UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Análise proteômica celular após estímulo do receptor AT1 por
ligantes com diferentes perfis farmacológicos**

Sarah Capelupe Simões

RIBEIRÃO PRETO

SP 2019

Sarah Capelupe Simões

**Análise proteômica celular após estímulo do receptor AT1 por
ligantes com diferentes perfis farmacológicos**

Orientador: Claudio Miguel da Costa-Neto

Coorientador: Lucas Tabajara Parreiras-e-Silva

Tese de doutoramento apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

RIBEIRÃO PRETO

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Simões, Sarah Capelupe.

Análise proteômica celular após estímulo do receptor AT1 por ligantes com diferentes perfis farmacológicos. Ribeirão Preto, 2019.

122 p. : , 30 cm.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa-Neto

Coorientador: Dr. Lucas Tabajara Parreiras e Silva

1. GPCR. 2. Receptor AT1. 3. Proteômica. 4. Sinalização 5. Fracionamento celular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Simões, Sarah Capelupe

Título: Análise proteômica celular após estímulo do receptor AT1 por ligantes com diferentes perfis farmacológicos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Luiz e Darcilei por todo amor que dedicam a mim,
amo vocês!*

*Aos meus amores Renata e André Brandão por tornarem minha
vida feliz, e por serem meu apoio durante essa trajetória.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me erguer quando achei que não era capaz de continuar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio M. da Costa-Neto, obrigada de coração, pela grande oportunidade que tive. Você permitiu que eu me tornasse uma pesquisadora com um ótimo senso crítico, me deu liberdade de criar, confiou em mim. Foi um excelente exemplo de como orientar e chefiar pessoas com paciência, persistência, firmeza sem ser arrogante ou insensível.

À minha família: minha mãe Darcilei, meu pai Luiz e minha irmã Renata, obrigada por sempre me mostrarem o que realmente importa na vida, vocês são meus exemplos de persistência e de simplicidade, e com vocês aprendi como é fácil ser feliz, amo vocês.

Aos meus avós Marina (*in memoriam*) e Sebastião (*in memoriam*), mesmo não estando mais aqui conosco continuam sendo exemplos de amor e perseverança.

Aos meus avós Tereza e Luiz que são as pessoas mais admiráveis e iluminadas que conheço, nos ensinam todos os dias a ter fé no criador e em nós mesmos. Que são exemplos de bondade e compaixão, mesmo quando a vida não é tão generosa.

Aos meus tios, tias, primos, primas e amigos de Barbacena, obrigada por sempre torcerem por mim.

Ao meu noivo, você me mostrou que o amor é lindo sim! Nada melhor do que encontrar em uma mesma pessoa: amor, paciência, persistência, caridade, simplicidade e companheirismo. Foi muito mais fácil e prazeroso chegar até aqui ao seu lado. Essa conquista é nossa! Amo você.

A minha sogra Sueli, sogro Carlinhos, cunhados e sobrinhos. Obrigada por sempre serem tão amáveis e carinhosos comigo. A torcida e o apoio de você são muito importantes para mim, amo e admiro muito vocês.

Ao meu coorientador Dr. Lucas Tabajara Parreiras-e-Silva foi um prazer ser coorientada por um excelente pesquisador, de um coração enorme, apenas finge bem mal que é bravo. Obrigada pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Victor M. Faça e todo o seu laboratório, sem vocês não conseguiria fazer este trabalho. Em especial a Dra. Carolina Thomé e Ana Masson.

Ao Alan Lorenzetti e Dimitrius por me ajudarem nas análises de bioinformática, muito obrigada!

Ao Prof Dr. Felipe R. Teixeira por sempre estar disposto a me ajudar, principalmente na fase inicial do meu projeto, obrigada pela paciência.

À Prof^a. Dr. Isis e todo o seu laboratório por serem sempre tão amáveis e solícitos. Obrigada por me ajudarem a enriquecer meu trabalho.

À todos do laboratório do Prof. Dr. Antunes por sempre permitir que usemos seus equipamentos e por serem sempre tão gentis.

Ao laboratório da Prof^a Dr. Rita Tostes por serem colaboradores tão especiais, e permitirem o uso de reagentes e equipamentos.

Aos laboratórios dos Profs. Drs. Adriano Sebollela e Marcelo Damário por permitirem o uso de equipamentos e reagentes. Muito Obrigada!

Ao Prof.Dr. Eduardo Brandt por ser um grande exemplo de profissional, o senhor nos ensina todos os dias que a grandeza interior e intelectual é muito mais

importante que espaço físico. Obrigada por ser esse grande Professor e nos mostrar que ciência se faz com gentileza e colaboração.

Aos meus amigos de laboratório: André, Diego, Lucas, Larissa, Laena, Deisy, Lígia, Vanessa, Jhonatan, Nichelle, Matheus, Caio, Helena e Lúcia. Muito obrigada, vocês são incríveis, tornam qualquer ambiente de trabalho uma verdadeira diversão. Vocês são além de competentes e inteligentes pessoas que hoje tem orgulho de chamar de amigos.

Ao André Balico além de um grande amigo, um irmãozinho mais novo, obrigada por sempre ser meu parceiro de experimento e por ter tanta paciência comigo (tudo bem que já está perdendo um pouco né!).

Aos meus amigos de longa data do corredor da bioquímica, que sempre animam meus cafés da tarde. E aos que não estão no corredor como a Luana, Flávia e Fabinho. É um prazer conviver com vocês.

Á uma grande amiga e fisioterapeuta Heliana, você foi um anjinho que Deus colocou na minha vida, que todo o bem que você proporciona a seus amigos e pacientes volte em dobro para você. Muito obrigada!

Á Silvinha e Aninha Masson as técnicas que considero como amigas, obrigada por sempre me incentivarem a ser melhor a cada dia, vocês são meus maiores exemplos profissionais, além de serem ótimas pessoas.

Ao Jhonatan e Lucas Tabajara por pacientemente corrigirem minha tese com tanto carinho!

A todos os Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia por estarem sempre disponíveis e por serem tão carinhosos e atenciosos.

Em especial ao pessoal da secretaria: Ivone, Rose e Ronaldo, por sempre resolverem nossos pepinos com tanta preocupação. E a Cacilda, Lúcia, Silvia, Silvana e Odete por sempre serem tão carinhosas comigo.

Á FAPESP (Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado e auxílio financeiro na execução desse projeto (Processo 2016/089200-0).

Á CAPES, CNPq, FAEPA por apoiarem financeiramente a realização deste trabalho.

“Saber finalizar uma fase da vida requer tanta sabedoria quanto para iniciar.”

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

Simões, Sarah Capelupe. Análise proteômica celular após estímulo do receptor AT1 por ligantes com diferentes perfis farmacológicos. 2019. 122f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) são importantes alvos de estudos biomédicos. O receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R) medeia importantes efeitos fisiopatológicos em diferentes órgãos e tecidos e tem como principal efetor a AngII. Neste trabalho investigamos por análise proteômica como o estímulo por 24hrs de células HEK293T expressando AT1R com o ligantes AngII, TRV027, Ang1-7 e L1623,313, que apresentam diferentes perfis farmacológicos, afetam a abundância total de proteínas e como essas alterações podem modificar eventos celulares, tais como apoptose e autofagia. Após a análise global de proteínas, demos início ao estudo de subfrações celulares através da padronização do fracionamento celular e análise por espectrometria de massas. Dessa forma este amplo estudo usando diversas abordagens desde a escolha dos ligantes com diferentes características farmacológicas até o monitoramento de proteínas enriquecidas em diferentes subfrações, permitiu a descrição de eventos celulares e vias de sinalização intimamente ligadas a ativação do AT1R. Este estudo enriquece significativamente o conhecimento a respeito do AT1R permitindo no futuro correlacionar eventos celulares microscópicos, como o tráfego proteico a eventos fisiológicos mais complexos e direcionar o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras chave: AT1R, GPCR, Proteômica, Fracionamento Celular.

ABSTRACT

Simões, Sarah Capelupe. Cell Proteomics analysis after AT1 receptor stimulation by ligands with diferente pharmacological profiles.2019.122f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

G-protein coupled receptors (GPCRs) are important targets in biomedical studies. Angiotensin II type 1 receptor (AT1R) mediates important pathophysiological effects in different organs and tissues, where the peptide AngII is its main effector. In this work, we investigated by proteomic analysis how stimulation of HEK293T cells expressing AT1R 24hrs by the ligands AngII, TRV027, Ang1-7 or L1623,313, which have different pharmacological profiles, modulate the total abundance of proteins, and how these alterations can modify events such as apoptosis and autophagy. After the global analysis of proteins, we performed a of cellular subfractions study by standardization of cell fractionation and mass spectrometry analysis. This study, using different approaches such as choosing ligands with different pharmacological profiles and monitoring proteins enriched in different cellular subfractions, allowed the description of cellular events and signaling pathways closely related to AT1R activation. Our study significantly enriches the knowledge about AT1R, which shall allow in the future to correlate microscopic cellular events, such as protein traffic, to more complex physiological events, and hence to contribute and drive the development of new drugs.

Keywords: AT1 Receptor. GPCR. Proteomics. Cell fractionation.

LISTA DE ABREVIATURAS

7TM	Sete hélices transmembranares
AngI	Angiotensina I
AngII	Angiotensina II
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
AT1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina II do tipo 2
AT4	Receptor de angiotensina II do tipo 4
ATGs	Genes relacionados à autofagia (<i>Autophagy-related genes</i>)
BRET	Transferência de energia por ressonância bioluminescência
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
DAG	Diacilglicerol
DMEN	Meio de Cultura (<i>Dubelcco's modified Eagle's medium</i>)
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EC	Extracelular
EC ₅₀	Concentração de agonista com a qual se atinge 50% da ativação máxima
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
IC	Intracelular
IC ₅₀	Concentração de agonista com a qual se atinge 50% de inibição da resposta máxima
IP ₃	Inositol trisfosfato
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GRK	Quinase de receptores acoplados à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina

HEK	Rim de embrião humano (<i>Human embryonic kidney</i>)
LC3	<i>Micruble associated protein light chain 3</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MARCKs	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>
M.S.	<i>Mass spectrometry</i>
PEI	Polietilenoimina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
SFB	Soro fetal bovino
SRA/SRAA	Sistema Renina-Angiotensina/ Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona
TMT	<i>Tandem mass tag</i>
T.I.	Membrana insolúvel ao triton (<i>Lipid rafts</i>)
T.S.	Membrana solúvel ao triton
W.B.	<i>Western blotting</i>

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
1.1 Receptores acoplados a proteína G (GPCRs).....	19
1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	22
1.3 Receptor AT1: Estrutura, função e sinalização.....	23
1.3.1 Receptor AT1 e implicações patológicas.....	25
1.3.1.2 Receptor AT1 e processos celulares relacionados ao desenvolvimento de doenças.....	30
1.4 Características farmacológicas dos ligantes usados no estudo.....	31
1.4.1 TRV027.....	31
1.4.2 Ang 1-7.....	31
1.4.3 L162,313.....	32
1.5 Abordagem proteômica.....	33
2.Objetivos.....	36
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3.Materiais e métodos.....	38
3.1 Culturas de células.....	38
3.2 Geração de linhagem estável HEK293T-hAT1.....	38
3.3 Transfecção transiente.....	39
3.4 Validação funcional das linhagens expressando o receptor hAT1.....	39
3.4.1 Ensaio de <i>binding</i> com células inteiras.....	39
3.4.2 Ensaios de mobilização de Ca ²⁺ intracelular.....	41
3.5 Ensaio de BRET (<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>)	41
3.6. Ensaios de fosforilação de ERK1/2.....	42

3.7 Análise do perfil de ativação de kinases.....	43
3.8. Ensaio para análise de abundância proteica diferenciada de células HEK293T-hAT1 em diferentes tratamentos.....	44
3.8.1 Preparo das amostras para análise proteômica.....	45
3.8.2. Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas.....	46
3.8.3 Critérios de análise utilizados para identificar proteínas diferencialmente moduladas entre os tratamentos.....	46
3.8.4 Western blotting para validação de alvos modulados identificados por M.S.....	46
3.9 Identificação de proteínas por espectrometria de massas em frações celulares enriquecidas.....	48
3.9.1 Otimização do fracionamento subcelular.....	49
3.9.2 Validação do fracionamento subcelular.....	52
3.9.3 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas após separação por SDS-PAGE.....	51
3.10 Análise estatística.....	52
3.11Análise de bioinformática.....	52
4. Resultados.....	54
4.1 Produção de linhagem celular com expressão estável do receptor AT ₁ humano.....	54
4.2 Ativação do AT1R por Ang1-7 e L162,313.....	57
4.2.1 Dados obtidos com a ativação por Ang 1-7.....	57
4.3 Dados obtidos com a ativação por L162,313 e TRV027.....	59
4.4 Perfil de ativação de quinases promovida pelo estímulo dos agonistas: Ang II, Ang 1-7, L162,313.....	61

4.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massas em extrato de células HEK293T-hAT1 estimuladas por: AngII, TRV027, Ang1-7 e L162,313	63
4.5.1 Classificação e distribuição de proteínas identificadas com abundância relativa modulada entre os tratamentos.....	69
4.5.2 Vias de sinalizações mais relevantes que podem ser afetadas por proteínas que tiveram abundância relativa moduladas após tratamentos.....	72
4.5.3 Validação dos dados de proteômica por <i>western blotting</i> e investigação de possíveis processos celulares alvos de estudo.....	82
4.5.3.1 Processos celulares importantes desempenhados por proteínas com abundância relativa modulada pelos tratamentos.....	86
4.5.4 Abordagem proteômica no estudo do enriquecimento proteico em diferentes compartimentos celulares após ativação do AT1R.....	98
5. Discussão de Resultados.....	97
6. Conclusão.....	109
7.Referências bibliográficas.....	111
8. Anexos.....	117

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), também conhecidos como receptores de sete domínios transmembranares (7TMRs) são constituintes da maior família de receptores de superfície celular (GILCHRIST; MAZZONI, 2010; HAUSER *et al.*, 2017). Estes receptores são caracterizados por possuírem domínios alfa-helicoidais que atravessam a membrana sete vezes (TMs 1 a 7), interligados por três alças extracelulares (EC-1, EC-2 e EC-3) e três intracelulares (IC-1, IC-2 e IC-3), com o N-terminal voltado para a região extracelular e o C-Terminal para a região intracelular, como esquematizado na figura 1. Apesar de serem receptores preferencialmente de membrana plasmáticas, essas proteínas são endereçadas a outras estruturas celulares, e a sinalização desempenhada nessas regiões vem sendo cada vez mais explorada (GOETZL, 2006).

Figura 1. GPCR esquematizado na membrana plasmática em forma de serpentina.

Os GPCRs são agrupados baseando-se na similaridade das sequências dos segmentos das 7TMs, e são subdivididos em 5 subfamílias: rodopsina (701 membros), adesão (24 membros), *frizzled/taste* (24 membros), glutamato (15 membros) e

secretina (15 membros) (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013). Apesar destas várias características em comum entre os GPCRs, cada receptor apresenta características únicas de estrutura, ativação e transdução de sinal, envolvendo o acoplamento a diferentes subtipos de proteína G, β -arrestinas, bem como vias de sinalização dependentes de outras proteínas reguladoras (ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009).

Essa grande diversidade de receptores de membrana é ativada por uma ampla gama de ligantes, tais como: fótons, íons, aminas biogênicas, neurotransmissores peptídicos e não peptídicos, fatores de crescimento e lipídeos (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013; ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009). Dessa forma são extremamente importantes para a manutenção da homeostasia celular e medeiam uma diversidade de processos fisiológicos, incluindo: olfato, visão, cognição, percepção da dor, secreção exócrina e endócrina, metabolismo, inflamação, imunidade, controle cardíaco e neurotransmissão, bem como surgimento e progressão de patologias (GUREVICH; GUREVICH, 2018). Portanto, não é de se surpreender que os GPCRs sejam alvos de mais de 27% dos fármacos existentes no mercado e tenham gerado mais de 890 bilhões de dólares nos últimos anos para as indústrias farmacêuticas (HAUSER *et al.*, 2017)

A sinalização via GPCRs inicia-se após a estabilização da conformação do receptor no estado ativo através da interação com o ligante ou por outros estímulos, como estresse mecânico. (YIM *et al.*, 2019). A dissociação do heterotrímero de proteína G ocorre após ativação do receptor e o tipo de evento sinalizatório dependerá da combinação de subunidades α , β e γ ativados pelo receptor, sendo possíveis diversas combinações já que são conhecidas: 16 isoformas de subunidade α , 5 de β e 12 de γ (KHAN *et al.*, 2013). Os principais efetores ativados e mensageiros

secundários gerados após a dissociação desse heterotrímero são bem conhecidos, como por exemplo: i) GPCRs que acoplam a $G\alpha_q$ promovem ativação de fosfolipases C que hidrolisam os fosfolipídeos de membrana fosfatidil 4,5-bisfosfato (PIP_2), resultando na formação dos segundos-mensageiros inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) e 1,2-diacylglicerol (DAG). O IP_3 abre canais de Ca^{2+} no retículo endoplasmático o que acarreta no aumento da concentração citosólica deste íon. O DAG e o Ca^{2+} ativam proteína quinase C (PKC), a qual fosforila diversas proteínas alvo; ii) já os que acoplam a $G\alpha_s$ ativam a enzima adenilato ciclase que catalisa a formação do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) o qual leva à ativação da proteína quinase A (PKA), responsável por fosforilar diferentes proteínas e controlar a expressão de diversos genes; iii) outros receptores se acoplam a $G\alpha_i$ e atuam inibindo a adenilato ciclase, diminuindo os níveis de cAMP, e as subunidades $\beta\gamma$ podem participar da ativação de canais de potássio e da inibição de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem; iv) Receptores que ativam proteínas $G_{12/13}$ medeiam o estímulo de GTPases pequenas como a Rho, envolvidas no remodelamento do citoesqueleto. É importante ressaltar que a maioria dos GPCRs tem capacidade de interagir e ativar mais de uma isoforma de proteína G, porém cada receptor apresenta preferência por uma delas (HAUSER *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2013).

A sinalização de proteína G iniciada na membrana plasmática é cessada após a fosforilação da região C-terminal dos GPCRs, o que promove sua internalização e dessensibilização (DEWIRE *et al.*, 2007). As β -arrestinas, junto a outras proteínas acessórias, promovem a endocitose do receptor através da formação de vesículas revestidas por clatrin e, ao contrário do que se acreditou durante muito tempo, a sinalização é continuada mesmo após a internalização dos receptores, inclusive pela ativação de proteínas G (IRANNEJAD *et al.*, 2013). As β -arrestinas servem de

ancoramento para proteínas efetoras importantes na sinalização dos GPCRs, além de possuírem diversas outras funções (Figura 3) (CASSIER *et al.*, 2017; FREISSMUTH; CASEY; GILMAN, 2018; WITHEROW *et al.*, 2004).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é composto por inúmeros peptídeos, enzimas e receptores que estão envolvidos na regulação da pressão arterial e homeostasia de íons e fluidos corporais (SPARKS *et al.*, 2014).

O sistema é iniciado com o angiotensinogênio, glicoproteína que é gerada no fígado pela síntese e processamento da pré-pró-renina até renina nas células justaglomerulares do rim. Após a formação da renina, ela é liberada na circulação sanguínea e promove a quebra do angiotensinogênio em AngI (1-10) e outras carboxi- e aminopeptidases são responsáveis pela conversão deste peptídeo em diferentes efetores do SRA como: angiotensina (1-8) (AngII), Angiotensina IV (3-8) e angiotensina 1-7 Ang (1-7) (Figura 2) (FORRESTER *et al.*, 2018).

Os diferentes peptídeos, metabólitos de AngI, formados atuam via receptores de membrana gerando os efeitos fisiológicos. O receptor AT1 de angiotensina II (AT1R), o principal receptor deste peptídeo, está diretamente relacionado com controle da pressão arterial e balanço hidroeletrolítico. O outro receptor de AngII, AT2R, que apesar de não ser profundamente entendido, é descrito possuir função antagônica ao do AT1R e é abundantemente expresso em tecidos fetais. O receptor AT4 não é um GPCR e está principalmente distribuído no cérebro relacionado a regiões cognitivas, sensoriais e motoras. O receptor MAS também possui atividades

antagônicas àquelas do AT1R, com potente efeito anti-inflamatório (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; SPARKS *et al.*, 2014).

Figura 2 Representação do Sistema Renina-Angiotensina: Principais vias enzimáticas responsáveis por produzir os peptídeos ativos do SRA, e descrição de efeitos biológicos desencadeados após ativação dos receptores pertencentes a este sistema. ACE (enzima conversora de angiotensina). Adaptado de: (S.J. *et al.*, 2018).

1.3 Receptor AT1: Estrutura, função e sinalização

O AT1R possui 359 aminoácidos (~41kDa) e pertence à família dos receptores tipo-rodopsinas. Sua ativação medeia importantes efeitos fisiológicos no organismo, tais como: contração do músculo liso vascular, esteroidogênese adrenal e secreção de aldosterona, ativação neuronal, neurosecreção, transporte iônico, crescimento celular, proliferação, atividade pró-inflamatória, angiogênese, formação de tecido fibrótico entre outras (FORRESTER *et al.*, 2018; HUNYADY; CATT, 2006b).

O AT1R quando estimulado pela AngII sinaliza preferencialmente via proteína Gαq/11 promovendo ativação de fosfolipases C, com subsequente aumento dos níveis dos mensageiros intracelulares dessa via, com cálcio. Após esse evento a região C-terminal do receptor é fosforilada por proteínas quinases, chamadas GRKs (quinases de GPCRs), criando regiões de interação a β-arrestinas e consequente dessensibilização e internalização do receptor, que pode ser encaminhado para degradação, direcionado para outras estruturas celulares ou ser reciclado para membrana. O caminho percorrido pelo receptor é dependente do estímulo e da composição celular (DEWIRE *et al.*, 2007; SITARAMAYYA, 2010).

Existem agonistas com habilidade de induzirem e/ou estabilizarem diferentes conformações dos GPCRs, dessa forma o processo pelo qual o agonista faz com que o receptor expresse alguns, mas não todo seu repertório de sinalização, este fenômeno é conhecido como agonismo tendencioso (LIMA *et al.*, 2014). Para AT1R, o primeiro agonista tendencioso descrito foi o peptídeo [Sar¹-ile-⁴ile⁸]-AngII (SII), ele é capaz de levar a fosforilação de ERK1/2 dependente de β-arrestina 2, porém sem ativar as vias clássicas dependentes de proteína G (DEWIRE *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2014; VIOLIN *et al.*, 2010) (Figura 3). Ao longo dos anos diversos agonistas tendenciosos foram descritos para os GPCRs, muitos estudos visam o uso destes agonistas para aplicação terapêutica, acreditando na diminuição de efeitos colaterais (KENAKIN, 2011).

Figura 3. Representação esquemática da sinalização desempenhada pelo AT1R. Em vermelho representa o agonista total e em verde o agonista tendencioso. Adaptado de Costa-Neto, C. M.(2014).

1.3.1 Receptor AT1 e implicações patológicas

O AT1R está presente em diferentes células e tecidos, tais como: vasos sanguíneos, cérebro, rins, olhos, coração, placenta, pâncreas, gengiva e uretra. É extremamente importante para a manutenção da homeostasia corporal. Por isso, quando o SRA por algum motivo está em desequilíbrio e gera aumento ou diminuição da ativação do AT1R ou de outros componentes do sistema ele pode acelerar o progresso e o surgimento de diferentes patologias (FORRESTER *et al.*, 2018; HUNYADY; CATT, 2006b)(Figura 4).

A ativação do AT1R nas células componentes do sistema cardiovascular é fisiologicamente importante para a manutenção da resistência vascular e pelo aumento do débito cardíaco com efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos, fazendo

com que o coração acelere ou diminua o ritmo cardíaco quando necessário. Estudos mostram que em algumas patologias como hipertensão e arritmias cardíacas ocorre o aumento de produção de angiotensina local e consequente aumento da expressão do AT1R, por esse motivo os efeitos deletérios da ativação continuada da via da proteína Gαq promove danos ao sistema, tais como: hipertrofia, remodelação cardíaca, aumento da pressão arterial e apoptose de cardiomiócitos (SITARAMAYYA, 2010).

De fato, muitos tratamentos para doenças cardíacas visam interferir no SRA. A atuação pode ocorrer nas seguintes etapas do sistema: i) drogas que atuam na secreção da renina renal; ii) drogas que antagonizam a ação da renina; iii) drogas que inibem a conversão de angiotensina I em angiotensina II (inibidores de ECA); e iv) drogas que antagonizam o AT1R. Atualmente, os fármacos mais usados pela clínica médica são: os inibidores de ECA e antagonistas do AT1R, por serem de fácil administração e possuírem boa biodisponibilidade quando administrado por via oral (LOPATOWSKA *et al.*, 2018; OIGMAN; FRITSCH, 1998).

Medicamentos que promovem a inibição da ECA ou bloqueio do AT1R , podendo ser associados ou não com outras drogas como betabloqueadores, inibidores de canais de cálcio ou diuréticos, reduzem significativamente a taxa de mortalidade, já que: reduzem o índice de infarto do miocárdio, levam à regressão da hipertrofia vascular arterial e ventricular, promovem atenuação da vasoconstrição coronária mediada pelo sistema simpático, e atuam no controle da hipertensão e retardo da remodelação cardíaca. Além de promover aumento da expectativa de vida também promove uma melhora significativa na qualidade de vida. (KUMAGAI *et al.*, 2003; OIGMAN; FRITSCH, 1998).

Não só o sistema cardiovascular, mas também o sistema renal pode ser seriamente afetado pela hiperativação do AT1R. Muitos estudos mostraram que doenças renais como nefropatites, estenose da artéria renal, dano agudo renal e progressão para doença renal crônica, estão intimamente ligados ao desequilíbrio do SRA (SHARMA; ANDERS; GAIKWAD, 2019).

Inúmeras outras patologias mostraram ser iniciadas ou agravadas por meio do AT1R e a busca por drogas mais eficientes e com menores efeitos colaterais são uma real necessidade do mercado farmacêutico (Figura 4). Por isso, por mais que seja um receptor estudado há anos, ainda existe muito a ser descoberto, já que, dependendo do ligante, a sinalização desempenhada por este receptor pode ser completamente diferente daquela gerada pelo agonista endógeno, a AngII.

Figura 4. Panorama geral de patologias que foram relatadas o envolvimento do AT1R. Figura adaptada do site <https://www.targetvalidation.org/>.

1.3.1.2 Receptor AT1 e processos celulares relacionados ao desenvolvimento de doenças.

O AT1R por atuar em diversas vias de sinalização consegue através de sua ativação modular processos celulares diretamente ligados a morte e sobrevivência da célula (COSTA-NETO *et al.*, 2014; PANG *et al.*, 2017).

Por ser capaz de alterar a homeostasia celular, um desbalanço funcional deste receptor pode gerar inúmeros danos teciduais através de eventos como: autofagia e proteólise que são processos celulares catabólicos e essenciais para o desenvolvimento e diferenciação celular. Os substratos da autofagia são biomoléculas que vão desde proteínas e lipídios até organelas celulares e patógenos (FABREGAT *et al.*, 2018). Outro evento importante modulado pelo AT1R é apoptose, a morte celular controlada e programada. Tanto a autofagia quanto a apoptose são processos que estão intimamente ligados e contribuindo para o desenvolvimento e progressão de doenças, e compreender o mecanismo de regulação entre estes eventos é a chave para tratamentos de muitas delas (MONDACA-RUFF *et al.*, 2019).

Estudos mostraram que a AngII aumenta a formação de autofagossomos em células cardíacas em situações de estresse como hipertensão e isquemia. Acredita-se que diminuindo-se o fluxo autofágico por antagonizar o AT1R, seja um importante mecanismo para a manutenção da função cardíaca (CHENG *et al.*, 2018). Também já foi descrito o envolvimento de AT1R com doenças neurodegenerativas, como na progressão da doença de Parkinson onde acredita-se que a ativação excessiva do AT1R induza apoptose de células neurais dopaminérgicas através do processo de autofagia (GAO *et al.*, 2016).

1.4 Características farmacológicas dos ligantes usados no estudo

1.4.1 TRV027

O TRV027 (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-ProD-Ala-OH) é um ligante peptídico do AT1R, tendencioso para a via das β -arrestinas, descrito pela primeira vez por Violin e colaboradores em 2010 (KENAKIN, 2011; VIOLIN *et al.*, 2010). Tem como característica central a capacidade de antagonizar o acoplamento da proteína G, mas simultaneamente, estimular a sinalização mediada pelas β -arrestinas. Resultados *in vitro* e *in vivo* mostraram o potencial do TRV027 em aumentar a contratilidade dos cardiomiócitos e reduzir reversivelmente a pressão arterial preservando a função renal (FELKER *et al.*, 2015; PANG *et al.*, 2017). O estudo clínico foi realizado com doses crescentes de TRV027 para explorar sua tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica em voluntários saudáveis. Neste estudo, TRV027 foi seguro e bem tolerado, porém não foi efetivo no tratamento de insuficiência cardíaca aguda (FELKER *et al.*, 2015). Apesar de falhar no teste clínico, não significa que esse ligante seja desinteressante do ponto de vista farmacológico, já que possui alta afinidade pelo AT1R e tem capacidade de modificar a sinalização clássica desempenhada por este receptor sendo uma ótima ferramenta de estudo (FELKER *et al.*, 2015; M. GODIN; S.G. FERGUSON, 2012; SANTOS, G. A. *et al.*, 2015a).

1.4.2 Ang 1-7

A Ang1-7 é um componente do sistema renina-angiotensina e é descrito como um peptídeo farmacologicamente ativo antes de ser identificada como um ligante endógeno do receptor Mas (MasR, SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2003). Ao ativar o MasR, a Ang1-7 produz efeito vasodilatador, anti-angiogênico e anti-proliferativo em diversos órgãos. Até o momento foi relatado que a ativação do MasR pela Ang1-7 gera

aumento dos níveis de ácido araquidônico e ativa vias dependentes de Akt, porém não foi possível observar ativação de nenhuma proteína G conhecida, apenas alteração da atividade constitutiva de proteína Gq. Os efeitos da ativação do receptor Mas pela Ang 1-7 contrabalança os efeitos cardiovasculares negativos induzidos pela AngII via AT1R (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

Nosso grupo mostrou que a Ang 1-7 também se liga ao AT1R, com menor afinidade que a AngII, porém é tendencioso para a via das β -arrestinas e com fortes indícios de ser cardioprotetor, dessa forma se torna um bom ligante para compreender melhor os diferentes papéis desempenhados pelo AT1R (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

1.4.3 L162,313

O composto L162,313 foi o primeiro agonista não-peptídico para AT1R que, ao se ligar ao receptor, mimetiza os efeitos biológicos desencadeados pela AngII. Estudos mostraram que quando o L162,313 foi administrado via intravenosa em ratos promoveu aumento da pressão arterial e por tempos mais prolongados que ao aumento induzido pela administração de AngII (KIVLIGHN *et al.*, 1995).

Dados gerados em nosso laboratório sugerem que este composto, apesar de ter alta afinidade por AT1R, se comporta como agonista parcial para a via canônica do AT1R e produz efeitos biológicos semelhantes ao agonista referência. Isto sugere que, ao ativar o receptor, induz uma sinalização própria e potente já que fisiologicamente conseguiu produzir efeitos mais prolongados mesmo sendo um agonista parcial (KIVLIGHN *et al.*, 1995; PERLMAN *et al.*, 1995a).

1.5 Abordagem proteômica

O proteoma é um sistema multidimensional e altamente dinâmico, no qual cada proteína apresenta várias propriedades interconectadas, que conjuntamente representam o fenótipo de uma célula ou organismo. A medida precisa destas propriedades é algo particularmente desafiador devido à diversidade e dinâmica das proteínas. Com os avanços em espectrometria de massas (M.S.) voltada ao estudo de proteomas, várias medidas de abundância, localização celular, síntese/degradação e modificações pós-traducionais, começam a ser analisadas de maneira integrada, permitindo uma melhor compreensão de processos fisiológicos e celulares. (LARANCE; LAMOND, 2015). Especificamente, a localização subcelular de proteínas e o seu tráfego entre subcompartimentos representam fatores fundamentais para a correta função delas, pois a localização aberrante de proteínas contribui para a patogênese de diversas doenças humanas, entre elas o câncer (HUNG; LINK, 2011). Em várias situações, esta localização aberrante está associada à presença de modificações pós-traducionais e/ou de interações proteína-proteína não comuns. Portanto, o estudo proteômico multidimensional é uma ferramenta importante para a compreensão de mecanismos patogênicos (DRISSI; DUBOIS; BOISVERT, 2013).

Embora seja uma tecnologia com grande poder de análise, existem poucos estudos envolvendo o AT1R por essa abordagem, principalmente tendo como objetivo analisar variações de perfil proteômico e localização celular após a ativação do receptor por agonistas tendenciosos, parcial e total. Métodos proteômicos baseados em M.S. estão emergindo como estratégia bastante interessante para permitir tanto a quantificação da localização de proteínas dentro das células quanto a modulação da abundância delas. Através da integração de estudos proteômicos e moleculares foi

possível destacar a diversidade de sinalizações afetadas pela ativação do AT1R, usando diferentes ligantes para mapear e ressaltar como podem influenciar na fisiologia celular, bem como eventos celulares que podem ser modulados através dessas diferentes interações.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho foi analisar comparativamente a modulação do perfil proteômico total de células HEK393T expressando o AT1R frente a estímulo com ligantes que apresentam diferentes características farmacológicas. Além disso, acessar a translocação proteica por meio do enriquecimento de frações celulares após o estímulo deste receptor com a AngII.

2.2 Objetivos específicos:

- Análise do proteoma global do extrato de células HEK293T-hAT1 após 24hrs de tratamento com:
 - AngII (agonista balanceado);
 - TRV027 (agonista tendencioso para a via de β -arrestinas, Trevana Inc., USA);
 - Ang 1-7 (agonista endógeno e tendencioso para a via de β -arrestinas);
 - L162,313 (agonista parcial não peptídico).
- Identificar as principais proteínas com modulação diferencial, e apontar os principais eventos biológicos que estão inseridos por meio de análises de bioinformática;
- Validação do estudo por ensaios de *western blotting*;
- Quanto ao enriquecimento de proteínas de diferentes compartimentos celulares, tivemos como intuito iniciar o estudo através da padronização do fracionamento celular e analisar e interpretar os resultados para que possamos utilizar este método para o estudo de translocação de proteínas não só por AT1R, mas por diferentes GPCRs.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Culturas de células

As células HEK293T e HEK293T-ECO-PHOENIX foram cultivadas em DMEM High Glucose (Gibco) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco-origem América do Sul) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas de 150 cm².

3.2 Geração de linhagem estável HEK293T-hAT1

Para o estabelecimento da linhagem expressando estavelmente o AT1R humano (hAT1) utilizamos o método retroviral, que consistiu em duas etapas: i) subclonagem da sequência do receptor hAT1 fusionado a FLAG e a um peptídeo sinal na sua extremidade N-terminal no vetor PBABE-puro; ii) co-transfecção de células Hek293T, do sistema Eco Phoenix, com este construto na presença de um plasmídeo que expressa genes de proteínas da cápsula viral, utilizando-se com o reagente polietilenimina linear 25 kDa (Polysciences). As células foram semeadas previamente na placa de 100mm. ii) Após 48h da transfecção o sobrenadante das células transfectadas, o qual continha os vírus carreando a sequência do receptor de interesse, foi filtrado, acrescido de polybrene (4 µg/mL) e transferido para placas de 6 poços contendo células HEK293T semeadas em uma confluência de 50%. A placa foi centrifugada para facilitar a adesão dos vírus às células. Este processo foi repetido por mais duas vezes a cada 24h e, após a última infecção, deu-se início à seleção dos clones positivos com o antibiótico Puromicina (2 µg/mL, Sigma). Durante a seleção, as células foram diluídas e replaqueadas de forma a conter apenas uma célula por poço, obtendo assim diferentes clones.

3.3 Transfecção transiente

As células HEK293T foram soltas das garrafas de cultura usando-se Tripsina EDTA (Invitrogen). Elas foram contadas e semeadas em placas de 10 cm², de 6 ou de 96 poços, dependendo do experimento a ser realizado. Quando plaqueadas em placas de 10 cm foram utilizadas 6x10⁶ células/placa, em placas de 6 poços, 1x10⁶ células/poço e em placas de 96 poços, 40.000 células/poço. As células foram transfectadas com os vetores de interesse, utilizando o reagente polietilenimina linear 25 kDa (Polysciences). Após 48 horas, as células foram utilizadas para experimentação.

3.4 Validação funcional das linhagens expressando o receptor hAT1

3.4.1 Ensaio de *binding* com células inteiras.

Os ensaios de *binding* nas células HEK293-hAT1 foram realizados em paralelo com células HEK293T(controle). Foram plaqueadas 3,0x 10⁵ células por poço em placas de 24 poços previamente tratadas com uma solução de poli-L-lisina (0,1mg/mL em PBS), e lavadas com PBS. Após adição das células em meio DMEM suplementado, as placas foram incubadas na estufa até o dia seguinte, e imediatamente antes de ser iniciado o ensaio de *binding* foram lavadas brevemente com tampão de lavagem gelado (Tris-HCl 25mM, pH 7,4, NaCl 10mM, MgCl₂ 5mM, 0,1% albumina de soro bovino). Os experimentos de foram realizados em tampão de *binding* gelado (TrisHCl 25mM, pH 7,4, contendo MgCl₂ 5mM, albumina de soro bovino 0,1% (p/v), e bacitracina (Sigma) numa concentração final de 100 µg/mL) e iniciados com a adição do ligante marcado (3H-Ang II/poço) na presença de diferentes concentrações de ligante frio (AngII), em um volume final de reação de 525µL. Após a adição do ligante marcado (diluído no tampão de *binding*), as placas foram deixadas

por pelo menos 16 horas a 4°C. Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com tampão de lavagem gelado e foi adicionado em cada poço 200µL de tampão de lise (ureia 48%, detergente NONIDET P-40 2%, preparado em ácido acético 3M), após a transferência do lisado para os tubos de contagem foram adicionados mais 3 mL de líquido de cintilação para subsequente contagem radioativa em contador beta (Packard Tri-carb 2100TR). Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima de AngII radioativa, e através de cálculos de regressão não-linear realizados com o software GraphPad Prism 6 e foram calculados os valores de IC₅₀.

3.4.2 Ensaios de mobilização de Ca²⁺ intracelular

Os ensaios de cálcio com os diferentes clones expressando AT1 (HEK293-hAT1) foram feitos em paralelo com células HEK293T(controle). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com paredes pretas e fundo transparente (ViewPlate-96, PerkinElmer), pré-tratadas com poli-L-lisina (0,1mg/mL em PBS). A quantidade de célula cultivada na placa foi de 5 x 10⁴ células por poço em 50µL de meio DMEM sem fenol suplementado com 10% de SFB e estreptomicina/penicilina. No dia seguinte após o plaqueamento as células foram incubadas por 2 hora a 37°C com 50µL do indicador fluorescente (FLIPR®, FLIPR Calcium 6 Assay Kit, Molecular Devices) com probenecida (Sigma). A probenecida é um inibidor do transportador de ânions orgânicos dependentes de ATP e foi utilizado para inibir a extrusão do indicador fluorescente. Em seguida, as placas foram inseridas no leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices) e iniciou-se a mensuração de fluorescência após a excitação a 485nm e emissão a 525nm. As medidas foram feitas durante 90 segundos (uma medida a cada 2,0 segundos) e 25µL do agonista em concentrações crescentes foram injetados automaticamente pelo equipamento no tempo de 16 segundos. Alguns

experimentos foram realizados em presença de Losartan (antagonista do receptor AT1) na concentração de 10^{-5} M e com D9754 (antagonista de receptor de IP3) 10^{-4} M incubados 30 min, durante a incubação com o indicador fluorescente, FLIPR. Os dados obtidos foram apresentados em curvas concentração-resposta utilizando-se os valores de área sob a curva da resposta utilizando-se o programa GraphPad Prism (San Diego, CA).

3.5 Ensaio de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*)

Os ensaios de BRET foram realizados como descritos na literatura (CHAREST; TERRILLON; BOUVIER, 2005). Brevemente, células HEK293T transfectadas transientemente com o reagente polietilenimina linear 25 kDa (Polysciences) numa razão de PEI:DNA de 3:1. A quantidade total de DNA transfectado em cada placa foi ajustado com DNA de espermatozoides de salmão (Invitrogen). As células foram semeadas em placas de 96 poços brancas, tratadas com poli-L-lisina (0,1 mg/mL) e lavadas com PBS. Após 48 horas de transfecção, as células foram lavadas uma vez e incubadas em PBS a 37°C por 30 minutos. Estímulos com os agonistas de interesse foram realizados e foi então adicionado o substrato de interesse da enzima luciferase por 5 minutos. Para o BRET1 (quando o par de proteínas biossensoras utilizado foi RLucII e GFP, ou YFP), o substrato utilizado foi a celenterazina h (Biotium). As leituras foram realizadas no luminômetro de microplacas, Victor X Light (PerkinElmer), permitindo a integração sequencial dos sinais detectados nas janelas de 480 ± 20 e 530 ± 20 nm para BRET1. O sinal de BRET foi determinado pelo cálculo da razão da intensidade da luz emitida pela proteína fluorescente sobre a intensidade da luz emitida pela RLucII. Os valores foram corrigidos subtraindo-se o valor basal detectado quando RLucII foi expressa sozinha.

3.6. Ensaios de fosforilação de ERK1/2

Para realizar o ensaio de fosforilação de ERK1/2, as células HEK293T-hAT1 e HEK 293T(controle) foram semeadas em placas de 6 poços (10^6 células por poço) previamente tratadas com poli-L-lisina (0,1mg/mL em PBS) e crescidas em DMEM suplementado com SFB e estreptomicina/penicilina. Para o ensaio de ativação de ERK, as células foram privadas de SFB aproximadamente por 16 horas. No início do experimento, o meio de cultura foi aspirado e foram então adicionados 800 μ L de DMEM sem SFB em cada poço. Em seguida, foram realizados os estímulos com 800 μ L de DMEM sem SFB contendo AngII no dobro da concentração final nos tempos de 2, 5, 10 e 20 e 30 minutos a 37°C. No poço controle (ausência de estímulo) de cada placa foram adicionados 800 μ L de DMEM sem SFB e sem AngII. A concentração final de AngII utilizada para ativação foi de 100nM. Após a incubação com o agonista, as placas foram imediatamente colocadas em gelo. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 60 μ L de tampão de lise gelado (Tris-HCl 10mM, pH 7,5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, SDS 0.1%, Nonidet P-40 1%) acrescido do coquetel de inibidores de protease (Sigma fast TM Protease Inhibitor), e de inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio 1mM e fluoreto de sódio 10mM). O lisado celular foi recuperado, homogeneizado por 30 minutos a 4°C e centrifugado por 15min, a 4°C, a 13.000rpm. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford e 50 μ g de proteínas totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) e foi realizado *western blotting* (W.B.) utilizando anticorpos contra ERK total (tERK, Santa Cruz) na diluição de 1:2000 e ERK fosforilada (pERK, Santa Cruz) na diluição de 1:1000. As bandas foram reveladas utilizando o kit ECL Primer (GE) e o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi

utilizado para a quantificação densitométrica das bandas. Em seguida, os valores da razão (pERK/tERK) foram normalizados em relação ao controle e plotados utilizando-se o programa Graph-Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA).

3.7 Análise do perfil de ativação de kinases

Utilizou-se o *array* de quinases (R&D Systems Minneapolis, MN, EUA) como descrito por Santos *et al.*, 2015. Células HEK293T (6×10^6 células / poço) foram plaqueadas em placas de cultura de 10 cm^2). Após 24h as células foram privadas de soro durante 16h e depois estimuladas a 37°C com 100 nM de AngII, $1 \mu\text{M}$ de Ang1-7 ou 100nM de L162,313 como a concentração final durante 10 min. Subsequentemente, as células foram tratadas de acordo com as instruções do fabricante. As células foram enxaguadas e lisadas, utilizando o tampão de Lise 6 e depois o lisado foi misturado durante 30 min a 4°C . Depois disso, o homogenato foi centrifugação a $14.000 \times g$ durante 5 min a 4°C , e 600 μg de proteína total dos lisados foram incubados com um as respectivas membranas contidas no kit. Após o período de incubação, foram adicionados o Chemo Reagent Mix e o sinal quimioluminescente foi capturado pelo ImageQuant 350 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Para a análise do nível de fosforilação, as membranas foram digitalizadas e processadas usando o software ImageJ. As intensidades dos *spots* foram quantificadas e divididas pelos valores do controle e os resultados foram plotados em forma de *heatmap*.

3.8 Ensaio para análise de abundância proteica diferenciada de células HEK293T-hAT1 em diferentes tratamentos.

Figura 5: Esquema representativo da análise proteômica. A) As células foram incubadas com os diferentes tratamentos por 24 horas e as amostras foram preparadas e marcadas para análise no MS Orbitrap Fusion. **B)** Estrutura das diferentes moléculas presentes nos reagentes de marcação dos peptídeos contidos nas amostras.

Adaptado: www.thermofisher.com/order/catalog/product/90064

Células HEK 293T-hAT1 foram semeadas em placas de 15 cm². Assim que as células aderiram e adquiriram a morfologia ideal iniciamos o tratamento com as drogas nas seguintes concentrações: AngII (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA):100nM; TRV027 (sintetizado e gentilmente cedido pelo Prof.Eduardo Brandt): 100nM; Ang 1-7 (BACHEM) 1µM e L162,313 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): 100nM;). As drogas foram diluídas em meio Dmen sem soro fetal. Foram colocadas nas placas contendo as células e foram incubadas por 24hrs em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 24hr de incubação, o meio foi aspirado, as células foram lavadas 3x com PBS gelado, lisadas com Tampão de lise (uréia 8M e Tris 0,1M pH 8,5) acrescido do coquetel de inibidores de protease (Sigma fast TM Protease Inhibitor), e de inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio 1mM e fluoreto de sódio 10mM). Os lisados celulares foram recuperados, homogeneizados por 20" no vortex, 5' no ultrassom e incubado 5' no gelo, estes passos foram repetidos 3 vezes. Logo em seguida foram

centrifugados por 30', a 4°C, a 20.000 x g. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford e separadas para análise e armazenadas a -80°C.

3.8.1 Preparo das amostras para análise proteômica

As amostras celulares (100 ug cada) foram inicialmente reduzidas, pela adição de solução de Dithiothreitol (DTT) (Sigma) na proporção de 1:1 (massa de proteínas: massa de DTT) por 30' a 37°C. Em seguida, foi realizada a alquilação com de iodoacetamida (IAA) proporção 1:3 (massa de proteínas: massa de IAA) à temperatura ambiente por 30' no escuro.

As amostras foram então diluídas 5 vezes com solução de Tris 100mM, pH 8,5. Posteriormente, foi adicionada tripsina na proporção 1:25 (enzima: substrato) e a reação foi mantida overnight a 37°C. As amostras foram purificadas em colunas de extração de fase-reversa (Oasis – Waters), conforme instruções do fabricante, secas em Speedvac e reconstituídas em solução de 3% acetonitrila /0,1% ácido fórmico para análise.

Antes da análise as amostras foram marcadas isobaricamente com reagentes do Kit *Tandem Mass Tag™ 6-plex (TMTsixplex™)* (Thermo Scientific) que permitem a identificação de proteínas multiplexadas e análises quantitativas por espectrometria de massa em tandem. Estes reagentes contêm compostos isobáricos diferentes com a mesma massa e estrutura química composta por um grupo NHS-éster e amino reativo, e um braço espaçador. Dessa forma os reagentes permitiram que peptídeos diferentes preparados a partir uma mesma corrida de fossem identificados.

3.8.2. Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas

A mistura de peptídeos preparada conforme seção anterior, foi analisada pela Mass Spectrometry Facility do Fred Hutchinson Cancer Research Center, o espectrômetro de massas usado foi *Orbitrap Fusion* acoplado a um sistema de cromatografia UPLC (*Ultra Performance/Pressure Liquid Chromatography*). A amostra celular (após a marcação todos os lisados celulares foram misturados, tornando-se apenas uma amostra) foi corrida em triplicata em um gradiente de 3 horas. Os dados foram obtidos e analisados pelo programa *ProteomeDiscoverer 2.2* da *Thermo Scientific*, os resultados foram submetidos ao *Uniprot Human database* resultados foram filtrados para conter apenas ID's (código correspondente a proteínas e peptídeos) de peptídeos altamente confiantes. Diversos critérios de confiança estatística foram considerados para propor listas de proteínas diferencialmente abundantes nas amostras analisadas. De maneira geral, foram consideradas proteínas com pelo menos 3 peptídeos identificados e para os quais os dados de intensidade puderam ser obtidos para a análise quantitativa.

3.8.3 Critérios de análise utilizados para identificar proteínas diferencialmente moduladas entre os tratamentos.

Foram consideradas proteínas com abundância diferencialmente modulada após os tratamentos, aquelas que após o cálculo de *fold change* era superior ou inferior 30% para análise inicial. E para a validação por W.B. e melhor compreensão dos processos celulares que possam ser modulados ampliamos o range para 20%.

3.8.4 Western blotting para validação de alvos modulados identificados por M.S.

As amostras de extratos celulares foram obtidas segundo o que foi descrito na seção 3.8.1, quantificadas e aplicadas 100 µg de proteínas/ grupo em géis gradientes

(4%-15% Biorad). As bandas foram reveladas utilizando o kit ECL Primer (GE) e o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para a quantificação densitométrica das bandas. Em seguida, os valores da razão (pERK/tERK) foram normalizados em relação ao controle e plotados utilizando-se o programa Graph-Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA). Alguns alvos apresentam n=2, n=3 ou apenas um experimento realizado, indicado nos resultados. Abaixo está a lista de anticorpos usados no ensaio.

Tabela 1 Lista de anticorpos usados na validação dos dados obtidos por M.S

Proteínas identificadas pelo M.S	Isoformas Reconhecidas pelo anticorpo	Código/Marca
		#9212
p38 alfa	P38 α , β e γ	Cell Signalling
mTOR		Cell Signalling
Smad1		#2972
Smad 2	Smad 2 e 3	Cell Signalling
MARCKs		#D59D7
Sumo -2	Sumo 2/3	Cell Signalling
Fbx07		#D7X7
Galectin-1		Cell Signalling
GAPDH		#D88D11
LC3		Cell Signalling
ATG-7		#D4971
Cullin-2		Cell Signalling
		#D8I4
		#D6O8T
		Cell Signalling.
		#D16H11
		Cell Signalling.
		#2775
		Cell Signalling.
		#2631
		Sigma
		SAB4503362

3.9 Identificação de proteínas por espectrometria de massas em frações celulares enriquecidas.

3.9.1 Otimização do fracionamento subcelular

Células HEK293T-hAT1 foram semeadas em placas de 15 cm² (10⁸ células) para cada condição. Foram lavadas com PBS, tripsinizadas e lavadas mais 3x com PBS gelado. As células foram ressuspensas em tampão M (50 mM HEPES pH 7.4, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA acrescido de inibidor de proteases (Complete Mini, Roche Applied Science), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and 1 mM Na₄P₂O₇.10 dH₂O) e deixadas por 30' no gelo. Após esse tempo o extrato celular foi passado 20x em uma seringa de 1 mL com agulha 26G, e logo após no homogeneizador de tecido (IKAT10 basic) dentro de um becker com gelo. A amostra foi centrifugada por 30' a 500 x g 4 °C. Após a centrifugação o pellet 1 contém núcleo e células não rompidas, para continuar a preparação dessa fração, o foi ressuspenso em tampão N (8 M ureia e 4% Chaps) sonificado por 5', deixado no gelo por 5' e agitado vigorosamente por vinte segundos (3 vezes). Logo após o extrato foi centrifugado por mais 30' velocidade 20.000xg a 4°C, o sobrenadante 2 que continha a fração nuclear foi congelado. O sobrenadante 1 foi centrifugado a 16000 x g por 20'. O sobrenadante 3 continha a fração citoplasmática. O pellet 2 foi ressuspenso no Tampão A (25 mM 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid, 150 mM NaCl, pH 6.5] a amostra é combinada com igual volume do tampão A contendo 2% Triton X-100, e inibidores de fosfatase e

protease), deixado 1h no gelo sendo agitado vigorosamente por uns 20'' a cada 10 min. Após esse processo o pellet foi centrifugado a 16000 x g 20' a 4°C. No sobrenadante 4 continha a fração de membrana solúvel em triton (T.S). O pellet 3 foi lavado com o tampão A sem adição de triton, centrifugado a 16000xg por 20' a 4 °C. Em seguida o pellet foi ressuspenso em tampão B [10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 60 mM β -octylglucoside e inibidores de fosfatases e proteases] e deixado por 30' no gelo e min agitado vigorosamente por 20'' a cada 5' centrifugado 30' a 16.000 x g. O sobrenadante dessa última centrifugação continha a fração de *lipid raft* (T.I.) (Figura 6)

Figura 6: Esquema representativo do protocolo de otimização do fracionamento celular. Este protocolo permitiu fracionar células HEK293T-hAT1 em quatro subfrações: Núcleo (N), citosol (C), membrana solúvel em triton (T.S) e insolúvel (T.I).

3.9.2 Validação do fracionamento subcelular

Para comprovar a obtenção de frações subcelulares enriquecida foi feito WB com intuito de identificar marcadores: citoplasmático, nuclear e membranas nas diferentes frações. Foram usados os anticorpos contra GAPDH (Santa Cruz anti-mouse diluição 1:1.000) marcador citoplasmático, nucleofosmina (Millipore anti-mouse 1: 3500) marcador nuclear, Anti-Lyn (Cell.Signaling anti-rabbit 1:1.000) marcador de Lipid rafts; Anti-receptor de transferrina (BD anti-mouse 1:1.000).

3.9.3 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas após separação por SDS-PAGE

Células HEK293T-hAT1 estimuladas por AngII por 30 min/ controle, foram fracionadas em 4 subfrações: Núcleo (N), citosol (C), membrana solúvel (T.S) e *Lipid rafts* (membrana insolúvel (T.I.)). As amostras foram processadas, tripsinizadas, alquiladas e separadas em gel SDS-page antes de ser submetidas a análise do M.S no laboratório do Investigador Principal Pierre Thibault do Instituto IRIC- Université de Montréal. O gel foi corado com coomassie e cortado. A corrida das amostras foi feita individualmente por ~3h no M.S Eletrospray Q-ToF Synapt-G2 (Waters) acoplado a um sistema de cromatografia UPLC.

3.10 Análise estatística

Os dados foram analisados e submetidos ao teste de variância (ANOVA), e foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,01$.

3.11 Análise de bioinformática

Para integração de dados, análise de bioinformática de vias regulatórias, interações proteína-proteína e foram utilizados programas de domínio público como: String (<http://string-db.org/>) e reactome (reactome.org). Para correlacionar os tratamentos utilizou-se o Perseus e a ferramenta disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/> foi utilizada para confecção do diagrama de Venn.

A partir dos dados de identificação e quantificação das proteínas, foram realizadas análises de enriquecimento de classes funcionais, funções moleculares, compartimentos celulares e confecção de *heatmap* utilizando softwares disponíveis: Panther, Uniprot (uniprot.org) e MeV (mev.tm4.org).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Produção de linhagem celular com expressão estável do receptor AT₁ humano

A linhagem de HEK293T-hAT₁ foi produzida com o intuito de evitarmos o efeito da super-expressão e heterogeneidade nos níveis de expressão do receptor entre as células, causado pelo método da transfecção transiente, o que poderia interferir nos resultados da análise por M.S.

A sequência do receptor AT₁R humano (contendo a sequência de um peptídeo sinal para melhor expressão membranar seguido de uma sequência FLAG na extremidade N-terminal do receptor) foi subclonada em vetor pBABE-puro que confere resistência à puromicina para posterior seleção dos clones (Figura. 7).

Figura 7. Mapa do vetor pBABE-puro (Cell Biolabs, Inc.). As setas indicam os sítios de restrição utilizados para a clonagem unidirecional do receptor SP-FLAG-hAT₁.

A geração da linhagem estável e a seleção dos clones foram realizadas como descritos em Materiais e Métodos. Após isolamento e crescimento de possíveis clones, foram feitos ensaios funcionais para a escolha daquele com melhor janela de resposta. Os ensaios escolhidos foram: ensaios de mobilização de cálcio intracelular, *binding* por competição com ligante radioativo e ativação de ERK por W.B. Dos 3 clones selecionados, um deles (chamado de clone 4) apresentou a melhor janela de ativação nos ensaios de mobilização de cálcio após estímulo com AngII (Figura 8A). A inibição de tal resposta pelo antagonista seletivo do AT₁R, o losartan, e por um

bloqueador do receptor de IP3, D9754 (Figura 8B), confirmaram a especificidade da resposta pelo AT1R. Ensaios de *binding* também confirmaram a expressão membranar satisfatória do AT1R neste clone (Figura 8C), uma vez que células parentais utilizadas para geração do clone, não apresentaram ligação significativa de AngII radioativa. Ensaios de ativação de ERK apresentaram resultados condizentes com a sinalização via receptor AT1, já que houve ativação de ERK em tempos iniciais de incubação com o agonista (Figura 8D). Nossos resultados mostraram que a geração da linhagem HEK293T-hAT1 foi bem-sucedida, e, dessa forma, este clone foi escolhido para dar seguimento com os ensaios funcionais para a obtenção das amostras para subseqüentes análises proteômicas.

Ensaio de mobilização de cálcio intracelular

Figura 8. Validação dos clones estáveis selecionados quanto à expressão do receptor AT1 por mobilização de cálcio intracelular, binding e ativação de ERK. Curvas concentração-efeito de AngII em 3 clones selecionados e células não transfectadas como controle negativo (**A e B**). Medida da mobilização de cálcio nos 3 clones e em células não transfectadas na ausência e na presença de losartan, um antagonista seletivo do AT1R ou D9754, um inibidor de receptor de IP3 (**C**). Perfis de binding por competição para AngII contra [^3H] AngII no clone 4 e em células não transfectadas. Dados estão expressos como porcentagens do *binding* específico máximo do radioligante (**D**) Ensaio de cinética de ativação de ERK com AngII 100 nM com clone 4 e em paralelo com células não transfectadas. Cada ponto ou barra representa a média $\pm$ s.e.m. de 3 experimentos independentes.

4.2 Ativação do AT1R por Ang1-7 e L162,313

A escolha dos ligantes para o estudo proteômico levou em consideração os resultados obtidos em ensaios funcionais prévios, que são aqui mostrados.

4.2.1 Dados obtidos com a ativação por Ang 1-7.

Os ensaios funcionais comparando a Ang1-7 e a AngII no AT1R mostraram que a Ang1-7 se liga com menor afinidade, ~200nM, quando comparada à afinidade da AngII, ~1nM (Figura 9A). O ensaio de mobilização de cálcio (Figura 9C), mostrou que a Ang 1-7 não foi capaz de aumentar cálcio intracelular. O AT1R, quando ativado por Ang 1-7, perde a capacidade de ativar proteína Gq e Gi, (dados não mostrados) porém continua recrutando β -arrestina 2 (Figura 9B), e promovendo sua mudança conformacional (Figura 9D), porém com menor potência devido à menor afinidade de Ang1-7. Para complementação do estudo, foi feito o ensaio de ativação de ERK para mostrar que a Ang1-7 interage com AT1R, e que apesar de não mobilizar cálcio intracelular, promove a sinalização via β -arrestina, dado comprovado com o aumento de fosforilação de ERK após estímulo com Ang 1-7 (Figura 9E).

Figura 9. Ensaios funcionais comparativos entre AngII e Ang1-7 agindo sobre o AT1R. A) Ensaio de *binding* competitivo para Ang1-7 e [^3H] AngII em células HEK293T expressando AT1R transientemente. Resultado expresso em porcentagem do *binding* específico máximo para o radioligante. Cada ponto representa a média $\pm$ s.e.m. de pelo menos 3 experimentos independentes. **B) Ensaio de mobilização de cálcio intracelular** curva dose-resposta cada ponto representa a média $\pm$ s.e.m. de pelo menos 3 experimentos independentes. **C) Ensaio de recrutamento de β -arrestina 2 e D) Mudança conformacional.** Curvas Concentração-resposta para Ang1-7 e AngII foram geradas para avaliar a habilidade dos ligantes em induzir ativação de β -arrestina, avaliada por análise das mudanças conformacionais de ou β -arrestina2 Resultados são expressos como a diferença do sinal de BRET. **E) Ensaio de ativação de ERK** cinética da ativação de ERK os pontos representam a média $\pm$ s.e.m. de pelo menos 3 experimentos independentes. *As figuras B e C foram geradas pela Larissa de Bortoli Teixeira, e acrescentadas aqui para contextualização da escolha do ligante para desenvolver o estudo proteômico.

4.3 Dados obtidos com a ativação por L162,313 e TRV027

Os ensaios funcionais com o ligante não peptídico L162,313 corroboraram os da literatura quanto a ser um agonista parcial (PERLMAN *et al.*, 1995b). Os ensaios de cálcio, em comparação com AngII e com o agonista tendencioso TRV027, mostraram que ele possui menor potência para mobilizar cálcio intracelular, porém não se comporta como um bloqueador para essa via, como o TRV027, sendo importante ressaltar que na maior concentração testada este ligante possui eficácia próxima à da AngII.

Já quanto à capacidade de recrutar as β -arrestinas, ele manteve baixa eficiência e potência repetidas o comportamento visto no ensaio anterior, porém em doses acima de 100nM, o ligante L162,313 consegue estimular o aumento de cálcio intracelular. Por isso, se tornou uma interessante ferramenta de estudo.

Mobilização de cálcio

Recrutamento de β arrestina 1

Recrutamento de β -arrestina 2

Figura 10. Análise comparativa entre AngII, TRV027 e L162,313 agindo no receptor AT1 para induzir mobilização de cálcio intracelular e recrutamento de β -arrestinas. A) Curvas concentração-resposta para AngII, TRV 027 e L162,313 foram geradas para avaliar a capacidade de mobilização de cálcio, usando o KIT FLIPR-6. Os resultados foram normalizados pela ativação máxima de ANG II e apresentados em porcentagem. B) Curvas concentração-resposta para AngII, TRV027 e L162,313 foram geradas para avaliar a habilidade dos ligantes em induzir ativação de β arrestina foi monitorada por BRET. *As figuras foram geradas em conjunto com Diego Ângelo Duarte, e acrescentadas aqui para contextualização da escolha do ligante para desenvolver o estudo proteômico.

4.4 Perfil de ativação de quinases promovida pelo estímulo dos agonistas: Ang II, Ang 1-7, L162,313.

Para avaliar o perfil de sinalização desempenhado por Ang1-7 (1 μ M) e L162,313 (100nM), comparando com a AngII (100nM), foi feito o ensaio de perfil de array de quinases após o estímulo de células HEK293T-hAT1 com estes 3 ligantes. Dessa forma, foi possível avaliar e comparar de forma mais refinada as diferenças cascata-abaxio da sinalização induzidas por estes ligantes que apresentam perfis farmacológicos tão diferentes. Os pontos (*spots*) contidos nas membranas, que representam o grau de fosforilação de cada proteína de interesse, foram quantificados usando o software Image J, e os valores foram plotados como *heatmap* utilizando valores da razão entre intensidade em pixels dos spots tratados sobre os do controle (ver Tabela 1 para uma lista de todos os substratos de quinase incluídos no *array*). Após o cálculo de *fold change* (tratamento/ctrl), valores entre os intervalos ≥ 1.5 ou ≤ 0.5 , foram considerados como proteínas diferencialmente moduladas (SANTOS, G. A. *et al.*, 2015a) (Figura 11A e 11B). Após esta análise, identificamos 20 quinases que são diferencialmente reguladas por Ang 1-7 e L162,313. Os valores para cada proteína estão destacados na tabela suplementar 1(T.S1). Os resultados obtidos pelo estímulo com TRV027 foram plotados apenas para comparação com o resultado dos outros ligantes, pois já foi anteriormente publicados por nosso grupo (SANTOS, G. A. *et al.*, 2015b). Para validar os resultados obtidos com o *array*, analisamos por W.B os níveis de fosforilação de ERK1/2 (Figura 11C) pois, como mostrado anteriormente, este é um excelente parâmetro para a confirmação da ativação do AT1R tanto por AngII quanto por Ang 1-7 (Figura 9E). Com este resultado demos continuidade no estudo proteômico, pois estes ligantes se mostraram bem relevantes e apresentaram diferença de ativação condizentes com respostas celulares distintas.

Figura 11. Perfil de ativação de quinases promovidas pela estimulação do receptor com os ligantes AngII, Ang1-7 e L162,313. A) Este *heatmap* representa a razão de quantificação dos níveis de fosforilação do substrato de quinase após 10 min de estímulo em relação ao controle. O resultado é apresentado em escala logarítmica em base 2. **B)** Membranas do arranjo de quinases que foram quantificadas em destaque os spots correspondentes a pERK **C)** Ensaio de WB validando o nível de ativação de ERK detectado no ensaio de arranjo de quinases. **D)** Ativação promovida pelo TRV027 em células transfectadas transientemente. Fonte: Santos et al., 2015.

4.5 Identificação de proteínas por espectrometria de massas em extrato de células HEK293T-hAT1 estimuladas por: AngII, TRV027, Ang1-7 e L162,313.

Com o intuito de avaliar se agonistas tendenciosos e balanceados influenciam de forma diferente na expressão de proteínas celulares após a ativação do AT1R, tendo em vista que o *array* de quinases mostrou diferenças significativas de ativação com incubação dos ligantes em tempos curtos. Células HEK293T-hAT1 foram tratadas por 24 horas com diferentes ligantes: i) agonista balanceado: AngII (100nM), ii) agonistas tendenciosos: TRV027 (100nM) e Ang1-7 (1μM) iii) agonista parcial: L163,313 (100nM). Para determinar a concentração dos ligantes levamos em consideração a afinidade dos ligantes pelo receptor.

No estudo foram identificadas mais de 3.000 proteínas. A seleção das proteínas-alvos identificadas por M.S. obedeceu ao seguinte critério: i) identificação de no mínimo três peptídeos únicos de cada proteína; ii) proteínas com abundância diferencial de 30% após tratamento. Consideramos proteínas diferencialmente abundantes aquelas que apresentaram valor $p \leq 0,01$.

Dessa forma foi possível selecionar um grupo contendo 434 proteínas, que após o tratamento foram diferencialmente moduladas por pelo menos um dos tratamentos. Os dados foram agrupados e clusterizados pelo método euclidiano e plotados em forma de *heatmap* como mostrado nas Figuras 12 a 12A5, análise feita com ajuda do Alan Lorenzetti, aluno de doutorado do laboratório da Prof^a.Dr.Tie Koide.

A

12.A1

12.A2

12.A3

12.A4

12.A5

Figura12. Proteínas identificadas por M.S em extrato total de HEK293T-hAT1. O *heatmap* representa proteínas que tiveram no mínimo 3 peptídeos únicos identificados e que foram significativamente moduladas nos grupos tratados em relação ao grupo controle. O cladograma à esquerda representa a organização em “clusters” das proteínas. Os resultados são apresentados em escala logarítmica em base 2. **A)** Panorama geral do *heatmap*. Regiões amplificadas do *heatmap*. **A1 a A5)** Representam regiões do *heatmap*.

4.5.1 Classificação e distribuição de proteínas identificadas com abundância relativa modulada entre os tratamentos

Para melhor organizar os dados e entender quais proteínas tiveram aumento ou diminuição de abundância após pelo menos um tratamento, usamos o programa disponível gratuitamente, Panther (<http://pantherdb.org/>), que permitiu uma visualização de quais classes proteicas são afetadas, e quais funções que elas desempenham. Os resultados obtidos nos mostraram que o AT1R quando estimulado promove regulação da expressão de proteínas que desempenham principalmente funções catalítica e pertencem em sua grande maioria a classes de proteínas que se ligam ao DNA e promovem adesão celular (Figura 13A e 13B).

Figura 13. Classificação de proteínas identificadas com abundância relativa modulada. As proteínas que foram identificadas e classificadas como modulada positivamente ou negativamente nos tratamentos foram agrupadas quanto **A)** Funções moleculares, e **B)** A classe de proteínas que se encontram.

Usando o programa Perseus-MAXPLANCK (<http://www.perseus-framework.org>) programa que permite o tratamento dos dados e diferentes formas de visualizá-los. Dessa forma foi possível traçar um panorama correlacionando os diferentes tratamentos. Os gráficos comparam dois tratamentos por vez e representam a distribuição dos valores de *fold change* obtidos para cada proteína. Embora os perfis de modulação proteica induzidos pelos tratamentos sejam semelhantes, algo esperado pois agem pelo mesmo receptor, foi possível observar diferenças sutis tanto de diversidade proteica quanto de abundância delas (Figura 14A a 14C).

Figura 14. Correlação entre os diferentes tratamentos. As proteínas identificadas e com abundância modulada em relação ao controle foram plotadas em gráficos de correlação. Os gráficos representam a distribuição proteica levando em consideração o *fold change* dos tratamentos sobre o controle. usando o programa PERSEUS. **A)** AngII no eixo Y **B)** TRV027 no eixo Y **C)** Ang1-7 no eixo Y.

Com objetivo de agrupar as proteínas que tiveram o mesmo tipo de regulação após os tratamentos, foi plotado o diagrama de Venn separando proteínas que tiveram abundância *up* (Figura 15A) e *down* (Figura 15B) reguladas.

Dessa forma foi possível identificar 24 proteínas *up* e 13 *down* reguladas por todos os tratamentos. E separá-las de forma a identificar aquelas que são reguladas por apenas um dos tratamentos, a fim de correlacionar a regulação com envolvimento em processos celulares / vias de sinalizações que podem ser correlacionados.

Figura 15. Representação da modulação de abundância relativa proteica pelo Diagrama de Venn. A) Proteína com abundância relativa regulada positivamente. B) Proteína com abundância relativa regulada positivamente.

4.5.2 Vias de sinalizações mais relevantes que podem ser afetadas por proteínas que tiveram abundância relativa moduladas após tratamentos.

Para melhor visualizar como os tratamentos podem influenciar a sinalização celular, submeteu-se os dados obtidos após a análise proteômica ao programa

REACTOME (reactome.org), este programa permite visualizar quais vias de sinalização e quais processos biológicos são controlados por proteínas estudadas. Dessa forma destacamos as principais vias de sinalização (Figuras 16 a 23) que as proteínas que tiveram abundância modulada diferencialmente estão envolvidas. Os grupos analisados foram proteínas com abundância relativa moduladas por: i) todos os tratamentos (Figuras 16 e 17); ii) apenas por AngII (Figuras 18 e 19); iii) apenas TRV027 (Figuras 20 e 21); iv) apenas Ang 1-7 (Figura 22); vi) apenas L162,313 (Figura 23). As proteínas foram agrupadas através da tabela gerada após a confecção do diagrama de Venn (Tabela T.S2).

- Síntese, secreção e inativação de GPI;
- Síntese, secreção e inativação de GPI;
- Síntese, secreção e inativação de Incretina;
- Regulação de expressão de genes em células beta;
- Regulação de desenvolvimento de células betas;
- OAS resposta antiviral;
- Fosforilação de CREB e ativação da cascata de CAMKII/CAMKIV/CamMKK;
- CaMK-IV medeia fosforilação de CREB;
- Ativação de receptores NMDA e eventos pós sinápticos;
- Eventos induzidos por calmodulina;
- Sinalização via CaM;
- Biossíntese de coenzima A;
- Sinalização via DAG e IP3;
- Processamento de tRNA;
- Translocação de GLUT4 para membrana plasmática;
- Resposta a danos do DNA;
- Receptores de Neurotransmissores e pós sinápticos;
- Eventos mediados pela PLC beta;
- Eventos mediados por GPCR.

Figura 16. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância *up* reguladas por AngII, TRV027, Ang1-7 ou L162,313.

- Ativação de RSK;
- Eventos nucleares mediados por MAPK;
- Sinalização via interleucina;
- Sinalização de receptores neurotransmissores e pós sinápticos;
- Transporte de transcritos para o citoplasma;
- Interações através de neurofacinas;
- Fosforilação de CREB
- Tráfego de GluR2-contendo receptores AMPA;
- Sinalização através de axon;
- Processamento de RNA mensageiro;
- Proteína de reparo;
- TRAF6 induz NFkB e MAPK após ativação de TLR7/8 ou 9;
- Alvos ERK/MAPK;
- MyD88 sinalização iniciada na membrana plasmática;
- Vias de sinalização TLR5;
- Vias de sinalização TLR10;
- Tráfego de receptores AMPA;
- Ativação via HSF1.

Figura 17. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância *down* reguladas por AngII, TRV027, Ang1-7 ou L162,313.

- Sinalização via MAPK6/MAPK4;
- Metabolismo de serotonina;
- RUNX3 regula sinalização via WNT;
- Metilação do DNA;
- Cascata de sinalização da via das MAPKs;
- Ligação a TCF/LEF:CTNNB1 alvo de promotores;
- TFAP2 (AP-2) família regular transcrição de fatores do ciclo celular;
- Biossíntese de acyl-CoA;
- G2/M Checkpoints;
- CDT1 associação com o complexo CDC6: ORC;
- Formação de complexo transativando a beta-catenin: TCF;
- Formação do complexo contendo HIV-1 Tat;
- Elongação de transcritos de HIV-tat;
- RUNX regula transcritos de genes envolvido na diferenciação de HSCs;
- Incisão dual em TC-NER 2;
- Reciclagem de eIF2:GDP 1;
- Complexo B-WICH regulando positivamente a expressão de rRNA;
- Regulação da transcrição de small RNAs
- Orc1 originada da cromatina 2;
- Tat-medeia e elongação de transcritos do HIV-1;
- Transcrição e regulação de granulopoieses;
- Metabolismo intracelular de ácidos graxos regulando a secreção de insulina;

Figura 18. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância *up* reguladas por AngII,

- Clivagem de proteínas do citoesqueleto mediado por capases;
- Via de Sinalização pertencente a MPS IV- Síndrome de Morquio;
- Transporte de RNA mensageiro maduro;
- Transcritos da RNA polimerase II;
- Biogênese de vesícula lisossomal;
- Tráfego para membrana;
- Eventos Pre-transcricional da RNA;
- Tráfego COPI-independente retrógrado do Golgi para Retículo endoplasmático;
- Metaloprotease DUBs;
- Via de sinalização indutora de apoptose;
- Transporte mediado por vesícula;
- Deubiquitinação;
- Mucopolissacaridoses;
- Sinalização via mTOR;
- Ativação de RAC1;
- Degradação de queratano sulfato;
- Vesículas de brotamento do Golgi;
- Interações neurofacinas;
- Transporte de transcrito maduro para o citoplasmas;
- Formação do complexo de elongação de RNA Pol II;
- Degradação de RNA mensageiro por exoribonuclease 5'-3'.

Figura 19. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância *down* reguladas por AngII,

- Via de transcrição de receptor nuclear;
- Influxo e efluxo de íon;
- Transporte e metabolismo de biotina;
- Sinalização estimulada por estrógeno através PRKCZ;
- Expressão e processamento Pré-NOTCH;
- Transcrito de iniciação da RNA polimerase III do promotor tipo 1;
- Metabolismo de vitamina B5;
- Pré-NOTCH processado no Golgi;
- Class C/3 (Receptores metabotrópicos de glutamato / feromônio);
- Resposta celular a estímulos;
- Inibição do início da replicação de fatores; de danos do DNA por RB1/E2F1;
- Extensão do telomero;
- mRNA Capping;
- E2F mediando a regulação da replicação do DNA;
- Tráfego Intra-Golgi;
- Tráfego retrógrado Golgi para o retículo endoplasmático;
- Transporte de Íons por ATPases do tipo P;
- RAB geranilgeranilação;
- Receptor de hormônios esteróides estimulando HSP90.

Figura 20. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância *up* reguladas por TRV027.

- Via de transcrição de receptor nuclear;
- Interface de Influxo/efluxo de íon patógeno-hospedeiro;
- Transporte e metabolismo de biotina;
- Sinalização estimulado por estrógeno através de PRKCZ;
- Pré-NOTCH Expression and Processing
- Pré-NOTCH expressão e processamento;
- RNA polimerase III transcrição e iniciação vinda de promotor tipo 2;
- RNA polimerase III transcrição e iniciação vinda de promotor tipo 1;
- Metabolismo de Vitamina B5 (pantotenoato)
- Pré-NOTCH Processamento em Golgi ;
- Classe C/3 (Metabotropico receptores glutamato/fermorônio);
- HSP90 chaperona ciclo para receptores de hormônios esteroidais (SHR).
- Resposta a estímulo celular externo;
- RNA Polimerase III abortivo e retrativo de iniciação;
- Inibição da replicação e da iniciação de danos do DNA por RB1/E2F1;
- Telômero extensão por Telomerase;
- mRNA Capping;
- RNA Polimerase III -Transcrição
- E2F medeia regulação da replicação do DNA;
- Tráfego Intra-Golgi;
- Intra-Golgi e tráfego retrógrado Golgi-ER;
- Rev medeia exportação nuclear de RNA HIV;
- Transporte de por ATPases Tipo P;
- RAB geranilgeranolação;
- NRIFsinalização celular de morte do núcleo.

Figura 21. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância *down* reguladas por TRV027.

- Resposta celular ao estresse ;
- Resposta a estímulo externo;
- PKMTs metila lisinas em histonas;
- Regulação negativa de expressão de rRNA por SIRT1;
- Detoxificação de ROS;
- Regulação da expressão de TP53;
- Metilação do DNA;
- Regulação de HSF1-mediado por resposta celular ao stress;
- RNA Polimerase II Transcrição e terminação;
- Lipofagia;
- Metabolismo e transporte de biotina;
- Resposta celular a estresse;
- mRNA 3'- terminação e processamento;
- Regulação epigenética negativa da expressão rRNA;
- Degradação de cisteína e hemocisteína;
- Formação de xilose-5-fosfato;
- Metabolismo de aminoácidos com enxofre;
- SUMOilação de fatores de transcrição ;
- Interface de Influxo/efluxo de íon patógeno-hospedeiro;
- Ativação de expressão de genes por SREBF(SREBP);
- Fase de atenuação;
- Regulação de atividade transcricional por ade FOXO

Figura 22. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância up reguladas Ang1-7

- Modificações de tRNA no núcleo e citosol;
- Tráfego dependente de microtúbulo de conexons do Golgi to a membrana plasmática;
- Transporte de conexons para membrana plasmática;
- TYSND1 cliva proteínas perioxossomais;
- RNA polimerase III transcrição e iniciação vinda de promotor tipo 2;
- Via de salvamento de metionina;
- RNA polimerase III transcrição e iniciação vinda de promotor tipo 1;
- RNA Polimerase II Transcrição e terminação;
- *Prefoldin* mediado por transferência de substrato CCT/TriC;
- Proteína *folding*
- RHO GTPases Ativado por forminas;
- Montagem do cluster de ferro-enxofre citosólico;
- Resolução e coesão de cromátides irmãs;
- Mitose-Anáfase;
- COPI-medida transporte anterogrado;
- RHO GTPases activate IQGAPs
- RNA Polimerase III Abortivo e Retrativo Iniciação;
- Modificação pós-traducional Carboxiterminal de tubulina;
- Processamento de tRNA;
- Ativação não canônica de NOTCH3
- Mitótica- Prometáfase
- Separação de cromátides irmãs.

Figura 23. Vias de sinalizações moduladas pelo grupo de proteínas com abundância *up* reguladas por L162,313.

4.5.3 Validação dos dados de proteômica por *western blotting* e investigação de possíveis processos celulares alvos de estudo.

Para validar os resultados obtidos fizemos ensaios de W.B sem a intenção de escolher alvos de estudo. Assim a escolha das proteínas alvos não seguiu o ponto de corte estimulado anteriormente, de 30%. Para facilitar a validação foram usadas proteínas que tinham valores de *fold change* de no mínimo 20 %, descritas na tabela 2. Os anticorpos foram disponibilizados gentilmente pelos laboratórios dos professores: Victor Marcel Faça, Felipe Roberti Teixeira, Marcelo Damário e Ísis do Carmo Kettelhut. Os primeiros ensaios nos mostraram que as proteínas: Atg-7 (Figura 25D), Galectin-1 (Figura 25B), Fbox-7 (Figura 25E), mTOR (Figura 24B) e Cullin-2 (Figura 25C) corroboram com os dados obtidos pelo M.S. Já as proteínas: p38 (Figura 24A), smad 2/3 (Figura 24C) e sumo 2/3 (Figura 24D) não são facilmente correlacionados com os dados proteômicos, já que os anticorpos identificam mais de uma isoforma proteica diferentemente do ensaio desenvolvido no M.S. Já as proteínas Smad-1 (Figura 16F) e e Marcks (Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate- (Figura 25) não foi possível confirmar por W.B os resultados obtidos pelo M.S., é necessário aumentar o número de ensaios para confirmação dos dados. Os gráficos foram plotados no GraphPad Prism através de resultados obtidos da quantificação das imagens no programa ImageJ, normalizados pela quantificação do GAPDH e em seguida cada resultado obtido por tratamento foi dividido pelo resultado normalizado pelo controle.

Tabela 2. Proteínas alvos de validação por Western Blotting. Valores representam a razão entre tratamento/controle obtidos por ensaio de M.S.

Proteínas identificadas pelo M.S	Isoformas Reconhecidas pelo anticorpo	<i>Fold change</i> (Abundância proteica em tratamento/ abundância no controle)			
		Ang II	TRV027	Ang 1-7	L162,313
p38 alfa	P38 α , β e γ .	n.m	n.m	n.m	n.m
mTOR		n.m	0,742	n.m	n.m
Smad1		n.m	n.m	1,235	0,749
Smad 2	Smad 2 e 3.	0,773	n.m	0,798	0,687
MARCKs		n.m	n.m	0,792	n.m
Sumo -2	Sumo 2 e 3	0,773	n.m	0,798	0,687
Fbxo7		1,255	n.m	1,22	1,295
Galectin-1		n.m	0,754	n.m	n.m
ATG-7		1,371	1,365	1,258	1,313
Cullin-2		n.m	1.256	1,392	n.m

Figura 24. Abundância de proteínas após 24 horas de tratamento com diferentes ligantes do AT1R. Quantificação dos blots usando ImageJ normalizados pelo GAPDH, e depois dividido pelo valor basal do controle e blots referente as quantificações. **A) p38. B) mTOR. C) Smad 2/3. D) Sumo 2/3. E) Fbx-07. F) Smad-1.**

Figura 25. Abundância de proteínas após 24 horas de tratamento com diferentes ligantes do AT1R. Quantificação dos blots usando ImageJ normalizados pelo GAPDH, e depois dividido pelo valor basal do controle e blots referente as quantificações. **A) MARCKs B) Galectin-1 C) Cullin-2. D) ATG7.** #* Cada ponto ou barra representa a média $\pm$ s.e.m. de 2 experimentos independentes.

4.5.3.1 Processos celulares importantes desempenhados por proteínas com abundância relativa modulada pelos tratamentos

Durante a análise de dados, o número de proteínas que pertence a processos celulares, tais como: Apoptose, proteólise gerada pelo sistema Ubiquitina-Proteassoma e Autofagia tiveram sua abundância diferencialmente moduladas pelos tratamentos. Destacamos as mesmas com intuito de visualizar como podem influenciar na homeostasia celular, tendo em vista que são processos que estão diretamente relacionados com morte e sobrevivência celular, podendo ser correlacionados com progressão ou regressão de enfermidades em que o AT1R está envolvido. Para isso foi usado software String, ele permite identificar redes de interações entre grupo de proteínas. As figuras 26A e 26B mostram que as proteínas destacadas interagem diretamente entre si, reforçando a ideia de que diminuição ou aumento de abundância dessas proteínas podem induzir ou retardar os processos citados, e nas tabelas 3 e 4 estão destacadas funções importantes dessas proteínas nestes sistemas. Porém outros ensaios são necessários para melhor compreender como esses ligantes após estímulo do AT1R controlam esses eventos.

A

Apoptose

B

Ubiquitina-Proteassoma e Autofagia

Figura 26. Rede de interação das proteínas moduladas nos tratamentos e controle. O programa STRING foi utilizado para elucidar os tipos de interações existentes para o grupo de proteínas que foram moduladas. **Nós pequenos:** proteínas que não possuem estrutura 3D determinadas. **Nós grandes:** proteínas com estrutura 3D descritas ou preditas. **Interações verdadeiras:** descritas nos bancos de dados disponíveis; Interações determinadas experimentalmente; **Interações preditas:** genes vizinhos; genes de fusão. **Outras informações:** dados bibliográficos; Co expressão; proteínas homólogas. **A.** Apoptose **B.** Sistema Ubiquitina-Proteassoma e Autofagia.

Tabela 3 Proteínas envolvidas em morte celular programada - Apoptose. Estão representados os nomes das proteínas, *fold change* (tratamento/ctrl) e respectivas funções.

Proteínas	Código	AngII	TRV	Ang 1 -7	L162,313	Tipo de regulação
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial 1	AIFM1	1,24	n.m	n.m	n.m	
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial 1	AKT1S1	n.m	n.m	n.m	n.m	Negativa
BRCA1-associated ATM activator 1	BRAT1	n.m	1,29	n.m	1,25	
Caspase-6	CASP6	1,21	1,34	1,23	n.m	Alta expressão induz apoptose.
CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 HSF-27	CDK5RAP3	1,47	1,25	n.m	1,33	
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2	CYFIP2	1,29	n.m	1,26	1,26	
Death domain-associated protein 6	DAXX	1,50	1,26	1,42	1,28	
Death-inducer obliterator 1	DIDO1	n.m	0,67	n.m	n.m	
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	MAP2K4	n.m	n.m	n.m	1,20	
Golgi phosphoprotein 3	GOLPH3	1,23	1,24	n.m	1,22	Negativa
Niban-like protein 1	FAM129B	1,28	1,24	n.m	1,31	Negativa
Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit	RELA	1,22	n.m	1,25	n.m	
Peroxiredoxin-2	PRDX2	n.m	n.m	n.m	0,79	Negativa
PP2A subunit A isoform PR65-beta	PPP2R1B	1,35	1,27	1,32	1,34	Negativa
Serine/threonine-protein kinase Chk2	CHEK2	1,34	1,38	1,33	1,40	Regulador positivo em danos no DNA por p53
STE20-like kinase MST3	STK24	1,41	n.m	n.m	n.m	Regulador positivo
Thioredoxin domain-containing protein 12	TXNDC12	1,00	0,79	0,77	0,79	Regulador negativo
TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator	C12orf5	1,36	1,39	1,22	n.m	Regulador positivo

Tabela 4. Proteínas envolvidas em proteólise ubiquitina-proteassoma-dependente e autofagia.
Estão representados os nomes das proteínas, *fold change* (tratamento/ctrl) e respectivas funções.

Proteínas	Código	AngII	TRV	Ang 1 -7	L162,313	Tipo de regulação
COMM domain-containing protein 8	COMMD8	n.m	1,21	1,27	1,28	Down regulação de RELA
Cysteine protease ATG4B	ATG4B	1,26	n.m	n.m	1,25	Positiva para autofagia
E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1	MID1	0,81	0,73	n.m	0,78	Promove ubiquitinação
E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	1,34	1,21	n.m	1,25	Promove ubiquitinação
ELKL motif kinase 1	MARK2	n.m	n.m	0,75	0,60	positivo da mitocôndria
ESCRT-II complex subunit VPS36	VPS36	0,76	0,75	0,77	0,70	
F-box only protein 7	FBXO7	1,26	n.m	1,22	1,30	Promove ubiquitinação
Glycogen synthase kinase-3 alpha	GSK3A	1,41	1,37	1,24	1,34	Regulador positivo de autofagia e S-Ubq-proteassoma
High mobility group protein B1	HMGB1	n.m	n.m	n.m	0,79	Regulador positivo de autofagia
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2	MAP1LC3B2	n.m	n.m	1,21	1,24	Regulador positivo de autofagia
Proteasome activator complex subunit 4	PSME4	1,58	n.m	n.m	n.m	
Proteasome adapter and scaffold protein ECM29	KIAA0368	1,23	n.m	n.m	n.m	
Proteasome assembly chaperone 1	PSMG1	1,33	1,37	1,28	1,30	Regulador positivo de S Ubq-proteassoma
Protein DDI1 homolog 2	DDI2	n.m	1,21	1,23	1,32	
Ragulator complex protein LAMTOR3	LAMTOR3	1,21	1,21	n.m	1,36	
Rho-associated protein kinase 1	ROCK1	n.m	n.m	n.m	1,31	
RING-type E3 ubiquitin transferase UBR7	UBR7	1,58	1,38	1,35	1,44	
Serine/threonine-protein kinase mTOR	MTOR	n.m	0,74	n.m	n.m	Regulador negativo de autofagia
Small ubiquitin-related modifier 2	SRA1	0,77	n.m	0,80	0,69	Regulador positivo ubiquitina-proteassoma
TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator	C12orf5	1,36	1,39	1,22	n.m	Regulador negativo de autofagia; positivo de apoptose de músculo cardíaco
Ubiquitin-4	UBQLN4	n.m	n.m	n.m	1,20	Regulador positivo de autofagia
Ubiquitin conjugation factor E4 A	UBE4A	n.m	1,22	n.m	1,38	
Ubiquitin-binding protein p62	SQSTM1	0,80	n.m	n.m	n.m	Regulador positivo de autofagia
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1	UBE2Q1	n.m	1,23	1,25	n.m	Regulador negativo do S. Ubq-Proteassoma
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 R1	CDC34	1,28	1,30	n.m	1,40	

Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S	UBE2S	n.m	0,79	n.m	0,77	
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	ATG7	1,37	1,36	1,26	1,31	Regulador positivo de autofagia
Ubiquitin-like protein 5	UBL5	n.m	1,49	1,49	1,22	
UBX domain-containing protein 1	UBXN1	n.m	n.m	0,75	0,78	
UBX domain-containing protein 7	UBXN7	1,20	n.m	n.m	1,21	
Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	VPS16	1,22	1,34	1,51	1,24	Regulador positivo de autofagia
Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	VPS4B	n.m	n.m	n.m	1,22	Regulador positivo de autofagia e S.Ubq-proteassoma

Para inferir com propriedade que o processo de autofagia está realmente sendo modulado, usamos extratos de células HEK293T-hAT1 que foram tratadas da mesma maneira que para o ensaio de proteômica. Foi feito W.B para marcadores de autofagia: LC3II/LC3I (27A); ATG7 (Fig.27D); p62 (27B), pMTOR (27D) e Beclin (19C). A partir da mensuração da abundância dessas proteínas, foi possível inferir que esse processo celular foi modulado pelos tratamentos em relação ao grupo controle. Para determinar se o impacto sobre a autofagia gerado pelos tratamentos é positivo ou negativo é necessário fazer o ensaio de fluxo autofágico. O W.B. e os dados obtidos pelo M.S corroboram os da literatura, já que mostram o envolvimento do AT1R no processo autofágico ressaltando que a intensidade e direção dessa interferência pode ser dependente do ligante. (CHENG *et al.*, 2018; MONDACA-RUFF *et al.*, 2019).

Figura 27. Abundância de proteínas após 24 horas de tratamento com diferentes ligantes do AT1R, destacando marcadores de autofagia. Quantificação dos blots usando ImageJ normalizados pelo GAPDH, e depois dividido pelo valor basal do controle e blots referente as quantificações. **A) LC3II/LC3I. B) p62. C) Beclin. D) pMTOR.** # Cada ponto ou barra representa a média $\pm$ s.e.m. de 3 experimentos independentes. Blots em Anexo.

4.5.4 Abordagem proteômica no estudo do enriquecimento proteico em diferentes compartimentos celulares após ativação do AT1R.

Diversas abordagens já foram utilizadas para decifrar como a ativação do AT1R, seja pela AngII ou por outros ligantes, pode influenciar na sinalização e interferir

em processos celulares (GAO *et al.*, 2016; MONDACA-RUFF *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2017; ZHENG, L. *et al.*, 2015).

Através do fracionamento celular com protocolos que permitam a posterior análise proteica de diferentes frações celulares pelo M.S., é possível aumentar o espectro de proteínas alvos de estudos e correlacioná-las com possíveis eventos celulares, já que dependendo da localização, a função proteica pode ser alterada.

Com intuito de aprofundar o entendimento sobre o tráfego proteico entre diferentes compartimentos celulares, após ativação do AT1R, células HEK293T-hAT1 estimuladas com AngII 100 nM por 30 min foram separadas em frações: nuclear, citosólica, de membrana total e de *lipid rafts* (são pequenos microdomínios presentes na membrana celular que apresentam uma composição molecular diferente do resto da membrana plasmática que facilitam a transdução de sinal). Para isso, foi padronizado o fracionamento celular, e chegou-se a um protocolo efetivo comprovado por WB através do uso de marcadores confiáveis para o estudo destas regiões celulares, como indicado na Figura 28 A.

Após a confirmação do enriquecimento das subfrações, a mesma quantidade de proteína foi aplicada ao gel SDS-PAGE e as proteínas foram devidamente separadas por eletroforese como mostrado na Figura 28B), cortadas e analisadas por M.S.

Figura 28. Fracionamento celular e separação das proteínas por SDS-page. A. W.B validando o fracionamento celular. N (Núcleo), C (Citosol), T.S (Membrana solúvel), T.I (Membrana insolúvel). B. Gel referência corado para extração de bandas para análise M.S.

Após análise das 4 subfrações celulares, foi possível identificar 1300 proteínas que tiveram abundância relativa modulada em pelo menos uma das quatro frações. A localização subcelular das proteínas identificadas e os compartimentos celulares em que já foram encontradas foram obtidos na base de dados do UNIPROT (Tabela 5). Sendo algumas delas também identificadas no estudo proteômico de extrato total, dessa forma fica possível em estudos futuros correlacionar a translocação proteica com aumento ou diminuição de abundância após a ativação do receptor. Apesar de ser um estudo preliminar achamos importante destacar o reconhecimento de proteínas que estão intimamente relacionadas com a ativação de GPCRs, destacando o AT1R, tais como: ERK1/2, G gama 12 e 4, diferentes RAS, Rho e RABs, destacados na Figura 29 (ZHANG; WU, 2019).

Figura 29. Proteínas identificadas por M.S. nas frações subcelular. O *heat map* representa proteínas que tiveram no mínimo 3 peptídeos únicos identificados e que foram significativamente moduladas no grupo tratado (AngII), em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. Os resultados são apresentados em escala logarítmica em base 2.

Tabela 5. Proteínas moduladas e identificadas em subfrações celulares

ID	Proteína	Localização
Q3LXA3	(FAD-AMP lyase (cyclic FMN forming)) Triokinase	Citosol; Núcleo e Região extracelular
P09110	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	Peroxisomo
P84098	60S ribosomal protein L19	Citosol
P47914	60S ribosomal protein L29	Matriz mitocondrial
P27144	Adenylate kinase 4, mitochondrial (AK 4)	Matriz mitocondrial
P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Matriz mitocondrial
Q9NVT9	Armadillo repeat-containing protein 1	Núcleo;
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Mitocôndria
P04040	Catalase	Núcleo
Q13112	Chromatin assembly factor 1 subunit B	Núcleo
O75367	Core histone macro-H2A.1	Núcleo
Q9P1F3	Costars family protein ABRACL	
Q7Z7K0	COX assembly mitochondrial protein homolog	Mitocôndria
Q9Y3D0	Protein FAM96B)	Núcleo; Citoplasma; Citoesqueleto
Q9BW61	DET1- and DDB1-associated protein 1(PCIA-1)	Núcleo
O95071	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	Núcleo
P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Mitocôndria
P13807	Glycogen [starch] synthase, muscle	Citosol; membrana e corpos de inclusão
Q12849	G-rich sequence factor 1 (GRSF-1)	Mitocôndria e citosol
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	Núcleo e spliceossomos
Q6FI13	Histone H2A type 2-A (Histone H2A.2) (Histone H2A/o)	Núcleo
Q6YN16	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	Peroxisomo
Q8WZA9	Immunity-related GTPase family Q protein	
Q8IU81	RING-type E3 ubiquitin transferase IRF2BP1	Núcleo
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9)	Membrana; citosol e núcleo
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 (67 kDa cytokeratin)	Membrana
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 9	Membrana de retículo endoplasmático
O95983	Methyl-CpG-binding domain protein 3	Núcleo
P26645	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Membrana; citosol e citoesqueleto
O14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	Membrana Plasmática
Q16718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	Membrana; mitocôndria
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Membrana ; mitocôndria
Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1 (P1)	Núcleo
P20962	Parathyromosin	Núcleo
Q14318	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 (PPIase FKBP8)	Membrana; citosol e mitocôndria
O95456	Proteasome assembly chaperone 1 (PAC-1).	Retículo endoplasmático
O60888	Protein CutA	Membrana; exossomos; região extracelular
Q9C005	Protein dpy-30 homolog (Dpy-30-like protein)	Golgi e Núcleo
Q13045	Protein flightless-1 homolog	Junção celular; citosol; citoesqueleto e núcleo
Q9ULX3	RNA-binding protein NOB1	Núcleo
Q9H4L4	Sentrin-specific protease 3, (SUMO-1-specific protease 3) (Sentrin/SUMO-specific protease SENP3)	Citosol e núcleo
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6	Núcleo
P61956	Small ubiquitin-related modifier 2 (SUMO-2)	Núcleo
O60493	Sorting nexin-3 (Protein SDP3)	Endossomo
O15400	Syntaxin-7	Endossomo
O60784	Target of Myb protein 1	Citosol e membrana
Q15654	Thyroid receptor-interacting protein 6	Junção celular; citosol; citoesqueleto e núcleo
Q13144	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon	Citosol e núcleo
Q9NXH9	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase.	Núcleo
P09012	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	Núcleo
Q9UMX0	Ubiquilin-1	Núcleo; Citosol; Autofagossomo; Membrana
O95218	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	Núcleo
P08758	Annexin A5	
P08133	Annexin A6	Citoplasma, melanossoma
P20073	Annexin A7	
A0A024R5Z7	Annexin ANXA2	

B4DDZ4	Annexin	
Q2M2I8	AP2-associated protein kinase 1	Membrana celular;
P04637	Cellular tumor antigen p53	Citoplasma, retículo endoplasmático; núcleo; mitocôndria
Q92793	CREB-binding protein	Núcleo e citoplasma
Q9NZ23	Drug-sensitive protein 1	
Q96D09	G-protein coupled receptor-associated sorting protein 2	Núcleo; Citoplasma; citosol; envelope nuclear
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	Membrana celular; citosol
P01116	GTPase KRas	Ancorada na membrana Celular; membrana; citoplasma
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	Ancorada Membrana celular; membrana
P50150	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-4	Ancorada na membrana celular;
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	Citoplasma; secretada
P63085	Mitogen-activated protein kinase 1 (ERK2)	Citoplasma; núcleo; membrana e citoesqueleto
P27361	Mitogen-activated protein kinase 3 (ERK1)	Citoplasma; núcleo; membrana
O43318	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 TGF-beta-activated kinase 1	Membrana celular; citoplasma e membrana
O00151	PDZ and LIM domain protein 1	Citoesqueleto; citoplasma
O14908	PDZ domain-containing protein GIPC1	Citoplasma; membrana
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1-PARP1	Núcleo
O35129	Prohibitin-2	Membrana, núcleo ; mitocôndria
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Citoplasma ; membrana
P35241	Radixin	Membrana celular, citoplasma e citoesqueleto
Q6IAA8	Ragulator complex protein LAMTOR1	Endossomo; lisossomo; membrana celular; membrana
P46060	Ran GTPase-activating protein 1	Citoplasma; núcleo
Q6VN20	Ran-binding protein 10	Núcleo; citoplasma
Q96S59	Ran-binding protein 9	Núcleo; citoplasma e membrana
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	Núcleo; citoplasma.
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	Citoplasma ;núcleo
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	Citoplasma
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	Núcleo; citoplasma e membrana
P62491	Ras-related protein Rab-11A	Membrana celular; reciclagem; fagossomo
P61106	Ras-related protein Rab-14	Complexo de golgi; reciclagem; endossomo
P62820	Ras-related protein Rab-1A	Retículo endoplasmático; citosol; membrana; citosol
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	Citoplasma; membrana; ancorada a membrana; lado citoplasmático
P20339	Ras-related protein Rab-2A	Complexo de golgi; reciclagem; endossomo; retículo endoplasmático
P20339	Ras-related protein Rab-5A	Membrana celular; endossomo; citosol; fagossomo; endossomo
P61020	Ras-related protein Rab-5B	Membrana celular; endossomo;
P51148	Ras-related protein Rab-5C	Membrana celular; endossomo;
P20340	Ras-related protein Rab-6A	Complexo de Golgi
P51149	Ras-related protein Rab-7a	Fagossomo, lisossomo e endossomo.
P61224	Ras-related protein Rap-1b	Citosol; Junção celular; membrana celular.
P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Citosol.
P84095	Rho-related GTP-binding protein RhoG	Ancorada na membrana; membrana; lado do citoplasma.
Q96S44	TP53-regulating kinase	Citoplasma; núcleo
P08670	Vimentin	Citoplasma; citoesqueleto e matriz nuclear.

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

5. Discussão de Resultados

O SRA é responsável por manter a homeostasia corporal controlando principalmente a pressão arterial e o balanço hidroeletrolítico do sangue. Sendo o AT1R um dos principais efetores deste sistema, o desequilíbrio gerado pela super expressão e ativação deste receptor é responsável por desenvolvimento e progressão de diversas patologias (HUNYADY; CATT, 2006a). Por ter grande importância fisiológica e patológica desenvolveu-se durante este trabalho um estudo minucioso a respeito deste receptor através da análise proteômica global, a fim de observar pequenas variações de abundância proteica após estímulo com diferentes ligantes, e dessa forma poder inferir como um mesmo receptor (AT1R), em um mesmo modelo celular consegue interferir em processos celulares tão distintos, além de expandir o conhecimento sobre a translocação de proteínas entre diferentes compartimentos intracelulares e tentar correlacionar o que eventos iniciais da ativação do AT1R podem gerar a longo prazo na célula.

Para iniciar o estudo foi criada linhagem de HEK293T expressando estavelmente o AT1R, dessa forma o nível de expressão se manteve homogêneo e assim garantimos que os efeitos vistos após estímulo do receptor não eram dependentes do nível de expressão, e sim do ligante (Figura 8A a 8D).

Após a geração das células estáveis deu-se seguimento aos ensaios e foi feito uma análise proteômica comparativa do comportamento celular com ligantes que possuíam características farmacológicas diferentes e descritas abaixo para justificar a escolha deles.

A AngII é o ligante endógeno, agonista total e referência para o estudo desse receptor, além de ser o mediador fisiológico da resposta do AT1R no organismo.

Medicamentos que bloqueiam a interação AT1R-AngII juntamente com beta bloqueadores e diuréticos são as principais vias medicamentosas para o controle de doenças cardiovasculares (FELKER *et al.*, 2015; MONDACA-RUFF *et al.*, 2019);

O TRV027 é um agonista peptídico sintético derivado da estrutura da AngII e tendencioso para a via das β -arrestinas. Por isso é referência para o estudo de agonismo tendencioso no AT1R, já que possui afinidade semelhante à da AngII, diferentemente do SII, primeiro agonista tendencioso descrito para o AT1R (SANTOS, G. A. *et al.*, 2015b). A descoberta e a elucidação do mecanismo de ação mostraram o potencial efeito cardioprotetor e a possível reversão do quadro de insuficiência cardíaca aguda. Porém, durante os ensaios clínicos em pacientes que apresentavam este quadro, o TRV027 não promoveu nenhum dos benefícios anteriormente vistos em ensaios em *in vitro* e *in vivo* (informação descrita no site <https://www.trevena.com>) e (PANG *et al.*, 2017). Apesar de ter falhado no teste clínico, não significa que este ligante seja menos interessante já que o AT1R está envolvido em diversas patologias de progressão bem diferentes do desenvolvimento de insuficiência cardíaca aguda, ou seja esse ligante ainda é um potencial fármaco, e compreender como o AT1R age após a interação com o TRV027 pode ajudar a indicá-lo para tratamentos de outras patologias.

A Ang 1-7 é um peptídeo endógeno e conhecido por ser o ligante referência do MasR, porém foi descrito por nosso grupo e por Gales et 2016, que Ang 1-7 ao se ligar ao AT1R (Figura 9A) não ativa proteína Gq nem Gi e não promove mobilização de cálcio intracelular (Figura 9B), mas recruta e modifica a conformação da β -arrestina 2 (Figura 9C) e promove ativação de ERK1/2 (Figura 9D), comportando-se então, como um agonista tendencioso para a via de β -arrestinas. Além disso mostrou nos ensaios *in vivo* que possui potencial efeito cardioprotetor (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

Dessa forma tornou-se interessante investigar melhor como este ligante endógeno e tendencioso poderia modular a abundância proteica celular e correlacionar com eventos benéficos e maléficos da ativação do AT1R via Ang 1-7.

O ligante L162,313 foi o primeiro agonista não peptídico descrito para o AT1R, tem afinidade próxima a AngII porém é um agonista parcial (PERLMAN *et al.*, 1995b). Apesar de ter sido bastante estudado nos anos 90, as técnicas disponíveis atualmente permitem compreender melhor como AT1R se comporta frente a este agonista. Resultados preliminares mostraram que a ativação de Gq ou β -arrestina é dose-dependente, já que como mostrado na figura 10A a 10C com 1 μ M o ligante promove a liberação de cálcio, mas não promove o recrutamento de nenhuma das β -arrestinas, isso pode ser explicado pelo fato de ser um agonista parcial e o ensaio de mobilização de cálcio ser mais sensível, ou pode ser uma característica da molécula, sendo necessário fazer outros ensaios para confirmar.

Por fim para complementar informações acerca dos ligantes escolhidos foi feito o painel de ativação de quinases após 10 min de estímulo com AngII, Ang 1-7 e L162,313, dessa forma foi possível confirmar que os ligantes ativam vias de sinalizações distintas. Diante desse resultado não é possível inferir quais eventos celulares podem ser estimulados ou inibidos, porém tendo em vista que os principais eventos patológicos envolvendo o AT1R derivam da capacidade de induzir angiogênese, apoptose, proliferação celular, formação de tecido fibroso e processo inflamatório(FELKER *et al.*, 2015; GOGIRAJU *et al.*, 2015; LAL *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; ZHENG, L. *et al.*, 2015), o painel pode ajudar a entender o papel dessas vias nos eventos citados acima e utilizar os ligantes estudados como protótipos para o desenho e produção de novos fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares com menos efeitos colaterais. Por exemplo, é conhecido que

aumento da ativação de ERK1/2 e STAT3 estimulam a formação de tecido fibroso no coração enquanto (ZHENG, L. *et al.*, 2015; ZHENG, L. Y. *et al.*, 2014), a p53 promove apoptose de miócitos (GOGIRAJU *et al.*, 2015) esses eventos contribuem para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e fibrilação atrial. Estas proteínas foram reguladas positivamente nas células tratadas com Ang 1-7, L162,313 e TRV027, porém essa regulação ocorreu com amplitudes distintas. Em contrapartida, eNOS, que é uma proteína ativada em situações de estresse celular, quando regulada positivamente inibe a fosforilação de ERK 1/2 e pode promover a diminuição da remodelação cardíaca (NAGATA *et al.*, 2004) (Figura 11).

O estudo da abundância proteica global após o estímulo do AT1R permite ampliar o conhecimento e a compreensão sobre como este receptor gera tantos efeitos fisiológicos e patológicos. Além disso, nos permite identificar vias de sinalização e eventos celulares anteriormente não correlacionados à ativação de AT1R. Com esse objetivo deu-se início ao estudo de proteômica global, a fim de se analisar eventos tardios do estímulo deste receptor com ligantes que possuem propriedades farmacológicas distintas. Foram identificadas mais de 3.000 proteínas que apresentavam valores estatisticamente confiáveis. Identificamos 645 proteínas que tiveram modulação de abundância de no mínimo 20% e 434 com no mínimo 30% por pelo menos um dos tratamentos. O AT1R como se localiza em região transmembrana, é difícil de ser acessado, por isso não o identificamos em nossas análises (XIAO *et al.*, 2007). As proteínas mais afetadas foram as com funções de ligação e catalítica, muitas com capacidade de se ligar a ácidos nucleicos (Figura 12A), induzir transcrição e modular a expressão proteica (Figura 12B). Para a análise dos dados partiu-se do grupo de 434 proteínas, facilitando a visualização e interpretação dos resultados (Figuras 11A a 11E). A clusterização mostrou que células

tratadas com composto L162,313 e TRV027 apresentaram comportamento mais próximo entre si e a Ang 1-7 promoveu uma modulação mais diferenciada, porém mais próxima da AngII. É preciso ter em mente que a rede de interação de proteínas envolvidas nas diferentes vias de sinalização é altamente complexa, e que os agonistas tendenciosos para a via das β -arrestinas interferem na composição celular distintamente, dessa forma colocamos em evidência que o agonismo tendencioso. É importante ressaltar que os tratamentos foram feitos respeitando-se a afinidade de cada ligante e em paralelo no mesmo modelo celular, ou seja, o efeito final gerado não foi dependente da composição celular ou um evento temporal algo bastante discutido dentro do estudo deste fenômeno farmacológico (COSTA-NETO, C. M.; PARREIRAS-E-SILVA; BOUVIER, 2016), mas sim pela presença dos mesmos níveis do receptor AT1 na superfície celular e por sua ampla capacidade de sinalização. Por isso, ligantes com características farmacológicas semelhantes conseguem gerar eventos celulares tão distintos via a este receptor.

Após separar as proteínas com abundância *up*- ou *down*-reguladas (Figuras 15A e 15B) em grupos, permitiu-se destacar as principais vias de sinalização das quais participam (Figuras 16 a 23). Não foi o objetivo dessa análise inferir o resultado que estas modulações de abundância proteica podem gerar, mas sim, ilustrar semelhanças e diferenças na sinalização celular proporcionadas por estes ligantes a fim de reconhecer novos alvos moleculares e descrever eventos ainda não correlacionados à ativação do AT1R. Possibilitando no futuro que estudos complementares *in vitro* e *in vivo* possam correlacionar os eventos moleculares encontrados com os efeitos fisiológicos possibilitando o desenho e a produção de novos fármacos. Ao observar a figura 16 podemos ressaltar que os tratamentos tem como característica comum promover o aumento de abundância de proteínas

relacionadas às vias de ativação de proteína G e PLC, resposta a danos ao DNA e ativação de CREB, em contrapartida a diminuição na abundância de proteínas que promovem ativação de RISK, processamento de RNAm e ativação de HSF1 (Figuras 17). Já, em relação às vias que são únicas a cada tratamento, o que mais chamou a atenção foi como a diminuição na abundância de proteínas relacionadas a via de ativação de mTOR pela AngII (Figura 18) não resultou em menor ativação da mesma, já que a mTOR apresentou pelo ensaio de WB um aumento significativo de fosforilação, indicando que continua sendo ativada por AngII (Figura 28D), sugerindo algum mecanismo regulatório de retroalimentação. Outra informação importante foi o aumento da abundância de proteínas que promovem algum tipo de interferência nas vias de replicação do vírus HIV, pelo tratamento. Alguns testes clínicos estão sendo desenvolvidos usando os antagonistas do AT1R para reverter fibrose formada em tecidos linfoides, diminuir carga viral e resposta imune sistêmica em pacientes HIV positivo (mais informações ver site: <https://www.targetvalidation.org>).

Embora o ensaio de M.S ter sido feito com marcação TMT, algo que gera maior confiabilidade nos dados, é senso comum validar alguns resultados obtidos por W.B. Para a escolha dos alvos foi ampliado o ponto de corte para 20% de modulação diferencial, já que usou-se anticorpos contra proteínas já disponíveis no laboratório. Não era intenção a princípio identificar alvos moleculares relevantes, e sim confirma os dados obtidos pelo M.S. A diferença de sensibilidade e a capacidade dos anticorpos disponíveis de reconhecerem mais de uma isoforma impossibilitou a validação dos resultados obtidos para as proteínas: p38, Smad 2 e SUMO 2, já para as proteínas: Galectin-1, Cullin-2, ATG-7, MARCKs, Fbx07 e mTOR foi possível confirmar os dados obtidos pelo estudo proteômico.

Mesmo sem o objetivo inicial de desvendar quais os eventos celulares poderiam ser influenciados pelos ligantes, chamou a atenção o fato de muitas proteínas identificadas participarem de três processos em especial: Apoptose (Tabela 3), degradação de proteína via sistema ubiquitina-proteassoma e Autofagia (Tabela 4). A análise usando o software String permitiu confirmar que além de participarem desses eventos essas proteínas se interagem entre si (Figura 26A e 26B). Ensaios específicos como análise do fluxo autofágico, atividade do proteassoma e ensaio de apoptose são necessários para compreender o que a modificação do conteúdo proteico gerado pelo estímulo com os ligantes resulta de efeito final da célula.

Ao iniciar a investigação da autofagia constitutiva celular viu-se que proteínas intimamente ligadas a este processo apresentavam abundância diferencial, sendo que o principal marcador de autofagia LC3II e ATG7 tiveram abundância *up* regulada por todos os tratamentos, de forma mais expressiva pela Ang1-7. A Beclin-1 (BCN1) e p62 (SQTMS1) tiveram abundância *down*-reguladas, sendo que as células tratadas com os ligantes L162,313 e Ang1-7 promoveram maior impacto na expressão dessa proteínas. O balanço dessas modulações só pode ser concluída após o ensaio de fluxo autofágico, no qual se inibe a atividade lisossomal e pode-se observar se o aumento dessas proteínas geradas pela incubação com estes ligantes, é devido ao acúmulo no citosol pela inibição da autofagia ou aumento da expressão por causa da excessiva atividade autofágica (Figura 30) (ROJAS *et al.*, 2018).

Figura 30. Esquema ilustrando o fluxo autofágico e principais proteínas envolvidas. Representação do fluxo autofágico destacando principais estruturas e proteínas envolvidas no processo. Fonte: Rojas(2018).

Em situações de isquemia/reperfusão, insuficiência cardíaca, hipertrofia cardíaca, diabetes mellitus e arteriosclerose o fluxo autofágico se encontra elevado (Figura 31). No caso da isquemia/reperfusão acredita-se que é uma forma de adaptação protetiva, já que inibe apoptose pela degradação de mitocôndrias evitando a formação de ROS, drogas que inibem este processo induzem morte celular. Já no caso da insuficiência cardíaca, a magnitude da hipertrofia do musculo cardíaco está relacionado com a atividade autofágica, sendo neste caso uma adaptação negativa aumentando o remodelamento cardíaco e agravando o quadro de insuficiência cardíaca.

Figura 31. Reguladores de autofagia em cardiomiócitos Fonte: Rojas(2018).

Um fator importante que regula a função dos receptores é moléculas de sinalização e do próprio receptor, incluindo transportes de superfície celular anterógrada, endocitoses, reciclagens e degradações lisossomal. Estes fatores determinam a magnitude das respostas celulares induzidas pela ativação do receptor em um determinado momento. No entanto, em comparação com a internalização e reciclagem bem caracterizadas, os mecanismos moleculares subjacentes ao transporte da superfície celular de GPCRs e moléculas relacionados a essa sinalização são relativamente menos bem compreendidos (ZHANG; WU, 2019).

Após obter uma ampla visão sobre a sinalização desempenhada pelo AT1R via esses diferentes ligantes, e poder observar de forma isolada proteína por proteína nos perguntamos se a diferença no padrão de sinalização dos ligantes se daria pela modificação da expressão proteica ou pela realocação de proteínas para compartimentos antes incomuns a elas, dessa forma alterando o padrão de sinalização celular.

A fim de no futuro conseguir responder com propriedade a esta pergunta deu-se início ao estudo de proteínas enriquecidas no núcleo, citosol, *lipid rafts* e membrana total, a fim de identificar proteínas que se translocam para regiões antes não ocupadas por elas. O estudo inicial foi usado apenas o agonista referência do AT1R e o grupo controle, assim foi possível montar um panorama geral da movimentação ou aumento de abundância de proteínas nessas regiões celulares (ZHANG; WU, 2019). E em adição, estes alvos identificados podem se tornarem ferramentas para o desenvolvimento de novos biosensores que facilite o estudo de interação proteica. Apesar de não ter sido validado por WB, os dados obtidos são bem interessantes, pois mostram proteínas que são conhecidamente afetadas pela sinalização via GPCR sendo redirecionadas para outros compartimentos ou sendo degradadas, já que diminuem abundância em algumas subfrações e aumenta em outras. Proteínas responsáveis por controlar o tráfego intracelular como, as rabs, e transduzem sinal após ativação de GPCRs, como GTPases e ERK1/2, são exemplos de movimentação proteica geradas por esta ativação (MEBRATU; TESFAIGZI, 2009; STENMARK, 2009). Interessante ressaltar que após ativação do AT1R pela AngII, a ERK1/2 ativada por proteína G é translocada para o núcleo ativa diferentes fatores de crescimento e vias de sobrevivência celular, o ensaio proteômico mostrou esse aumento significativo de ERK2 (Mitogen-activated protein kinase 1) nesta subfração (MEBRATU; TESFAIGZI, 2009; YAN *et al.*, 2018). Este movimento ocorre após a ativação de proteína G evidenciando que esse tipo de análise pode ser efetivo para visualizar o movimento proteico após o estímulo de receptores de membrana (MEBRATU; TESFAIGZI, 2009) (Figura 32).

Figura 32 Localização de ERK1/2 após ativação de GPCRs. (Fonte :Mebratu and Tesfaigzi, (2009))

Dessa forma este amplo estudo usando diversas abordagens desde a escolha dos ligantes com diferentes características farmacológicas até o monitoramento de proteínas enriquecidas em diferentes subfrações, permitiu a descrição de eventos celulares e vias de sinalização intimamente ligadas a ativação do AT1R. Este estudo enriquece significativamente o conhecimento a respeito do AT1R permitindo no futuro correlacionar eventos celulares microscópicos, como o tráfego proteico a eventos fisiológicos mais complexos e direcionar o desenvolvimento de novos fármacos.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

O estudo da abundância proteica global após o estímulo do AT1R usando ligantes com diferentes perfis farmacológicos permitiu ampliarmos o conhecimento e a compreensão sobre como este receptor quando ativado pode gerar tantos efeitos fisiológicos e patológicos. Nos permitiu identificar vias de sinalização que são afetadas por todos os ligantes e vias celulares que são unicamente influenciadas por cada ligante. Além disso, a atividade autofágica e a apoptose, que estão diretamente relacionados com a ativação do AT1R, podem ser reguladas pelos ligantes com intensidades distintas. Outros ensaios são necessários para confirmar se estes ligantes induzem ou inibem estes eventos.

Para finalizar, iniciamos o estudo do tráfego proteico após o estímulo do AT1R, apresentando resultados promissores para o uso de análise proteômica em frações subcelulares para o estudo de translocação proteica após o estímulo de GPCRs, a fim de tornar possível correlacionar eventos macroscópicos celulares disparados por esta família de receptores com a localização e função de algumas proteínas.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- CASSIER, E. *et al.* Phosphorylation of b-arrestin2 at Thr 383 by MEK underlies β -arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *eLife*, 2017.
- CHAREST, P. G.; TERRILLON, S.; BOUVIER, M. Monitoring agonist-promoted conformational changes of β -arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Reports*, 2005.
- CHENG, Z. *et al.* Mst1 knockout enhances cardiomyocyte autophagic flux to alleviate angiotensin II-induced cardiac injury independent of angiotensin II receptors. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2018.
- COSTA-NETO, C. M.; PARREIRAS-E-SILVA, L. T.; BOUVIER, M. A Pluridimensional View of Biased Agonism. *Molecular Pharmacology*, 2016.
- COSTA-NETO, CLAUDIO M. *et al.* Non-canonical signalling and roles of the vasoactive peptides angiotensins and kinins. *Clinical Science*, 2014.
- DEWIRE, S. M. *et al.* β -Arrestins and Cell Signaling. *Annual Review of Physiology*, 2007.
- DRISSI, R.; DUBOIS, M. L.; BOISVERT, F. M. Proteomics methods for subcellular proteome analysis. *FEBS Journal*, 2013.
- FABREGAT, A. *et al.* Reactome graph database: Efficient access to complex pathway data. *PLoS Computational Biology*, 2018.
- FELKER, G. M. *et al.* Heart Failure Therapeutics on the Basis of a Biased Ligand of the Angiotensin-2 Type 1 Receptor. *JACC: Heart Failure*, 2015.
- FORRESTER, S. J. *et al.* Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 2018.
- FREISSMUTH, M.; CASEY, P. J.; GILMAN, A. G. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *The FASEB Journal*, 2018.
- FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. *Renin-angiotensin system revisited. Journal of Internal Medicine.* [S.l: s.n.] , 2008

GAO, Q. *et al.* Activation of Autophagy Contributes to the Angiotensin II-Triggered Apoptosis in a Dopaminergic Neuronal Cell Line. *Molecular Neurobiology*, 2016.

GILCHRIST, A.; MAZZONI, M. R. Traditional GPCR pharmacology and beyond. *Signal Transduction: Pathways, Mechanisms and Diseases*. [S.l: s.n.], 2010. .

GOETZL, E. J. Diverse pathways for nuclear signaling by G protein-coupled receptors and their ligands. *The FASEB Journal*, 2006.

GOGIRAJU, R. *et al.* Endothelial p53 deletion improves angiogenesis and prevents cardiac fibrosis and heart failure induced by pressure overload in mice. *Journal of the American Heart Association*, 2015.

GUREVICH, V. V.; GUREVICH, E. V. *GPCRs and Signal Transducers: Interaction Stoichiometry. Trends in Pharmacological Sciences*. [S.l: s.n.], , 2018

HAUSER, A. S. *et al.* Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017.

HUNG, M.-C.; LINK, W. Protein localization in disease and therapy. *Journal of Cell Science*, 2011.

HUNYADY, L.; CATT, K. J. Pleiotropic AT₁ Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Molecular Endocrinology*, 2006a.

HUNYADY, L.; CATT, K. J. Pleiotropic AT₁ Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 5, p. 953–970, 2006b.

IRANNEJAD, R. *et al.* Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*, 2013.

KATRITCH, V.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2013.

KENAKIN, T. Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011.

KHAN, S. M. *et al.* The Expanding Roles of G Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacological Reviews*, 2013.

KIVLIGHN, S. D. *et al.* Discovery of L-162,313: a nonpeptide that mimics the biological actions of angiotensin II. *The American journal of physiology*, 1995.

KUMAGAI, K. *et al.* Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003.

LAL, H. *et al.* *The GSK-3 family as therapeutic target for myocardial diseases. Circulation Research.* [S.l: s.n.], 2015

LARANCE, M.; LAMOND, A. I. *Multidimensional proteomics for cell biology. Nature Reviews Molecular Cell Biology.* [S.l: s.n.], 2015

LIMA, V. *et al.* Non-canonical signalling and roles of the vasoactive peptides angiotensins and kinins. *Clinical Science*, 2014.

LOPATOWSKA, P. *et al.* *Adhering to the principles of clinical pharmacology - the correct fixed combinations of antihypertensive drugs. Expert Review of Clinical Pharmacology.* [S.l: s.n.], 2018

M. GODIN, C.; S.G. FERGUSON, S. Biased Agonism of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2012.

MEBRATU, Y.; TESFAIGZI, Y. *How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer? Cell Cycle.* [S.l: s.n.], 2009

MONDACA-RUFF, D. *et al.* Angiotensin II-regulated autophagy is required for vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Frontiers in Pharmacology*, 2019.

NAGATA, D. *et al.* AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 2004.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M. Drogas que intervêm no sistema renina-angiotensina. *HiperAtivo: Departamentos Brasileiro de Cardiologia*, 1998.

PANG, P. S. *et al.* Biased ligand of the angiotensin II type 1 receptor in patients with acute heart failure: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIB, dose ranging trial (BLAST-AHF). *European Heart Journal*, 2017.

PERLMAN, S. *et al.* Non-peptide angiotensin agonist: Functional and molecular interaction with the

AT1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1995a.

PERLMAN, S. *et al.* Non-peptide angiotensin agonist: Functional and molecular interaction with the AT1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 1995b.

ROJAS, M. K. *et al.* Autophagy. *Apoptosis and Beyond: The Many Ways Cells Die*. [S.l: s.n.], 2018. .

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G. F.; KOBILKA, B. K. *The structure and function of G-protein-coupled receptors*. *Nature*. [S.l: s.n.], 2009

S.J., F. *et al.* Angiotensin II signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 2018.

SANTOS, G. A. *et al.* Comparative analyses of downstream signal transduction targets modulated after activation of the AT₁ receptor by two β -arrestin-biased agonists. *Frontiers in Pharmacology*, 2015a.

SANTOS, G. A. *et al.* Comparative analyses of downstream signal transduction targets modulated after activation of the AT₁ receptor by two β -arrestin-biased agonists. *Frontiers in Pharmacology*, 2015b.

SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003.

SHARMA, N.; ANDERS, H. J.; GAIKWAD, A. B. *Fiend and friend in the renin angiotensin system: An insight on acute kidney injury*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. [S.l: s.n.], 2019

SITARAMAYYA, A. *Signal transduction: Pathways, mechanisms and diseases*. [S.l: s.n.], 2010.

SPARKS, M. A. *et al.* Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, 2014.

STENMARK, H. *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l: s.n.], 2009

TEIXEIRA, L. B. *et al.* Ang-(1-7) is an endogenous β -arrestin-biased agonist of the AT₁ receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Scientific Reports*, 2017.

VIOLIN, J. D. *et al.* Selectively Engaging β -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces

Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2010.

WANG, W. *et al.* Telmisartan reduces atrial arrhythmia susceptibility through the regulation of RAS–ERK and PI3K–Akt–eNOS pathways in spontaneously hypertensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2015.

WITHEROW, D. *et al.* beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2004.

XIAO, K. *et al.* Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007.

YAN, J. *et al.* The stress kinase JNK regulates gap junction Cx43 gene expression and promotes atrial fibrillation in the aged heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2018.

YIM, Y. Y. *et al.* The in vivo specificity of synaptic Gβ and Gγ subunits to the α 2a adrenergic receptor at CNS synapses. *Scientific Reports*, 2019.

ZHANG, M.; WU, G. *Mechanisms of the anterograde trafficking of GPCRs: Regulation of AT1R transport by interacting proteins and motifs. Traffic*. [S.l: s.n.]. , 2019

ZHENG, L. *et al.* Angiotensin ii in atrial structural remodeling: The role of ang II/JAK/STAT3 signaling pathway. *American Journal of Translational Research*, 2015.

ZHENG, L. Y. *et al.* Effect of Angiotensin II on STAT3 mediated atrial structural remodeling. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2014.

8.0 Anexos

T.S1 Quantificação do array de quinases fosforiladas. Valores representam a razão entre tratamento/controle.

Kinases	AngII/Ctrl	Ang1-7/Ctrl	L162,313/Ctrl
Akt 1/2/3 (S473)	1,83	2,40	1,53
Akt1/2/3 (T308)	2,11	3,17	2,33
AMPK alfa 2	1,22	2,10	1,56
AMPK alfa1(T183)	0,98	1,82	0,90
Beta-Catenin	1,55	2,88	2,14
Chk-2(T68)	1,26	1,53	1,74
c-Jun(S63)	3,24	4,54	4,82
CREB(S133)	3,45	1,84	1,68
EGFR (Y1086)	0,75	2,03	1,11
eNOs(S1177)	3,14	4,05	5,37
ERK1/2	2,31	2,69	0,94
FAK(Y397)	0,96	1,13	1,24
Fgr(Y412)	0,23	0,79	0,66
Fyn(Y420)	0,79	1,46	1,67
GSK-3 alfa/beta (S21/S9)	1,75	2,42	1,56
Hck(Y411)	1,34	1,43	1,73
HSP27(S78/S82)	0,70	1,96	1,20
HSP60	3,18	3,36	3,44
JNK1/2/3	1,26	2,06	1,00
Lck(Y397)	0,60	1,52	1,08
Lyn(Y394)	0,87	1,45	1,37
MSK 1/2(S376/S360)	1,06	2,31	1,06
p27(T198)	6,89	2,93	3,59
p38 alfa(T180/Y182)	0,46	1,70	0,62
p53 S392	1,97	3,00	1,82
p53(S15)	1,95	3,30	2,51
p53(S46)	2,43	2,83	2,61
p70S6 kinase(T389)	2,14	2,60	2,22
p70S6 Kinase (T421/S424)	2,64	3,16	2,88
PDGF R beta (Y751)	1,00	2,47	2,18
PLC-gamma1(Y783)	3,17	3,52	4,72
PRAS40 (t246)	1,70	1,17	1,60
Pyk2 (Y402)	3,03	3,00	3,87
RSK 1/2/3(S380)	1,90	2,63	2,59
Src(Y419)	0,99	1,58	1,40
STAT2(Y689)	1,32	2,49	1,95
STAT3(S727)	3,16	2,47	2,98
STAT3(Y705)	2,11	2,17	2,54
STAT5 a/b (Y699)	1,58	3,96	2,92
STAT5a	1,24	3,47	2,66
STAT5a(Y699)	1,37	3,66	3,17
STAT6(Y641)	1,41	2,41	2,09
TOR(S2448)	0,76	1,57	1,40
WNK1(T60)	2,08	2,71	2,51
Yes(Y426)	1,10	1,30	1,50

T.S 2 .Proteínas separadas em grupos pelo Diagrama de veen

Tratamentos	Total	Proteínas (UNIPROT ID)
Ang 1-7, Ang II L163,313 e TRV027	24	A0A0A0MQR2 Q6L8Q7 Q7L2Z9 Q96S55 Q15642 P07910 Q13057 Q9NVT9 Q8N806 P41214 Q5TOR9 P54619 B5ME97 P50552 O96017 Q96KP1 Q9NXH9 Q9NWT1 Q9C005 O00469 Q9UKZ1 H3BM91 Q8N8N7 Q9UEW8
Ang 1-7, Ang II e TRV027	8	P49916 H0Y3L9 Q12800 Q9BXY0 P28331 Q9BPY3 Q8ND90 Q86TU7
AngII, L163,313 e TRV027	30	Q96EY1 Q9NX74 O95456 Q6YN16 Q9UFC0 Q8IW35 I3L4N8 O75155 O14802 Q8IVM0 A0A0A0MRL7 Q9NWT6 J3KPP4 P49840 Q8NB90 P11388 O75367 Q8NEM2 Q92882 Q14676 Q7Z7K0 A0A2R8Y2A8 Q86WQ0 P20226 O95352 Q16718 Q8NCG7 Q15650 Q01433 E7ESZ7
Ang 1-7, Ang II e L163,313	16	Q9UJY5 P30154 Q7Z6E9 Q6UN15 Q9BQJ3 Q8IX18 Q86W56 Q9UPY3 O75818 Q9NV35 H3BP13 Q92995 Q9NRW7 Q96C23 Q96K76 Q5SRE5
Ang 1-7, L163,313 e TRV027	11	O95059 J3QQJ0 O14893 E9PN70 H0YH80 Q9NPQ8 Q5HYI8 Q9BS18 P38432 Q07960 Q9NR33
Ang II e TRV027	19	Q8TDQ7 Q8TBF4 P04040 Q15833 Q14318 Q9BU76 P13674 K7EK56 Q16795 Q9NQ88 Q9BTY2 P13807 Q9BT73 P82933 P61764 Q0VDG4 O60231 Q68CZ6 O00116
Ang 1-7 e Ang II	8	Q9GZZ9 Q96CS2 Q9NR50 O14530 Q9UER7 P09543 E9PES4 Q14353
Ang II e L163,313	26	G3V0E4 O60568 O95487 Q9UN36 E9PN81 Q99575 C9J6U3 P16383 M0R2Z9 Q96JB5 P36776 O15116 Q8NCE2 P62879 Q9NWW4 Q7L2E3 B8ZZ87 O43795 A0A0B4J1R7 Q6FI13 Q9UHD9 O14656 Q00536 O60784 Q13112 Q6P158
Ang 1-7 e TRV027	11	Q3ZCM7 A0A087WWM0 A0A087WZK0 Q9H269 P62699 Q9Y605 Q14558 Q9BZL1 A0A087WZN1 E5RJF8 O00186
L163,313 e TRV027	28	Q9UQ13 Q9HCG8 Q0VDF9 Q969G3 A2A2Q9 Q8WXC6 Q16787 O60493 Q9Y4P8 O75506 Q9Y4R8 P30084 P49427 Q12962 A0A0U1RRB6 F5H7W8 O60573 Q08AM6 Q9H4L4 Q8N9N8 Q9Y5B6 Q9BU89 O95619 P0CG39 Q9P032 O95983 Q9UUL1 P54687
Ang 1-7 e L163,313	14	Q9H9T3 Q96HR8 Q69YN4 Q9NXG2 Q9P086 Q9H900 Q5JWT2 Q00013 A0A2R8Y7Y4 Q9P1F3 M0QZR4 Q9H0W9 Q5JSZ5 P49902
Ang II	39	Q15555 P06899 Q7Z417 Q14997 Q9NU22 P62487 Q9Y223 Q13144 Q8N6R0 Q8TBQ9 Q6DKJ4 Q9H0F7 Q13217 Q5UIP0 A0A087X117 P05091 Q8WWK9 Q96EB6 Q9Y657 Q99504 Q95071 Q9Y6E0 Q8WUA4 P07919 P51116 O15400 P0DI82 C9JCC6 P36542 Q96T76 Q7Z5L9 Q9H6R4 H0YIS7 O60488 Q9NZ63 Q6DKI1 Q14789 Q96ER3 Q9UBD5
TRV027	29	Q96C90 P42356 Q13325 Q9BRR6 Q9Y3E7 P16278 Q9H9Y6 E5RFV3 P36406 Q13555 Q92552 P40616 O96013 Q96P16 B1AKR6 Q8NB37 P29084 O75317 C9JA93 O43663 Q9UKF6 P55212 Q9BUP0 Q96F86 S4R3N1 Q8WVC0 P63172 A0A0C4DGB5 Q8TD16
Ang 1-7	21	Q8IZE3 Q71DI3 Q86W42 Q5EBL8 Q13045 K7ESQ2 A6NED2 P25208 Q02809 O43502 O76071 Q13907 Q15291 E9PK54 Q9HAN9 P24530 Q13247 Q8WTS6 Q7Z4W1 A0A0A0MTN0 Q9BQ39
L163,313	55	Q15631 Q9ULX3 A3KN83 Q66K14 Q7Z6B0 Q5TDH0 P56962 A0A087X211 Q15528 Q9ULW0 P21964 Q9H9Q4 Q9UHA4 Q8IU81 P52655 Q13546 Q9Y6K9 Q8N3C0 Q96AG4 Q96TA1 A0A087WSV8 Q96PZ0 Q9NQG5 Q9P013 Q9UHY7 Q3LXA3 Q8TBZ6 Q13509 J3KNQ4 Q12849 E9PCR7 Q86X76 Q8WTW3 Q9HBM1 Q9Y3D0 Q13464 Q96P47 Q9NR09 P45877 A0A0U1RQK7 Q86U06 Q8WWY3 A0A2R8Y5Q8 P09110 Q9NVM6 Q08623 Q15397 Q86U44 Q14139 Q9Y5Q8 Q6ZRS2 Q13356 O60888 Q8IXK0 Q9GZP4

Tratamentos	Total	Proteínas (UNIPROT ID)
Ang 1-7, Ang II L163,313 e TRV027	13	Q9UPY8 P09012 H7C2N1 Q15418 C9JV77 Q03933 Q10570 Q13228 Q14061 A6NEL0 P84098 Q7Z2Z2
Ang 1-7, Ang II e L163,313	12	Q9BQI0 Q13131 P04264 A0A0A0MT26 G3V2S9 Q15437 A0A0J9YXC7 Q8NFH5 A0A0A0MR05 O95218 Q9UPQ9 Q14657
Ang1-7, L163,313 e TRV027	8	P41236 P83436 Q9NW08 Q9H7E9 Q969Q0 P56270 Q14814 O43665
Ang II e TRV027	2	Q15654 F8W8D3
Ang 1-7 e L163,313	25	Q96RN5 P27144 Q96T51 H3BR70 Q9NW82 P42025 Q9GZT4 Q53EZ4 Q66K14 Q9HCN8 O60318 O14745 Q4V328 Q8IUE6 Q13505 Q96AT1 P33552 Q9BW61 Q6UXH1 Q9BRP1 Q8WZ82 P62633 P52655 P35527 J3KMZ8
Ang II	10	P0DPB6 O43815 P07197 Q562E7 J3KTD8 Q6I9Y2 J3KPD3 Q99470 Q9UH65 Q96NC0
TRV027	13	O00461 Q96MG7 Q8WZA9 Q86WR0 Q8WUA4 Q5EBL8 Q15334 Q9BTC0 O75150 Q13637 B0ZBF6 Q15363 O95905

TS.3 Tamanho das proteínas em Kda das proteínas usadas no WB.

Proteínas	Tamanho Kda
LC3I	16
LC3II	14
ATG7	78
Beclin-1	60
pMTOR/ mTOR	289
Sumo 2/3	20
Cullin-2	75
Fbx07	65-72
Galectin-1	15
MARCKs	75

Pounceau

P38

Fbx-07

Smad 2/3

mTOR

SMAD-1

Cullin-2

Galectin

MARCKs

Figura 32. Membranas inteiras e representativas do ensaio de WB.