Figura 10. Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total.....	67
Figura 11. Ilustração da conclusão final.....	114

O aumento do estresse circunferencial ou mecânico é um dos principais estímulos responsáveis pela aterogênese induzida por hipertensão arterial, além de ser um determinante para a localização das placas ateroscleróticas na árvore arterial. Neste contexto, moléculas mecano-sensíveis ou responsivas ao estresse mecânico podem exercer um papel fundamental no desenvolvimento do fenótipo pró-aterogênico em células vasculares. A quinase de adesão focal (FAK) tem sido considerada uma proteína central na mecanotransdução em diversos tipos celulares, por seu papel potencial na ativação de vias de sinalização envolvidas no crescimento celular, anti-apoptose e inflamação. Neste trabalho, nós inicialmente caracterizamos a ativação da FAK em linhagem de célula endotelial de aorta de coelho (RAEC) submetida a estiramento mecânico pulsátil e, em seguida, investigamos a influência da inibição desta proteína, por meio de oligodeoxinucleotídeo-antisense e pelo inibidor farmacológico PP2, sobre a expressão de moléculas pró-aterogênicas e a adesividade leucocitária neste modelo experimental. Nossos resultados mostraram que a FAK é ativada precocemente por estiramento mecânico e é fundamental para a expressão de TLR2, TLR4, VCAM-1 e E-selectina induzida por sobrecarga mecânica em células endoteliais. A inibição da FAK endotelial com PP2 e oligodeoxinucleotídeo-antisense bloqueou a adesão de células monocitóides THP1 às células endoteliais induzida por estiramento *in vitro*. O próximo passo foi avaliar o impacto da FAK sobre expressão de moléculas pró-aterogênicas induzida por sobrecarga

hemodinâmica *in vivo*, utilizando o modelo de coarctação da aorta em ratos Wistar. Os

resultados dos estudos *in vivo* demonstraram que a FAK é ativada nas primeiras horas após instituição da sobrecarga pressora em segmentos de aorta. Após 7 dias de coarctação, os segmentos aórticos proximais à estenose apresentaram aumento na expressão de TLR2, TLR4, VCAM-1, E-selectina, metaloproteinases de matriz 2 e 9, além de maior adesividade às células THP1. Estes fenômenos foram inibidos por meio de tratamento prévio dos animais com *small interference* RNA direcionado especificamente contra a FAK. Em conjunto, estes dados indicam que a FAK exerce um papel fundamental na resposta pró-aterogênica de células vasculares ao estresse mecânico *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chaves: aterosclerose, quinase de adesão focal, estresse mecânico.

ABSTRACT

The increase in circumferential or mechanical stress is a major stimulus by which hypertension stimulates atherogenesis and a main determinant for the location of atherosclerotic plaques in the arterial tree. Mechano-sensitive molecules can play a key role in the development of pro-atherogenic vascular cell phenotype. Focal Adhesion Kinase (FAK) has been considered a central protein in mechanotransduction, because of its potential role in the activation of cell signaling pathways involved in cell growth, anti-apoptosis, and inflammation. In this work, we initially evaluated the activation of FAK in rabbit aortic endothelial cell (RAEC) lineage subjected to cyclic mechanical stretch and then investigated the impact of FAK inhibition, by transfection with specific oligodeoxynucleotide antisense and pre-treatment with the pharmacological inhibitor PP2, on the expression of pro-atherogenic molecules and leukocyte adhesion in this experimental model. Our results showed that FAK was rapidly activated by mechanical stretch and was critical to stretch-induced expression of TLR2, TLR4, VCAM and E-selectin in endothelial cells. FAK endothelial inhibition also blocked the adhesion of THP1 monocytoid cells to endothelial cells induced by stretch *in vitro*. The next step was to investigate the role of FAK in load-induced expression of pro-atherogenic molecules *in vivo*, by subjecting Wistar rats to aortic constriction. The results of *in vivo* assays revealed an early activation of FAK in aortic segments subjected to pressure overload. After 7 days of aortic constriction, vascular segments subjected to high pressure exhibited increased expression of TLR2, TLR4, VCAM-1, E-selectin, matrix metalloproteinases 2 e 9, and higher adhesion to THP-1

monocytoid cells. These events were inhibited by pre-treatment of rats with *small interference* RNA designed to silence FAK expression. In general these findings indicate that FAK is critical do stretch-induced expression of pro-atherogenic molecules in vascular cells *in vitro* and *in vivo*.

Key-Words: atherosclerosis, focal adhesion kinase, mechanical stretch.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose

1.1.1. Incidência

Segundo projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo tanto entre homens quanto entre mulheres. A doença arterial coronariana e os acidentes vasculares cerebrais ocupam, respectivamente, a primeira e a segunda posição mundial, mostrando o profundo impacto sócio-econômico da aterosclerose sobre a população. A aterosclerose coronariana foi responsável por mais de 12% das mortes em 2004, no mundo - cerca de 7,2 milhões de casos. Contudo, a taxa de mortalidade coronária vem aumentando alarmantemente e a sua previsão é que atinja aproximadamente 11 milhões de mortes em 2020 (Murray *et al*, 1997; Tunstall-Pedoe *et al*, 1999).

1.1.2. Patologia

De acordo com o conhecimento atual, a aterosclerose é considerada uma doença de natureza inflamatória que ocorre em resposta ao acúmulo de lipoproteínas plasmáticas na camada íntima das artérias, acompanhada de migração, proliferação e morte das células inflamatórias e musculares lisas (Lusis, 2000; Libby, 2002; Hansson, 2005). Trata-se de uma doença multifatorial, altamente dinâmica e de apresentação imprevisível, com um curso que varia desde agressiva oclusão arterial trombótica até mesmo a regressão das lesões. Embora qualquer artéria possa ser afetada, os principais alvos da doença são as artérias coronárias, cerebrais e aorta, tendo como principais consequências o

infarto do miocárdio e a isquemia cerebral. Na figura 1, pode-se visualizar a estrutura de uma artéria normal. Atualmente, as evidências demonstram que os mecanismos envolvidos na gênese da doença aterosclerótica são extremamente complexos e envolvem a interação de componentes genéticos, ambientais e resposta inflamatória (Libby, 2002; Hackam & Anand, 2003; Hansson, 2005).

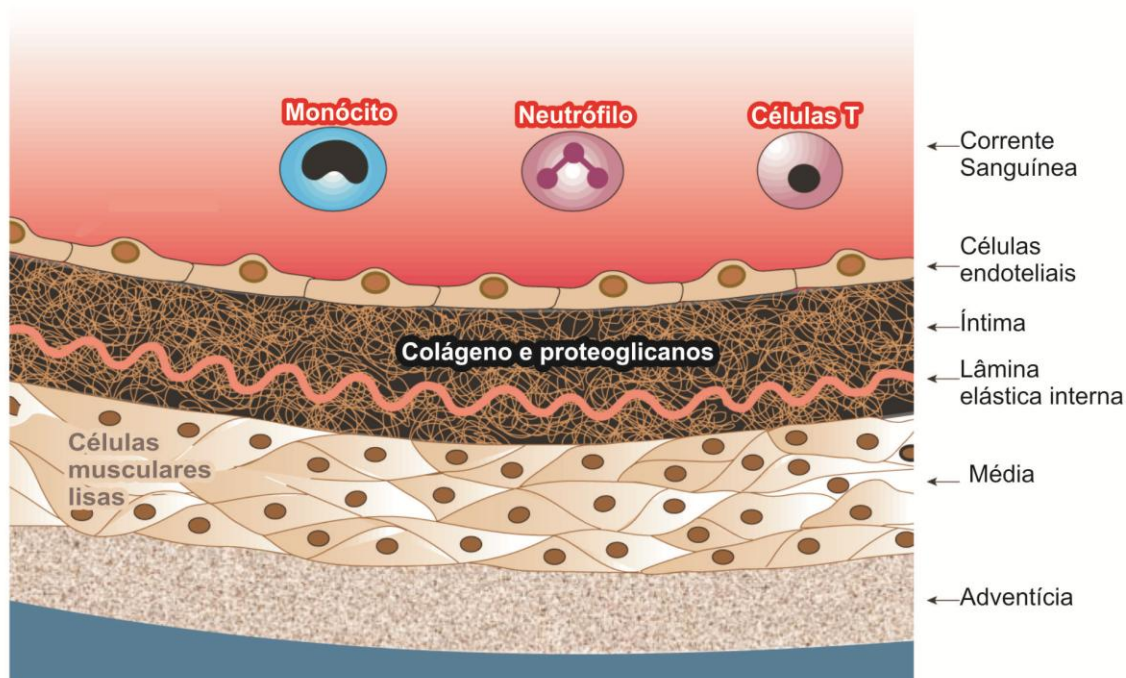


Figura 1. Estrutura de uma artéria normal (Lusis, 2000).

A aterosclerose é uma doença progressiva que pode sofrer influência de anormalidades metabólicas e nutricionais, forças hemodinâmicas, toxinas exógenas encontradas no tabaco, proteínas glicosiladas associadas com o *diabetes mellitus*, lipídeos modificados oxidativamente e possivelmente infecções virais e bacterianas (Stein *et al*, 2002; Hackam & Anand, 2003).

Estudos epidemiológicos mostram diversos fatores de riscos genético-ambientais associados à aterosclerose. No entanto, a complexidade das interações entre estes fatores de risco dificulta o entendimento a respeito das causas do desenvolvimento da placa. A aterosclerose não é uma simples consequência degenerativa do envelhecimento, mas sim uma condição inflamatória que pode ser convertida em um evento clínico e agudo ocasionado pela ruptura da placa e formação de trombos (Lusis, 2000). A resposta inflamatória na aterogênese é mediada através de mudanças funcionais em células endoteliais, linfócitos T, macrófagos derivados de monócitos e células do músculo liso. A ativação destas células desencadeia a elaboração e interação de um largo espectro de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, acúmulo de lipídeos e proliferação de células do músculo liso. Adicionalmente, a resposta inflamatória pode ser induzida pelo estresse oxidativo (Nicolletti *et al*, 2000; Libby, 2002; Hansson, 2005).

1.2. Endotélio, Hipertensão e Aterosclerose

O revestimento dos vasos sanguíneo, denominado endotélio, exerce funções anticoagulantes e antiinflamatórias que são fundamentais para manter a homeostasia. Ele tem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares mantendo a vasodilatação, inibindo a adesão leucocitária e a proliferação de células musculares lisas. O endotélio atua como sinalizador, registrando alterações hemodinâmicas e traduzindo-as em sinais que influenciam na reatividade do sistema vascular. Em condições fisiológicas, há um equilíbrio

entre a liberação e produção dos fatores contráteis e relaxantes (Cines *et al*, 1998). A proliferação e migração direcionada de células vasculares e a habilidade do sistema vascular em modificar sua geometria de acordo com as condições do microambiente (remodelamento vascular) são fatores-chave no desenvolvimento de doenças cardiovasculares como aterosclerose e hipertensão arterial. O remodelamento vascular geralmente é acompanhado por aumento de matriz extracelular, particularmente por aumento da deposição de colágeno. A camada endotelial atua como uma interface sinalizadora para as forças hemodinâmicas na regulação do remodelamento estrutural (Cines *et al*, 1998).

A hipertensão arterial consiste no aumento da força que o sangue exerce nas paredes das artérias. Ela se associa a alterações na função, nas propriedades mecânicas e estruturais das artérias, que podem ser observadas nas células endoteliais, células musculares lisas e matriz extracelular. Na hipertensão arterial crônica, em artérias de grande calibre geralmente observa-se hipertrofia da parede vascular, especialmente por proliferação e hipertrofia de células musculares lisas, com aumento da rigidez de componentes do meio extracelular (Sullivan *et al*, 2000; Savoia & Schiffrin, 2006). A hipertensão também pode promover a disfunção endotelial, por estimular a produção de moléculas de adesão pelas células endoteliais, favorecendo assim o recrutamento e adesão de monócitos à superfície do endotélio. Ela favorece a síntese de espécies reativas de oxigênio, como os radicais superóxidos, na parede arterial e estes podem induzir a interação de leucócitos com endotélio e a expressão de moléculas de adesão (Sullivan *et al*, 2000; Libby, 2002; Galley & Webster, 2004; Savoia & Schiffrin, 2006). Entretanto, embora esteja bem estabelecido que a hipertensão seja um fator de risco para a

doença aterosclerótica, os mecanismos relacionados a este processo ainda não estão claros.

1.3. Forças hemodinâmicas

As placas ateroscleróticas não ocorrem de maneira aleatória através do sistema vascular, como seria esperado devido à natureza sistêmica dos fatores de risco associados à sua gênese (e.g., hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes e tabagismo) (Frangos *et al*, 1999). Ao contrário, ocorrem em locais cuja circulação sanguínea apresenta alterações hemodinâmicas, como: 1) aumento do estresse circunferencial ou mecânico (a distensão pulsátil e repetitiva na parede vascular) e 2) redução do *shear stress* ou fluxo laminar (a força friccional atuando na superfície da célula endotelial como resultado do fluxo sanguíneo) (Frangos *et al*, 1999; Malek *et al*, 1999).

Embora a diminuição do *shear stress* seja reconhecida como um potencial mecanismo indutor de aterogênese e objeto de frequentes revisões na literatura (Malek *et al*, 1999), diversas evidências apontam para uma participação fundamental, e até mais importante, do estresse mecânico neste processo (Thubrikar *et al*, 1995). Sabe-se que o aumento do estresse mecânico local é um dos principais determinantes da localização seletiva de lesões ateroscleróticas, como no óstio de grandes ramos arteriais, nas bifurcações da aorta e das carótidas e na aorta descendente torácica (Thubrikar *et al*, 1995). Por outro lado, a redução deste estímulo tem sido considerada como a responsável pela ausência

de aterosclerose em artérias coronárias intramiocárdicas, abaixo de pontes miocárdicas, na porção intra-óssea de artérias vertebrais ou em modelos de aterosclerose experimentais onde a distensão vascular é impedida por meio de bandagens externas (Thubrikar *et al*, 1995; Ge *et al*, 1999; Tropea *et al*, 2000). Ademais, estudos eco-dopplercardiográficos revelaram uma correlação direta entre a tensão circunferencial na parede vascular e a espessura da camada íntima-média de carótidas de humanos, sugerindo que a intensidade deste estímulo pode ser importante para a magnitude do remodelamento vascular (Jiang *et al*, 2000).

O aumento do estresse mecânico tem sido apontado como o principal estímulo contributivo para a aterogênese em indivíduos portadores de Hipertensão Arterial Sistêmica (Taylor, 1999). Além disto, a observação em modelos experimentais de que a amplitude da distensão pulsátil é fundamental para a aterogênese (Thubrikar *et al*, 1988; Tropea *et al*, 2000) parece explicar o aumento da pressão de pulso como fator de risco independente para o desenvolvimento de aterosclerose (Safar *et al*, 2004). Contudo, o motivo pelo qual o desenvolvimento de aterosclerose é heterogêneo em pacientes hipertensos permanece pouco conhecido. Neste contexto, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na mecanotransdução vascular e seu papel potencial na aterogênese podem ser de grande relevância, ao fornecer a base para a determinação de marcadores de risco para aterosclerose assim como para o desenvolvimento futuro de ferramentas terapêuticas.

1.4. Mecanismos de Mecanotransdução vascular: Complexo de adesão Focal

Nos últimos anos, demonstrou-se que o estresse mecânico pode atuar diretamente sobre células vasculares, estimulando-as a desenvolver um fenótipo pró-aterogênico. Por exemplo, células endoteliais, quando estiradas, produzem moléculas de adesão (VCAM, ICAM e selectinas) (Yun *et al*, 1999; Chello *et al*, 2003). Estas proteínas são fundamentais para a adesão e migração subendotelial dos leucócitos sendo um pré-requisito para a progressão das lesões ateroscleróticas. O estiramento cíclico também pode contribuir para a aterogênese por induzir a produção de interleucinas, *Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)*, substâncias vasoativas, radicais livres de oxigênio e metaloproteinases pelas células endoteliais (Okada *et al*, 1998; Sweeney *et al*, 2004). Ademais, células musculares lisas vasculares também respondem a este estímulo, hipertrofiando-se e secretando componentes de matriz extracelular (Xu, 2000).

Diversos mecanismos celulares têm sido implicados na transformação do estímulo mecânico em sinal bioquímico celular. Estes incluem a ativação de canais iônicos e de proteínas de membrana conectadas ao citoesqueleto localizadas nos complexos de adesão focal, junções intercelulares e membrana nuclear, assim como em microdomínios lipídicos conhecidos como cavéolas (Davies, 1995). Contudo, várias evidências indicam que a ativação dos componentes do complexo de adesão focal é um dos principais mecanismos envolvidos na mecanotransdução em diversas células e tecidos (Li *et al*, 2002). Neste complexo, as *integrinas* (heterodímeros trans-membrana) funcionam como receptores de proteínas da matriz extracelular e ao mesmo tempo agregam proteínas do citoesqueleto e moléculas sinalizadoras dispersas no citosol, como a

Quinase de Adesão Focal (FAK), p60-Src, paxilina, PI3-kinase e Grb2 formando o *Complexo de Adesão Focal* (Yamada *et al*, 1995; Franchini *et al*, 2000). O complexo protéico resultante poderia ser suficiente para promover a transdução do estímulo tensional em evento bioquímico responsável pela regulação gênica em resposta ao estímulo mecânico (Figura 2). Dentre estas moléculas, destaca-se a FAK, a qual tem sido considerada uma proteína central na mecanotransdução, por seu papel potencial na ativação de vias de sinalização celular envolvidas no crescimento celular, anti-apoptose, e inflamação (Schlaepfer *et al*, 1999). Até o momento, sabe-se que a FAK é importante para a angiogênese, ativação de células inflamatórias e proliferação de células musculares lisas (Schlaepfer *et al*, 1999; Peng *et al*, 2004; Bond *et al*, 2004). Contudo, apesar de seu grande potencial na transdução das alterações hemodinâmicas, o papel da FAK na aterogênese induzida por estresse mecânico ainda não foi explorado.

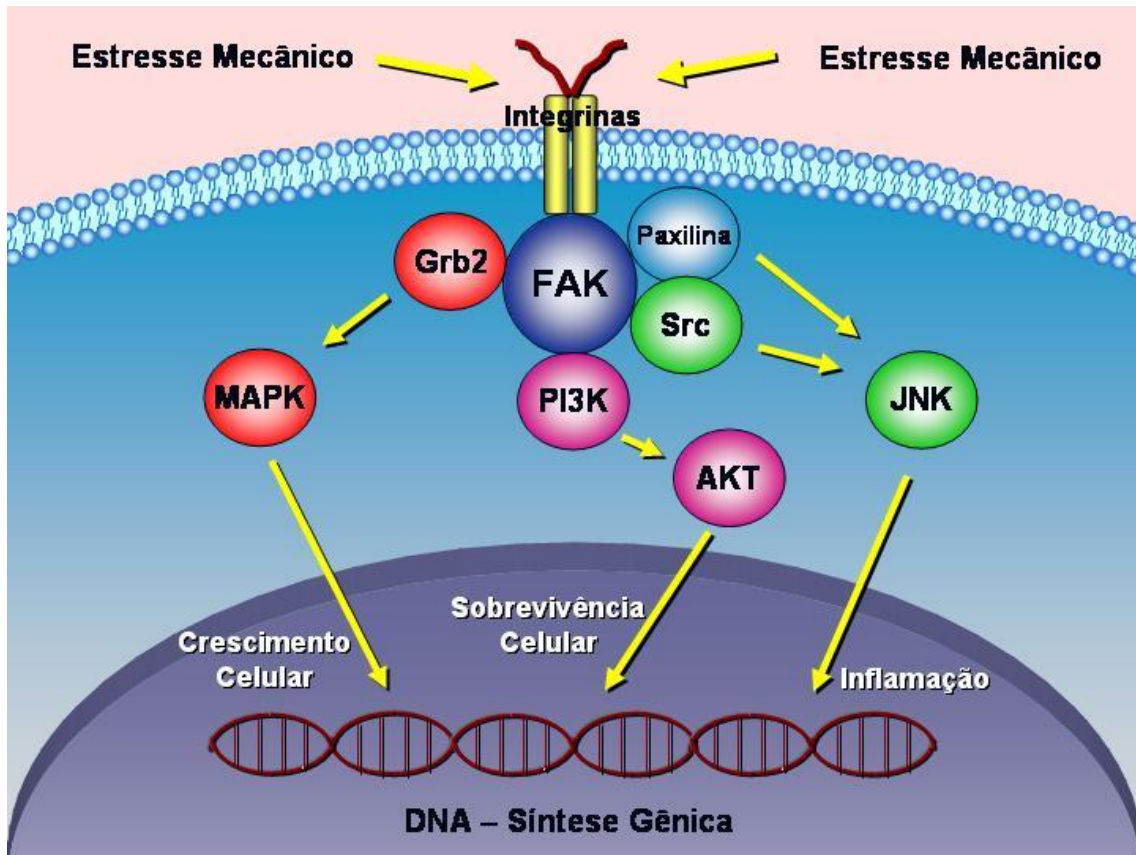


Figura 2. Potenciais vias de sinalização emergindo da FAK.

1.5. Quinase de adesão focal – FAK

A FAK é uma importante proteína sinalizadora na mediação da sinalização celular via integrinas (Guan, 1997; Mitra & Schlaepfer, 2006) e pode ser ativada por receptores tirosinas quinases e por receptores acoplados a proteína G (Parsons *et al*, 2000; Torsoni *et al*, 2003), constituindo assim um efetor comum a múltiplas vias de sinalização. A FAK é um importante mediador na transdução de sinais mecânicos em diferentes células (Wang *et al*, 2001; Shikata *et al*, 2005). Ela é uma tirosina-quinase citoplasmática, de aproximadamente 1052 aminoácidos, com uma massa molecular aproximado de 125 kDa. A estrutura da FAK (figura 3) é dividida em três domínios: o domínio N-terminal, o domínio quinase e o domínio

C-terminal, o que provavelmente permite que a mesma se associe a múltiplos substratos e determine a ativação de diversas vias de sinalização celular (Parsons, 2003; Vadali *et al*, 2007).

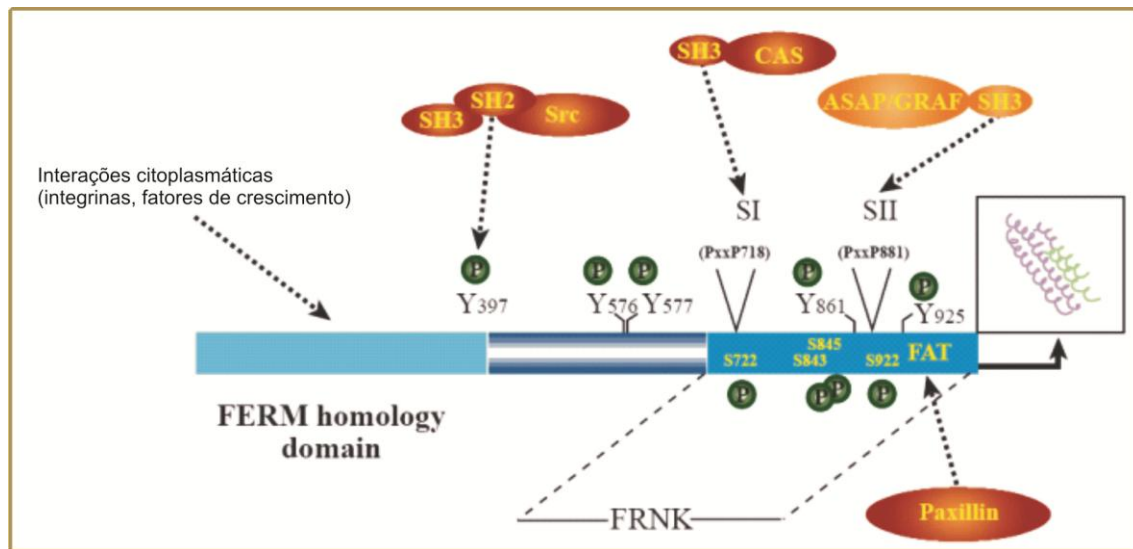


Figura 3. Esquema representativo da estrutura linear da FAK (Parsons, 2003).

O domínio N-terminal é composto por um domínio FERM, responsável pela interação com a extremidade citoplasmática da subunidade da integrina β (Mitra & Schlaepfer, 2006). Além disso, este domínio pode regular a atividade de quinase da FAK através de um mecanismo inibitório intramolecular (Parsons, 2003). Há uma região entre os domínios N-terminal e o domínio quinase, que contém o resíduo de tirosina 397, que é sítio de autofosforilação e ativação da FAK e um sítio para a ligação da porção SH2 da proteína Src (Guan, 1997; Schlaepfer *et al*, 1999; Parsons, 2003; Mitra & Schlaepfer, 2006; Vadali *et al*, 2007). O domínio quinase na região central correspondente à porção catalítica da enzima apresenta uma alça de ativação que contém os resíduos de tirosina 576 e 577. Já o domínio

C-terminal é rico em sítios de interação proteína-proteína (sequências ricas em prolina), possui um sítio de reconhecimento SH3 e uma extremidade C-terminal conhecida como FAT (*Focal Adhesion Targeting*) responsável pela adesão focal e pela associação com as proteínas talina e paxilina (Parsons, 2003; Mitra & Schlaepfer, 2006; Vadali *et al*, 2007).

A sinalização via FAK requer que esta seja ativada através da autofosforilação no resíduo de tirosina 397. Essa fosforilação em tirosina resulta na formação de um sítio de alta afinidade para a porção SH2 da Src e essa associação favorece a fosforilação em outros resíduos de tirosina da FAK (407, 576, 577, 861 e 925), levando a uma atividade máxima desta enzima (Guan, 1997; Schlaepfer *et al*, 1999; Parsons, 2003; Mitra & Schlaepfer, 2006; Vadali *et al*, 2007). O resíduo 397 fosforilado constitui um sítio de ligação para outras proteínas como a PI3 kinase, participando nas cascatas de sinalização anti-apoptóticas via AKT. Os resíduos de tirosina 576 e 577 se encontram no interior do domínio quinase da FAK e a fosforilação destes sítios estão envolvidos na regulação da atividade enzimática. Já a fosforilação da tirosina 925, localizada no domínio C terminal da FAK, cria sítios de ligação para o domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2. Essa associação leva a ativação de MAP kinases, reguladoras do crescimento e proliferação celular (Mitra & Schlaepfer, 2006; Vadali *et al*, 2007). Estudos anteriores demonstraram que estímulos mecânicos em miócitos cardíacos induzem um aumento na fosforilação e, por conseguinte, na atividade da FAK (Torsoni *et al*, 2003). Da mesma forma, a sobrecarga pressórica, induzida pela constrição do arco aórtico, induz um aumento na fosforilação da FAK (Franchini *et al*, 2000). Uma vez ativada essa proteína ativa uma série de

proteínas (ERK, MAP kinases, RhoA/ROCK) envolvidas no processo de hipertrofia cardíaca (Franchini *et al*, 2000; Torsoni *et al*, 2003; Nadruz *et al*, 2005).

Dada sua participação em processos celulares diversos, têm-se empregado grande esforço para esclarecer a função da FAK no desenvolvimento do sistema cardiovascular e nas doenças cardíacas (Vadali *et al*, 2007).

1.6. Moléculas pró-inflamatórias

1.6.1. Moléculas de adesão

As moléculas de adesão são responsáveis pela adesão precoce de leucócitos no endotélio arterial em sítios de ateromas iniciais. Entre as principais moléculas de adesão, destacam-se a molécula de adesão vascular (VCAM-1), a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), a E-selectina entre outras (Libby, 2002). Na disfunção endotelial, a produção dessas moléculas é estimulada favorecendo o recrutamento e adesão de alguns monócitos à superfície endotelial. Os leucócitos (neutrófilos e monócitos) são capazes de emigrar da corrente circulatória, dirigindo-se para um foco infeccioso ou inflamatório, localizado em qualquer tecido (diapedese). Sob condições normais, tanto os monócitos quanto as células endoteliais apresentam carga negativa na superfície da membrana. Esta carga negativa impede, de um lado, que os monócitos se agreguem entre si e, de outro lado, evita a adesão destas células ao endotélio vascular (Muller, 2003). Quando a infecção ou inflamação ocorre, os monócitos são ativados, a sua carga negativa diminui e a força de repulsão também diminui, contribuindo para a adesão das células ao endotélio. Isto facilita a agregação, a quimiotaxia e a diapedese das

células em direção aos tecidos. A sequência de eventos desencadeados pela interação de monócitos e células endoteliais possui quatro fases distintas: 1) a fase de rolamento, onde se estabelece o contato inicial entre monócitos e a superfície endotelial em condições hemodinâmicas normais, sendo mediada pela E-selectina e L-selectina; a interação é com a porção glicídica das glicoproteínas presentes na membrana dos leucócitos; 2) a fase de parada é caracterizada pela ativação de monócitos que se conectam às moléculas de adesão. Esta fase é dependente de integrinas presentes nos monócitos como $\alpha 4\beta 1$ e VCAM-1. Os monócitos aderidos podem se espalhar na superfície apical do endotélio, originando a terceira fase, denominada de espalhamento. Este processo é dependente de integrinas $\beta 2$ sintetizadas pelos monócitos e de ICAM-1 e/ou ICAM-2 presentes nas células endoteliais. Os monócitos já espalhados migram às junções intercelulares e ganham espaço subendotelial por diapedese; esta fase final é conhecida como fase diapedese. (Juliano, 2002; Muller, 2003; Galley & Webster, 2004).

A aterosclerose está associada à expressão de moléculas de adesão, permitindo a infiltração de monócitos nas paredes dos vasos em resposta aos fatores pró-aterogênicos (Wang *et al*, 2003b). Neste contexto, alguns estudos têm demonstrado que a expressão endotelial de selectinas, ICAM-1 e VCAM-1, além da adesão de células monocitóides ao endotélio são marcadores de formação da lesão aterosclerótica (Huo & Ley, 2001; Cybulsky *et al*, 1999; Dong & Wagner, 1998).

1.6.2. Toll like receptor – TLR

Sendo a aterosclerose uma doença inflamatória crônica, receptores de proteínas expressos pelos macrófagos e pelas células endoteliais podem reconhecer componentes e produtos de microorganismos e atuar como um importante papel na resposta imune inata (Tobias & Curtiss, 2005). Neste contexto, além das células inflamatórias *per se* (monócitos/macrófagos, linfócitos), as células vasculares (endoteliais, musculares lisas) também são capazes de atuar como células imunológicas, ao produzir moléculas e citocinas pró-inflamatórias (Libby, 2002).

Os Toll-Like Receptors (TLRs) reconhecem diversos ligantes exógenos e fragmentos teciduais endógenos, e têm sido implicados no desenvolvimento de patologias cardiovasculares (Kleijn & Pasterkamp, 2003). Recentemente, eles têm sido apontados como importante reguladores do desenvolvimento da aterosclerose, por modular expressão de moléculas de adesão e a resposta imune (Zeuke *et al*, 2002; Vinka *et al*, 2004).

Os TLRs são receptores transmembrana que, quando ativados, ligam-se à proteína adaptadora MyD88 e ativam moléculas de sinalização celular (especialmente o NK-kappa B e a c-Jun N-Terminal Quinase), promovendo a ativação subsequente de uma grande variedade de genes codificadores de proteínas pró-inflamatórias. Diversos ligantes exógenos e endógenos foram descritos como capazes de ativar os TLRs, tais como lipopolissacárides, peptideoglicanos e produtos de degradação da matriz extracelular (Vinka *et al*, 2004). O TLR4 é um receptor transmembrana classe I, expresso na superfície das células do sistema imunológico, e é ativado pela exposição à lipopolissacarídeos

derivados da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Como todos os outros membros da família dos TLRs, o TLR4 é composto por um domínio extracelular que contém múltiplas leucinas, uma região transmembrana, e uma cauda citoplasmática contendo o domínio conservado TIR. O TLR4 pode também ser ativado por vários ligantes endógenos como as *heat-shock proteins*, matriz extracelular, produtos de degradação e ácidos graxos saturados (Lundeberg & Hansson, 2009). Interações do TLR4 com ligantes endógenos estão relacionadas a várias doenças progressivas que acometem a humanidade como artrite, asma, arteriosclerose e diabetes (Shi *et al*, 2006). Os TLRs estimulam o aumento da expressão de moléculas de adesão das células endoteliais e a liberação de fatores quimiotáticos envolvidos na atração de monócitos nos sítios inflamatórios (Lundeberg & Hansson, 2009).

Evidências recentes demonstraram que animais geneticamente modificados com perda de função de componentes das vias de sinalização dos TLRs, como o TLR4 e o MyD88 apresentam uma profunda diminuição no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em modelo de hipercolesterolemia (Michelsen *et al*, 2004). Contudo, embora a conclusão óbvia indique que derivados de colesterol estimulem estes receptores, pouco se sabe sobre a participação de outros estímulos pró-aterogênicos sobre a ativação e regulação dos TLRs. Neste sentido, é válido ressaltar que novas observações apontam para um possível papel dos TLRs também como moléculas responsivas a forças mecânicas. Em primeiro lugar, sabe-se que alterações hemodinâmicas, como modificações no *shear stress*, modulam a expressão de TLRs em células endoteliais (Liang *et al*, 2002). Por outro lado, um estudo revelou que o TLR-4 é fundamental para o

desenvolvimento do remodelamento expansivo vascular, no qual ocorre uma “hipertrofia excêntrica” da parede arterial, considerada uma resposta que visa à normalização da tensão parietal (Vinka *et al*, 2004). Esta última observação sugere um papel dos TLRs não só na resposta inflamatória, mas na complexa indução de um fenótipo relacionado à compensação de um desequilíbrio nas forças hemodinâmicas intra-vasculares. Contudo, permanece desconhecida a ação do estresse mecânico sobre os TLRs em células vasculares e o papel destes receptores sobre a aterogênese em condições de sobrecarga mecânica/hemodinâmica.

1.6.3. Metaloproteinases

A matriz extracelular, além de ocupar parte do volume de uma placa, também acumula importantes funções no processo evolutivo da lesão aterosclerótica (Libby & Lee, 2000). A síntese e a renovação da matriz extracelular dependem de um rigoroso equilíbrio da situação fisiológica na qual se encontram. Na aterosclerose, o *turnover* da matriz extracelular é realizado principalmente pelas metaloproteinases (Galis *et al*, 1994; Libby & Lee, 2000).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio envolvidas no remodelamento da matriz extracelular. São produzidas por células vasculares e por células inflamatórias. Diferentes estudos já sugeriram a ação dessas enzimas no processo de estabilização do ateroma (Papazafiropoulou & Tentolouris, 2009). A expressão das MMPs é induzida rapidamente por várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo a angiotensina II (Wang *et al*, 2005). A atividade das MMPs é regulada

por dois grandes inibidores endógenos: a α 2-macroglobulina, uma proteína plasmática que atua como inibidor geral de proteinases, e o TIMP, um específico inibidor de MMPs. Esses inibidores regulam a atividade proteolítica na matriz, e um desequilíbrio no balanço entre MMPs e TIMPs vai acarretar numa menor ou maior degradação da matriz extracelular (Bosman & Stamenkovic, 2003; Papazafiropoulou & Tentolouris, 2009).

Entre as MMPs destacam-se as MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) que estão mais associadas às doenças cardiovasculares e possuem um papel fundamental no desenvolvimento da aterosclerose (Galis & Khatri, 2002). Os níveis plasmáticos de MMPs estão crescentemente sendo reconhecidos como um biomarcador aterosclerótico e de risco cardiovascular (Liu *et al*, 2009; Busti *et al*, 2010). Elas possuem diferentes isoformas e atuam diferentemente conforme o tipo de estresse a que foram submetidas. O'Callaghan e Williams (2000) observaram um aumento na atividade enzimática de MMP-2 e uma diminuição de MMP-1 em células musculares lisas humanas (CMLH) submetidas ao estiramento cíclico. Asanuma e colaboradores (2003) demonstraram que o estiramento estático uniaxial aumenta a atividade da MMP-2 e da MMP-9 em CMLH, porém o estiramento cíclico uniaxial provocou uma diminuição dessas atividades enzimáticas. Clemente e colaboradores (2007) constataram que o silenciamento da FAK no miocárdio de camundongos inibe os aumentos da expressão e da atividade de MMP-2 e MMP-9 induzidos por sobrecarga pressórica, indicando que a ativação da FAK contribui para o aumento da expressão e atividade de MMPs no miocárdio hipertrófico. De modo geral, as

MMPs promovem a degradação de várias proteínas da matriz extracelular, por isso estão envolvidas ativamente no processo de remodelamento tecidual. O desequilíbrio na regulação destas MMPs pode resultar em um aumento significativo de suas atividades, o que contribui como já citado, para o desenvolvimento e/ou progressão de diversas doenças cardiovasculares (Gallis & Khatri, 2002).

A viabilidade de efetivar terapias para a prevenção de doenças cardiovasculares e seus desfechos negativos, traduz-se em uma necessidade de identificar indivíduos de baixo, médio e alto risco para a aplicação de intervenções eficazes, antes dos problemas se manifestarem. O entendimento da patogênese da aterosclerose levanta questionamentos e abre oportunidades na prevenção e terapia desta doença. Portanto, a compreensão da biologia básica da inflamação na aterosclerose proporciona um melhor suporte clínico que pode alterar o caminho da prática da medicina preventiva e propiciar benefícios para a saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Investigar o impacto da FAK sobre o desenvolvimento do fenótipo pró-aterogênico em linhagem de célula endotelial submetida a estiramento mecânico pulsátil *in vitro* e em aorta de ratos submetidos à sobrecarga pressórica *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar a ativação da FAK, a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1 e E-Selectina) e Toll-Like Receptors (TLRs) e a adesão leucocitária induzidas por estiramento mecânico pulsátil em linhagem de célula endotelial de aorta de coelho (RAEC);
- Estabelecer o efeito da inibição da FAK sobre o fenótipo pró-aterogênico em linhagem de célula endotelial submetida a estiramento mecânico pulsátil;
- Caracterizar a ativação da FAK, a expressão de moléculas pró-inflamatórias e metaloproteinases e a adesão leucocitária em segmentos de aorta de ratos submetidos à sobrecarga pressórica *in vivo*;
- Estabelecer o efeito da inibição da FAK sobre o fenótipo pró-aterogênico na aorta de ratos submetidos à sobrecarga pressórica *in vivo*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 200g, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp (CEMIB).

3.2. Cultura de Células

As células de linhagem endotelial de aorta de coelhos (RAEC) foram obtidas da *American type culture collection* (ATCC), Filadélfia, PA, USA. As células foram cultivadas em meio F-12 (Sigma) enriquecidas com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Nutricell).

As células monocíticas (THP1) foram obtidas do Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de células, do Prof. Dr. Antônio Condino Neto (Centro de Investigação em Pediatria - CIPED, UNICAMP). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) enriquecidas com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Nutricell).

3.3. Anticorpos, reagentes e sais

- Anticorpos policlonais para FAK (Tyr 397), fosfo-FAK (Tyr 397), VCAM-1 (H-276), E-Selectina (H-300), TLR2 (H-175), TLR4 (M-300), MMP2 (H76), MMP9 (H129) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA), Alexa flúor 488 e faloidina da Invitrogen e DAPI da Vector Laboratories Inc.
- Oligonucleotídeos para transfecção *in vitro* (*Integrated DNA Technologies* - IDT):

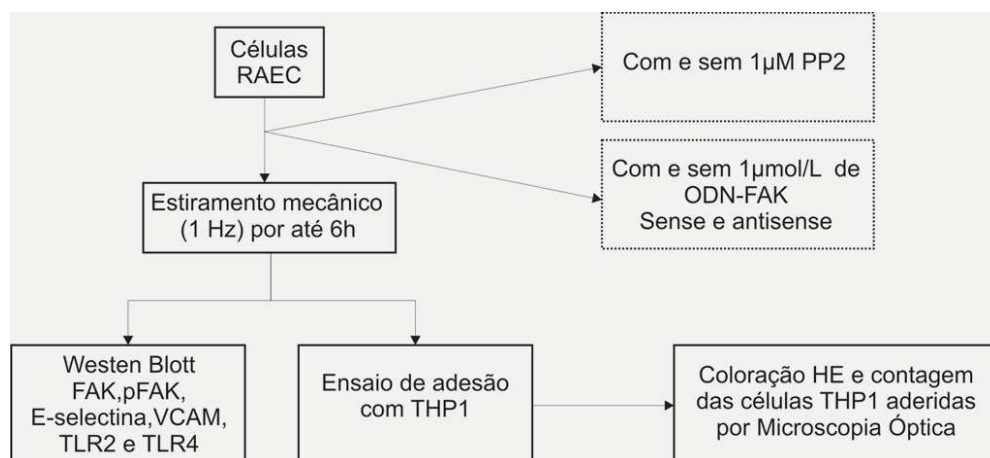
- Antisense – FAK: 5'- ACTTCTCCCTCACGCT-3'
- Sense – FAK: 5'- ATTCGCCTCATCCTCC-3'
- Oligonucleotídeos para a síntese de siRNA (IDT):
 - T7 sequência: 5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'
 - FAK sense sequência: 5' GCG AAA TCC ATA GCA GGC CAC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'
 - FAK antisense sequência: 5' ACG TGG CCT GCT ATG GAT TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'
 - GFP sense sequência: 5'GTG TCT TGT AGT TCC CGT CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'
 - GFP antisense sequência: 5' ATG ACG GGA ACT ACA AAC ACC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'
- Oligonucleotídeos para RT-PCR (IDT):
 - FAK sense sequência: 5' CTG AAG ATA AGC CAA CAT 3'
 - FAK antisense sequência: 5' CTA TGT CTT GGT CTA CTT GAT 3'
 - GAPDH sense sequência: 5' GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA 3'
 - GAPDH antisense sequência: 5' ATG TAG GCC ATG AGG TCC AC3'
- PP2 (Calbiochem), peroxidase (KPL), gelatina (Sigma), tripsina (Sigma), kit quimioluminescência (Pierce), kit de detecção nuclear (Enzo Life Sciences), Opti-Men (Gibco), lipofectamina (Invitrogen), kit Ampliscribe T7 high yield transcription (Epicentre), trizol (Invitrogen), oligo (dT) (Invitrogen),

Superscript II transcriptase reversa (Invitrogen), SYBR Green qPCR Master Mix (Invitrogen).

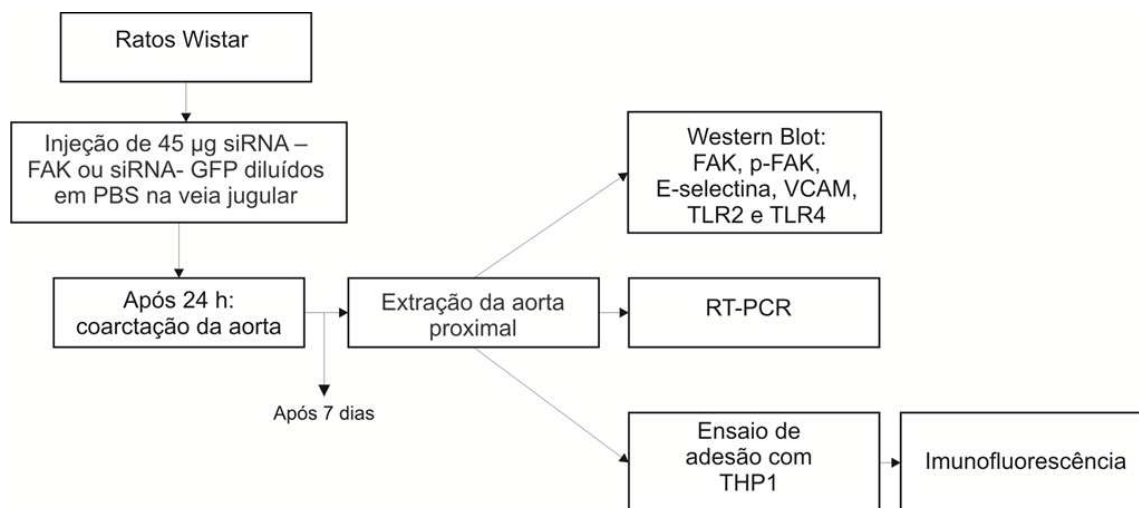
- Tris-HCl (Sigma), EDTA (Sigma), ortovanadato de sódio (Calbiochem), PMSF (Sigma), Triton-X 100 (Sigma), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Merk), β -mercaptoetanol (Sigma), glicerol (Synth), bromofenol (Sigma), metanol (Chemco), ácido acético glacial (Synth), DTT (Biosynth), glicina (Sigma), NaCl (Synth), Tween 20, formaldeído (Synth), CaCl_2 (Merk), NaN_3 (Riedel-de-Haen), Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), Entellan (Merk), álcool isopropílico (Merk), acetato de sódio (Merk), MOPS (Merk), xilenocianol, brometo de etídeo (Sigma), agarose (Invitrogen), clorofórmio (Synth).
- Xilazina (Syntec), cetamina (Syntec)

3.4. Esquemas ilustrativos das metodologias utilizadas

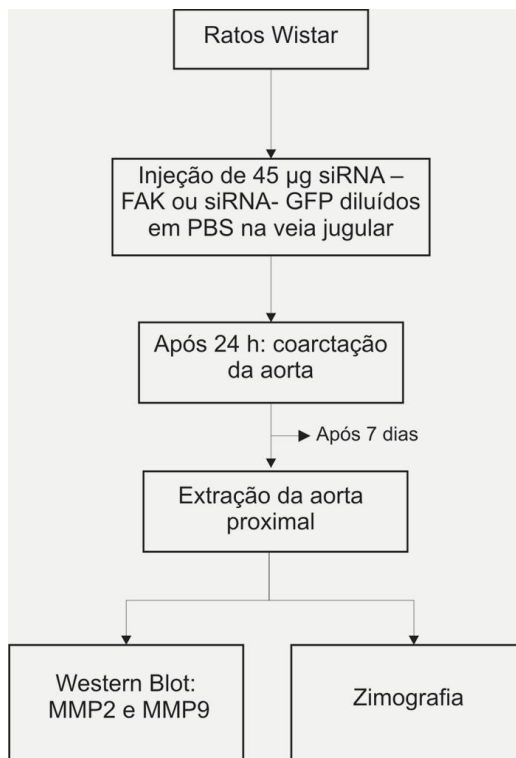
3.4.1. Esquema ilustrativo da metodologia *in vitro*



3.4.2. Esquema ilustrativo da metodologia *in vivo*



3.4.3. Esquema ilustrativo da avaliação da expressão e ativação de metaloproteinases



3.5. Estiramento pulsátil contínuo

Para estudar os efeitos do estiramento pulsátil sobre células vasculares e inflamatórias, foi utilizado um sistema de estiramento pulsátil *in vitro*. Esse sistema, conhecido por *Flexercell Tension Plus* (figura 4), é capaz de promover deformação biaxial controlada de células *in vitro*. O aparelho consiste de uma unidade de vácuo ligada a uma válvula controlada por computador. Quando o vácuo é aplicado às placas (figura 5), os *wells* da placa de cultura são deformados de acordo com o grau de deformação, a qual é traduzida para as células em cultura, resultando no alongamento destas.

As células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em placas de seis *wells* (25 mm de diâmetro) com fundo de silicone elástico (placa BioFlex Flexercell Corp, McKeesport, PA). Após a confluência, o meio de cultura foi substituído por meio F-12 puro. Após 24 horas, as placas foram estiradas (15%) com uma frequência de 1 Hertz (0,5% de contração/ 0,5% de relaxamento) por um período de até 6 horas. As placas de cultura não submetidas ao estiramento mecânico pulsátil foram utilizadas como controle. Para avaliar o papel da FAK as células foram cultivadas na presença ou não de $1 \mu\text{mol/L}$ do inibidor farmacológico da FAK/Src (PP2) que foi adicionado duas horas antes das placas de cultura serem estiradas (Torsoni *et al*, 2003).



Figura 4. Sistema *Flexercell Tension Plus* que controla o estiramento mecânico.

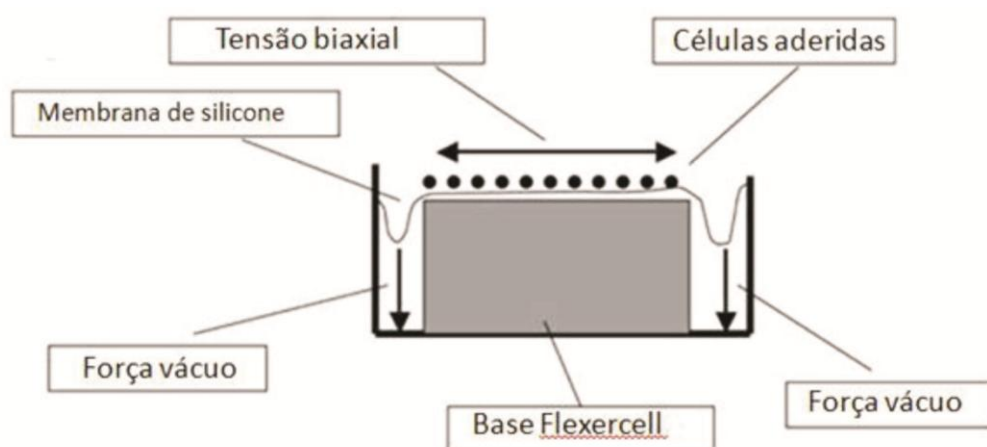


Figura 5. Esquema de aplicação de força de tensão em cultura de células no equipamento *Flexercell Tension Plus*.

3.6. Preparação dos extratos totais

No fim de cada período de estiramento, as células foram homogeneizadas imediatamente em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM EDTA, 10mM ortovanadato de sódio, 2mM PMSF, 10% Triton-X 100) a 4°C e

submetidas a várias aspirações com seringa de insulina. Após 40 minutos de incubação no gelo, os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel e o sobrenadante utilizado para a análise. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry utilizando comprimento de onda de 660 nm.

3.7. Análise das proteínas por immunoblotting

Após quantificação das proteínas, as amostras foram acrescidas de tampão de Laemmli (0,0625M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 5% β -mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. As amostras de proteínas normalizadas contidas no sobrenadante foram submetidas a gel de SDS-poliacrilamida 10% em tampão de corrida (4x: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina) em aparelho de eletroforese miniaturado da Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) utilizando um tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina) em aparelho de transferência miniaturado da Bio-Rad. As membranas foram incubadas por quatro horas, a temperatura ambiente, em solução basal de bloqueio (10mM Trisma base; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) contendo 5% leite em pó desnatado para minimizar as ligações inespecíficas dos anticorpos e depois lavadas três vezes por 7 minutos em solução basal. Em seguida, para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com anticorpos primários (FAK, fosfo-FAK,

VCAM-1, E-Selectina, TLR-2, TLR-4, MMP-2, MMP-9, ERK, GADPH) em tampão de anticorpo (3% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20), overnight a 4°C. Para a imunodeteção, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos conjugados a peroxidase em tampão de anticorpo durante duas horas, a temperatura ambiente. Em seguida, elas foram lavadas três vezes com solução basal e incubas por 5 minutos com o kit de detecção *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*. As bandas foram detectadas por auto-radiografia usando filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA) com intensificadores Kodak Lanex (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA) (figura 6). A intensidade das mesmas foi quantificada por densitometria óptica, utilizando um *scanner* (HP3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, MA, EUA) (Nadruz *et al*, 2005).

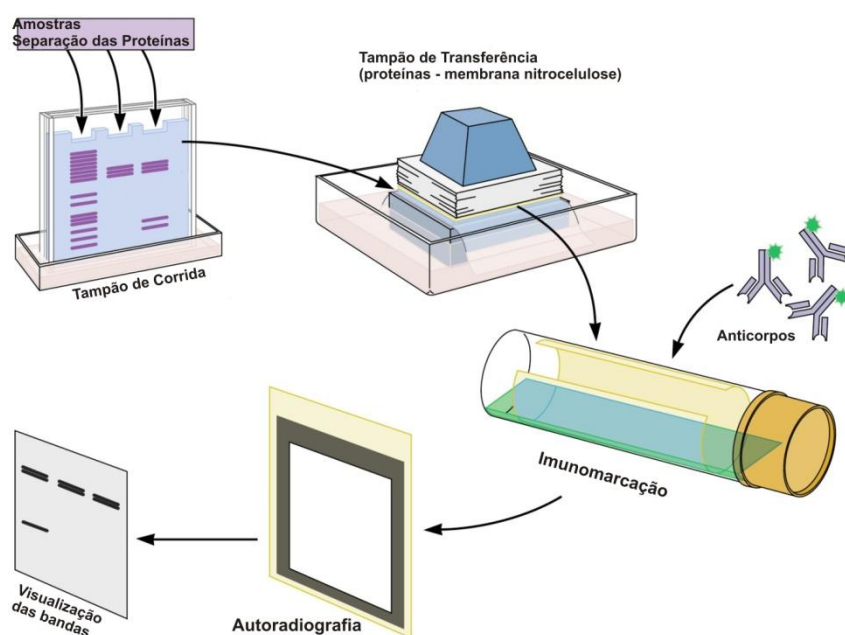


Figura 6. Técnica de Imunoblotting.

3.8. Transfecção do oligodeoxinucleotídeo nas RAEC

Para avaliar a inibição da FAK nas células endoteliais de aorta de coelho, uma sequência antisense e sense (controle) específica (descrita em materiais e métodos) foram sintetizadas pela *Integrated DNA Technologies - IDT* que corresponde ao gene (ENSOCUG00000003282) da FAK em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Esta sequência foi construída com base nos dados obtidos do *Ensemble Genome Browser*.

Essa técnica tem como base a transfecção de pequenas sequências de oligodeoxinucleotídeos (ODNs) complementares ao RNA mensageiro que vai codificar a proteína de estudo: FAK. Esses ODNs quando se ligam ao RNA mensageiro específico, inibem a sua tradução e consequentemente bloqueiam síntese da proteína (figura 7). As células foram plaqueadas sobre a superfície da placa Bioflex (1×10^6 células/mL) com meio de cultura F-12 contendo 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico e após a confluência, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por meio F-12 puro e transfectadas. Em paralelo, os complexos do antisense e sense da FAK foram preparados com 2 μ L/mL de lipofectamina e completados para 50 μ L de meio OptiMen. Em seguida deu-se uma incubação de 45 minutos para a formação dos complexos. Após a incubação, adicionaram-se 100 μ L da solução de transfecção em cada poço da placa, diretamente sobre as células, e a transfecção prosseguiu por 18 horas, em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de transfecção, as placas foram estiradas (15 %) com uma frequência de 1 Hertz (0,5% de contração/ 0,5%

de relaxamento) por um período de 6 horas. As placas de cultura não submetidas ao estiramento mecânico pulsátil foram utilizadas como controle.

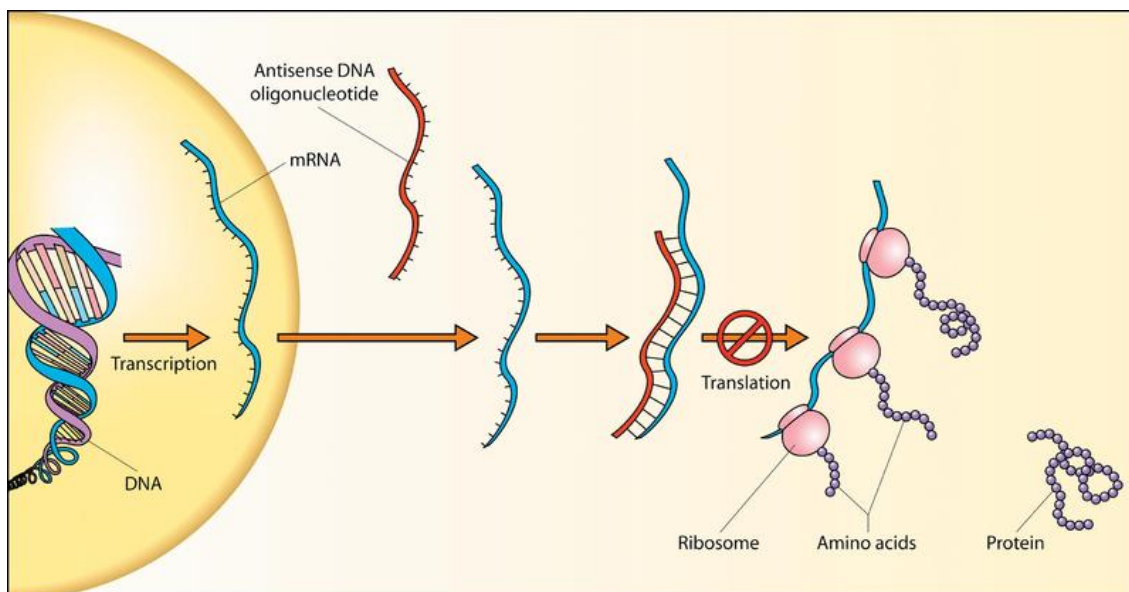


Figura 7. Esquema representativo de transfecção de oligodeoxinucleotídeos.

3.9. Microscopia de Imunofluorescência

3.9.1. Fixação do material

Para avaliar a localização e distribuição da FAK nas células RAEC tratadas ou não com os ODNs foi realizada a microscopia de imunofluorescência. As células RAEC aderidas sobre as lamínulas contidas nas placas de petri foram lavadas cuidadosamente com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.9.2. Reação de Imunofluorescência

Após o período de fixação, as lamínulas foram lavadas três vezes, cuidadosamente com PBS a temperatura ambiente. Para o bloqueio das reações inespecíficas e permeabilização das células, as lamínulas foram incubadas em solução de PBS contendo 3% de BSA e 0,8% de Triton X-100 por 1 hora a temperatura ambiente. Logo após a incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS a temperatura ambiente.

Para a imunomarcação, as células foram incubadas com o anticorpo primário policlonal rabbit anti-FAK (1: 200) em solução PBS contendo 1% de BSA, durante toda a noite a 4°C. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS a temperatura ambiente e incubadas no escuro com os anticorpos secundários alexa verde 488 policlonal anti-rabbit (1:200) em solução PBS contendo 1% de BSA por 2 horas e faloidina (1:40) em solução de PBS contendo 1% de BSA por 40 minutos. Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS três vezes por 5 minutos. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield com DAPI. As lâminas foram observadas no microscópio de imunofluorescência (Leica DMI 4000) (Dalla Costa *et al*, 2010).

3.10. Ensaio de Adesão Leucocitária

Para o estudo de adesão leucocitária, foi utilizada a metodologia descrita por Carluccio e colaboradores (1999). RAEC foram cultivadas até a confluência nas placas do sistema Bioflex, sendo submetidas a estiramento cíclico por 6 horas

ou não, tratadas ou não com os ODNs e o inibidor farmacêutico PP2. Após este período, 1×10^6 células/mL de suspensão de células leucêmicas monocíticas (THP1) foram adicionados às placas por 30 min a 37°C sob agitação constante. Após este período, o sobrenadante foi recuperado e as células aderidas foram fixadas com metanol.

3.11. Coloração das lamínulas pela técnica Hematoxilina-Eosina – HE

Após o ensaio de adesão e retirada do sobrenadante, as placas contendo as células foram incubadas com metanol por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, o metanol foi descartado e as placas foram lavadas cuidadosamente três vezes com água destilada. Adicionou-se a hematoxilina por 45 segundos seguida de duas lavagens rápidas com água destilada e mais uma lavagem de um minuto. Posteriormente, adicionou-se a eosina por trinta segundos seguidos de três lavagens cuidadosas com água destilada. Enfim, as lamínulas foram banhadas rapidamente nos alcoóis 70%, 80%, 90% e 100%. As lâminas foram então montadas com a adição de uma gota de entellan sobre elas sendo que as lamínulas ficassem com a superfície celular voltada para baixo. Esperar as lâminas secarem para a posterior visualização no Microscópio Leica DMI 4000. O número de células aderentes foi determinado pela contagem de 6 campos diferentes com uma objetiva 203 ($0.16 \text{ mm}^2/\text{campo}$). Os campos utilizados para contagem leucocitária foram localizados aleatoriamente na região correspondente à metade do raio da placa a partir do seu centro.

3.12. Silenciamento da FAK na aorta de ratos

3.12.1. Síntese do *small interference* RNA (siRNA)

O siRNA direcionado contra a FAK foi previamente sintetizado pelo grupo do professor Kleber Franchini (Clemente *et al*, 2007) do Departamento de Clínica Médica da FCM-Unicamp e utilizado em nosso experimento. Para a síntese de siRNA da FAK foi utilizado um molde de DNA correspondente a posição 669 no mRNA do gene da FAK de rato (AF020777), cuja sequência é apresentada em materiais e métodos. Como controle foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma sequência irrelevante (GFP), sem homologia com genes de ratos. A síntese *in vitro* do siRNA-FAK e siRNA-GFP foi realizada sob domínio do promotor da RNA polimerase III T7, utilizando o kit Ampliscribe T7 high yield transcription, de acordo com o protocolo do fabricante. A interferência por RNA (iRNA), implica na introdução de uma fita dupla de RNA na célula e tem sido utilizada como uma ferramenta altamente eficiente para a determinação da função gênica. Esta técnica induz a diminuição da expressão gênica pós-transcricional de maneira específica e, em alguns casos, a níveis não-detectáveis (Tuschl & Borkhardt, 2002; Dykxhoorn *et al*, 2003; Pederson, 2004). No iRNA, o alvo é o RNA mensageiro (RNAm) (figura 8). A fita dupla de RNA (siRNA, *small interfering RNA*) introduzida na célula é incorporada em um complexo multiprotéico de silenciamento induzido por RNA (*RISC*). O duplex siRNA é desfeito pela ação de uma helicase, a fita antisense permanece e guia o complexo *RISC* ao mRNA alvo de sequência complementar. O mRNA é então clivado pela ação da nuclease Argonaute 2 e rapidamente degradado. Esta degradação diminui seletivamente a tradução do gene em proteína (Dykxhoorn *et al*, 2003).

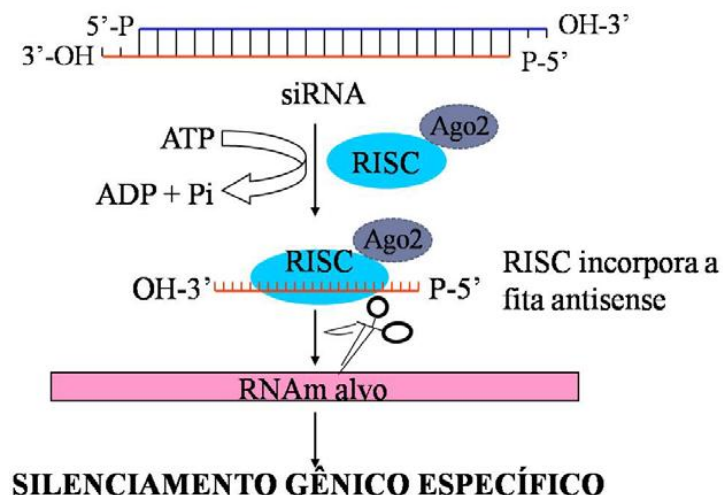


Figura 8- Esquema representativo do mecanismo de interferência por RNA.

3.12.2. Injeção na veia jugular dos ratos

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 160 e 200 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp. O siRNA-FAK e o siRNA-GFP (controle) diluídos em PBS foram injetados através da veia jugular. Para tanto, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e de xilazina (5mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, a região do pescoço foi aberta, a jugular direita dissecada e introduziu-se uma cânula de polietileno (PE-10 estirada) de forma que a solução de siRNA (45µg/ 900µL de PBS) foram infundidas lentamente (40µL, intervalo de 5 segundos, mais 40µL e assim por diante). Uma segunda injeção foi realizada com 80µL de PBS para lavagem da cânula. Ao final da injeção, a cânula foi retirada, a jugular ocluída e a região da ferida cirúrgica fechada. Após a recuperação anestésica, os animais foram devolvidos às suas gaiolas.

3.12.3. Coarctação da aorta

Após 24 horas da injeção do siRNA-FAK e siRNA-GFP, os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de cetamina (100mg/kg) e de xilazina (5mg/kg). Em seguida, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo, a croça da aorta foi dissecada e os ratos foram coarctados com um clamp de prata permanente, selecionado de acordo com o peso do animal utilizando um calibrador, provocando, portanto, uma constrição de 40 %. A cavidade torácica foi fechada e após a recuperação anestésica os ratos 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.

3.12.4. Medida da pressão arterial

Antes de serem sacrificados, os ratos foram anestesiados e submetidos à monitorização da pressão arterial e do gradiente trans-constrição da aorta através da inserção de cateteres de polietileno (PE-50 estirado) nas artérias carótida 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 (figura 9). Os registros hemodinâmicos foram realizados até 2 horas e após sete dias de coarctação da aorta, sendo os animais, em seguida, submetidos à extração da aorta distal e proximal para posterior análise de proteínas e *western*

blotting. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de biureto (540 nm) (Clemente *et al*, 2007).

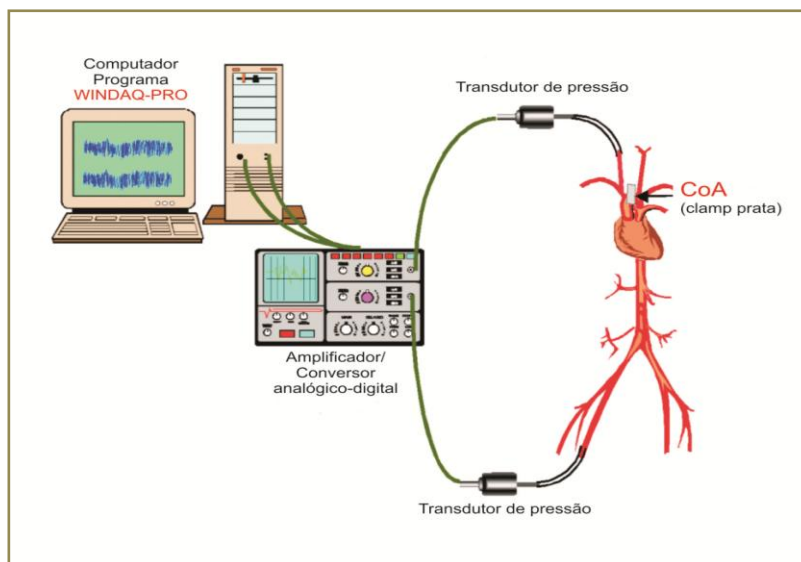


Figura 9: Ilustração do local onde foi realizada a coarctação da aorta e os aparelhos utilizados para a obtenção da pressão arterial dos animais.

3.13. Zimografia

Para avaliar a atividade enzimática de metaloproteínases (MMP-2 e MMP-9) nos experimentos *in vivo*, foram utilizados homogenatos de aorta, conforme descrito por Dalla Costa *et al* (2010). A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de biureto (540 nm). A amostra foi colocada em tampão de amostra (2% de SDS, 60mM de Tris pH 6.8, 30% de glicerol e 0,01% de bromofenol). As amostras (20µg) foram aplicadas em gel 10% de poliacrilamida e 0,1% de gelatina. Após a corrida de eletroforese (20mA), o gel foi lavado com tampão de 10mM de Tris (pH 8.0) incluindo 2,5% de Triton X-100 para a remoção de SDS e a renaturação das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos em solução reveladora do gel (50mM de Tris pH 8.8, 5mM de

CaCl₂, 0,02% de NaN₃) e Triton X-100 e depois a 37°C por 20 horas. Após todo o período de incubação, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250 por 8 horas e descorado numa solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial por 30 minutos. As metaloproteínases ativas foram identificadas com bandas claras de lise (negativas) em fundo azul.

3.14. *Análise de RT-PCR*

3.14.1. Extração do RNA

As aortas dos ratos extraídas e congeladas foram pulverizadas em nitrogênio líquido. O tecido pulverizado foi colocado em eppendorf contendo 1mL de trizol para a extração do RNA celular total. As amostras foram levadas ao vortex e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram centrifugadas por 10 minutos (12.000g/ 4°C). O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro eppendorf, na qual foi adicionado 200µL de clorofórmio. As amostras foram levadas ao vórtex por 15 segundos, incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos (12.000g/ 4°C). A fase aquosa formada foi recuperada e transferida para um novo eppendorf. A precipitação do RNA deu-se com a adição de 500µL de álcool isopropílico, incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação por 10 minutos (12.000g/ 4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 75%. O pellet foi centrifugado por 5 minutos (7500g/ 4°C) e o etanol foi retirado com o auxílio de uma pipeta. A amostra foi secada a temperatura ambiente. Após o material estar seco, estes foram eluídos em água DEPC e aquecidos por 10 minutos a 55°C. O RNA foi dosado em espectrofotômetro a 260 nm.

3.14.2. Avaliação da integridade do RNA

Após a quantificação, 0,5µg de RNA total foi submetido à eletroforese em gel desnaturante (1,2% agarose, MOPS, 2,2M formaldeído em água DEPC). Cada amostra teve seu volume elevado até 5µL 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 55°C por 15 minutos e aplicadas no gel. Após a corrida (5 V/cm), o gel foi exposto à luz UV e fotografado.

A Figura 10 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).

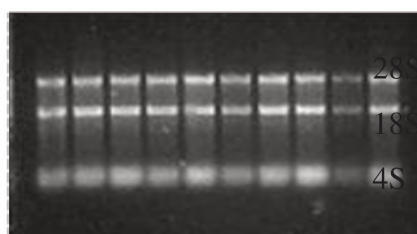


Figura 10- Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total.

3.14.3- Síntese de *cDNA*

Para a síntese de *cDNA* foram adicionados:

- 1µL de oligo dT
- 2µg de RNA
- água DEPC para 12µL

As amostras foram aquecidas por 10 minutos a 70°C e colocadas rapidamente no gelo. Em seguida, foram adicionados:

- 4µL 5x first strand buffer
- 2µL DTT 0,1M
- 1µL dNTP mix 10Mm
- 1µL Superscript II

As amostras de RNA totais foram transcritos inversamente a 42°C durante 1 h.

3.14.4- *PCR em tempo real*

A expressão gênica da FAK foi analisada em *cDNA* de aorta de ratos por PCR em tempo real com o sistema Syber Green. Para cada conjunto de primers específicos utilizado, foi feita uma curva de eficiência do primer variando-se a concentração do mesmo.

Para as reações de PCR foram adicionados:

- 3µL de *cDNA* (30ng)
- 3µL de primers (F+R) 400nM
- 6µL de SYBR Green qPCR Master Mix

As reações foram feitas no Mx3000TM Comparative Quantitative PCR System (Stratagene). Os parâmetros para a reação de PCR utilizados foram: 95°C por 10 minutos e depois 30 ciclos de 95°C (30 segundos), 55°C (45 segundos) e 72°C (30 segundos), seguido por uma curva de desnaturação. Todas as reações foram realizadas em triplicata e com normalização pelo fluoróforo de referência ROX. O valor médio de *threshold* foi usado para análise. Os valores de *threshold* foram normalizados pelo nível de expressão de GAPDH.

Os oligonucleotídeos da FAK e do GAPDH utilizados para o RT-PCR estão descritos em materiais e métodos.

3.15. Metodologia do ensaio de adesão *ex vivo*

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 180 e 210 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e de xilazina (5mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, a região do pescoço foi aberta e a aorta extraída. Fragmentos da aorta (0,5cm) foram removidos e seccionados no sentido longitudinal. A aorta foi lavada três vezes com PBS 1X contendo 1% de penicilina pra evitar contaminação. Em seguida, os fragmentos da aorta com a camada adventícia para baixo foram colocados em uma placa de petri tratada com 0,1% de gelatina para a sua adesão. Aproximadamente 1mL de meio DMEM contendo 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina foi acrescentado em cima dos fragmentos da aorta. Logo após a adesão do tecido, foram adicionadas 1×10^6 células/mL de suspensão de células THP1 tratadas previamente com fluoróforo e após 30

minutos, as células foram lavadas cuidadosamente três vezes com PBS e visualizadas no microscópio de imunofluorescência Leica FLU 4000 V 1.2.1.

As células THP1 foram previamente tratadas com um kit próprio para marcação de núcleo e nucléolos, o *Nuclear Detection Kit- Enzo Life Sciences*, (conforme instruções do fabricante). As THP1 foram centrifugadas por 5 minutos, 400g e a temperatura ambiente para obter o pellet. Cuidadosamente, o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta e em seguida, foi adicionado um volume do kit de detecção suficiente para cobrir o pellet celular. O pellet foi protegido da luz e incubado por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas com 100µL de tampão 1X. O excesso de tampão foi removido e as células foram ressuspensas em 100µL de tampão 1X. As células THP1 foram, portanto, adicionadas sobre as aortas de rato e visualizadas no microscópio de imunofluorescência Leica FLU 4000 V 1.2.1.

3.16. Análise Estatística

Os dados estão representados como a média $\pm$ erro padrão dos valores. As diferenças entre as médias dos valores foram testadas pela análise de variância de 1 via e pelo teste de Bonferroni. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. Capítulo 1

FOCAL ADHESION KINASE MEDIATES STRETCH-INDUCED PRO- ATHEROGENIC RESPONSE IN VASCULAR CELLS

Maruska R. N. Fernandes, Carolina M. F. Z. Clemente, Thais H. Theizen, Ana P D. Costa, Roberto Schreiber, Lício A. Velloso, Kleber G. Franchini and Wilson Nadruz Jr.

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

Address for correspondence:

Wilson Nadruz Junior, MD, Ph.D. Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
Cidade Universitária “Zefferino Vaz” 13081-970 Campinas, SP. Brasil.
Phone: (55) (19) 35217836 FAX: (55) (19) 35217836
E-Mail: wilnj@fcm.unicamp.br

Word Count: 5031

Abstract Word Count: 189

Number of Figures: 6

Number of Tables: 0

Running head: Stretch, FAK and atherosclerosis

ABSTRACT

Objective: The mechanisms by which mechanical stretch stimulates atherosclerosis remain poorly understood. In this study, we investigated whether Focal Adhesion Kinase (FAK) plays a role in the pro-atherogenic response to mechanical stretch in vascular cells *in vitro* and *in vivo*.

Methods and Results: Cyclic stretch (biaxial, 1 Hz) induced FAK phosphorylation at Tyr397, stimulated the expression of E-selectin, vascular adhesion molecule-1 and toll-like receptors in rabbit aortic endothelial cells (RAECs) and enhanced monocyte adhesion to endothelial cells. These events were inhibited by disrupting FAK signaling with FAK antisense transfection or treatment with FAK/Src inhibitor PP2. Studies in rats subjected to aortic constriction demonstrated that pressure overload increased the expression of adhesion molecules, toll-like receptors and metalloproteinases in aortic extracts. Likewise, increased monocyte adhesion to the endothelial layer was observed in overloaded aortic segments. Finally, aortic FAK silencing obtained by specific small interfering RNA markedly attenuated the rise in adhesion molecules, toll-like receptors and metalloproteinases and the increase in monocyte adhesion to endothelial layer induced by pressure overload.

Conclusions: The present data indicate that FAK plays an important role in mediating the pro-atherogenic response of vascular cells to mechanical stretch.

Keywords: Focal Adhesion Kinase, atherosclerosis, stretch, adhesion molecules, metalloproteinase.

INTRODUCTION

Mechanical or hemodynamic forces associated with blood flow play a pivotal role in the initiation and progression of atherosclerosis (1, 2). One such force is cyclic circumferential stretch caused by a transmural force acting perpendicularly to the vessel wall, which is assigned to play a major role in hypertension-induced atherosclerosis (2, 3). However, the processes by which mechanical stretch is transduced to biochemical signals and subsequently translated into changes in vascular cells phenotype remain elusive.

In the early phases of atherosclerotic plaque development, activated endothelial cells express elevated amounts of adhesion molecules such as selectins and intracellular and vascular (VCAM-1) adhesion molecules at their surface (4). Conversely, toll-like receptors (TLRs) and metalloproteinases (MMPs) are also expressed in excess by activated vascular cells (5, 6, 7). These conditions favor the recruitment and the accumulation of monocytes and lymphocytes in the intima of vessels and the progression of atherosclerotic plaque.

New understanding of signaling molecules associated with the various constitutive elements of cytoskeletal proteins are beginning to elucidate the mechanisms of mechano-sensing and mechano-transduction in vascular cells. Among the candidate molecules, much attention has been given to Focal Adhesion Kinase (FAK), a tyrosine kinase which is rapidly activated in vascular cells by mechanical stretch (8, 9) and is essential to angiogenesis and endothelial barrier function (10). However, a clear demonstration that FAK plays a role in the control of pro-atherogenic response to mechanical stimuli in vascular cells is still lacking.

In the present study, we investigated whether disruption of FAK signaling influences the expression of adhesion molecules, TLRs and MMPs as well as the adhesion of monocytes to endothelial cells in vascular cells subjected to mechanical stretch *in vitro* and *in vivo*.

Methods:

A full description of the methods can be found in the supplemental materials

In Vitro Cyclic Stretch on Cultured Rabbit Aortic Endothelial cells (RAECs)

RAECs (11) were plated in type I collagen Bioflex plates (Flexcell International Corp) using F12 enriched medium with 10% of fetal bovine serum and 0.5% penicillin/streptomycin. Cells were stretched in a Flexercell FX-3000 strain unit to 115% of resting length at a frequency of 1 Hz for variables periods.

FAK-Antisense oligodeoxynucleotide (ODN) transfection

This procedure was performed as previously described with minor modifications (12, 13). FAK-antisense ODN was a 16-mer (5'-ACTTCTCCCTCACGCT-3') directed against rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) FAK mRNA (gene ID: ENSOCUG00000003282). FAK sense ODN (5'-AGCGTGAGGGAGAAGT-3') was used as control. All bases were obtained from Life Technologies and were phosphorothioate-protected. ODNs (1 $\mu\text{mol/L}$) were transfected into RAECs by using Lipofectamine. Twenty-four hours later, cells underwent cyclic stretch.

FAK/Src pharmacological inhibition

Thirty minutes before stretching, cells were treated with the FAK/Src inhibitor PP2 (1 $\mu\text{mol/L}$) (13), which was purchased from Calbiochem.

In vitro Leukocyte Adhesion test

A suspension (1 mL - 1×10^6 cells/mL) of THP1 monocytoides cells (American Type Culture Collection) was added to cultured RAECs for 30 min at 37°C swirling constant and nonadherent cells were removed by aspiration. The plates were stained with Haematoxylin-Eosin and THP1 cells were counted by using a Leica DM4000 microscope. The results were normalized to percentage of control values and data were expressed as mean $\pm$ SEM.

Western Blot

Western blot analysis was performed as previously described (12). Primary antibodies against FAK, phospho-FAK Tyr397, VCAM-1, E-Selectin, TLR-2, TLR-4, ERK1/2, MMP-2, MMP-9 and GADPH (Santa Cruz Biotechnology) were used.

Immunofluorescence Analysis

This procedure was performed as previously described (14). RAECs were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with anti-FAK antibody (Santa Cruz Biotechnology). FITC (Cy2)-conjugated secondary antibodies and phalloidin-rhodamine were used to visualize the specific proteins and DAPI stained cells nuclei. Cells were then viewed using an immunofluorescence microscope (Leica FW 4000 V1.2.1).

Transverse aortic constriction model

Male Wistar rats (160 to 200 g) were handled in compliance with the principles of laboratory animal care formulated by the Animal Care and Use Committee of the State University of Campinas. Procedures such as vascular catheterization and aortic banding were performed under anesthesia with a mixture of ketamine

(100mg/kg) and xylazine (5mg/kg). Pressure overload was obtained by aortic constriction promoted by the placement of a silver clip placed around the transverse thoracic aorta (15). Sham operated animals underwent an identical procedure except for placement of the clip. Blood pressure was simultaneously recorded in the carotid and femoral arteries to determine the transconstriction systolic gradient after selected periods.

RNA interference design and synthesis

The small interference RNA targeted to rat FAK (siFAK) gene (NM_013081.1) and the control sequence siGFP were synthesized as previously described (16). DNA oligonucleotides (Integrated DNA Technologies) were as follows: (1) T7: 5'-GGTAATACGACTCACTATAG-3'. (2): FAK sense (AB030035): 5'-GCGAAATCCATAGCAGGCCACTATAGTGAGTCGTATTACC-3'. (3) FAK antisense 5'-ACGTGGCCTGCTATGGATTTCTATAGTGAGTCGTATTACC-3'. (4) GFP sense: 5'-GTGTCTTGTAGTTCCCGTCTATAGTGAGTCGTATTACC-3'. (5) GFP antisense: 5'-ATGACGGGAAC TACAAACACCTATAGTGAGTCGTATTACC-3'.

In vivo FAK knockdown

A catheter was positioned in the right jugular vein and siFAK (45 µg) or siGFP (45 µg) was injected in bolus (16). After 24 hours of siFAK or siGFP injection, rats underwent aortic constriction. Seven days after the surgery, aortic segments were extracted for analyses.

RT-PCR analysis

Transcript levels of *FAK* and *GADPH* in rat aortic extracts were quantified by real-time reverse transcription–PCR as described (14). All primer sequences are provided in Online supplemental data.

Ex- vivo leukocyte adhesion test

Fragments of rat ascending aorta were placed with adventitious layer down in a Petri dish treated with 0.1% of gelatine. A suspension (1×10^6 cells/mL) of THP1 cells treated with Nucleolar/Nuclear Detection Kit (Enzo Life Sciences) was added on the aortic tissue for 30 min and nonadherent cells were removed by aspiration. THP1 cells were counted by using a immunofluorescence microscope (Leica FW 4000 V1.2.1).

Zymography

Gelatin zymography for assaying MMP-2 and MMP-9 activity was carried out as described previously (14). Briefly, aliquots (10 mg of total protein per sample) of aorta homogenates were electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel containing 2 mg/mL gelatin. Gels were stained in 0.5% Coomassie blue R-250 and destained for 1 h in 40%methanol:10% acetic acid. The zymograms were digitalized and MMP proteolytic activity was determined by densitometry.

Statistical Analysis

All data are expressed as means + SEM (standard error of the mean). Statistical comparisons were performed with one-way ANOVA, followed by Bonferroni's test. A statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

Cyclic stretch activates FAK in RAECs

As an initial approach, we examined the effects of cyclic stretch on FAK phosphorylation at Tyr397 in RAECs. Similar increases (approximately two-fold) in FAK phosphorylation were seen in cells stretched by 5–20% of the initial length (Figure 1A). Increased FAK phosphorylation at Tyr397 was detected from 10 to 120 min (Figure 1B). Conversely, FAK protein expression did not significantly change in stretched RAECs (Figures 1A and B).

FAK is critical to stretch-induced expression of endothelial pro-atherogenic proteins and monocyte adhesion to RAECs

In order to evaluate the role of FAK in stretch-induced endothelial cell activation, RAECs were transfected with FAK-antisense ODN or pretreated with the FAK/Src inhibitor PP2. The effectiveness of FAK-antisense ODN to reduce FAK protein expression was demonstrated by immunoblotting and immunofluorescence analysis (Figures 2A and 2B). Antisense ODN transfection reduced FAK protein expression by ~75% (Figure 2A), an effect confirmed by immunohistochemical analysis (Figure 2B). The specificity of this procedure was indicated by the fact that GAPDH and ERK1/2 expression remained unaltered in cells transfected with FAK antisense ODN and by the observation that sense ODN transfection produced no changes on FAK, GAPDH or ERK1/2 expression and on stretch-induced FAK activation in RAECs (Figure 2A). Moreover, the lack of change in the morphology of antisense ODN-transfected RAECs supports the notion that this procedure induced no deleterious effect in these cells (Figure 2B). Conversely, PP2 treatment

inhibited stretch-induced FAK phosphorylation, without changing FAK protein expression (Figure 2A).

The next step was to assess the impact of FAK inhibition on the expression of pro-inflammatory molecules in endothelial cells subjected to mechanical stress (Figures 3A and 3B). Cyclic stretch significantly increased VCAM-1, E-selectin, TLR-2 and TLR-4 protein levels in RAECs. However, such increases were abrogated by pretreatment with PP2 and transfection with FAK-antisense ODN, but not with FAK-sense ODN.

Given that FAK inhibited the stretch-induced expression of adhesion molecules, we then investigated whether this protein could modulate leukocyte adhesion to endothelial cells *in vitro* (Figure 3C). For this purpose, monocytoid THP1 cells were incubated over stretched and non-stretched RAECs for 30 min and adherent monocytes were counted afterwards. Cyclic stretch induced a 2.5-fold increase in the number of adherent THP1 cells to RAECs. Similar results were obtained when stretched RAECs were pretreated with FAK-sense ODN. On the other hand, treatment with PP2 or transfection with FAK-antisense ODN significantly attenuated stretch-induced monocyte adhesion to endothelial cells (Figure 3C).

Pressure overload activates FAK and induces the expression of pro-atherogenic proteins in rat aorta

Figure 4A summarizes the effect of aortic constriction on systolic blood pressure measured in the ascending and abdominal aorta of anesthetized rats. Systolic blood pressure measured in the ascending aorta increased by ≈ 45 mmHg

in the period ranging from 10 min to 7 days after aortic constriction. Systolic pressures measured in the abdominal aorta were similar in aorta-constricted and in sham-operated rats.

In order to evaluate the impact of acute pressure overload on FAK activation, we analyzed FAK phosphorylation at Tyr397 and FAK protein expression in ascending aortic segments from rats that underwent transverse aortic constriction from 10 to 120 min. Increased FAK phosphorylation at Tyr397 was detected in all periods of pressure overload, while no changes in FAK protein expression were observed (Figure 4B).

The next step was to evaluate whether chronic pressure overload altered the expression of adhesion molecules and TLRs in rat aorta. For this purpose, rats underwent aortic constriction for 7 days. Pressure overload induced increases in the expression of VCAM-1, E-selectin, TLR-2 and TLR-4 in ascending aortic segments, whereas no differences in proteins expression in distal aorta were detected between aorta-constricted and sham-operated rats (Figure 4C).

Silencing of aortic FAK inhibits pro-atherogenic response induced by pressure overload in rats

To assess the functional importance of FAK to vascular activation induced by pressure overload, aortic cells were depleted of FAK with specific small interference RNA. For this purpose, siFAK or siGFP were injected on the day before sham operation or aortic banding and ascending aortic samples were extracted seven days after the surgical procedure. Transfection of siFAK reduced FAK protein (Figure 5A) and mRNA (Figure 5B) expressions in ascending aortic

segments by ~60%, in comparison to aortic samples not transfected with small interference RNA or siGFP (Figures 5A and B). The specificity of the small interference RNA targeted to FAK was further confirmed by the lack of change in GAPDH and ERK1/2 protein expression (Figure 5A). In addition, siFAK transfection did not alter blood pressure levels in comparison to siGFP transfected rats (Figure 5C).

Western blot analysis showed that 7 days of pressure overload significantly enhanced the expression of VCAM-1, E-selectin, TLR2 and TLR4 in aortic extracts from siGFP-transfected rats (Figure 6A). Conversely, these increases induced by hemodynamic overload were markedly attenuated in rats transfected with siFAK. Likewise, results of ex-vivo adhesion assays demonstrated a striking decrease in load-induced adhesion of THP1 monocytes to the endothelial layer of aortic FAK-depleted cells in comparison to monocyte adhesion to siGFP-transfected aortas (Figure 6B).

In another set of experiments, we evaluated whether FAK silencing could modulate aortic MMPs activation induced by pressure overload. Aortic extracts from siGFP-transfected rats subjected to seven days of pressure overload exhibited significant increases in MMP-2 and MMP-9 activity (Figure 6C) and protein expression (Figure 6D) in comparison to aortic homogenates from sham siGFP-transfected animals. On the other hand, treatment of rats with siFAK markedly attenuated load-induced enhancement of MMP-2 and MMP-9 activity and expression (Figures 6C and 6D).

Discussion

The increase in mechanical stretch is considered a major stimulus by which hypertension stimulates atherogenesis (2). However, the mechanisms whereby elevated blood pressure, and thus stretch, translate into a change in vascular cells phenotype remain elusive. In the present report, we showed that FAK knockdown in endothelial cells *in vitro* and in aortic tissue *in vivo* markedly inhibited the rise in adhesion molecules and toll-like receptors expression and attenuated the adhesion of monocytes to endothelial cells induced by stretch. Additionally, we demonstrated that FAK silencing abrogated the expression of metalloproteinases in aorta segments subjected to pressure overload. Given that upregulation of pro-inflammatory molecules and metalloproteinases and enhanced monocyte adhesion to endothelial cells are features of a pro-atherogenic phenotype (4, 5, 6), these findings imply that FAK is necessary to the development of early stages of stretch-induced atherosclerosis. This is in line with data showing that FAK is crucially involved in the hypertrophic response of cardiac myocytes to stretch (16, 17), further suggesting that this tyrosine kinase might play a central role in regulating cardiovascular organ damage related to mechanical overload.

A major finding of this study was that reductions of vascular FAK expression attenuated the expression of pro-inflammatory molecules and the adhesion of monocytes to endothelial cells induced by mechanical overload. To test the role of FAK *in vitro*, RAECs were transfected with FAK-antisense ODN or treated with the FAK/Src inhibitor PP2. Noticeably, both strategies inhibited stretch-induced up-regulation of adhesion molecules, TLRs and THP1 adhesion to endothelial cells, thus indicating that FAK signaling plays a major role in this regard. Nevertheless, the phenotype of vascular cells is deeply altered *in vitro*, such that the responses to

mechanical stimuli differ significantly from *in vivo* conditions, where cells are exposed to a complex, tensile and 3D matricial environment (18). Therefore, in order to evaluate the effects of FAK inhibition *in vivo*, rats were transfected with small interference RNA directed against FAK. This procedure markedly attenuated FAK expression in rat aorta and inhibited the vascular expression of adhesion molecules and TLRs as well as THP-1 adhesion to endothelial cells induced by pressure overload. However, hemodynamic influences arising in consequence of FAK silencing in the vessels of the peripheral circulation might arguably contribute to the attenuation of pro-atherogenic response in banded rats treated with siFAK. Although we did not evaluate the effects of FAK gene silencing in vascular resistance in banded rats treated with siFAK, the demonstration here that rats treated with siFAK or siGFP had comparable transconstriction systolic gradients and increases in blood pressure in ascending aorta indicates that it is unlikely that reductions in the vascular resistance and alterations in systemic hemodynamics contributed substantially to the attenuation of the pro-atherogenic response in rats treated with siFAK. In this sense, the present findings support the conclusion that FAK inhibition attenuated the development of pro-atherogenic phenotype by affecting the responses of vascular cells to mechanical overload.

MMPs are a family of structurally related, zinc-containing enzymes that degrade the extracellular matrix and play an important role in vascular remodeling (7). Enhanced MMP-2 and MMP-9 expression has been detected in the atherosclerotic plaque and activation of MMPs facilitates atherosclerosis and plaque destabilization (19, 20). Previous studies have demonstrated that cyclic stretch stimulates the expression of MMPs in vascular cells (21). Similarly, we

demonstrated here that pressure overload stimulated the expression and activity of MMP-2 and MMP-9 in rat aorta. On the other hand, we provided novel evidence showing that FAK silencing is critical to stretch-induced up-regulation of MMPs in vascular cells *in vivo*. To our knowledge this is the first evidence linking FAK to activation of MMPs induced by mechanical overload in vascular cells. Interestingly, these results accord with recent data showing that FAK signaling plays a major role in MMPs expression and activation in endothelial cells treated with angiotensin II and extracellular matrix proteins (22, 23), thus supporting the notion that FAK might be an important upstream regulator of MMPs in vascular cells subjected to pro-atherogenic stimuli.

Cyclic stretch was shown to induce rapid phosphorylation of FAK Tyr397 that was sustained over a period of a few hours in endothelial cells, as previously reported for cardiac myocytes and cardiac fibroblasts (13, 14). Likewise, pressure overload induced an early phosphorylation of FAK Tyr397 in rat aorta. A current model implies clustering and binding of integrins to ECM proteins and a complex spatial relocation to focal adhesion sites in FAK activation induced by mechanical stress (24). In this context, integrin clustering results in FAK autophosphorylation at Tyr-397, promotes Src family protein-tyrosine kinase binding to the phosphorylated FAK Tyr-397 site, thus facilitating the formation of the FAK-Src signaling complex that results in the activation of various signaling pathways (25). Although the intermediate signaling pathways linking FAK to the expression of pro-atherogenic proteins were not explored in the present study, some downstream FAK effectors could explain, in part, its influence on such proteins. For instance, FAK activation has been shown to promote efficient and robust stimulation of MAP kinases

pathways, Protein Kinase C and NF-kappa beta (26, 27). Accordingly, data from other sources have shown that such signaling proteins or transcription factors are activated and play a role in the expression of pro-atherogenic genes induced by mechanical stretch in vascular cells. In this regard, NF-kappa beta activation was required to adhesion molecules expression (18, 28), while MAP kinases and Protein Kinase C were necessary to MMP upregulation (29, 30, 31). However, further studies are necessary to elucidate the signaling pathways whereby FAK regulates the expression of stretch-induced pro-atherogenic molecules in vascular cells.

In the present report, we demonstrated that cyclic stretch stimulated the expression of pro-atherogenic proteins in endothelial cells *in vitro*, thus confirming data from other groups (32, 33, 34). In addition, rat aortic segments subjected to seven days of pressure overload also exhibited increased expression of adhesion molecules and TLRs, which reproduced the results of the *in vitro* studies. Nevertheless, it can be argued that systemic changes in the activity of neurohormonal systems (eg, renin–angiotensin system) induced by aortic banding might have also contributed to increase the expression of these pro-inflammatory proteins in rat aorta. In order to address this issue, we analyzed aortic rings extracted from regions proximal and distal to the constriction, which were exposed to higher and lower blood pressure levels, respectively. Noticeably, increased expression of VCAM-1, E-Selectin and TLRs were solely detected in aortic segments proximal to the constriction. These results agree with data from Wang et al, which demonstrated that upregulation of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin requires high blood pressure but not circulating renin-angiotensin

system in a rat model of aortic constriction (35). Similarly, in a rabbit model of experimental atherosclerosis with aortic stenosis, monocyte adhesion and expression of VCAM-1 were more prevalent in the proximal aorta, where pressure is elevated than the normotensive distal aorta (36). Overall, these data support the conclusion that mechanical stretch *per se* rather than humoral factors is responsible for the development of an aortic pro-atherogenic phenotype in pressure overload models induced by aortic banding.

In conclusion, this study showed that cyclic stretch and pressure overload induced the activation of a pro-atherogenic phenotype in vascular cells through the mediation of FAK. These findings may expand the knowledge regarding the mechanisms whereby elevated blood pressure stimulates vascular remodeling and atherosclerosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from FAPESP and CNPq. Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1) Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med.* 2006; 259:381–392.
- 2) Hahn C, Schwartz MA. The role of cellular adaptation to mechanical forces in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:2101-2107.

- 3) Shyu KG. Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes. *Clin Sci*. 2009; 116:377-389.
- 4) Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352:1685–1695.
- 5) Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010:393946.
- 6) Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007; 5:265-282.
- 7) Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75:346-359.
- 8) Yano Y, Geibel J, Sumpio BE. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. *Am J Physiol*. 1996; 271:C635- C649.
- 9) Tanabe Y, Saito M, Ueno A, Nakamura M, Takeishi K, Nakayama K. Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*. 2000; 215:103-113.
- 10) Vadali K, Cai X, Schaller MD. Focal adhesion kinase: an essential kinase in the regulation of cardiovascular functions. *IUBMB Life*. 2007; 59:709-716.
- 11) Buonassisi V, Venter JC. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976; 73:1612-1616.

- 12) Nadruz W Jr, Kobarg CB, Constancio SS, Corat PD, Franchini KG. Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. *Circ Res*. 2003; 92:243-251.
- 13) Nadruz W Jr, Corat MA, Marin TM, Guimarães Pereira GA, Franchini KG. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. *Cardiovasc Res*. 2005; 68:87-97.
- 14) Dalla Costa AP, Clemente CF, Carvalho HF, Carvalheira JB, Nadruz W Jr, Franchini KG. FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex. *Cardiovasc Res*. 2010; 86:421-431.
- 15) Nadruz W Jr, Kobarg CB, Kobarg J, Franchini KG. c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286:H760- H767.
- 16) Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I, Souza JR, Franchini KG. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res*. 2007; 101:1339-1348.
- 17) Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W Jr, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2003; 93:140-147
- 18) Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengel D, Ninio E, van Haperen R, de Crom R, Tedgui A, Lehoux S. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Res*. 2007;100:1226-1233.

- 19) Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:121-131
- 20) Jefferis BJ, Whincup P, Welsh P, Wannamethee G, Rumley A, Lennon L, Thomson A, Lawlor D, Carson C, Ebrahim S, Lowe G. Prospective study of matrix metalloproteinase-9 and risk of myocardial infarction and stroke in older men and women. *Atherosclerosis*. 2010; 208:557-563.
- 21) Gupta V, Grande-Allen KJ. Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res*. 2006; 72:375-383.
- 22) Jiménez E, Pérez de la Blanca E, Urso L, González I, Salas J, Montiel M. Angiotensin II induces MMP 2 activity via FAK/JNK pathway in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 380:769-774.
- 23) Jin YJ, Park I, Hong IK, Byun HJ, Choi J, Kim YM, Lee H. Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin $\alpha(5)\beta(1)/\alpha(v)\beta(3)$ -dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Signal*. 2011; 23:125-134.
- 24) Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10:21–33.
- 25) Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18:516-523.

- 26) Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999; 71:435–478.
- 27) Petzold T, Orr AW, Hahn C, Jhaveri KA, Parsons JT, Schwartz MA. Focal adhesion kinase modulates activation of NF-kappaB by flow in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297:C814-C822.
- 28) Ali MH, Pearlstein DP, Mathieu CE, Schumacker PT. Mitochondrial requirement for endothelial responses to cyclic strain: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287:L486-L496.
- 29) Wang BW, Chang H, Lin S, Kuan P, Shyu KG. Induction of matrix metalloproteinases-14 and -2 by cyclical mechanical stretch is mediated by tumor necrosis factor- α in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2003; 59:460-469.
- 30) von Offenberg Sweeney N, Cummins PM, Birney YA, Cullen JP, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic strain-mediated regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 expression and activity. *Cardiovasc Res* 2004; 63:625–634.
- 31) Kim JI, Cordova AC, Hirayama Y, Madri JA, Sumpio BE. Differential effects of shear stress and cyclic strain on Sp1 phosphorylation by protein kinase C ζ modulates membrane type 1-matrix metalloproteinase in endothelial cells. *Endothelium.* 2008; 15:33-42.
- 32) Yun JK, Anderson JM, Ziats NP. Cyclic-strain-induced endothelial cell expression of adhesion molecules and their roles in monocyte-endothelial interaction. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44:87-97.

- 33) Wójtowicz A, Babu SS, Li L, Gretz N, Hecker M, Cattaruzza M. Zyxin mediation of stretch-induced gene expression in human endothelial cells. *Circ Res*. 2010; 107:898-902.
- 34) Wagner AH, Kautz O, Fricke K, Zerr-Fouineau M, Demicheva E, Güldenzoph B, Bermejo JL, Korff T, Hecker M. Upregulation of glutathione peroxidase offsets stretch-induced proatherogenic gene expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29:1894-1901.
- 35) Wang H, Nawata J, Kakudo N, Sugimura K, Suzuki J, Sakuma M, Ikeda J, Shirato K. The upregulation of ICAM-1 and P-selectin requires high blood pressure but not circulating renin-angiotensin system in vivo. *J Hypertens*. 2004; 22:1323–1332.
- 36) Tropea BI, Huie P, Cooke JP, Tsao PS, Sibley RK, Zarins CK. Hypertension-enhanced monocyte adhesion in experimental atherosclerosis. *J Vasc Surg*. 1996; 23:596–605.

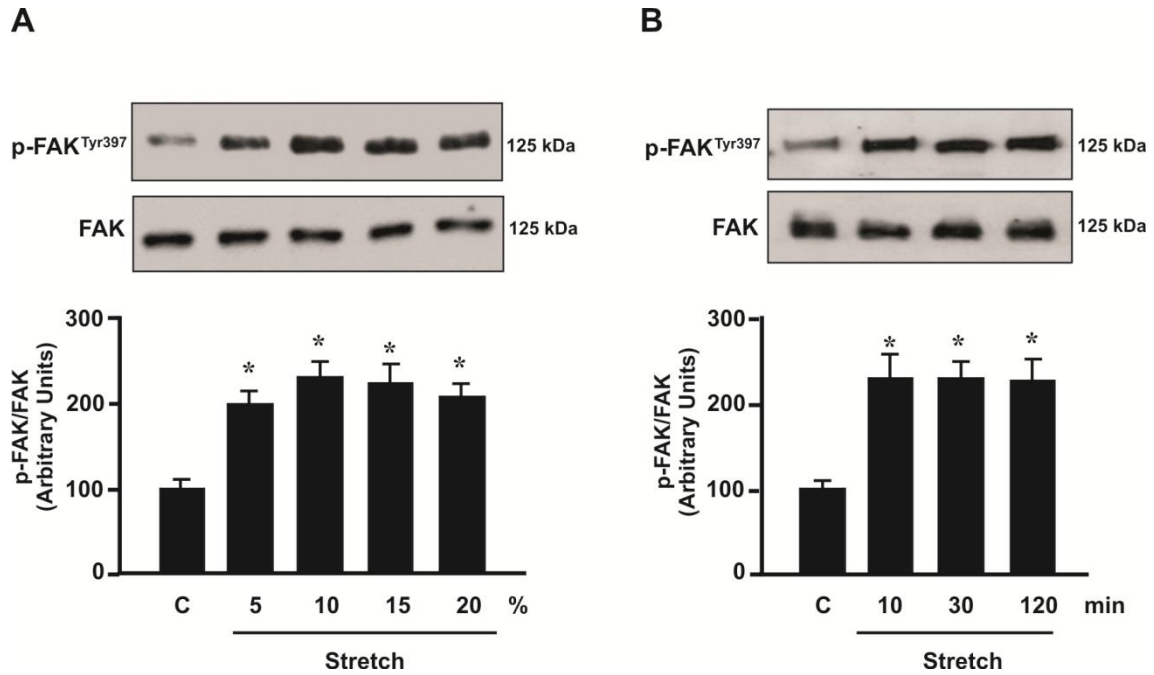


Figure 1. Stretch-induced FAK activation. A, RAECs were stretched (5% to 20%) for 30 min and cell extracts blotted with antibodies against FAK or phospho-Tyr397-FAK (p-FAK^{Tyr397}). Graphic shows densitometric analysis (n=5) of p-FAK/FAK ratio in stretched cells compared to control (C, non-stretched) values. B, RAECs were stretched at 15% for periods ranging from 10 to 120 min (n=5). * $P < 0.05$ compared with non-stretched cells.

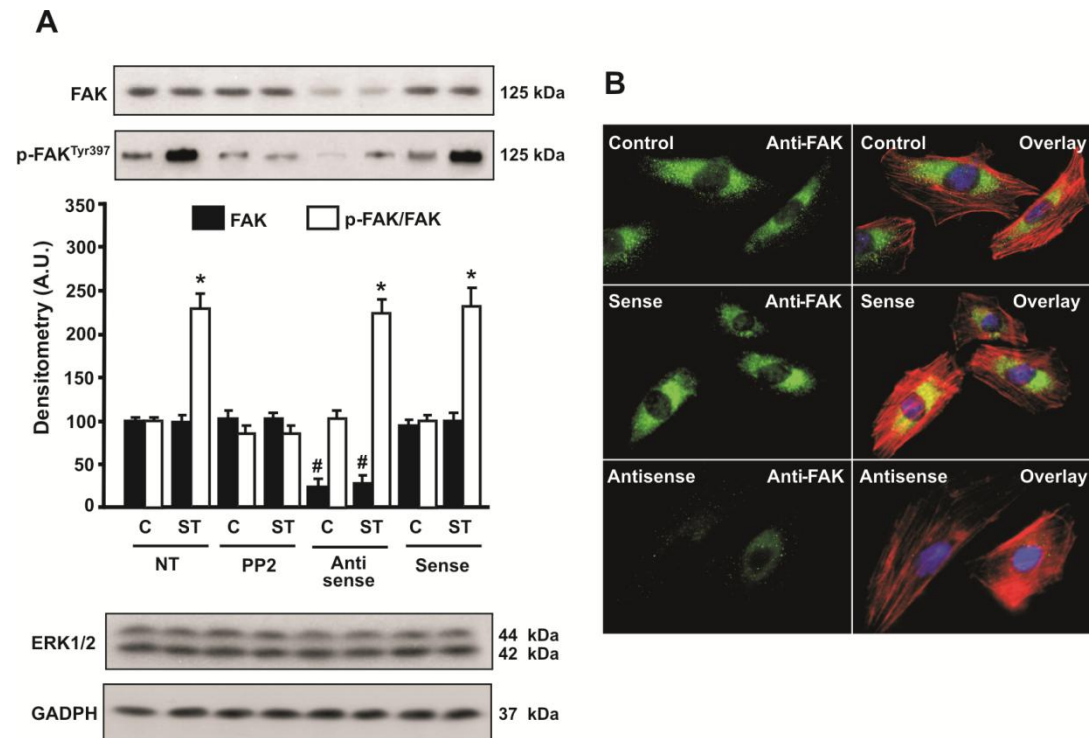


Figure 2. Effect of FAK ODNs and PP2 on RAECs. A, Representative blots (n=5) from extracts of RAECs transfected or not with FAK antisense and sense ODNs or treated with PP2 performed with anti-FAK, -phospho-Tyr397-FAK, -ERK1/2 and -GADPH antibodies and average values of densitometric readings of FAK and p-FAK/FAK ratio. No significant change on ERK1/2 and GADPH expression was detected. C, non-stretched and ST, 30-min-stretched cells. NT, not transfected with ODNs and not treated with PP2. A.U., arbitrary units. * $P < 0.05$ compared to non-stretched cells. # $P < 0.05$ compared to NT, PP2-treated and sense-transfected cells. B, Immunofluorescence analysis of control (non-transfected with ODNs), sense and antisense-transfected RAECs labeled with anti-FAK antibody, phalloidin and DAPI.

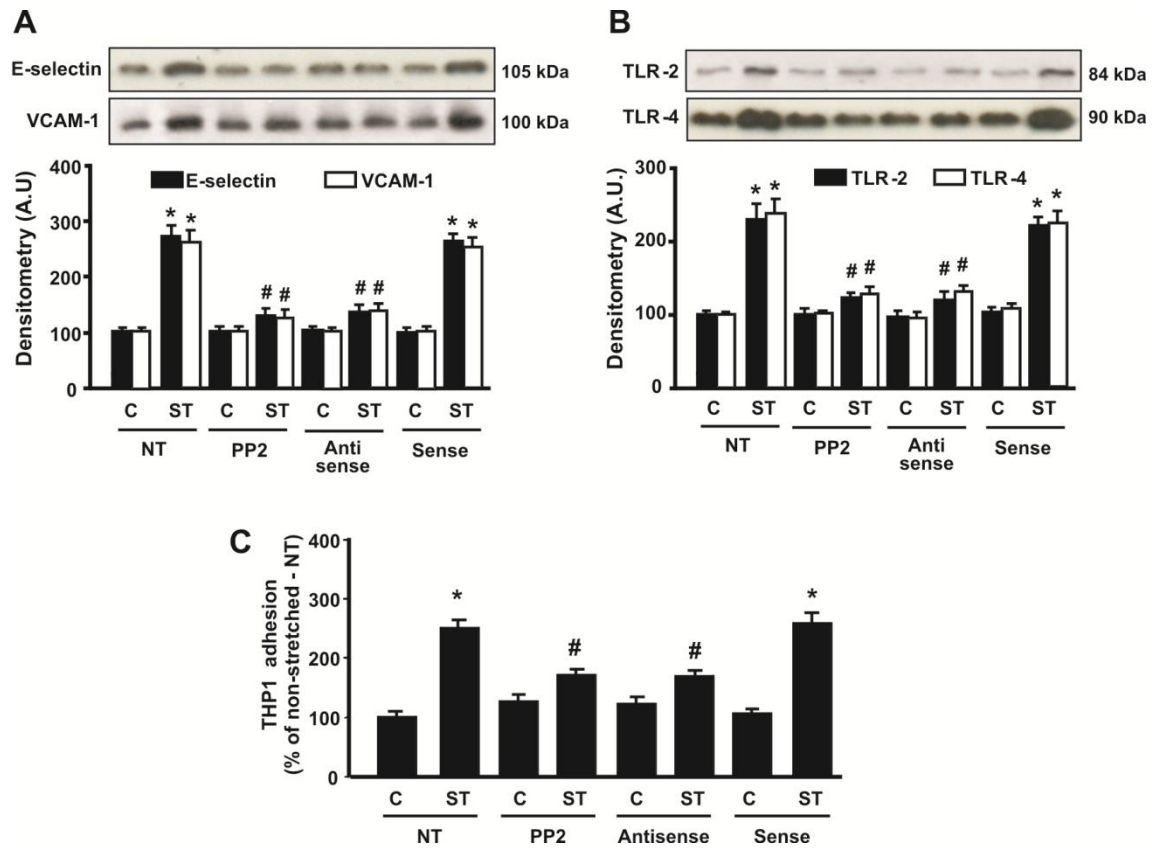


Figure 3. Effect of FAK inhibition on stretch-induced pro-atherogenic response in RAECs. Representative blots and average values of densitometric readings (n =5) of: A, E-selectin and VCAM-1; B, TLR-2 and TLR-4 from RAECs extracts. A.U., arbitrary units. C, THP1 monocytic cell adhesion (n=5) to RAECs was determined as described in Methods. C, non-stretched and ST, 6-h-stretched cells. NT, not transfected with ODNs and not treated with PP2.* $P < 0.05$ compared to non-stretched cells. # $P < 0.05$ compared to NT and sense-transfected cells.

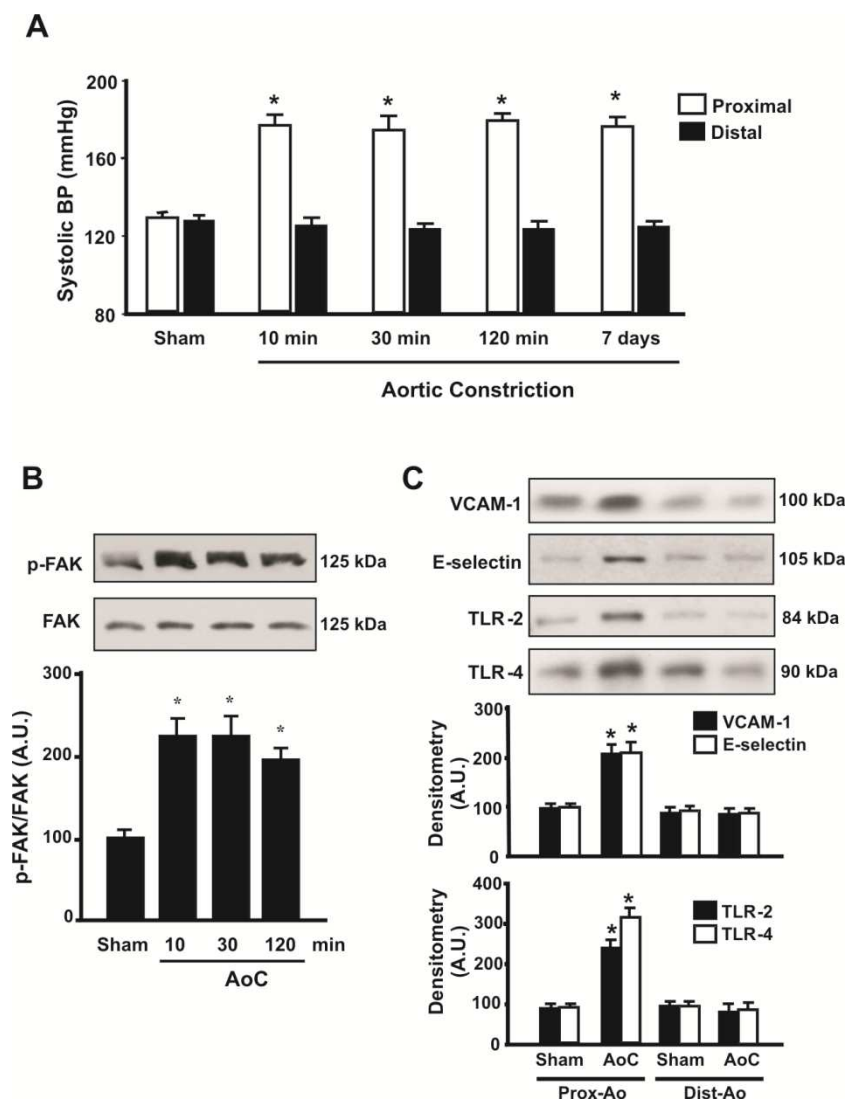


Figure 4. Effect of pressure overload on FAK activation and pro-atherogenic proteins expression in rat aorta. A, Systolic blood pressure measured proximally and distally to aortic constriction (n=6) along the experimental period. BP, blood pressure. * $P < 0.05$ compared to sham-operated animals. B, Ascending aortic extracts were blotted with antibodies against FAK or phospho-Tyr397-FAK (p-FAK^{Tyr397}). Graphic shows densitometric analysis (n=6) of the percent changes in the p-FAK/FAK ratio. AoC, aortic constriction. A.U., arbitrary units. * $P < 0.05$

compared to sham-operated animals. C, Aortic segments proximal (Prox-Ao) and distal (Dist-Ao) to the constriction were blotted with antibodies against E-selectin, VCAM-1, TLR-2, and TLR-4 after 7 days of pressure overload (n=6). A.U., arbitrary units. * $P<0.05$ compared to sham-operated animals.

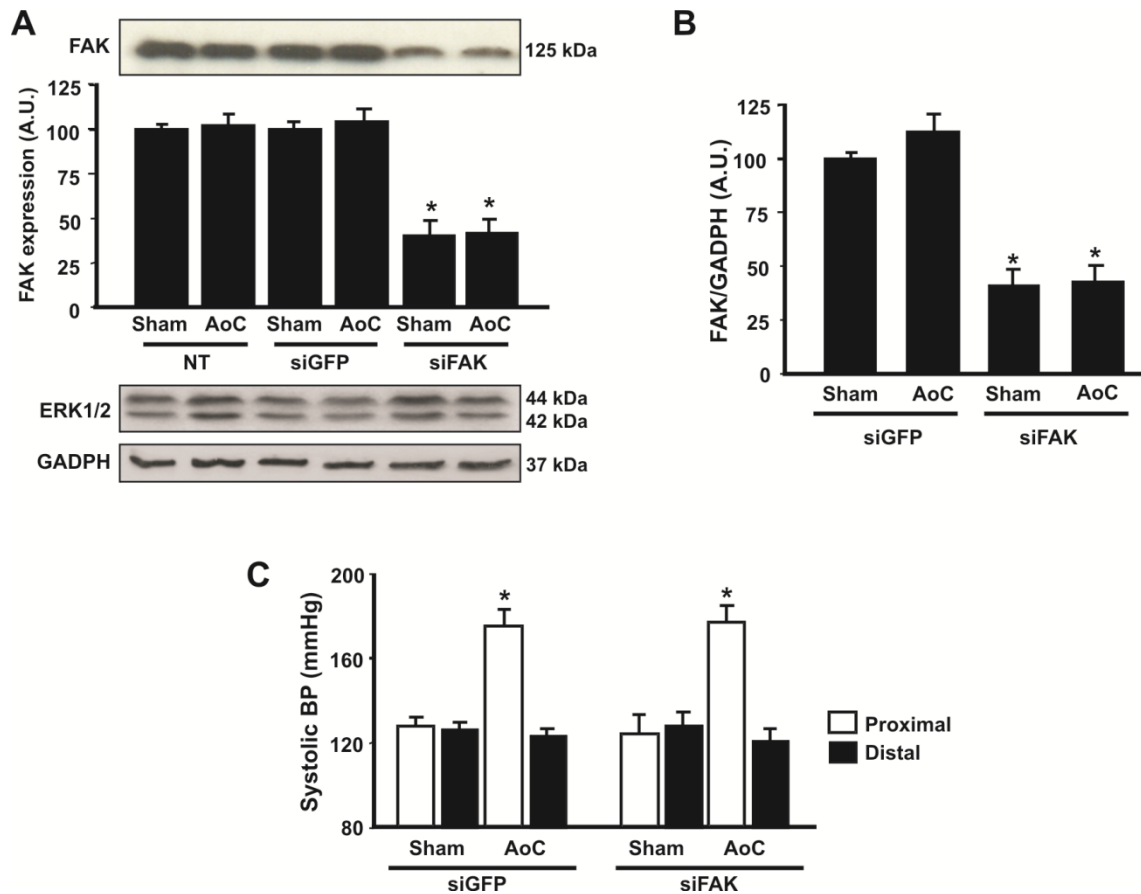


Figure 5. Effect of small interference RNA on aortic FAK expression and on blood pressure levels in rats. A, Ascending aortic extracts were blotted with anti-FAK, -ERK1/2 and -GADPH antibodies. Graphic shows densitometric analysis (n=6) of FAK expression. AoC, 7-day-aorta-constricted rats. A.U., arbitrary units. * $P < 0.05$ compared to NT (non-transfected) and siGFP transfected rats. B, FAK/GADPH mRNA ratio in ascending aortic extracts evaluated by RT-PCR. AoC, 7-day-aorta-constricted rats. A.U., arbitrary units. * $P < 0.05$ compared to siGFP transfected rats. C, Systolic blood pressure measured proximally and distally to aortic constriction (n=6) along the experimental period. BP, blood pressure. AoC, 7-day-aorta-constricted rats.

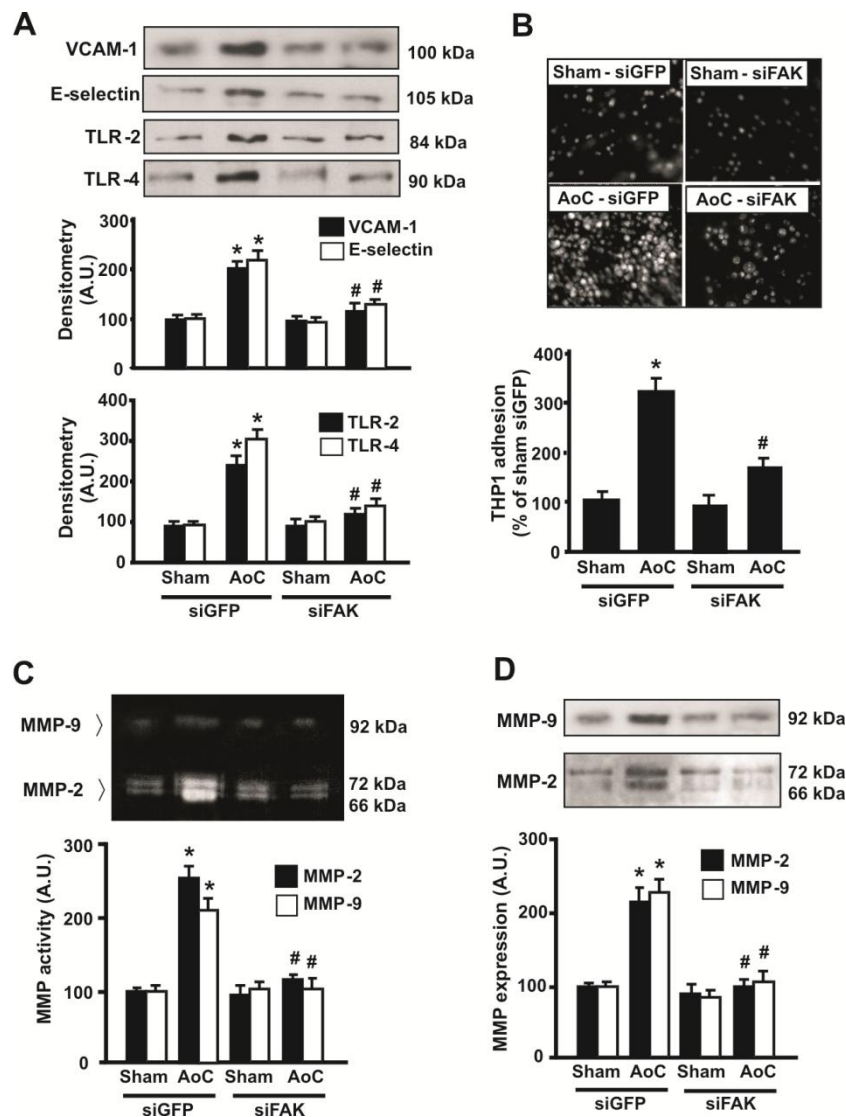


Figure 6. Effect of FAK silencing on pro-atherogenic response to pressure overload. A, Ascending aortic extracts were blotted with anti-E-selectin, -VCAM-1, -TLR-2 and -TLR-4 antibodies (n=6). A.U., arbitrary units. B, THP1 monocytic cell adhesion (n=4) to RAECs was determined as described in Methods. Ascending aortic extracts were analyzed by: C, zymography in order to evaluate MMP-2 and MMP-9 activity (n=4) and D, western blot with anti-MMP-2 and -MMP-9 antibodies

(n=6). AoC, 7-day-aorta-constricted rats. * $P < 0.05$ compared to sham-operated animals. # $P < 0.05$ compared to aorta-constricted rats transfected with siGFP.

5. DISCUSSÃO

No estudo apresentado nós realizamos experimentos para determinar se a FAK possui influência sobre a expressão de moléculas pró-aterogênicas em linhagem de célula endotelial *in vitro* submetida a estiramento mecânico pulsátil e em aorta de ratos *in vivo* submetidos à sobrecarga pressórica e qual o impacto sobre a adesividade leucocitária nestes modelos experimentais. Para tanto, demonstramos *in vitro* que, células RAEC submetidas ao estiramento cíclico apresentam ativação precoce da FAK e aumento da expressão de moléculas inflamatórias (TLR2 e TLR4) e de moléculas de adesão (VCAM e E-selectina), permitindo uma maior adesividade de células monócitoides sobre RAECs. A inibição da FAK endotelial com o inibidor farmacológico PP2 e com o ODN-antisense diminuiu a expressão de moléculas pró-aterogênicas e a adesão de células monócitoides sobre as células endoteliais induzidas por estiramento cíclico. Nos nossos estudos *in vivo*, observamos que o tratamento com siRNA-FAK foi capaz de reduzir significativamente a expressão da FAK e das moléculas pró-aterogênicas nas aortas de ratos submetidos à sobrecarga pressórica, além de inibir a adesividade leucocitária de THP1 sobre as células endoteliais *ex vivo*.

A FAK é uma molécula que oferece uma percepção dos mecanismos moleculares que controlam processos celulares envolvidos no desenvolvimento e funcionamento do sistema cardiovascular (Vadali *et al*, 2007). Os nossos resultados demonstraram aumento da ativação da FAK quando as células endoteliais foram submetidas ao estiramento mecânico. A ativação da FAK pode ser inferida por sua fosforilação no resíduo de tirosina 397. Estes dados estão de acordo com os estudos de Vadali e colaboradores (2007), os quais observaram o aumento da fosforilação da FAK no resíduo Tyr 397 em células endoteliais submetidas ao estiramento mecânico cíclico. Por outro lado, nossos dados também corroboram com aqueles obtidos por Torsoni e colaboradores (2003), os quais mostraram a ativação da FAK em cultura primária de cardiomiócitos submetida a estresse mecânico.

Os nossos resultados com o inibidor farmacológico PP2 sobre a ativação da FAK demonstraram uma inibição dessa molécula sobre a ativação da FAK quando as células estiradas foram tratadas com PP2. Esse resultado reproduz estudo realizados por nosso grupo em cardiomiócitos (Torsoni *et al*, 2003; Nadruz *et al*, 2005). Isso provavelmente aconteceu porque a ativação da FAK é dependente de uma atividade recíproca catalítica entre a FAK e a família da Src quinase. A autofosforilação do resíduo de tirosina quinase 397 cria uma ligação de alta afinidade com o domínio SH2 da Src. Consequentemente o tratamento com um inibidor específico da família da Src inibe a fosforilação do resíduo de tirosina 397 e a ativação da FAK (Torsoni *et al*, 2003). Com o intuito de desenvolver uma estratégia que permitisse a inibição seletiva da expressão da FAK nas RAEC, decidimos realizar a transfecção de olideoxigonucleotídeos antisense (ODN-Antisense) especificamente desenhados para inibir a FAK expressa em células de coelho. Essa metodologia vem sendo utilizada por muitos autores para investigar o papel da FAK nas diversas vias de sinalização celular (Mehta *et al*, 2002; Torsoni *et al*, 2003; Long *et al*, 2005; Nadruz *et al*, 2005). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com ODN-Antisense da FAK foi eficaz, ao promover uma diminuição significativa da expressão da proteína, sem exercer efeitos inespecíficos sobre a expressão de outras proteínas nas células, tais como ERK1/2 e GAPDH. A microscopia de imunofluorescência também revelou que a integridade geral celular não foi afetada com o tratamento do antisense e do sense da FAK. Todos estes resultados indicam que o antisense foi específico para a FAK, diminuindo especificamente a expressão da proteína, sem alterar a viabilidade celular.

Sendo a aterosclerose uma doença inflamatória crônica, receptores de proteínas expressados pelos macrófagos e pelas células endoteliais podem reconhecer componentes e produtos de microorganismos e atuar como um importante papel na resposta imune inata (Tobias & Curtiss, 2005). Os nossos resultados demonstraram um aumento da expressão dos TLR2 e TLR4 em resposta ao estímulo mecânico de 6 horas. Estes dados ainda não foram previamente descritos na literatura, mas somam-se a estudos anteriores que mostraram aumento da expressão de TLR4 por *shear stress* em células endoteliais de artérias coronárias humanas no desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Liang *et al*, 2002). Quando o inibidor da FAK (PP2) e o ODN-Antisense foram utilizados, a expressão de TLR2 e TLR4 apresentou-se reduzida, sugerindo uma possível participação da FAK no processo analisado.

Algumas moléculas de adesão em células endoteliais atuam como marcadores de ativação endotelial. Com isso, o envolvimento de moléculas de adesão específicas no processo da aterosclerose tem sido investigado. A aterosclerose como uma doença inflamatória está associada à expressão de selectinas, VCAM-1 e ICAM-1, permitindo a infiltração de monócitos nas paredes dos vasos em respostas aos fatores pró-aterogênicos (Wang *et al*, 2003b). Os nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de E-selectina e VCAM-1, os quais corroboram com estudos prévios encontrados na literatura (Huo & Ley, 2001; Chiu *et al*, 2004). No entanto, quando as células endoteliais foram submetidas ao estiramento mecânico, tratadas com PP2 e com o ODN-Antisense, a expressão dessas moléculas foi inibida, apontando para uma relação entre a expressão dessas moléculas nas células endoteliais e a ativação da FAK. Após

confirmarmos que o ODN-Antisense inibiu eficazmente a expressão de FAK, padronizamos em nosso laboratório ensaios funcionais a fim de verificar a adesividade leucocitária de células THP1 sobre as RAEC e avaliar se a FAK é de fato importante para a ativação endotelial mediada por estiramento mecânico. Diversos estudos já haviam demonstrado que o estresse mecânico ativa a FAK em células endoteliais pulmonares e de aorta (Lehoux *et al*, 2005; Ali *et al*, 2006; Lehoux *et al*, 2006). Nossos dados forneceram novas evidências que a expressão/ativação da FAK é crucial para adesão de células THP1 às RAEC induzida por estiramento mecânico. Neste contexto, observamos que a pré-incubação das RAEC com PP2 inibiu a adesão de THP1 induzida por estiramento mecânico. Como o PP2 apenas bloqueou a ativação da FAK sem alterar a expressão protéica, estes dados indicam que a fosforilação da FAK é um passo fundamental para este processo. Por outro lado, ao utilizarmos a metodologia de ODN-Antisense, observamos que a inibição da expressão da FAK também foi capaz de bloquear a adesão celular de THP1 induzida por estiramento. Estes dados funcionais indicam fortemente que a FAK é uma proteína que exerce um papel central na ativação endotelial induzida por mecanotransdução.

Os dados dos experimentos *in vitro* fizeram com que investigássemos se a FAK também poderia ser uma proteína central na mecanotransdução vascular *in vivo*. Para alcançar este intuito, sintetizamos uma molécula de RNA *interference* (siRNA) que inibisse a expressão de FAK na aorta de ratos. Em nossos experimentos, ratos Wistar transfectados com siRNA-FAK apresentaram inibição da expressão de FAK na aorta dos ratos em cerca de 60% em comparação com a expressão na aorta de animais transfectados com siRNA-GFP ou de animais

controle (não transfectados). Nos ensaios, demonstramos que a expressão aórtica de TLR2, TLR4, E-selectina e VCAM-1 é estimulada após sobrecarga mecânica crônica induzida por coarctação da aorta. Notadamente, este processo foi inibido pela transfecção dos animais com siRNA-FAK que inibiu a expressão de FAK.

A técnica de interferência por RNA é um processo celular natural que regula a expressão do gene por um mecanismo altamente preciso de silenciamento genético na etapa da tradução através da degradação específica do mRNA ou pelo bloqueio da tradução. Nos últimos anos, o uso de siRNA tem proporcionado um grande avanço na aplicação terapêutica de diversas doenças (López-Fraga *et al*, 2009). Diversos trabalhos mostraram a redução da expressão da FAK através da administração de iRNA específico em células tumorais (Duxbury *et al*, 2003; Halder *et al*, 2006; Thamilselvan *et al*, 2007; Canel *et al*, 2008) e na hipertrofia cardíaca em cardiomiócitos (Clemente *et al*, 2007) indicando a aplicabilidade da técnica para a redução da expressão específica desta proteína e, portanto, seu potencial para ser utilizado como ferramenta na avaliação da função da FAK na aterogênese.

Como os nossos ensaios funcionais *in vitro* forneceram evidências de que a expressão/ativação da FAK é crucial para adesão de células monocitóides THP1 às RAECs induzidas por estiramento mecânico e, além disto, os dados disponíveis *in vivo* indicaram que a FAK, ao inibir a expressão de moléculas de adesão, pode potencialmente modular a adesão de células inflamatórias ao endotélio aórtico, nós padronizamos uma técnica experimental que permitisse avaliar a adesão de células inflamatórias *ex vivo*. Conforme apresentado, os resultados de adesão *ex vivo* mostraram uma notável diminuição na adesão das células THP1 sobre a

camada íntima das aortas dos ratos transfectados com o siRNA-FAK quando comparados com os animais que foram transfectados com a sequência controle (siRNA-GFP).

É possível especular que as influências hemodinâmicas resultantes do silenciamento da FAK nos vasos da circulação periférica possam ter contribuído para a atenuação da resposta pró-aterogênica em ratos com bandas tratados com siRNA-FAK. Embora não tenhamos avaliado os efeitos do silenciamento da FAK sobre a resistência vascular em ratos coarctados tratados com siRNA-FAK, nossos dados mostraram que ratos tratados com siRNA-FAK ou siRNA-GFP tiveram um gradiente comparável de transconstrição sistólica e um aumento similar da pressão arterial na aorta ascendente, indicando que é improvável que reduções na resistência vascular e alterações hemodinâmicas sistêmicas contribuíram substancialmente para a atenuação da resposta pró-aterogênica em ratos tratados com siRNA-FAK. Neste sentido, os atuais resultados permitem concluir que a inibição FAK atenuou o desenvolvimento do fenótipo pró-aterogênico por afetar as respostas das células vasculares por sobrecarga mecânica.

Como diversas evidências indicam que as metaloproteinases (MMPs) exercem um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose e no remodelamento vascular (Busti *et al*, 2010), realizamos ensaios para avaliar a expressão e a ativação de MMP2 e MMP9 induzidas por sobrecarga pressórica na aorta de ratos e o impacto da inibição da FAK neste processo. Os nossos resultados mostraram que a sobrecarga pressórica aumentou a expressão e a atividade tanto de MMP2 quanto de MMP9 na aorta de ratos transfectados com

siRNA-GFP, enquanto que nos animais tratados com siRNA-FAK a coarctação não se acompanhou de aumento da expressão e atividade de MMPs na aorta. Estes resultados indicaram que a FAK exerce um papel crucial na ativação e expressão vascular de MMPs induzida por sobrecarga hemodinâmica. Por outro lado, eles corroboram com resultados da literatura, os quais demonstraram que a FAK também é essencial para expressão/atividade de MMPs em fibroblastos cardíacos (Dalla-Costa *et al*, 2010). O aumento da atividade de MMPs causa a proteólise dos componentes da matriz extracelular, facilitando o processo pró-fibrótico, uma vez que libera moléculas com efeitos em potencial na síntese de matriz, como fatores biológicos ativos e matriciais, as quais estimulam a formação de tecido conjuntivo novo (Li *et al*, 2000; Busti *et al*, 2010). Os efeitos patológicos causados devido às alterações na regulação da atividade das MMPs são fundamentais para o desencadeamento aterosclerótico, como por exemplo: na infiltração e inflamação celular, na migração de células musculares lisas, na proliferação e na angiogênese. Além disso, a degradação da matriz extracelular pelas MMPs pode causar a instabilidade e a ruptura das placas ateroscleróticas (George, 2000; Beaudeau *et al*, 2004; Watanabe & Ikeda, 2004; Johnson, 2007; Liu *et al*, 2009; Papazafiropoulou & Tentolouris, 2009; Busti *et al*, 2010).

Embora as vias de sinalização intermediárias que ligam a expressão da FAK às proteínas pró-aterogênicas não foram exploradas no atual estudo, alguns efetores *downstream* da FAK poderiam explicar, em parte, sua influência sobre essas proteínas. Por exemplo, a ativação da FAK mostrou promover uma estimulação eficiente e robusta de precursores das vias das MAP quinases, da proteína quinase C e de NF-kappa beta (Schlaepfer *et al*, 1999; Petzold *et al*,

2009). Nesse sentido, dados de outros trabalhos mostraram que estas proteínas ou fatores de transcrição são ativados e desempenham um papel na expressão de genes pró-aterogênicos induzida por estiramento mecânico em células vasculares. Além disto, a ativação de NF-kappa beta foi requerida para a expressão de moléculas de adesão (Ali *et al*, 2004; Riou *et al*, 2007), enquanto que MAP quinases e proteína quinase C foram necessárias para a regulação de MMP (Wang *et al*, 2003; Sweeney *et al*, 2004; Kim *et al*, 2008). No entanto, são necessários mais estudos para elucidar as vias de sinalização pelas quais a FAK regula a expressão de moléculas de pró-aterogênicas induzida por estiramento mecânico em células vasculares.

Neste trabalho, foi demonstrado que o estiramento cíclico estimulou a expressão de proteínas pró-aterogênicas em células endoteliais *in vitro*, confirmando assim dados dos outros grupos (Yun *et al*, 1999; Wagner *et al*, 2009; Wójtowicz *et al*, 2010). Além disso, segmentos das aortas de ratos submetidos a sete dias de sobrecarga pressórica também apresentaram aumento na expressão de moléculas de adesão e TLRs reproduzindo os resultados *in vitro*. No entanto, pode ser especulado que alterações sistêmicas nas atividades neurohormonais (ex: sistema renina-angiotensina) induzidas por coarctação aórtica podem também contribuir para aumentar a expressão dessas proteínas pró-inflamatórias na aorta de ratos. Para avaliar esta questão, analisamos os anéis aórticos extraídos das regiões proximais e distais da constrição, que foram expostos a níveis de pressão arterial maiores e menores, respectivamente. Notadamente, o aumento da expressão de VCAM-1, E-selectina e TLRs foi detectado unicamente nos segmentos aórticos proximais da constrição. Estes resultados estão de acordo

com dados de Wang *et al* (2004), que demonstraram que o aumento de moléculas de adesão foi secundário à elevação da pressão arterial mas não à circulação de componentes do sistema renina-angiotensina em ratos submetidos à constrição da aorta (Wang *et al*, 2004). Da mesma forma, em um modelo de aterosclerose experimental em coelhos com coarctação da aórtica, a aderência de monócitos e a expressão de VCAM-1 foram mais prevalentes na aorta proximal, onde a pressão é mais elevada do que na aorta de normotensos distal (Tropea *et al*, 1996). Em geral, esses dados sustentam a conclusão que o estiramento mecânico *por si* é responsável pelo desenvolvimento de um fenótipo pró-aterogênico da aorta em modelos de sobrecarga de pressão induzido por coarctação da aorta.

Em resumo, nossos resultados fortalecem a idéia de que a FAK é uma molécula biossensora capaz de responder a alterações mecânicas em células vasculares. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, a importância da regulação da FAK sobre a expressão e a ativação de proteínas envolvidas na aterogênese induzida por sobrecarga hemodinâmica. Com base nestes dados, a FAK emerge como um potencial alvo terapêutico com o objetivo de inibir o remodelamento vascular secundário à sobrecarga de pressão arterial.

6. CONCLUSÃO

A FAK é uma molécula fundamental para a expressão de moléculas de adesão e de moléculas inflamatórias envolvidas no processo da aterogênese em células vasculares submetidas ao estresse mecânico *in vitro* e *in vivo* (Figura 11).

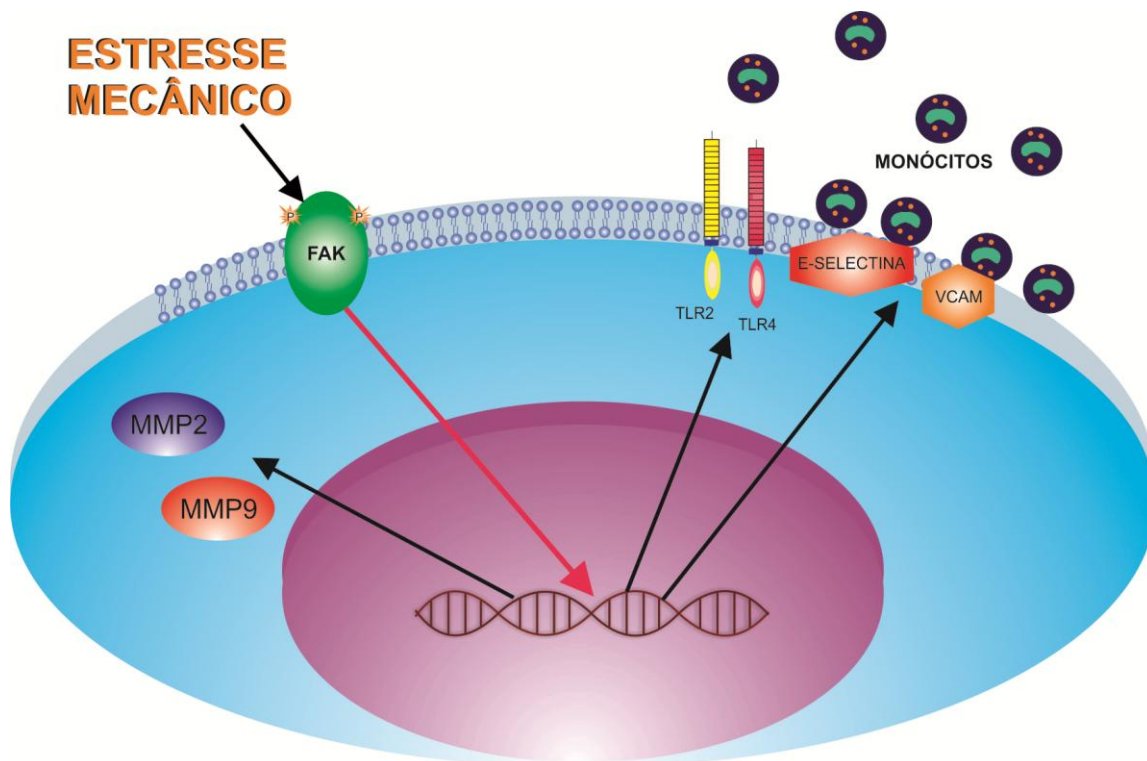


Figura 11. Ilustração da conclusão final.

7. COLABORAÇÕES EM ATIVIDADES DE PESQUISA DURANTE O DOUTORADO

As colaborações que resultaram em publicações durante o período do doutorado estão apresentadas abaixo:

- Co-autora do trabalho: **Toll-like receptor 6 Ser249Pro Polymorphism is associated with lower left ventricular wall thickness and inflammatory response in hypertensive women**, publicado no *American Journal of Hypertension*. 2010;23:649-54.

- Co-autora do trabalho: **The functional toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women**, publicado na *Clinica Chimica Acta*. 2010;411:744-8.

- Co-autora do trabalho: **Sodium intake is associated with carotid structure alterations and plasma matrix metalloproteinase-9 upregulation in hypertensive adults**, publicado no *Journal of Nutrition* 2011;141:877-82.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ALI MH, PEARLSTEIN DP, MATHIEU CE, SCHUMACKER PT. Mitochondrial requirement for endothelial responses to cyclic strain: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 287:L486-L496.
- 2) ALI MH, MUNGAI PT, SCHUMACKER PT. Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 291; L38-L45.
- 3) ASANUMA K, MAGID R, JOHNSON C, NEREM RM, GALIS ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*. 2003; 284; H1778-H1784.
- 4) BEAUDEUX JL, GIRAL P, BRUCKERT E, FOGLIETTI MJ, CHAPMAN MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42:121-131.
- 5) BOND M, SALA-NEWBY GB, NEWBY AC. Focal adhesion kinase (FAK)-dependent regulation of S-phase kinase-associated protein-2 (Skp-2) stability. A novel mechanism regulating smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 37304-37310.
- 6) BOSMAN FT, STAMENKOVIC I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol*. 2003; 200:423-428.
- 7) BUONASSISI V, VENTER JC. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976; 73:1612-1616.
- 8) BUSTI C, FALCINELLI E, MOMI S, GRESELE P. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Intern Emerg Med*. 2010; 5: 13-25.

- 9) CANEL M, SECADES P, GARZÓN-ARANGO M, ALLONCA E, SUAREZ C, SERRELS A, FRAME M, BRUNTON V, CHIARA M. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *Br J Cancer*. 2008; 98 (7): 1274-84.
- 10) CHELLO M, MASTROROBERTO P, FRATI G, PATTI G, D'AMBROSIO A, DI SCIASCIO G, COVINO E. Pressure distension stimulates the expression of endothelial adhesion molecules in the human saphenous vein graft. *Ann Thorac Surg*. 2003; 76: 453-458.
- 11) CHIU JJ, LEE PL, CHEN CN, LEE CI, CHANG SF, CHEN LJ, LIEN SC, KO YC, USAMI S, CHIEN S. Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor- α in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 73-79.
- 12) CINES DB, POLLAK ES, BUCK CA, LOSCALZO J, ZIMMERMAN GA, McEVER RP, POBER JS, WICK TM, KONKLE BA, SCHWARTZ BS, BARNATHAN ES, McCRAE KR, HUG BA, SCHMIDT AM, STERN DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91: 3527- 3561.
- 13) CLEMENTE CFMZ, TORNATORE TF, THEIZEN TH, DECKMANN AC, PEREIRA TC, CENDES IL, SOUZA JRM, FRANCHINI KG. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ. Res*. 2007; 101: 1339-1348.
- 14) COLE JE, GEORGIU E, MONACO C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010:393946.
- 15) CYBULSKY MI, LICHTMAN AH, HAJRA L, LIYAMA K. Leucocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin. Chim. Acta*. 1999; 286: 207-218.

- 16) DALLA COSTA AP, CLEMENTE CF, CARVALHO HF, CARVALHEIRA JB, NADRUZ W Jr, FRANCHINI KG. FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex. *Cardiovasc Res*. 2010; 86:421-431.
- 17) DAVIES PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995; 75:519-560.
- 18) DONG ZM, WAGNER DD. Leukocyte-endothelium adhesion molecules in atherosclerosis. *J. Lab. Clin. Med*. 1998; 132: 369-375.
- 19) DUXBURY M, ITO H, BENOIT E, ZINNER M, ASHLEY S, WHANG E. RNA interference targeting focal adhesion kinase enhances pancreatic adenocarcinoma gemcitabine chemosensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 311: 786-92.
- 20) DYKXHOORN D, NOVINA C, SHARP P. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Mol Cell Biol*. 2003; 4: 457-67.
- 21) FRANCHINI KG, TORSONI AS, SOARES PH, SAAD MJ. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res*. 2000; 87: 558-565.
- 22) FRANGOS SG, GAHTAN V, SUMPIO B. Localization of atherosclerosis. Role of hemodynamics. *Arch Surg* 1999; 134: 1142-1149.
- 23) GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW, LIBBY P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994; 94 (6): 2493-2503.
- 24) GALIS ZS, KHATRI JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002; 90: 251-262.

- 25) GALLEY HF, WEBSTER NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004; 93: 105-113.
- 26) GE J, JEREMIAS A, RUPP A, ABELS M, BAUMGART D, LIU F, HAUDE M, GORGE G, VON BIRGELEN C, SACK S, ERBEL R. New signs characteristic of myocardial bridging demonstrated by intracoronary ultrasound and Doppler. *Eur Heart J*. 1999; 20: 1707-1716.
- 27) GEIGER B, SPATZ JP, BERSHADSKY AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10:21-33.
- 28) GEORGE SJ. Therapeutic potential of matrix metalloproteinase inhibitors in atherosclerosis. *Expert Opin Inv Drug*. 2000; 9(5): 993-1007.
- 29) GUAN JL. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997; 29: 1085 -1096.
- 30) GUPTA V, GRANDE- ALLEN KJ. Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res*. 2006; 72:375-383.
- 31) HACKAM GD, ANAND SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003; 290: 932-940.
- 32) HAHN C, SCHWARTZ MA. The role of cellular adaptation to mechanical forces in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:2101-2107.
- 33) HALDER J, KAMAT AA, LANDEN CN, HAN LY, LUTGENDORF SK, LIN YG, MERRITT WM, JENNINGS NB, CHAVES-REYES A, COLEMAN RL, GERSHENSON DM, SCHMANDT R, COLE SW, LOPEZ-BERESTEIN G, SOOD AK. Focal adhesion kinase targeting using *in vivo* short interfering RNA delivery in

neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(16): 4916-4924.

34) HANSSON GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1685-1695.

35) HUO Y, LEY K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand.* 2001; 173: 35-43.

36) JEFFERIS BJ, WHINCUP P, WELSH P, WANNAMETHEE G, RUMLEY A, LENNON L, THOMSON A, LAWLOR D, CARSON C, EBRAHIM S, Lowe G. Prospective study of matrix metalloproteinase-9 and risk of myocardial infarction and stroke in older men and women. *Atherosclerosis.* 2010; 208:557-563.

37) JIANG Y, KOHARA K, HIWADA K. Association between risk factors for atherosclerosis and mechanical forces in carotid artery. *Stroke.* 2000; 31: 2319-2324.

38) JIMÉNEZ E, PÉREZ DE LA BLANCA E, URSO L, GONZÁLEZ I, SALAS J, MONTIEL M. Angiotensin II induces MMP 2 activity via FAK/JNK pathway in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 380:769-774.

39) JIN YJ, PARK I, HONG IK, BYUN HJ, CHOI J, KIM YM, LEE H. Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin $\alpha(5)\beta(1)/\alpha(v)\beta(3)$ -dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Signal.* 2011; 23:125-134.

40) JOHNSON JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007; 5:265-282.

- 41) JULIANO RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Rev Pharmacol Toxicol*. 2002; 42:283-323.
- 42) KIM JI, CORDOVA AC, HIRAYAMA Y, MADRI JA, SUMPIO BE. Differential effects of shear stress and cyclic strain on Sp1 phosphorylation by protein kinase Czeta modulates membrane type 1-matrix metalloproteinase in endothelial cells. *Endothelium*. 2008; 15:33-42.
- 43) KLEIJN D de, PASTERKAMP G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiov Res*. 2003; 60: 58-67.
- 44) LEHOUX S, ESPOSITO B, MERVAL R, TEDGUI A. Differential regulation of vascular focal adhesion kinase by steady stretch and pulsatility. *Circulation*. 2005; 111: 643-649.
- 45) LEHOUX S, CASTIER Y, TEDGUI A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern. Med*. 2006; 259: 381-392.
- 46) LI Y, McTIERNAN C, FELDMAN A. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 214-24.
- 47) LI S, BUTLER P, WANG Y, HU Y, HAN DC, USAMI S, GUAN J-L, CHIEN S. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 3546-3551.
- 48) LIANG F, HUANG N, WANG B, CHEN H, WU L. Shear stress induces interleukin-8 mRNA expression and transcriptional activation in human vascular endothelial cells. *Chin Med J*. 2002; 115:1838-1842.

- 49) LIBBY P, LEE RT. Matrix matters. *Circulation*. 2000; 102(16): 1874-1876.
- 50) LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-874.
- 51) LIU D, GE S, ZHOU G, XU G, ZHANG R, WUSHENG Z, LIU Z, CHENG S, LIU X. Montelukast inhibits matrix metalloproteinases expression in atherosclerotic rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009; 23: 431-437.
- 52) LONG LC, XIANG ZZ, YONG-JIAN X, WANG NI, SHI-XIN C. Focal adhesion kinase antisense oligodeoxynucleotides inhibit human pulmonary artery smooth muscle cells proliferation and promote human pulmonary artery smooth muscle cells apoptosis. *Chin. Med. J*. 2005; 118 (1):20-26.
- 53) LÓPEZ-FRAGA M, MARTINEZ T, JIMÉNEZ A. RNA interference Technologies and therapeutics: from basic research to products. *BioDrugs*. 2009; 23(5): 305-332.
- 54) LUNDBERG AM, HANSSON GK. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2009; 134: 5-24.
- 55) LUSIS AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407: 233-241.
- 56) MALEK AM, ALPER SL, IZUMO S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*. 1999; 282: 2035-2042.
- 57) MEHTA D, TIRUPPATHI C, SANDOVAL R, MINSHALL RD, HOLINSTAT M, MALIK AB. Modulatory role of focal adhesion kinase in regulating human pulmonary arterial endothelial barrier function. *J. Physiol*. 2002; 539: 779-789.
- 58) MICHELSEN KS, WONG MH, SHAH PK, ZHANG W, YANO J, DOHERTY TM, AKIRA S, RAJAVASHISTH TB, ARDITI M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 10679-84.

- 59) MITRA AK, SCHLAEPFER DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin cell Biol.* 2006; 18:516-523.
- 60) MULLER WA. Leucocyte-endothelial- cell interactions in leucocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003; 24: 327-334.
- 61) MURRAY CJ, LOPEZ AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997; 349: 1269-1276.
- 62) NADRUZ W JR, KOBARG CB, CONSTANCIO SS, CORAT PD, FRANCHINI KG. Load-induced transcriptional activation of c-jun in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. *Circ Res.* 2003; 92: 243-251.
- 63) NADRUZ W JR, KOBARG CB, KOBARG J, FRANCHINI KG. c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H760-H767.
- 64) NADRUZ W JR, CORAT MA, MARIN TM, GUIMARÃES-PEREIRA GA, FRANCHINI KG. FAK Mediates MEF2 and c-Jun Activation by Stretch: Role in the Activation of the Cardiac Hypertrophic Genetic Program . *Cardiovasc Res.* 2005; 68: 87-98.
- 65) NICOLLETTI A, CALIGIURI G, HANSSON GK. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med.* 2000; 247: 397-405.
- 66) O'CALLAGHAN CJ, WILLIAMS B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta (1). *Hypertension.* 2000; 36: 319-324.

- 67) OKADA M, MATSUMORI A, ONO K, FURUKAWA Y, SHIOI T, IWASAKI A, MATSUSHIMA K, SASAYAMA S. Cyclic stretch upregulates production of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 894-901.
- 68) PAPAZAFIROPOULOU A, TETOLOURIS N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia.* 2009; 13(2): 76-82.
- 69) PARSONS JT, MARTIN KH, SLACK JK, TAYLOR JM, WEED SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene.* 2000; 19 (49): 5606-5613.
- 70) PARSONS JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1409-1416.
- 71) PEDERSON T. RNA interference and RNAi silencing: How far will they reach?. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(2): 407-10.
- 72) PENG X, UEDA H, ZHOU H, STOKOL T, SHEN TL, ALCARAZ A, NAGY T, VASSALLI JD, GUAN JL. Overexpression of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells promotes angiogenesis in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2004; 64: 421-430.
- 73) PETZOLD T, ORR AW, HAHN C, JHAVERI KA, PARSONS JT, SCHWARTZ MA. Focal adhesion kinase modulates activation of NF-kappaB by flow in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297:C814-C822.
- 74) RAFFETTO JD, KHALILI RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75:346-359.

75) RIOU S, MEES B, ESPOSITO B, Merval R, VILAR J, STENGEL D, NINIO E, van HAPEREN R, de CROM R, TEDGUI A, LEHOUX S. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Res*. 2007;100:1226-1233.

76) SAFAR ME, JANKOWSKI P. Central blood pressure and hypertension: role in cardiovascular risk assessment. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 116 (4): 273-282.

77) SAVOIA C, SCHIFFRIN EL. Inflammation in Hypertension. *Curr Opin Nephrol Hy*. 2006; 15:152-158.

78) SCHLAEPFER DD, HAUCK CR, SIEG DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999; 71: 435-478.

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

80) SHYU KG. Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes. *Clin Sci*. 2009; 116:377-389.

81) STEIN O, THIERY J, STEIN Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002; 160:1-10.

82) SULLIVAN GW, SAREMBOCK IJ, LINDEN J. The role of inflammation in vascular disease. *J Leukocyte Biol*. 2000; 67: 591- 602.

83) SWEENEY VON ON, CUMMINS PM, BIRNEY YA, CULLEN JP, REDMOND EM, CAHILL PA. Cyclic strain-mediated regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 expression and activity. *Cardiovasc Res*. 2004; 63: 625-34.

- 84) TANABE Y, SAITO M, UENO A, NAKAMURA M, TAKEISHI K, NAKAYAMA K. Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 2000; 215:103-113.
- 85) TAYLOR WR. Hypertensive vascular disease and inflammation: mechanical and humoral mechanisms. *Curr Hypertens Rep.* 1999; 1: 96-101.
- 86) THAMILSELVAN V, CRAIG D, BASSON M. FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway. *FASEB J.* 2007; 21(8): 1730-41.
- 87) THUBRIKAR MJ, BAKER JW, NOLAN SP. Inhibition of atherosclerosis associated with reduction of arterial intramural stress in rabbits. *Arteriosclerosis.* 1988; 8: 410-420.
- 88) THUBRIKAR MJ, ROBICSEK F. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg.* 1995; 59: 1594-1603.
- 89) TOBIAS P, CURTISS LK. Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis. *J Lipid Res.* 2005; 46: 404-411.
- 90) TORSONI AS, CONSTANCIO SS, NADRUIZ W JR, HANKS SK, FRANCHINI KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003; 93:140-147.
- 91) TROPEA BI, HUIE P, COOKE JP, TSAO PS, SIBLEY RK, ZARINS CK. Hypertension-enhanced monocyte adhesion in experimental atherosclerosis. *J Vasc Surg.* 1996; 23:596–605.

- 92) TROPEA BI, SCHWARZACHER SP, CHANG A, ASVAR C, HUIE P, SIBLEY RK, ZARINS CK. Reduction of aortic wall motion inhibits hypertension-mediated experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2127-2133.
- 93) TUNSTALL-PEDOE H, KUULASMAA K, MAHONEN M, TOLONEN H, RUOKOKOSKI E, AMOUYEL P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet.* 1999; 353: 1547-1557.
- 94) TUSCHL T, BORKHARDT A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv.* 2002; 2(3): 158-67.
- 95) VADALI K, CAI X, SCHALLER D. Focal adhesion kinase: an essential kinase in the regulation of cardiovascular functions. *IUBMV Life.* 2007; 59(11): 709-716.
- 96) VINKA A, DE KLEIJNB DP, PASTERKAMP G. Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 515-521.
- 97) XU Q. Biomechanical-stress-induced signaling and gene expression in the development of arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2000; 10: 35-41.
- 98) WAGNER AH, KAUTZ O, FRICKE K, ZERR-FOUINEAU M, DEMICHEVA E, GÜLDENZOPH B, BERMEJO JL, KORFF T, HECKER M. Upregulation of glutathione peroxidase offsets stretch-induced proatherogenic gene expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1894-1901.
- 99) WANG BW, CHANG H, LIN S, KUAN P, SHYU KG. Induction of matrix metalloproteinases-14 and -2 by cyclical mechanical stretch is mediated by tumor necrosis factor- α in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2003; 59:460-469.

- 100) WANG JG, MIYAZU M, MATSUSHITA E, SOKABE M, e NARUSE K. Uniaxial cyclic stretch induces focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation followed by mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 288: 356-361.
- 101) WANG H, NAWATA J, KAKUDO N, SUGIMURA K, SUZUKI J, SAKUMA M, IKEDA J, SHIRATO K. The upregulation of ICAM-1 and P-selectin requires high blood pressure but not circulating renin-angiotensin system in vivo. *J Hypertens.* 2004; 22:1323-1332.
- 102) WANG M, ZHANG J, SPINETTI G, JIANG LQ, MONTICONE R, ZHAO D, CHENG L, KRAWCZYK M, TALAN M, PINTUS G, LAKATTA EG. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol.* 2005; 167: 1429-1442.
- 103) WANG Y, ZHANG Y, LEWIS DF, GU Y, LIH, GRANGER DN, ALEXANDER JS. Protease chymotrypsin mediates the endothelial expression of P-and-E-selectin, but not ICAM and VCAM, induced by placental trophoblasts from pre-eclamptic pregnancies. *Placenta.* 2003b; 24: 851-861.
- 104) WATANABE N, IKEDA U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2004; 6(2): 112-120.
- 105) WÓJTOWICZ A, BABU SS, LI L, GRETZ N, HECKER M, CATTARUZZA M. Zyxin mediation of stretch-induced gene expression in human endothelial cells. *Circ Res.* 2010; 107:898-902.
- 106) YAMADA KM, MIYAMOTO S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Cur Op Cell Biol.* 1995; 7: 681-689.

- 107) YANO Y, GEIBEL J, SUMPIO BE. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. *Am J Physiol.* 1996; 271:C635- C649.
- 108) YUN JK, ANDERSON JM, ZIATS NP. Cyclic-strain-induced endothelial cell expression of adhesion molecules and their roles in monocyte-endothelial interaction. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44: 87-97.
- 109) ZEUKKE S, ULMER AJ, KUSUMOTO S, KATUS HA, HEINE H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res.* 2002; 56: 126-34.