UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**"Análise comparativa de perfis de sinalização do receptor
AT₁ ativado por agonistas seletivos para a via de β -
arrestinas"**

Geisa Aparecida dos Santos

RIBEIRÃO PRETO, SP

2013

Geisa Aparecida dos Santos

**"Análise comparativa de perfis de sinalização do receptor
AT₁ ativado por agonistas seletivos para a via de β -
arrestinas"**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, como parte
das exigências para obtenção do título de
mestre em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Claudio Miguel da Costa Neto

RIBEIRÃO PRETO, SP

2013

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.

SANTOS, Geisa Aparecida dos

Análise comparativa de perfis de sinalização do receptor AT₁ ativado por agonistas seletivos para a via de β -arrestinas. Ribeirão Preto, 2013.

82 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Costa Neto, Claudio Miguel da

1. GPCR. 2. Sinalização. 3. Agonismo seletivo. 4. AT₁.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANTOS, Geisa Aparecida dos

Título: Análise comparativa de perfis de sinalização do receptor AT₁ ativado por agonistas seletivos para a via de β -arrestinas

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, como parte
das exigências para obtenção do título de
mestre em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

Aprovado em : _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos aqueles que usam da sua intuição, inspiração e ou imaginação para de alguma forma tentar ao menos contribuir com o progresso do mundo.

AGRADECIMENTOS

Às agências financiadoras CAPES e CNPq, que financiaram minha bolsa de mestrado, FAPESP e FAEPA.

Aos Professores Dr. André Sampaio Pupo e Dr. Vitor Marcel Faça, que fazem parte da banca examinadora desta dissertação de mestrado, por sua disponibilidade, presença e certamente importantes contribuições que virão a ser feitas;

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto por sua dedicação a minha formação acadêmica, sempre preocupado em discutir e planejar criteriosamente e criticamente tudo que fosse feito em seu laboratório, e que de maneira alguma se restringiu a me passar somente conhecimento científico mas também contribuições para minha formação pessoal;

Aos colegas de laboratório mais presentes durante este trabalho: Andrea, Diego, Érika, Lucas e Rosana um agradecimento especial, não só por estarem sempre dispostos a contribuir de maneira prática auxiliando em algum experimento, intelectual participando ativamente das discussões, mas também pessoal... conquistei verdadeiros amigos;

Também a nossa técnica Lúcia por suas contribuições práticas imprescindíveis, além dos colegas recém chegados ao nosso grupo, ou que passaram por ele durante o desenvolvimento deste trabalho: Daisy, Camila e Felipe;

Ao Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, especialmente por supervisionar parte importante no desenvolvimento deste projeto, além de suas inúmeras contribuições intelectuais e permissão do uso de seu laboratório sempre que necessário. Agradeço também a suas alunas Lara e Simoni e sua técnica Odete que sempre nos auxiliaram quer de maneira intelectual ou prática além de amizade;

Ao Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes pela importante participação nas discussões, sempre nos auxiliando a desvendar os problemas experimentais, além de permissão para uso de seu laboratório. Agradeço ao pessoal de seu grupo Adriana, Carolina, Cacilda, Claudia e Felipe pelas contribuições práticas, intelectuais e amizade;

Ao Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva por permitir o uso de seu laboratório em parte dos experimentos além das contribuições nas discussões. Também aos integrantes de seu laboratório Amanda, Eriston, Karoline, Lilian, Welington, Renato e Zuleica pelas contribuições práticas, intelectuais e amizade;

Ao Prof. Dr. Dario Simões Zamboni, por permitir o uso de seu laboratório em parte dos experimentos, em especial a seus alunos: Luis Henrique (Beraba), Catarina e Juliana e sua técnica Maira por me auxiliarem sempre que necessário;

Aos diversos colegas conquistados na bioquímica ao longo dos anos, o pessoal da secretaria: Ivone, Ronaldo e Pamela; os técnicos de outros laboratórios: Beto, Silvinha, Silvia e Paulinho (*in memoriam*); e alunos de quem conquistei amizade: André, Felipe, Gabriela e Priscila.

Aos amigos, de graduação que contribuíram não só com minha formação intelectual e possível desenvolvimento desta dissertação, como também continuarão presentes me apoiando, ouvindo e comemorando sempre. Em especial: Camila Sousa, Camila Devicaro, Damily, Laís, Maryna, Rafaella, Raquel e Pedro;

Às minhas companheiras Claudia, Nayara, Joana e Stephanie que estiveram comigo durante todo este tempo, prontas a qualquer momento para ouvir meus problemas e comemorações com experimentos, embora muitas vezes cansadas sempre tentando ajudar de alguma forma... e conseguiram;

À minha família, Roseli, Ivo, Geiva, Manoel Marcelo e meu imenso amor... Marcelinho que contribuíram com seu carinho e apoio incondicional a tudo que fosse decidido, certamente sem vocês eu não teria conseguido.

“Eu acredito na intuição e na inspiração. A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado, enquanto a imaginação abraça o mundo inteiro, estimulando o progresso, dando à luz à evolução. Ela é, rigorosamente falando, um fator real na pesquisa científica”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIACÕES	11
INTRODUÇÃO	12
1. Receptores acoplados à proteína G	13
1.1. Agonismo seletivo, agonismo tendencioso, ou agonismo “ <i>biased</i> ” (“ <i>Biased agonism</i> ”)	15
2. O Sistema Renina-Angiotensina	18
2.1. SRA e agonismo seletivo	21
2.2. SRA e câncer	23
2.2.1. SRA e câncer de mama	25
OBJETIVO	26
1. Objetivos gerais	27
2. Objetivos específicos	27
MATERIAIS E MÉTODOS	28
1. Síntese do peptídeo TRV120027	29
2. Cultura de células imortalizadas de rim de embrião humano – HEK-293T	30
3. Cultura de células imortalizadas de tumor de mama humano –MDA-MB-231	30
4. Transfecção transiente por cloreto de Ca^{2+} do receptor AT_1 em células HEK-293T	31
5. Análise de fosforilação de diferentes quinases por arranjo de quinases	31
6. Ensaio de cinética de fosforilação	32
7. Extração de proteínas totais	32
8. Western blotting	33
9. Análise da modulação gênica por arranjo de PCR em tempo real	34

10. Ensaio de migração	34
11. Análises estatísticas	35
RESULTADOS	36
1. Perfil de fosforilação de quinases	37
2. Cinética de fosforilação de quinases	41
3. Perfil de expressão gênica	43
4. Ensaio de migração com MDA-MB-231.....	53
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	78
1. Anexo 1.....	79
2. Anexo 2.....	82

RESUMO

SANTOS, G. A., **Análise comparativa de perfis de sinalização do receptor AT₁ ativado por agonistas seletivos para a via de β -arrestinas**. 82f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão preto, 2013

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), também chamados de receptores 7TM, são conhecidos por regular virtualmente todos os processos fisiológicos em mamíferos e cerca de 40% de todas as drogas comerciais agem através destes receptores. A sinalização mediada por eles é classicamente atribuída à proteína G, que é ativada pela troca de GDP por GTP, promovendo a separação das subunidades G α e G $\beta\gamma$, e leva à produção de mensageiros secundários como cAMP, Ca²⁺ e DAG. Após a resposta os GPCRs são fosforilados pelas quinases de GPCRs (GRKs), sinalizando para recrutamento das β -arrestinas citoplasmáticas, que por sua vez desencadeiam a formação de endossomos internalizando e dessensibilizando o receptor. Entretanto, estudos mostram que este endossomo, contendo o complexo ligante-receptor- β -arrestina, pode interagir com proteínas sinalizadoras no citoplasma desencadeando vias de sinalização independentes de proteína G. Recentemente foram descritos para diferentes receptores, ligantes capazes de ativar seletivamente uma das duas vias, proteína G ou β -arrestina, chamados agonistas seletivos. O receptor AT₁ é um GPCR particularmente interessante no estudo do agonismo seletivo, tanto por sua vasta expressão em tecidos quanto pelo conhecimento de agonistas seletivos já estabelecidos, tais como os ligantes SII e TRV120027. O objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente os perfis de sinalização decorrente da ativação de AT₁ por SII ou TRV120027 através do uso de arranjos de quinases e da modulação de genes relacionados a sinalização de GPCRs. Ang II que é ligante natural e total (ativa via dependente de proteína G e de β -arrestina) neste receptor foi usada como controle para fins de comparação. Nossos dados mostraram que o perfil da sinalização mediada pelo receptor AT₁ varia não só entre AngII e os agonistas seletivos, mas também entre os dois ligantes seletivos SII e TRV120027, mostrando que a interação receptor-ligante pode influenciar a sinalização em um grau mais refinado, além da ativação dependente de β -arrestina ou proteína G. Estes dados mostram que existem perspectivas para o desenvolvimento futuro de ligantes com ainda maior grau de seletividade.

Palavras chave: 1. GPCR, 2. Sinalização, 3. Agonismo seletivo 4. Receptor AT₁

ABSTRACT

SANTOS, G. A., **Comparative analysis of AT₁ receptor signaling profiles activated by β -arrestin biased agonists pathway**. 82f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão preto, 2013.

G protein coupled receptors (GPCRs), also known as 7TM receptors, are known to regulate virtually all physiological processes in mammals and approximately 40% of all current clinical drugs act by modulating such receptors. The signaling mediated by them is classically by coupling to G protein, which is activated by exchanging bound GDP for GTP, dissociation of G α and G $\beta\gamma$ subunits, then leading to production of second messengers such as cAMP, Ca²⁺, and DAG. After the signal transduction, GPCR are phosphorylated by GPCR kinases (GRKs), followed by recruitment of cytoplasmic β -arrestins, which initiate the endosome formation with consequent internalization and desensitization of the receptor. However, it has been demonstrated that the endosome assembling the ligand-receptor- β -arrestin complex can interact with cytoplasmic signaling proteins, therefore activating signaling pathways independently of G protein coupling. Recently, for different receptors, it has been described ligands capable of selectively activating one of these signaling pathways, G protein or β -arrestin, called biased agonists. The AT₁ receptor is a particularly interesting GPCR for the study of biased agonism, either due to its wide tissue expression as well as also due the existence of known and established biased ligands, such as SII and TRV120027. The aim of our study was to comparatively analyze the AT₁ receptor signaling pathways profiles after activation by SII or TRV120027, using kinases arrays, and expression modulation of genes related to GPCRs signaling. AngII is the natural and full agonist of this receptor (activates both G protein and β -arrestin signaling pathways) was used for comparison. Our data show that the signaling profile mediated by AT₁ receptor can be distinct not only when comparing the profiles from AngII and the biased agonists, but also when comparing the profiles from the two biased ligands SII and TRV120027; revealing that the complex ligand-receptor can influence the downstream signaling pathways in a fine-tune way, further to the activation of β -arrestin or G-protein. This data show that there are perspectives for the future development of ligands with even higher degree of selectivity.

Key words: 1. GPCR, 2. Signaling, 3. Biased agonism 4. AT₁ receptor

LISTA DE ABREVIÇÕES

7TMR - Receptores de sete domínios transmembranares

Akt - Proteína quinase B

Ang 1-7 - Angiotensina-1-7

AngII – Angiotensina II

AT₁ - Receptor de angiotensina tipo 1

AT₂ - Receptor de angiotensina tipo 2

BSA –Albumina de soro bovino

DEMEM – Do inglês: *Dulbecco's Modified Eagles Medium*

ECA - Enzima conversora de Angiotensina I

ECA2 - Enzima conversora de Angiotensina 2

ERK1/2 - Quinase regulada por sinal extracelular

GPCR - Receptor acoplado a proteína G

GRK - Quinases de receptores acoplados a proteína G

MAPKs - Proteíno-quinases ativadas por mitógenos

PKA – Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

SFB - Soro fetal bovino

SII - Sar¹-Ile⁴-Ile⁸-Angiotensina II

SRA – Sistema renina-angiotensina

TRV120027 – Código comercial para Sar¹ - D-Ala⁸-Angiotensina II (*Trevena Company* [®])

Introdução

1. Receptores acoplados à proteína G.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), ou receptores de sete domínios transmembranares (7TMRs), assim denominados por sua estrutura contendo segmentos α -hélice que passam sete vezes pela bicamada lipídica, são largamente conhecidos por suas inúmeras funções, podendo ser ativados por uma enorme diversidade de ligantes tais como: neurotransmissores, peptídeos, lipídeos, carboidratos e glicoproteínas, ou mesmo por fótons (Maudsley, *et al.*, 2012; Maudsley, *et al.*, 2005; Venkatakrishnan *et al.*, 2013). Os primeiros a descreverem a estrutura de sete hélices transmembranares nestes receptores foram Hargrave e colaboradores em 1983 estudando a rodopsina. Desde então diversos outros GPCRs, tais como o receptor muscarínico de acetilcolina, receptor β -adrenérgico, receptores de angiotensina, receptores de cininas além de outros, vem sendo largamente estudados. São conhecidos mais de 800 membros de GPCRs no genoma humano, representando cerca de 2% do total de genes, o que torna esta a classe mais comum e mais ubíqua de receptores, regulando virtualmente todos os processos fisiológicos em mamíferos (Drake *et al.*, 2006; Lefkowitz, 2004; Rajagopal, *et al.*, 2010; Sprang & Elk, 2012). Além disso cerca de 40% de todas as drogas conhecidas com alvos codificados pelo genoma humano são direcionadas para GPCRs (DeWire & Violin 2011a; Forse 2000; Rask-Andersen, *et al.*, 2011).

A sinalização clássica mediada por estes receptores envolve a participação da proteína G, a qual é uma proteína heterotrimérica que liga alternadamente GDP ou GTP, e se encontra ancorada na face citoplásmica da membrana celular. Quando um ligante interage com o receptor ocorre uma mudança conformacional no receptor que então interagindo com a proteína G a modifica de forma que sua subunidade $G\alpha$ troque GDP por GTP e se separe das subunidades $G\beta\gamma$ que permanecem juntas na forma de um heterodímero. Como mecanismo geral de sinalização cascata abaixo, mensageiros secundários como adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), inositol trisfosfato, e diacilglicerol são produzidos, assim como liberação de íons de cálcio (Ca^{2+}) de estoques intracelulares (Rajagopal *et al.*, 2010; Maudsley, 2012). Existem três classes principais de proteínas G, G_q (proteína G que leva à ativação da fosfolipase C), G_s (proteína G que leva à ativação da adenilato ciclase) e G_i (proteína G que leva à inibição da adenilato ciclase), que

diferem em relação à sinalização e aos receptores aos quais se acoplam. De maneira resumida proteínas G_s atuam através da ativação da adenilato ciclase, que produz AMPc e subsequentemente ativa a proteína-quinase A (PKA), que então fosforila proteínas-alvo cascata abaixo. As proteínas G_i possuem ação contrária a G_s , inibindo a adenilato ciclase, além de poderem participar na regulação direta de canais iônicos. A sinalização via proteína G_q leva à ativação da fosfolipase C, que atuando sobre os fosfolípidos de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato leva a produção do segundo mensageiro inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol. O primeiro atua no retículo endoplasmático levando a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de IP_3 e consequente liberação deste íon no citoplasma. O diacilglicerol tem como papel principal a ativação de proteína-quinase C (PKC) que leva à fosforilação de proteínas alvo cascata abaixo. (Forse 2000; Godin & Ferguson 2012; Kim *et al.*, 2009; Lefkowitz 2004; Rajagopal, *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Zimmerman *et al.*, 2012). Após a ativação da proteína G e consequente respostas intracelulares, a região C-terminal do receptor é fosforilada por ação de quinases de receptores acoplados a proteína G (GRKs), processo que sinaliza para o recrutamento de proteínas chamadas arrestinas. As arrestinas por sua vez medeiam a formação de vesículas, internalização e consequente dessensibilização destes receptores (Dawson *et al.*, 1992; Lohsesb *et al.*, 1992; Pippig *et al.*, 1993). As arrestinas são proteínas citoplasmáticas e são conhecidas quatro isoformas delas, duas expressas exclusivamente na retina (arrestina 1 e 4) e duas ubiquamente expressas, (arrestinas 2 e 3) também conhecidas como β -arrestina 1 e β -arrestina-2. Já as GRKs, igualmente citoplasmáticas, compõem uma família expressa por sete diferentes membros, GRK 1 e 7 expressas exclusivamente na retina, GRK 4 restrita ao cerebelo, testículo e rins e GRKs 2, 3, 5 e 6 ubiquamente expressas nos tecidos de mamíferos. (Luttrell & Lefkowitz 2002; Reiter & Lefkowitz 2006).

Além do seu papel na dessensibilização dos receptores, as β -arrestinas também participam da ativação de vias de sinalização intracelulares, como será descrito a seguir.

1.1. Agonismo seletivo, agonismo tendencioso, ou agonismo “biased” (“*Biased agonism*”)

Em 1998, Jarpe e colaboradores mostraram que um GPCR poderia sinalizar através de vias independentes de proteína G. Estimulando o receptor de neurocinina, um GPCR, com um análogo à substância P, ligante endógeno deste receptor, eles demonstraram que apesar de não mobilizar cálcio, este análogo poderia desencadear sinalização por ativação de via dependente de c-jun (jun proto-oncogene) e independentemente de proteína G. Surgia o termo “*biased agonism*” usado para tratar o fenômeno de que os GPCRs poderiam, dependendo da interação com determinados ligantes, sinalizar para respostas distintas incluindo as independentes da clássica via de proteína G. Outros termos também surgiram a fim de tratar estas novas propriedades farmacológicas dos GPCRs, tais como: “*stimulus-trafficking*,” “*collateral efficacy*” e “*functional selectivity*” (Kenakin 2007a), no entanto “*biased agonism*”, ou numa tradução aproximada “agonismo tendencioso” ou “agonismo seletivo” são os termos mais conhecidos e utilizados.

Paralelo aos experimentos anteriores, diversos trabalhos usando diferentes GPCRs demonstraram que as arrestinas, e consequentemente as GRKs, exerciam um importante papel na sinalização mediada por estes receptores. Ignatova e colaboradores (1999) co-transfectando o receptor Opióide com dinamina selvagem (a qual permite a formação de endossomos) ou mutada (não permite a formação de endossomos) em células HEK-293 e COS-7, mostraram que ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular) colocaliza e tem ativação influenciada pela interação à vesículas endossomais, ocorrendo de maneira tempo dependente em células expressando dinamina mutada, mas de maneira normal em células com dinamina selvagem. Ainda em 1999, Vögler e colaboradores usando o receptor muscarínico de acetilcolina associado a técnicas de supressão da expressão de β -arrestina e uso de dinamina mutante, mostraram que a formação do endossomo diminuía de 60-75% em células com supressão de β -arrestina e que a formação das vesículas era essencial para a sinalização através da via das MAPKs (proteíno-quinases ativadas por mitógenos) nestes receptores, demonstrando um papel direto das arrestinas em vias de sinalização mediadas por GPCRs. No mesmo ano, Luttrell e colaboradores, usando agora o receptor β -adrenérgico, também transfectado em células HEK-293 e

COS-7 e ativado por isoproterenol mostraram por microscopia confocal a colocalização entre estes receptores e β -arrestina-1 após ativação, além de que o complexo formado por Src-quinases e β -arrestina-1, ou Src-quinases e β -arrestina-1-clatrina (proteínas essenciais na formação de endossomos) influenciava diretamente na cascata de sinalização que levava à fosforilação de ERK1/2. Posteriormente foi também mostrado o papel de sinalização das β -arrestinas em GPCRs, através da formação de endossomos e internalização em receptores ativados por protease (PAR), receptores de neuroquinina e receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) (DeFea *et al.*, 2000a; DeFea *et al.*, 2000b; Luttrell *et al.*, 2001, respectivamente). A proteína β -arrestina 2 também foi descrita como envolvida na sinalização de receptores 7TM, onde seu papel envolve a ativação da via das MAPKs dependente de c-jun, incluindo sua colocalização com JNK ("*c-jun amino-terminal kinase 3*") (McDonald *et al.*, 2000).

A figura 1 mostra comparativamente a visão clássica de sinalização de GPCRs, onde a sinalização decorrente de sua ativação é dependente exclusivamente de proteína G, e onde o papel das β -arrestinas é exclusivamente de dessensibilização, e o panorama contemporâneo, demonstrando que o processo de sinalização envolvido com estes receptores envolve não só a participação da proteína G, mas também das β -arrestinas, que podem participar por diversas vias.

Figura 1- Esquema geral das vias de sinalização mediadas por receptores acoplados à proteína G. A. Visão clássica da sinalização envolvida com estes receptores, mostrando o papel de sinalização exclusivo via proteína G. **B.** Panorama atualizado, mostrando a participação das β-arrestinas ativamente em diversas vias de sinalização e não somente no processo de dessensibilização do receptor. (Adaptado de Lefkowitz & Shenoy 2005).

A nova visão para uma dada resposta desencadeada pela ativação de um receptor mostra que dependendo da conformação alcançada pelo complexo formado entre o ligante e o receptor, diferentes perfis de sinalização podem ser obtidos. Dessa forma, o conceito agonista “on” e antagonista “off” se revela muito restritivo, e sugere que dada complexidade, o processo de sinalização possa ser interpretado e analisado de outras maneiras. Assim, uma nova perspectiva para a descoberta e estudo de drogas atuando de forma mais eficiente sobre um dado receptor também passou a ser imaginado para um futuro próximo (Kenakin 2001; Kenakin 2007b).

Em síntese, agonismo seletivo pode ser definido como a capacidade dos receptores 7TM de sinalizar seletivamente ou preferencialmente por vias distintas dependendo do estado conformacional do complexo receptor-ligante formado, sendo que esta sinalização pode ser dependente de proteína G ou de β -arrestina.

Ferramentas bioquímicas e moleculares foram e são usadas no estudo do agonismo seletivo. A produção de análogos aos agonistas de determinados receptores é uma delas. “Screenings” destes análogos são descritos, como no caso de Holloway e colaboradores (2002) que analisam um conjunto de 14 análogos de angiotensina II (AngII) com base na manutenção de sua afinidade pelo receptor AT₁ e vias de sinalização envolvidas na ativações dos receptores por estes peptídeos. Mutações sitio dirigidas nos receptores alterando o padrão de sinalização e/ou internalização usual também são descritas (Seta *et al.* 2002).

2. O Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem papel clássico na regulação da pressão arterial e controle hidroeletrolítico do sangue (Gasparo *et al.* 2000; Fleming *et al.* 2006).

O processo de formação das angiotensinas se inicia com a clivagem catalítica do pró-peptídeo angiotensinogênio, produzido no fígado, mas circulante no organismo. A Renina é a enzima responsável por este processo, a qual é produzida por células justaglomerulares dos rins, mas enviada para a circulação. O resultado desta clivagem é o peptídeo Angiotensina I (AngI) de dez aminoácidos, que então sofre ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA), perdendo dois

aminoácidos de sua extremidade c-terminal, dando origem ao octapeptídeo AngII, que é principal peptídeo ativo do SRA. A AngII produzida pode ainda sofrer ação da chamada ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2), uma carboxipeptidase, formando diretamente angiotensina 1-7 (Ang 1-7), outro peptídeo ativo do SRA. A Ang 1-7 pode também ser formada indiretamente a partir da AngI, inicialmente por ação de ECA2 levando à formação de angiotensina 1-9 (Ang 1-9), e posteriormente de ECA (Gasparo *et al.*, 2000; Hunyady & Catt 2006; Bader & Ganten 2008; Santos *et al.*, 2013). A AngII também pode ter ação local, sendo produzida em vários órgãos como rins, vasos, coração, testículos, glândulas adrenais, olhos e cérebro.

A figura 2 ilustra de maneira esquemática a formação dos peptídeos ativos do SRA, sua interação com os respectivos receptores e respostas subsequentes.

Figura2 - Representação esquemática do Sistema Renina-Angiotensina. O angiotensinogênio sofre ação da renina formando Ang I, que pode sofrer ação de ECA formando AngII, ou de ECA2, formando Ang 1-9, que por sua vez pode sofrer ação de ECA formando Ang 1-7. A própria AngII pode sofrer ação de ECA2 levando a formação de Ang 1-7. AngII pode se ligar aos receptores AT₂ e AT₁ desencadeando respostas contrárias enquanto Ang1-7 se liga ao receptor Mas levando a algumas repostas similares as de AngII estimulando o receptor AT₂.

A AngII pode se ligar a dois receptores, AT₁ e AT₂. O receptor AT₁ virtualmente é responsável por todos os efeitos da AngII no organismo sendo expresso não só no endotélio vascular, onde é responsável por suas funções clássicas, mas também em outros tecidos, órgãos e sistemas, tais como sistema nervoso, excretor, reprodutor, muscular e endócrino. O receptor AT₂ é expresso majoritariamente em tecidos fetais, sendo menos encontrado em tecidos adultos (Carey 2005; Reudelhuber 2005; Fleming *et al.*, 2006; Bader & Ganten 2008). O receptor AT₁ atua via proteína Gα_{q/11}, uma proteína G do grupo das G_q, que como descrito anteriormente sinaliza via ativação de PKC e mobilização de Ca²⁺, além da via das β-arrestinas levando a ativação de vias como as das MAPKs, tirosino-quinases, NF-κB (fator nuclear kappa B) e Jak/STAT (janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição). Os eventos finais decorrentes da ativação do receptor AT₁ por Ang II levam a diversas respostas fisiológicas tais como contração do músculo liso de vasos sanguíneos, ativação de cascatas proliferativas, pró-inflamatórias e pró-angiogências (Gasparo *et al.* 2000; Aplin *et al.* 2007), participando de diversas patologias como diabetes, insuficiência cardíaca e renal, câncer, Alzheimer e patologias ósseas. A sinalização do receptor AT₂ ainda é bastante obscura, tendo sido descrita a ativação de G_i, e principalmente efeitos opostos aos sinalizados pelo receptor AT₁ (Carey 2005; Reudelhuber 2005; Hunyady & Catt 2006; Aplin *et al.* 2007; Bonde *et al.* 2010). Em 1988 Santos e colaboradores descreveram um novo peptídeo ativo do SRA, Ang 1-7, e em 2003 o receptor Mas foi identificado como receptor para este peptídeo (Santos *et al.*, 2003).

Diversos inibidores farmacológicos deste sistema são conhecidos e são largamente usados para controle de seus efeitos, principalmente em doenças como hipertensão, insuficiência cardíaca e diabetes (Paul *et al.* 2006). As principais classes de bloqueadores do SRA atuam como inibidores de ECA e antagonistas diretos do receptor AT₁, tais como Captopril (Ferguson *et al.* 1977) e Losartan (Wong *et al.* 1991), respectivamente. Em decorrência de sua vasta atuação local, muitas vezes o bloqueio deste sistema por estes inibidores leva a alterações locais, que em alguns casos podem ser prejudiciais em decorrência de efeitos colaterais.

2.1. SRA e agonismo seletivo

Diversos estudos comprovam que a sinalização do receptor AT₁ pode ser separada em dois componentes, via proteína Gq e β -arrestinas 1 e 2 (Tohgo *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2004; Hunyady & Catt 2006; Aplin *et al.*, 2009).

Em 2002 Holloway e colaboradores descreveram, dentre outros análogos para AngII, Sar¹-ile⁴-ile⁸-Ang II (SII), um peptídeo derivado de AngII em que os aminoácidos 1, 4 e 8 foram substituídos por Sarcosina, Isoleucina e Isoleucina respectivamente. Mas foi em 2003 que Wei e colaboradores analisando os efeitos do SII na ativação do receptor AT₁, descreveram sua interessante capacidade seletiva na ativação da via das β -arrestinas. Este grupo mostrou que quando estimulado com SII o receptor AT₁ é internalizado e continua ativando ERK1/2, que esta resposta é suprimida pela depleção da expressão de β -arrestina 2 por técnicas de siRNA (do inglês: *small interfering RNA*) mas não por inibição de PKC. O peptídeo SII se revelou um excelente protótipo de agonista seletivo para o receptor AT₁, sendo largamente usado em diversos estudos de sinalização *in vivo* e *in vitro* (Daniels *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009).

A sinalização do receptor AT₁ tanto via proteína G ou via β -arrestina pode ser analisada em termos de efeito final através dos níveis de fosforilação de ERK1/2. Esta quinase é ativada por ambas as vias mas com um perfil particular quando ativada por cada uma delas. Quando ativada via proteína G a fosforilação de ERK1/2 é rápida e pode levar a ativação de fatores de transcrição no núcleo com efeitos como fosforilação de Elk-1 (membro da família de oncogenes ETS) e ativação de c-Fos (oncogene viral homólogo ao osteosarcoma murinho) culminando no aumento da expressão de diversos genes. No caso de β -arrestina a fosforilação de ERK1/2 é diretamente por interação desta proteína com a vesícula de internalização formada, a fosforilação é sustentada ao longo do tempo quando comparada com a via de proteína G e desencadeia respostas citoplasmáticas (Tohgo *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Esta sinalização diferencial foi demonstrada experimentalmente em cardiomiócitos por Aplin (2007), mostrando que a sinalização de ERK1/2 decorrente de proteína G atua no núcleo e tem como resposta o aumento de proteínas e hipertrofia celular, enquanto a sinalização desta quinase decorrente

da ativação por β -arrestina leva a repostas citoplasmáticas, desencadeando proliferação celular.

A afinidade do SII pelo receptor AT_1 é baixa, com constante de dissociação (K_D) em torno de 300 nM. Comparativamente a K_D da AngII pelo mesmo receptor é em torno de 1,6 nM (Holloway *et al.*, 2002). K_D demonstra a afinidade de uma droga por um receptor, desta forma quanto maior a K_D , menor a afinidade. Esta propriedade de SII dificulta consideravelmente estudos *in vivo* usando este agonista seletivo. Em 2010, Violin e colaboradores descreveram um novo agonista seletivo para o receptor AT_1 , com atuação extremamente semelhante a do SII, porém com uma afinidade maior, K_D estimada de 19 nM. Este agonista seletivo, chamado TRV120027, é um análogo de AngII com substituição do primeiro resíduo por Sarcosina, e oitavo por D-Alanina. Além da propriedade de alta afinidade, nos experimentos desenvolvidos em ratos por este grupo, o agonista seletivo TRV120027 mostrou eficiência em reduzir a pressão arterial e aumentar o desempenho cardíaco. A figura 3 ilustra comparativamente a sequência de aminoácidos de AngII, SII e TRV120027.

	1	2	3	4	5	6	7	8
AngII	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe
SII	Sar	Arg	Val	Ile	Ile	His	Pro	Ile
TRV 120027	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D-Ala

Figura 3 - Sequência de aminoácidos comparativa entre AngII, SII e TRV120027. Angiotensina é o agonista natural do receptor AT_1 . A partir de modificações em sua sequência foram gerados os análogos SII e TRV120027 agonistas seletivos para via das β -arrestinas neste receptor.

Se considerarmos o fato de que o agonismo seletivo pode ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de drogas com potencial terapêutico, pois estabelecendo inibição seletiva de vias de sinalização pode-se diminuir a ocorrência de efeitos colaterais, como demonstrado para receptor AT_1 (e também em outros receptores, veja DeWire & Violin 2011), juntamente com o fato de que GPCRs são alvo de grande parte das drogas comerciais, torna-se indiscutível a importância de estudos aprofundados sobre a sinalização envolvida com o agonismo seletivo.

2.1. SRA e câncer

A presença de componentes do SRA já foi mostrada em diversos tipos de câncer como de: cérebro, pulmão, pâncreas, mama, próstata, colo, pele e carcinoma cervical. Em muitos destes tumores verifica-se que a expressão dos integrantes deste sistema, em especial do receptor AT₁, que se mostra aumentada em relação ao tecido saudável equivalente (Ager, *et al.*, 2008; Deshayes & Nahmias 2005).

Fisiologicamente foi mostrado que o bloqueio funcional do SRA, quer por inibição de ECA ou por bloqueio do receptor AT₁ pode diminuir o risco de formação de tumores, além de eventos relacionados ao agravamento da doença. Um estudo clínico realizado por Lever e colaboradores em 1998 foi o primeiro a demonstrar estes efeito na prática. Analisando um total de 5207 pacientes, dos quais 1559 receberam tratamento com inibidores de ECA e os outros 3648 algum outro tipo de tratamento para hipertensão (como inibidores de canais de cálcio, diuréticos e β -bloqueadores) eles mostraram que o risco relativo de reincidência, ou fatalidade de tumores era menor em pacientes tratados com inibidor de ECA, 0,72 e 0,65 respectivamente, comparado aos outros tipos de tratamento, 1,1 e 1,03 respectivamente. Outros estudos também mostraram que a inibição de ECA (Volpert *et al.*, 1996; Yasumatsu *et al.*, 2004) ou do receptor AT₁ (Fujita *et al.*, 2002; Uemura *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Otake *et al.*, 2010) diminuem as taxas de crescimento e angiogênese em tumores, alguns trabalhos ainda mostraram que a ausência do receptor AT₁ quer por deleção (Egami *et al.*, 2003) ou naturalmente (Herr *et al.*, 2008) também torna menor a capacidade de progressão tumoral.

Estimular o processo de angiogênese (formação de vasos) é uma das maneiras mais estudadas pelas quais o SRA contribui para a progressão do câncer (Volpert *et al.*, 1996; Herr *et al.*, 2008). O processo de angiogênese influencia diretamente a capacidade de crescimento e malignidade de tumores em decorrência do suprimento sanguíneo ao tumor, além do aumento de comunicação com outras partes do organismo (Hanahan & Folkman 1996). A ativação do receptor AT₁ contribui estimulando a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Huang *et al.*, 2008), angiopoietina 2 (Yasumatsu *et al.*, 2004), fator de crescimento de fibroblasto *b* (b-FGF) (Wysocki *et al.*, 2006) e fator de crescimento

derivado de plaquetas (PDGF) (Fujita *et al.*, 2002), todos conhecidos como fatores estimuladores do processo de formação de novos vasos.

A ativação do receptor AT₁ pode também contribuir para a capacidade proliferativa das células tumorais. Em tumor de próstata (Uemura *et al.*, 2003) e mama (Greco *et al.*, 2003) já foi mostrado que a transativação do receptor AT₁ com o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) pode levar a ativação de cascatas proliferativas envolvendo a participação de ERK1/2, STAT3 e PKC. O receptor AT₁ pode ainda sinalizar via cascata fosfatidilinositol-3-fosfato/Akt acarretando em inibição da morte celular, ou através da indução da expressão de survivina ou inibição de caspase-3 (Ohashi *et al.*, 2004). As cascatas decorrentes de sinalização do receptor AT₁ podem ainda influenciar sobre a capacidade de migração e formação de metástases em tumores contribuindo com a malignidade desta doença (Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2012).

No caso da AngII agindo no receptor AT₂ e da Ang1-7 agindo no receptor mas, estes parecem influenciar de maneira negativa sobre a progressão de tumores, diminuindo o processo de angiogênese e proliferação, ou aumentando a apoptose. Desta maneira, o balanço entre a expressão dos receptores AT₁ e AT₂ e dos peptídeos AngII e Ang1-7, decorrente principalmente da regulação de ECA2 no segundo caso, passa a ser essencial na regulação da progressão tumoral (Ager *et al.*, 2008; George *et al.*, 2010).

Em relação ao agonismo seletivo e câncer, apenas especulações podem ser feitas no atual momento. Vias de sinalização influenciando no desenvolvimento de tumores são sabidamente reguladas pela via das β -arrestinas em outros tecidos, como as vias de Wnt/ β -catenin e WNT/RAC-1 (Bryja *et al.*, 2007; Bryja *et al.*, 2008), que podem desestabilizar a adesão e levar à migração celular; ou fosfatidilinositol-3-OH quinase-Akt (Luan *et al.*, 2009) que pode inibir a morte celular e aumenta proliferação em tumores. A sinalização dependente de β -arrestina é relatada em alguns tipos particulares de câncer como: pulmão, mama, ovário, bexiga, próstata e colo retal (Hu *et al.*, 2013).

2.2.1. SRA e câncer de mama

Em 2008 mais de 450.000 mulheres do mundo todo morreram em decorrência do câncer de mama e a cada ano mais de 1,3 milhões são diagnosticadas com a doença, o que o torna o segundo tipo mais comum dentre os tumores com 11% de proporção total (incluindo homens, que representam 1% dos casos diagnosticados), perdendo apenas para o câncer de pulmão com 13% (*Nature Outlook Breast Cancer* 2012).

Paepe e colaboradores 2001 mostraram uma particularidade na expressão do receptor AT₁ em câncer de mama. Testando biopsias de pacientes eles observaram uma alta taxa de expressão deste receptor na membrana citoplasmática na hiperplasia, mas diminuída quando o tumor se torna invasivo. Já o receptor AT₂ se comporta de forma diferente, apesar de sua baixa expressão em tecido mamário saudável, ocorre um aumento de sua expressão tanto na hiperplasia quanto no estágio invasivo. Este fato demonstra que a sinalização e o balanço entre os níveis de receptores AT₁ e AT₂ têm papel regulatório no processo de evolução tumoral, como também dito anteriormente (Ager *et al.*, 2008; Deshayes & Nahmias 2005). Foi mostrado ainda que a inibição do receptor AT₁, ou alteração em sua expressão em células tumorais influencia processos angiogênicos e metastáticos, contribuindo para o desenvolvimento da doença (Herr *et al.*, 2008; Inwang *et al.*, 1997; Rhodes *et al.*, 2009; Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2012). Outros componentes do SRA, além dos receptores, são expressos em câncer de mama, como: angiotensinogênio, pró-renina, e ECA (Tahmasebi *et al.*, 2006).

Objetivos

1. Objetivos gerais

O objetivo principal deste trabalho foi analisar comparativamente os perfis de sinalização decorrente da ativação do receptor AT₁ por dois diferentes agonistas seletivos para a via de β -arrestinas, SII e TRV120027, usando como referência o agonista natural deste receptor, AngII.

2. Objetivos específicos:

Analisar o perfil de ativação de quinases em células HEK-293T transfectadas com receptor AT₁ – GFP (receptor de angiotensina tipo 1 acoplado com proteína fluorescente verde) estimuladas com AngII, SII, ou TRV120027, através do uso de um arranjo contendo anticorpos contra 45 diferentes quinases.

Analisar o perfil de expressão gênica em células HEK-293T transfectadas com receptor AT₁ – GFP estimuladas com AngII, SII, ou TRV120027, através do uso de um arranjo de PCR em tempo real, que consiste de placas contendo *primers* liofilizados para 84 alvos gênicos relacionados a sinalização via GPCRs.

Após análise do perfil de ativação de quinases, analisar cineticamente quinases envolvidas na sinalização por GPCRs que se mostraram reguladas diferencialmente ao estímulo por AngII, SII ou TRV120027.

Analisar comparativamente o efeito dos diferentes estímulos por AngII, SII e TRV120027, no processo de migração celular em linhagens de células de câncer de mama humano MDA-MB-231.

Materiais e Métodos

1. Síntese do peptídeo TRV120027

Sob supervisão do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, da FMRP-USP, foi feita a síntese do peptídeo comercialmente conhecido como TRV120027 cuja sequência é Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala (sarcosina, arginina, valina, tirosina, isoleucina, histidina, prolina e D-alanina, respectivamente). Partindo de 100 mg de resina Fmoc-D-Ala Wang 0,9 mmol/g - 90 μ mol- (Fmoc -9-fluorenilmetil-cloroformato), foram adicionados os resíduos subsequentes em massa correspondente a 90 μ mol: Fmoc-Pro 153 mg, Fmoc-His (TRt) 279 mg, Fmoc-Ile 159 mg, Fmoc-Tyr 207 mg, Fmoc-Val 153 mg, Fmoc-Arg (Pbf) 291 mg e Boc-Sar (Boc- terc-Butoxicarbonil) 150 mg, respectivamente. Para síntese utilizou-se o método HOBt/HBTU (- 1-hidroxibenzotriazol/ O-Benzotriazol-N,N,N',N' tetrametil-urânio-hexafluoro-fosfato) que consiste em dissolver o Fmoc - aa em 400 μ l DMSO/NMP (Dimetilsulfóxido/Metilpirrolidona), adicionar esta solução a resina desbloqueada seguido de 495 μ l de HOBt/HBTU 0,45 M agitando por 1-2 minutos, adicionar 303 μ l de DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) 1.2 M e dar 6 pulsos de micro-ondas em potência 1 (2 minutos cada pulso). Após a adição do resíduo a resina deve ser desbloqueada por adição de 3 ml de solução 20% piperidina + 2 x DBU/piperidina (DBU-1,8-Diazobiciclo[5.4.0]undec-7-ene) e exposição por 1 minuto a micro-ondas, depois ela é lavada com solução de metanol, em seguida adiciona-se mais 3 ml de solução 20% piperidina + 2 x DBU/piperidina e a submete a mais um pulso de 1 minuto no micro-ondas deixando a solução em contato com a resina por 3 minutos totais, lava-se novamente e recoloca-se a solução com um novo pulso de micro-ondas deixando-a em contato com a resina por 7 minutos desta vez e lavando novamente por fim. Para clivar o peptídeo pronto da resina, a mesma foi lavada com Metanol, seca a vácuo e tratada com 1 ml de 88% TFA (ácido trifluoracético) 4% TIS (trialquil silanos), 2% anisol e 2% DTT (Ditiotreitol) por suas horas. Recuperou-se a solução de peptídeo em TFA por método de filtração em disco poroso lavou-se a resina com 2 x de 200 μ l de TFA. Foi feito tratamento com éter por 3x sobre o precipitado, sempre removendo-se o éter após centrifugação 500 rpm a 0 °C por 5 minutos em tubo cônico com tampa. O material precipitado foi seco ao ar e em seguida o peptídeo foi solubilizado em água.

Aproximadamente metade do peptídeo obtido foi purificado por HPLC (Cromatografia líquida de alta performance) com gradiente de 1% de acetonitrila/minuto, em que foi coletado o pico principal. Uma amostra deste pico foi usada para fazer a análise de composição de aminoácidos, garantido se tratar do peptídeo de interesse

2. Cultura de células imortalizadas de rim de embrião humano – HEK-293T

Para os experimentos de caracterização funcional dos ligantes foi usada HEK 293T (*Human Embryonic Kidney 293 cells / simian virus 40 (SV40) large T antigen*), uma linhagem de células imortalizada obtida de rim de embrião humano que expressa constitutivamente SV40 facilitando a expressão de DNA plasmidial transfectado. Estas células foram mantidas em meio DEMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10 % SFB (Soro fetal bovino), penicilina 100 u/ml e estreptomicina 100 µM, e mantidas a 37 °C, 5% CO₂. Para manutenção da linhagem a cada 2-3 dias as células eram soltas da garrafa de cultura no próprio meio por impacto mecânico e parte era repassada a uma nova garrafa e assim sucessivamente.

3. Cultura de células imortalizadas de tumor de mama humano – MDA-MB-231

Para os experimentos de estudo da participação da resposta aos diferentes ligantes em modelo de câncer foi usada a linhagem MDA-MB-231, imortalizada e isolada a partir de adenocarcinoma de glândula mamária humano. Estas células foram mantidas em meio DEMEM suplementado com 10 % SFB, penicilina 100 u/ml e estreptomicina 100 µM e mantidas a 37 °C, 5% CO₂. Para manutenção da linhagem a cada 3-4 dias as células eram soltas com solução de tripsina/EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) a 0,05 % em PBS (Salina tamponada por tampão fosfato).

4. Transfecção transiente por cloreto de Ca^{2+} do receptor AT_1 em células HEK-293T.

Foi usado plasmídeo contendo sequência de receptor AT_1 de rato acoplado a GFP (green fluorescent protein). A transfecção é feita em garrafas de cultura de 75 cm^2 para células aderentes com aproximadamente 70 % de confluência. Para precipitação do DNA deve-se misturar 30 μg de DNA plasmidial, 60 μl de CaCl_2 (cloreto de cálcio) 2 M e completar com TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5) para 480 μl . Esta solução foi adicionada a 480 μl de HBS 2x (50 mM Hepes (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico), 280 mM NaCl (cloreto de sódio), 1,5 mM NaH_2PO_4 (fosfato monossódico) pH 7,1) gota a gota sob baixa agitação e após 45 minutos adicionada a garrafa de células contendo 10 ml de meio DEMEM 10% SFB penicilina 100 u/ml e streptomicina 100 μM , posteriormente foi adicionada solução 300 μl de cloroquina 2mg/ml gota a gota ao meio. Após 4h30 o meio deve ser trocado e após 48h, em que se detectava um pico de expressão, as células estavam prontas para ser usadas nos experimentos.

5. Análise de fosforilação de diferentes quinases por arranjo de quinases

Foi usado kit Proteome Profiler™ Array – Human Phospho-Kinase Array Kit (Cat. nº ARY003B – R&D Systems). O protocolo e soluções usados foram os indicados pelo fabricante. Foram analisados quatro grupos experimentais: controle, somente com veículo, no caso DEMEM estreptomicina/penicilina, tratado com Angiotensina 100nM, com SII 30 μM e TRV120027 100nM, todos por 10 minutos. O Kit é composto por quatro conjuntos de duas membranas que contém adsorvidos 45 anticorpos contra diversas quinases em duplicata, além de três duplicatas de referência e duas de controle negativo. O lisado das células pós tratamento foi quantificado, e a cada conjunto de duas membranas foi adicionado o equivalente a 300 μg totais de proteínas. A leitura foi feita por método biotina-estreptavidina-Peroxidase, com detecção de quimioluminescência em fotodocumentador digital ImageQuant 350 (GE Healthcare). A quantificação foi feita densitometricamente por

meio do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e os valores obtidos foram normalizados pelas marcações de referência da respectiva membrana e relacionados ao controle que teve seu valor considerado basal, isto é 1.

6. Ensaio de cinética de fosforilação

A cinética de fosforilação foi feita usando HEK-293T transfectada com o receptor AT₁. As células foram semeadas em placas de 6 poços a aproximadamente 300.000 células/poço. No dia anterior ao experimento as células foram incubadas na ausência de SFB e mantidas em DEMEM estreptomicina/penicilina. No início do experimento ao poço controle adicionou-se 1 ml de DEMEM estreptomicina/penicilina e aqueles a serem estimulados 0,5 ml; em seguida as drogas, diluídas em meio, foram adicionadas em ordem degressiva de tempo (20, 10, 5 e 2 minutos) na quantidade de 0,5 ml a estes respectivos poços, para isso foram preparadas 2x para sua concentração final desejada durante o estímulo. Ao fim do procedimento a droga foi retirada e colocado 80 µl de tampão de lise proteica (2,5 mM de CaCl₂, 0,25% Triton-X100 em Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (*Sigma fastTM Protease Inhibitor*) e inibidores de fosfatases, ortovanadato de sódio 1 mM e fluoreto de sódio 10mM).

7. Extração de proteínas totais

As amostras em tampão de lise foram homogeneizadas a 4° C por 30 minutos, e então centrifugadas a 13.000 rpm, 15 minutos a 4 °C. O *pellet* formado foi descartado e o sobrenadante quantificado para proteínas por método colorimétrico de Bradford (Bio RAD protein assay), que usando uma curva-padrão obtida de valores de soluções de BSA em concentrações entre 0,0625 e 2,0000 mg/ml, permite calcular a concentração proteica de cada amostra.

Após quantificação, amostras contendo as mesmas quantidades de proteína total foram separadas por SDS-PAGE 12% (Gel de poliacrilamida -12% em concentração- contendo Sódio dodecil sulfato para eletroforese) e então transferidas

para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) em sistema semi-seco (BioRad, Hercules, CA). A qualidade da transferência foi monitorada corando as membranas com Ponceau (Sigma Aldrich).

8. **Western blotting**

Após bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 5 % em TBST (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05%, pH 7,5) ou 5% de leite desnatado por 1 hora à temperatura ambiente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C (ou 1 hora a temperatura ambiente, no caso do anticorpo contra β -actina) com anticorpo contra a proteína fosforilada que se desejava analisar. Foram feitas marcações, para ERK1/2 fosforilada-Tyr 204 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Akt fosforilada-Thr308 (1:500) (Cell signaling Technology), JNK fosforilado-Thr 183/ Tyr 185 (1:500) (Abcam), c-Jun fosforilado-Ser 63 (1:1000) (Sigma), p53 fosforilada-Ser 15 (1:1000) (Cell signaling Technology) e β -actina (1:10000) (Millipore) Após incubação com o anticorpo primário, a membrana era lavada 3 vezes de 5 minutos com TBST e incubada por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados a peroxidase (diluídos somente em TBST) contra seu respectivo primário. Os anticorpos secundários usados foram anti-coelho (1:2000) (Cell signaling Technology), anti-camundongo (1:2000) (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.). Após incubação com secundário a membrana era lavada 3 vezes de 15 minutos com TBST e então tratada com reagentes quimioluminescentes (contendo luminol, um substrato para peroxidase) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A quimioluminescência foi registrada por meio do fotodocumentador digital ImageQuant 350 (GE Healthcare) e as bandas de interesse foram quantificadas densitometricamente por meio do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

9. Análise da modulação gênica por arranjo de PCR em tempo real.

Foram usadas para análise células HEK-293T transfectadas com AT₁-GFP. As células foram tratadas com angiotensina 100 nM, SII 30 µM e TRV120027 100nM por 6 horas. O RNA foi extraído usando o RNeasy MiniKit Qiagen (Cat. n° 74104) que utiliza método de coluna de afinidade acoplado a centrifugações, e o tratamento com DNase foi feito na própria coluna anteriormente a eluição e a quantificação do RNA total feita em espectrofotômetro no comprimento do ultra-violeta. O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por amostra usando Kit RT² First Strand Kit Qiagen (Cat. n° 330401) baseado no uso de transcriptase reversa e ciclagem de temperatura. Para o arranjo de genes foi usado o Kit RT² Profiler PCR Array – Human GPCR Signaling PathwayFinder (Cat. n° PAHS-071D). Este arranjo consiste em uma placa contendo 84 primers liofilizados para alvos gênicos relacionados com sinalização de receptores acoplados a proteína G além de controles negativos, de DNA genômico e primers para seis diferentes genes constitutivos. Aproximadamente 92% do cDNA proveniente da etapa anterior é adicionado de solução contendo tampão, polimerase, *SYBR green* e água, e dividido entre os 96 poços da placa. O PCR em tempo real foi processado em termociclador BioRad CFX 96 (C1000™ thermal Cyclor) e os resultados analisados por software disponibilizado pela própria SABioscience-Qiagen para o arranjo em questão.

10. Ensaio de migração

Foram usadas células MDA-MB-231 para este ensaio. As células eram semeadas em placas de 24 poços com a aproximadamente 200.000 células por poço em meio DEMEM 10% SFB estreptomicina/penicilina. Dois dias após era adicionado o tratamento, sendo 6 poços mantidos somente com veículo neste caso DEMEM 10% SFB estreptomicina/penicilina, 6 com angiotensina 100nM, 6 com SII 30 µM e 6 com TRV 120027 100 nM. Após 24 horas cruzeiras eram feitas manualmente em cada poço com auxílio de uma ponteira de 10 µl e apoio da tampa da placa, o tratamento era então retirado, as células lavadas com PBS para retirada das que se soltaram durante o procedimento e adicionado DEMEM

esptreptomicina/penicilina (sem SFB). Duas fotos foram tiradas em cada poço, nas posições verticais da cruz (em cima e embaixo em relação ao centro) exatamente na mesma posição com 0h, 24h, e 48h após o procedimento.

11. Análises estatísticas

Análises estatísticas de dados com mais de três grupos experimentais foram realizadas pelo teste *One-Way ANOVA* (*analysis of variance*), usando pós-teste Newman-Keuls, para comparação de todos os grupos entre si, utilizando o software Prism GraphPad 5 (GraphPad, San Diego, CA). Análises entre dois grupos experimentais foram feitas utilizando o teste t-Student. Nos gráficos, os grupos designados com um asterisco (*) representam aqueles que com $p < 0,05$ demonstraram diferença em relação ao grupo controle, ou entre os próprios grupos de tratamento para cada experimento.

Resultados

1. Perfil de fosforilação de quinases

O perfil de fosforilação de quinases obtido a partir do tratamento de células HEK-AT₁-GFP com veículo (controle), AngII 100nM, SII 30μM ou TRV120027 100nM por 10 minutos é apresentado na figura 4.

Os dados quantitativos são mostrados na tabela 1, e representam a média da duplicata para cada quinase, normalizada pela média da marcação de referência da respectiva membrana. São mostrados valores de vezes em relação ao controle (considerado 1), valores positivos representam aumento e negativos diminuição dos níveis de fosforilação.

Figura 4 - Perfil de fosforilação de quinases após ativação do receptor AT₁ por AngII SII ou TRV120027. Da esquerda para direita é mostrado o perfil de fosforilação de quinases obtido a partir de células HEK-AT₁-GFP estimuladas ou não (controle) com AngII 100nM, SII 30μM ou TRV120027 100nM por 10 minutos. São mostradas as coordenadas para identificação das marcações, que estão especificadas na tabela 1, junto aos dados quantitativos.

Tabela 1- Resultados quantitativos do perfil de fosforilação de quinases após ativação do receptor AT₁ por AngII SII ou TRV120027. Os valores são mostrados em vezes com relação ao controle. Valores maiores que 1,33 estão marcados em vermelho representando aumento, menores que -1,33 em verde representando diminuição. Para identificação do mapa completo, incluindo amostras referências, controles negativos além de identificação de lista para abreviações das quinases analisadas consultar o anexo 1.

Membrana A.

Coordenada		AngII	SII	TRV
A-A3, A4	p38 α T180/Y182	1,04	1,15	-1,45
A-A5,A6	ERK1/2 T202/Y204, T185/Y187	1,83	1,44	-1,21
A-A7,A8	JNK pan T183/Y185, T221/Y223	1,06	1,15	-1,16
A-A9,A10	GSK-3 α/β S21/S9	1,35	1,41	1,16
A-B3, B4	EGF R Y1086	-1,24	-1,25	-1,56
A-B5,B6	MSK1/2 S376/S360	1,02	1,01	-1,36
A-B7,B8	AMPK α 1 T174	-1,19	-1,04	-1,20
A-B9,B10	Akt S473	-1,20	1,18	-1,10
A-C1,C2	TOR S2448	1,06	-1,09	-1,09
A-C3,C4	CREB S133	1,05	-1,14	-1,27
A-C5,C6	HSP27 S78/S82	-1,12	-1,13	1,07
A-C7,C8	AMPK α 2 T172	1,07	1,02	-1,07
A-C9-C10	β -Catenin ____	-1,06	-1,04	-1,09
A-D1,D2	Src Y419	1,06	-1,14	1,09
A-D3,D4	Lyn Y397	-1,11	-1,28	-1,21
A-D5,D6	Lck Y394	-1,33	-1,11	-1,08
A-D7,D8	STAT2 Y689	1,05	1,06	1,12
A-D9,D10	STAT5a Y694	-1,25	-1,07	-1,28
A-E1,E2	Fyn Y420	-1,12	-1,36	-1,23
A-E3,E4	Yes Y426	1,00	1,10	-1,07
A-E5,E6	Fgr Y412	-1,13	-1,06	-1,13
A-E7,E8	STAT6 Y641	1,00	1,11	-1,07
A-E9,E10	STAT5b Y699	-1,11	1,18	-1,23
A-F1,F2	Hck Y411	-1,13	-1,29	-1,20
A-F3,F4	Chk-2 T68	-1,33	-1,11	-1,27
A-F5,F6	FAK Y397	-1,09	1,03	-1,19
A-F7,F8	PDGF R β Y751	1,07	1,73	1,16
A-F9,F10	STAT5a/b Y694/Y699	-1,06	1,07	-1,20
A-G3,G4	PRAS40 T246	-1,33	-1,17	-1,32

Membrana B.

Coordenada		AngII	SII	TRV
B-A13,A14	p53 S392	-1,19	-1,04	-1,32
B-B11,B12	Akt T308	-1,21	-1,03	-1,15
B-B13,B14	p53 S46	-1,19	1,00	-1,29
B-C13,C14	p53 S15	-1,38	1,07	-1,26
B-C15-C16	c-Jun S63	-1,59	1,13	-1,27
B-D11,D12	p70 S6 Kinase T421/S424	-1,20	1,01	-1,15
B-D13,D14	RSK1/2/3 S380/S386/S377	-1,28	1,03	-1,23
B-D15,D16	eNOS S1177	-1,63	1,27	-1,24
B-E11,E12	STAT3 Y705	-1,13	-1,04	-1,16
B-E15,E16	PLC- γ 1 Y783	-1,41	1,53	1,25
B-F11,F12	STAT3 S727	1,17	1,09	1,19
B-F13,F14	WNK1 T60	-1,33	1,18	1,09
B-F15,F16	PYK2 Y402	1,29	1,68	1,35
B-G11,G12	HSP60	-1,17	1,07	-1,03

O perfil geral de fosforilação de quinases após ativação do receptor AT₁ difere entre todos os grupos, Ang II, SII e TRV120027 e o controle e também entre os próprios grupos. Consideramos alterações na fosforilação maiores que 33% (1/3) (Xiao et al. 2010) entre os grupos e o controle, ou entre os próprios grupos como as mais interessantes, dessa maneira destacam-se 16 quinases p38 α , ERK1/2, GSK-3 α , EGF R, MSK1/2, Lck, Fyn, Chk-2, PDGF R β , PRAS40, p53, c-Jun, eNOS, PLC- γ 1, WNK1, PYK2, as quais os perfis de fosforilação são mostrados em detalhe na figura 5.

Figura 5 - Níveis de fosforilação de quinases após ativação do receptor AT₁ por AngII, SII e TRV120027. São mostradas quinases com regulação de pelo menos 33% no seu nível de fosforilação em células HEK-AT₁-GFP estimuladas com AngII 100nM (■), SII 30 μ M (■) ou TRV120027 100nM (■) por 10 minutos. Os Níveis de fosforilação são mostrados em vezes de aumento (positivos) ou diminuição (negativos) em relação ao controle (considerado basal, isto é 1).

Algumas quinases se destacam por mostrarem níveis de fosforilação altamente diferenciados entre os grupos de tratamento. p38 α , por exemplo, diminui sua fosforilação em comparação ao controle, em resposta a TRV120027 de maneira significativa enquanto praticamente não se altera nos outros tratamentos. ERK 1/2 também mostra um perfil muito interessante, sua fosforilação é aumentada ao tratamento com AngII, e também com SII, embora os níveis sejam menores aos verificados para AngII, mas para TRV120027 decaem. EGF R e MSK 1/2 se destacam, pois mostram uma diminuição significativa de fosforilação em resposta ao tratamento com TRV120027, mas não aos demais. Já PDGF R β e PYK2 têm seus níveis de fosforilação aumentados somente ao estímulo com SII. p53, c-jun e eNos, apresentam um perfil semelhante com diminuição de fosforilação tanto para AngII, quanto para TRV120027, com SII sem alteração ou aumentado.

2. Cinética de fosforilação de quinases.

A cinética de fosforilação das quinases ERK 1/2, p53, JNK e Akt são apresentados na figura 6. Os níveis de fosforilação foram mensurados em células HEK-AT₁-GFP estimuladas com AngII 100nM, SII 30 μ M ou TRV120027 100nM por 0 (controle), 2, 5, 10 ou 20 minutos. São mostrados níveis de fosforilação normalizados pelo controle.

Figura 6 - Cinética de fosforilação de ERK 1/2, c-Jun, p53, JNK e Akt após ativação do receptor AT₁ com AngII, SII ou TRV120027. Fosforilação de ERK 1/2 (A), p53 (B), JNK (C) E AKT (D) a partir de células HEK-AT₁-GFP estimuladas com AngII 100nM (●), SII 30μM (■) ou TRV120027 100nM (▲) por 0 (controle), 2, 5 10 ou 20 minutos. Dados representando a média de 2 ou 3 experimentos independentes (n = 3 ou 2), * denota diferença em relação aos demais grupos de tratamento quando n=3 com p<0,05 usando *One-Way ANOVA* e pós teste Newman-Keuls.

A cinética de fosforilação obtida para todas as quinases analisadas mostra diferenças, ou ao menos uma tendência de diferença entre os grupos de tratamento. No caso de ERK1/2 a fosforilação decorrente do estímulo com AngII tende a aumentar nos tempos iniciais (2 e 5 minutos) em maior nível se comparada à SII e TRV120027, que embora, também apresentam tendência de aumento, SII com seu maior em 2 minutos, e TRV120027 em 5 minutos este é menos pronunciado. A partir de 10 minutos os níveis diminuem em todos os tratamentos permanecendo próximos ao valor do controle. p53 mostra uma tendência de pequeno aumento (aproximadamente 1,5 vezes em relação ao controle) ao longo do tempo, quando tratada com AngII ou TRV120027, enquanto para SII tende à diminuição, caindo pela metade os níveis de fosforilação com 10 minutos de estímulo. JNK mostra uma variação em relação aos três estímulos, com AngII a tendência é um aumento de quase 3 vezes na fosforilação com 2 minutos e sustentação ao longo do tempo; SII se comporta de modo a aumentar os níveis de fosforilação nos tempos iniciais alcançando o valor mais alto com 10 minutos e decaindo novamente; TRV mostra pequena diminuição dos níveis de fosforilação ao longo do tempo, e mostra diferença significativa em relação aos demais grupos. Para Akt o perfil sugerido é de manutenção da fosforilação equivalente ao controle ao longo do tempo para AngII e SII, enquanto TRV120027 mostra diminuição com 10 e 20 minutos, se mostrando significativamente diferente em relação aos outros tratamentos.

3. Perfil de expressão gênica

O perfil de expressão gênica obtido a partir do tratamento de células HEK-AT₁-GFP com veículo (controle), AngII 100nM, SII 30μM ou TRV120027 100nM por 6 horas é apresentado na figura 7 por gráficos do tipo *Heat map* em que os dados de expressão são representados por uma escala de cores que vai do vermelho, máximo de expressão alcançado, passando pelo preto, expressão basal referente ao controle, até o verde, mínimo de expressão.

Os dados quantitativos são mostrados na tabela 2, e representam vezes de expressão de RNAm em relação ao controle (estabelecido como 1), valores positivos representam aumento e negativos diminuição dos níveis de expressão.

Figura 7 - Perfil de expressão gênica após ativação do receptor AT_1 por AngII SII ou TRV120027. Heat maps do perfil de expressão gênica de células HEK- AT_1 -GFP não estimuladas (controle) ou estimuladas com (A) AngII 100nM, (B) SII 30 μ M ou (C) TRV120027 100nM por 6 horas. A escala de cores do verde ao vermelho vai do mínimo ao máximo de expressão como mostrado na figura, com preto determinando sem alteração em relação ao controle e o cinza genes que não tiveram expressão detectada. São mostradas as coordenadas para identificação dos genes, que estão especificados na tabela 2, junto aos dados quantitativos. Dados representando a média de 2 experimentos independentes (n=2).

Tabela 2- Resultados quantitativos do perfil de expressão gênica após ativação do receptor AT₁ por AngII SII ou TRV120027. Os valores são mostrados em vezes com relação ao controle e foram previamente normalizados pela expressão do gene *housekeeping* (destacado em cinza) . Estão destacados os genes em que a expressão difere em mais de 66 % entre os grupos de tratamento.

Coordenada	Gene	AngII		SII		TRV120027	
A01	<i>Adenylate cyclase 5</i>	-1.34	-	-1.18	-	-1.24	-
A02	<i>Adenosine A2a receptor</i>	1.01	-	1.06	-	1.00	-
A03	<i>Adrenergic, beta-1-, receptor</i>	-1.43	-	-1.40	-	-1.91	-
A04	<i>Adrenergic, beta-2-, receptor, surface</i>	-1.49	-	-1.20	-	-1.92	A
A05	<i>Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)</i>	1.06	¹ B	-1.03	B	1.68	-
A06	<i>Angiotensin II receptor, type 1</i>	-1.29	-	-1.08	-	-1.40	¹ A
A07	<i>Angiotensin II receptor, type 2</i>	-	¹ C	-	C	-	C
A08	<i>Angiotensin II receptor-associated protein</i>	-2.48	-	-2.33	-	-2.97	-
A09	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	-2.30	-	-2.42	-	-2.51	-
A10	<i>Arrestin, beta 1</i>	-2.20	-	-2.34	-	-2.23	-
A11	<i>Arrestin, beta 2</i>	-1.22	-	-1.40	-	-1.95	-
A12	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 1</i>	-2.20	-	-2.12	-	-1.57	-
B01	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	-1.41	A	-1.19	-	-1.20	A
B02	<i>BCL2-like 1</i>	-2.18	-	-2.47	-	-2.36	-
B03	<i>Calcitonin Receptor</i>	1.99	B	2.89	-	2.07	-
B04	<i>Calcitonin receptor-like</i>	-1.74	-	-1.31	B	-1.69	-
B05	<i>Calcium-sensing receptor</i>	-6.84	-	-3.23	-	-1.39	-
B06	<i>Chem-ine (C-C motif) ligand 2</i>	1.34	-	1.68	B	1.75	-

Coordenada	Gene	AngII		SII		TRV120027	
B07	<i>Chem-ine (C-C motif) ligand 4</i>	-1.97	-	-1.31	B	-1.96	-
B08	<i>Cyclin D1</i>	-1.07	-	1.02	-	-1.30	-
B09	<i>Cyclin E1</i>	-1.70	-	-1.56	-	-1.99	-
B10	<i>Cyclin E2</i>	1.04	-	1.22	-	-1.02	-
B11	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>	1.21	-	1.36	-	1.33	-
B12	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>	-1.65	-	-1.38	-	-1.57	-
C01	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>	-1.86	-	-1.58	-	-1.67	-
C02	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-1.45	-	-1.34	-	-1.34	-
C03	<i>Corticotropin releasing hormone receptor 1</i>	-1.13	B	-1.02	B	1.80	-
C04	<i>Corticotropin releasing hormone receptor 2</i>	-1.63	B	-1.38	B	-2.23	-
C05	<i>Connective tissue growth factor</i>	-1.08	-	1.36	-	-1.16	-
C06	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>	1.17	B	1.54	B	2.91	-
C07	<i>Dopamine receptor D1</i>	1.24	B	-1.17	B	2.66	-
C08	<i>Dopamine receptor D2</i>	2.16	-	1.35	B	3.73	-
C09	<i>Dual specificity phosphatase 14</i>	-1.76	-	-1.62	-	-1.93	-
C10	<i>Endothelin 1</i>	-1.14	-	-1.21	-	-1.44	A
C11	<i>Early growth response 1</i>	-1.51	A	-1.54	A	-2.46	A
C12	<i>ELK1, member of ETS oncogene family</i>	-2.06	-	-1.84	-	-2.64	-
D01	<i>ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)</i>	-2.35	A	-2.31	A	-2.17	A

Coordenada	Gene	AngII		SII		TRV120027	
D02	<i>Fibroblast growth factor 2 (basic)</i>	-2.14	-	-2.20	-	-1.91	-
D03	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	-5.03	-	-1.95	-	-1.38	-
D04	<i>Galanin Receptor 2</i>	1.71	B	2.72	B	1.69	B
D05	<i>Glucagon receptor</i>	-1.28	-	-1.06	B	-1.85	B
D06	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide</i>	-1.21	-	-1.08	-	-1.23	-
D07	<i>GNAS complex locus</i>	-1.21	-	-1.10	-	-1.39	-
D08	<i>Glutamate receptor, metabotropic 1</i>	1.24	-	1.46	-	1.29	-
D09	<i>Glutamate receptor, metabotropic 2</i>	-1.49	-	-1.39	-	-2.95	A
D10	<i>Glutamate receptor, metabotropic 4</i>	1.48	B	1.56	B	1.06	-
D11	<i>Glutamate receptor, metabotropic 5</i>	-1.31	-	-1.10	-	-1.54	-
D12	<i>Glutamate receptor, metabotropic 7</i>	-	C	-	C	-	C
E01	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	-	C	-	C	-	C
E02	<i>Interleukin 1, beta</i>	-1.29	-	-1.14	B	-1.28	-
E03	<i>Interleukin 1 receptor, type I</i>	-2.58	-	-1.72	-	1.06	-
E04	<i>Interleukin 1 receptor, type II</i>	-2.68	-	-2.08	B	-1.48	-
E05	<i>Interleukin 2</i>	-	C	-	C	-	C
E06	<i>Jun proto-oncogene</i>	-1.85	-	-1.82	B	-1.48	-
E07	<i>Jun B proto-oncogene</i>	-2.56	-	1.17	B	-1.13	-
E08	<i>Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor</i>	1.01	B	1.36	-	-2.55	-
E09	<i>Lysophosphatidic acid receptor 1</i>	-	C	-	C	-	C
E10	<i>Lysophosphatidic acid receptor 2</i>	-	C	-	C	-	C

Coordenada	Gene	AngII		SII		TRV120027	
E11	<i>MYC associated factor X</i>	1.01	-	-1.11	-	1.09	-
E12	<i>Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)</i>	-1.55	-	-1.67	-	-1.33	-
F01	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	-	C	-	C	-	C
F02	<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>	-1.47	-	-1.36	-	-1.45	-
F03	<i>Opioid receptor, delta 1</i>	-1.48	B	-1.27	B	-1.28	-
F04	<i>Opioid receptor, kappa 1</i>	-2.02	-	-1.91	-	-1.93	-
F05	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>	-1.39	-	-1.14	-	-1.11	-
F06	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide</i>	-7.57	-	-2.76	-	-2.41	-
F07	<i>Protein kinase C, alpha</i>	-1.94	-	-1.34	-	1.42	-
F08	<i>Prostaglandin D2 receptor (DP)</i>	-1.57	-	-1.24	-	-1.54	-
F09	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	-	C	-	C	-	C
F10	<i>Parathyroid hormone 1 receptor</i>	-1.32	-	-1.15	-	-1.19	-
F11	<i>Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa</i>	-1.15	B	2.03	B	2.58	-
F12	<i>Rhodopsin</i>	2.03	A	2.93	A	1.79	A
G01	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>	-1.89	A	-1.52	-	-1.42	A
G02	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 2</i>	-1.13	-	1.10	-	-1.25	-
G03	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 3</i>	-2.55	-	-2.26	-	-1.25	-
G04	<i>Secretin receptor</i>	-	C	-	C	-	C

Coordenada	Gene	AngII		SII		TRV120027	
G05	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	-2.22	-	-1.27	-	-	-
G06	Suppressor of cyt-ine signaling 1	-1.66	A	-1.77	A	-1.60	A
G07	Tumor necrosis factor	-1.78	-	-2.21	-	-2.79	-
G08	Thyroid stimulating hormone receptor	-1.22	B	-1.52	B	-2.35	-
G09	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	1.41	-	2.12	-	-1.08	-
G10	Vascular cell adhesion molecule 1	-	C	-	C	-	C
G11	Vascular endothelial growth factor A	-1.21	-	-1.25	-	-1.05	-
G12	Tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	-1.99	-	-1.65	-	-1.92	-
² H01	Actin, beta	-1.23	-	-1.07	-	-1.68	-
H02	Beta-2-microglobulin	-1.17	-	-1.04	-	-1.21	-
³ H03	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.00	-	1.00	-	1.00	-
H04	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	1.08	-	1.12	-	-1.17	-
H05	Ribosomal protein, large, P0	-1.59	-	-1.22	-	-2.00	-

¹ **A.** Entre controle e amostra, um apresentou ct (*threshold cycle*)>30 (significando pouca expressão) e o outro <30, indicando que o valor em vezes de alteração ao controle mostrado na tabela pode ter amplitude maior que o mostrado, mas é pelo menos o indicado. **B.** Tanto controle quanto amostra tem ct >30, dessa maneira o valor indicado pode variar muito (p>0,05) e novas análises são necessárias para confirmação. **C.** Amostra e controle tem ct>35 indicando que o gene não tem expressão detectável.

² Os genes com coordenadas H01, H02, H03, H04 e H05 são mostrados na tabela, mas não na figura 7 em decorrência de terem sido usados como possíveis genes housekeeping, não tendo sido incluídos na análise por *Heat map*.

³ Gene usado como housekeeping, escolhido por ter a menor taxa de variação na expressão entre os 4 grupos analisados.

O perfil geral de expressão gênica após ativação do receptor AT₁ diferiu entre todos os grupos testados, Ang II, SII e TRV120027 além de entre estes e o controle. Consideramos alteração no nível de expressão maior ou igual 66% (2/3) entre os grupos de tratamento como as mais interessantes, dessa maneira destacam-se 27 genes, marcados na tabela 2 e representados graficamente na figura 8.

Figura 8 - Níveis de expressão gênica após ativação do receptor AT₁ por AngII, SII e TRV120027. São mostrados genes em que o nível de expressão é pelo menos 66% diferente entre pelo menos dois dos tratamentos testados. Os estímulos foram feitos com AngII 100nM (■), SII 30μM (■) ou TRV120027 100nM (■) em células HEK-AT₁-GFP por 6 horas. Os Níveis de expressão são mostrados em vezes de aumento (positivos) ou diminuição (negativos) em relação ao controle (considerado 0). Dados representando 2 experimentos independentes (n=2). Observação: para identificação dos genes verifique a lista no anexo 2.

Alguns genes se destacam por expressão altamente diferenciada entre os grupos de tratamento. CASR, FOS e PIK3CG foram altamente suprimidos ao tratamento com AngII comparado ao controle ou aos demais tratamentos, demonstrando pelo menos 4 vezes de diminuição. CRHR1 e CYP19A1 se destacam por expressão elevada com TRV120027 em comparação aos demais tratamentos, no caso do primeiro inclusive somente este peptídeo foi capaz de desencadear expressão. TRV120027 foi ainda capaz de diminuir a expressão de EGR1, GRM2, LHCGR, TNF, TSHR e ELK1 de maneira muito mais significativa que AngII e SII. CALCR, GALR2, RHO e UCP se destacam por ter a expressão elevada somente em resposta ao estímulo com SII.

4. Ensaio de migração MDA-MB-231.

A capacidade de migração celular em linhagem de tumor de mama humano MDA-MB-231, previamente estimuladas ou não (controle) com AngII 100nM, SII 30µM ou TRV120027 100nM por 24 horas , é mostrada 24 e 48 horas ser feita ferida no tapete celular (figura 9).

Figura 9 - Migração relativa de células MDA-MB-231 estimuladas com AngII, SII ou TRV120027. É mostrada migração relativa ao tempo inicial (T0), ponto em que foi feita a ferida, e após com 24 e 48 horas em células MDA-MB-231 controle ou previamente estimuladas com AngII 100nM (■), SII 30μM (■) ou TRV120027 100nM (■) por 24 horas. Dados representando 4 experimentos independentes (n=4), * denota diferença significativa ao controle com $p < 0,05$ a partir de teste t-Student.

A capacidade de migração celular é aumentada em células pré-estimuladas com AngII, sendo cerca de 36% maior que o controle com 24 horas após ser feita a ferida e não se alterando mais até 48 horas. Os pré-tratamentos com SII e TRV120027 apresentaram uma capacidade de migração menor que AngII em 24 horas, porém se mostrou similar em 48 horas.

Discussão

No passado acreditava-se que a sinalização procedente da ativação dos GPCRs era exclusivamente dependente de proteína G, como uma via única de resposta. Hoje se sabe que outras proteínas podem participar da sinalização mediada por estes receptores, e que, portanto, a cascata de sinalização não segue um fluxo simples e exclusivo. As proteínas mais conhecidas por participar na sinalização dos receptores 7TM, independente da participação de proteína G, são as β -arrestinas nas suas isoformas 1 e 2, que desencadeiam vias específicas subsequentes à sua ativação (Luttrell *et al.*, 2001; McDonald, 2000). A estrutura estabilizada entre o receptor e a molécula ligante foi mostrada como um fator decisivo para os diversos tipos de respostas desencadeadas “cascata abaixo” (Zimmerman *et al.*, 2012). O conceito de que um mesmo receptor interagindo com ligantes diferentes poderia desencadear respostas distintas (deixando de ativar uma determinada via de sinalização) é muito diferente do conceito de antagonista, que no caso interage com um receptor mas age simplesmente como um bloqueador de sua ação. Este novo conceito leva à conclusão que as respostas associadas à ativação de GPCR não devem ser interpretadas apenas como “on” ou “off”. De fato, acreditasse que os padrões de sinalização são modulados refinadamente em um grau muito mais complexo, que notadamente é influenciado pela estrutura do ligante em questão (Kenakin & Carolina 2007), bem como possivelmente por outros aspectos que possam influenciar a dinâmica estrutural/funcional do receptor, tais como presença de proteínas adaptadoras, dimerização com outros GPCRs, e mesmo alteração da composição da membrana plasmática.

Os agonistas seletivos capazes de funcionalmente separar as possíveis vias desencadeadas por um receptor 7TM, são extensivamente usados para estudos de como a regulação diferencial de vias tem influência nas respostas finais de um dado receptor. O receptor AT₁ é particularmente interessante para esses estudos, pois os peptídeos SII e TRV120027 já estão bem caracterizados como agonistas seletivos para a via de β -arrestinas neste receptor (Wei *et al.*, 2003; Violin *et al.*, 2010). O peptídeo SII é largamente estudado, e as vias de sinalização desencadeadas quando este peptídeo se liga ao receptor AT₁ estão principalmente relacionadas à família das Src quinases, e cascatas dependentes das MAPKs, ERK1/2 e JNK (Luttrell *et al.*, 2001; Luttrell & Lefkowitz 2002; Lefkowitz & Shenoy 2005; Reiter & Lefkowitz 2006). O análogo TRV120027, embora estabelecido como ligante seletivo

para β -arrestinas, e mostrado como uma das promessas de drogas no controle de doenças influenciadas pela ativação do receptor AT_1 (DeWire & Violin 2011), no entanto, foi muito pouco analisado quanto às respostas “finais” após sua interação com este receptor. Neste estudo nós realizamos uma análise comparativa do perfil de sinalização destes dois agonistas seletivos com leituras de possíveis alvos abaixo (“downstream”) ao acoplamento com as β -arrestinas.

Nossos dados inicialmente confirmam que a sinalização mediada pelo receptor AT_1 varia conforme o ligante que está interagindo com o receptor. Consoante a literatura, nós ainda verificamos que as vias da proteína G e de β -arrestinas desencadeadas pela ativação do receptor AT_1 culminam em respostas de sinalização caracteristicamente diferentes (Tohgo *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2006; Aplin 2007; Lee *et al.*, 2008). O fato mais interessante observado em nossos dados é no entanto que, embora SII e TRV120027 sinalizem inicialmente via β -arrestina, as repostas “cascata abaixo” à ativação do receptor AT_1 por estes ligantes é diferente. Nós mostramos que tanto o perfil de ativação de quinases na célula (resposta inicial), quanto de expressão gênica (resposta tardia) varia de acordo com o peptídeo que interage com receptor, mesmo que a via de acoplamento inicial, no caso β -arrestina, seja coincidente. Nossos dados são sustentados por estudos que demonstram que a estrutura é essencial nas vias de sinalização desencadeadas por GPCRs, incluindo estudos com SII que estabilizaria uma conformação específica do complexo β -arrestina- AT_1 no endossomo (Tohgo *et al.*, 2003; Zimmerman *et al.*, 2012).

Algumas hipóteses para explicar como SII e TRV120027, mesmo partindo de uma sinalização comum via β -arrestina poderiam desencadear cascata abaixo respostas distintas podem ser levantadas. Nobles e colaboradores (2011) mostraram para o receptor β_2 -adrenérgico, que diferentes GRKs (proteínas que fosforilam a extremidade C-terminal dos receptores 7TM sinalizando para o recrutamento de β -arrestinas) interagindo com o receptor podem levar a um padrão específico de resíduos fosforilados, uma espécie de código de barras biológico, que diferencia o modo como ocorre a interação de β -arrestinas com este receptor, e dessa forma podendo influenciar na estrutura do endossomo formado e subsequente interação de proteínas com o mesmo. Assim, GRKs diferentes, gerando “códigos de barras” diferentes, poderiam desencadear conformações distintas do complexo ligante-

receptor- β -arrestina, seguido por alterações na estrutura dos endossomos e consequentemente na sua interação com moléculas de sinalização, desencadeando respostas distintas. Nossa hipótese seria a de que no receptor AT₁, diferentes GRKs poderiam ter o mesmo efeito na fosforilação do receptor que o verificado para o receptor β_2 -adrenérgico. Dessa forma, SII e TRV120027 poderiam permitir a ação de isoformas distintas de GRKs, explicando as diferenças verificadas nas vias de sinalização cascata abaixo nos nossos dados. É interessante notar que existem duas isoformas de β -arrestina presentes nas células que participam da sinalização via receptor AT₁, β -arrestina 1 e β -arrestina 2, e que a sinalização diferencial decorrente da ativação preferencial de uma destas diferentes isoformas, embora ainda pouco estudada, é provável. Dessa forma, como uma possível explicação para o fenômeno que observamos em nossos dados, é possível que SII e TRV recrutem preferencialmente e/ou distintamente uma das isoformas de β -arrestina.

Os dados mais relevantes obtidos a partir dos arranjos de quinases e arranjos de PCR em tempo real são os relacionados à via de sinalização JNK-c-jun-fos. Condizente aos dados para a quinase c-jun, que tem aumento nos níveis de fosforilação após o estímulo do receptor AT₁ por SII, e diminuição por AngII, e dados do arranjo de PCR que mostram supressão da expressão dos genes fos e Jun B após estímulo por AngII, dados da literatura mostram que β -arrestina 2 é capaz de ativar a via JNK (McDonald, 2000). JNK é uma quinase que pode ativar c-jun juntamente com c-fos, que dimerizam podendo acarretar aumento da expressão gênica no núcleo (Massaro, *et al.*, 2009). Dados obtidos com TRV120027 mostram menos influência nas vias de MAPKs por parte deste ligante, com diminuição de fosforilação de ERK 1/2 e p38 α no ensaio de arranjo de quinases. No caso da cinética de fosforilação das quinases ERK1/2, c-Jun, p53, JNK e Akt pode-se observar um perfil que tende a variar entre os tratamentos do receptor AT₁ por AngII, SII ou TRV120027, o que dessa maneira corroboraria com nossos demais resultados, vale ressaltar, no entanto, que estes são dados preliminares.

Nossos dados em células tumorais, mostrados no modelo de migração de células de tumor de mama MDA-MB-231, mostram diferenças de efeitos do agonista completo AngII e os agonistas seletivos testados. No entanto, estes dados são apenas preliminares e portanto são inconclusivos sobre diferenças funcionais significativas entre os agonistas seletivos. Por outro lado, tais dados preliminares,

somados aos dados aqui descritos para os arranjos de quinases e de PCR em tempo real mostram que estes peptídeos podem - em algum grau – levar a uma reprogramação das células de modo a influenciar no processo de migração, e provavelmente em muitos outros com relevância para outros eventos fisiopatológicos. Tais perspectivas, se mostram como interessantes investigações para o futuro do nosso laboratório e de outros grupos com interesse em GPCR e agonismo seletivo.

Conclusão

Nossos dados permitem concluir que embora os agonistas seletivos para o receptor AT₁, SII e TRV120027, sinalizem preferencialmente através da via dependente de β -arrestinas, observando-se cascata abaixo suas respostas são caracteristicamente diferentes, influenciando distintamente a regulação do nível de fosforilação de quinases intracelulares bem como a expressão de alguns genes. Estes estudos alteram ainda mais o cenário sobre a sinalização desencadeada pelos receptores 7TM, mostrando que mesmo entre agonistas seletivos podem ocorrer “seletividades” ou “tendências” para a sinalização em maior ou menor grau por vias distintas cascata abaixo.

Dessa forma, este trabalho contribui com a caracterização funcional de ligantes que tenham como alvo GPCRs, pois mostra de forma ainda mais completa os efeitos que diferentes ligantes desencadeiam quando interagindo com um mesmo tipo de receptores, e a regulação diferencial de suas complexas vias de sinalização.

A figura 10 mostra um modelo esquemático das alterações particulares que cada ligante pode acarretar em um receptor, modificando o receptor e consequentemente os processos cascata abaixo e respostas.

Figura 10 - Modelo esquemático das diferenças de sinalização induzidas pela interação ligante/receptor. O ligante ao interagir com o receptor o modifica estruturalmente de maneira particular de forma que a resposta desencadeada possa ser modulada por esta estrutura adquirida. A figura ilustra que no caso do receptor AT_1 os três ligantes testados, levam a uma resposta cascata abaixo diferente, embora esta resposta possa partir de vias equivalentes nos agonistas seletivos.

Referências Bibliográficas

- Ager, Eleanor I, Jaclyn Neo, and Christopher Christophi. 2008. "The renin-angiotensin system and malignancy." *Carcinogenesis* 29(9): 1675–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632755> (March 30, 2013).
- Ahn, Seungkirl, Sudha K Shenoy, Huijun Wei, and Robert J Lefkowitz. 2004. "Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor." *The Journal of biological chemistry* 279(34): 35518–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15205453> (March 30, 2013).
- Aplin, Mark, Marie Mi Bonde, and Jakob Lerche Hansen. 2009. "Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity." *Journal of molecular and cellular cardiology* 46(1): 15–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848837> (May 8, 2013).
- Aplin, Mark, Gitte Lund Christensen, Mikael Schneider, Arne Heydorn, Steen Gammeltoft, Anne Louise Kjølbye, Søren P Sheikh, and Jakob Lerche Hansen. 2007. "Differential extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation by the angiotensin type 1 receptor supports distinct phenotypes of cardiac myocytes." *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 100(5): 296–301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448114>.
- Bader, Michael, and Detlev Ganten. 2008. "Update on tissue renin-angiotensin systems." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 86(6): 615–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18414822> (May 8, 2013).
- Bing Luan, Jian Zhao, Haiya Wu, Baoyu Duan, Guangwen Shu, Xiaoying Wang, Dangsheng Li, Weiping Jia, Jiuhong Kang & Gang Pei. 2009. "Deficiency of a β -arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance." *Nature* 457: 1146–1149.
- Bonde, Marie Mi, Jonas Tind Hansen, Samra Joke Sanni, Stig Haunsø, Steen Gammeltoft, Christina Lyngsø, and Jakob Lerche Hansen. 2010. "Biased signaling of the angiotensin II type 1 receptor can be mediated through distinct mechanisms." *PloS one* 5(11): e14135. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2994726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 3, 2013).

- Bryja, Vítězslav, Dietmar Gradl, Alexandra Schambony, Ernest Arenas, and Gunnar Schulte. 2007. "Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(16): 6690–5. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1871847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bryja, Vítězslav, Alexandra Schambony, Lukás Cajánek, Isabel Dominguez, Ernest Arenas, and Gunnar Schulte. 2008. "Beta-arrestin and casein kinase 1/2 define distinct branches of non-canonical WNT signalling pathways." *EMBO reports* 9(12): 1244–50. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2608197&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 12, 2013).
- Carey, Robert M. 2005. "Update on the role of the AT2 receptor." *Current opinion in nephrology and hypertension* 14(1): 67–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15586018>.
- Daniels, Derek, Daniel K Yee, Lucy F Faulconbridge, and Steven J Fluharty. 2005. "Divergent behavioral roles of angiotensin receptor intracellular signaling cascades." *Endocrinology* 146(12): 5552–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123155> (May 9, 2013).
- Dawson, Ted M, Jeffrey L Arriza, Donna E Jaworsky, Felice F Borisy, H Attramadal, Robert J Lefkowitz, and Gabriele V Ronnettt. 1992. "β₂-Adrenergic Receptor Kinase2 and P-Arrestin-2." 120047(December).
- DeFea, K a, Z D Vaughn, E M O'Bryan, D Nishijima, O Déry, and N W Bunnett. 2000. "The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20): 11086–91. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- DeFea, K a, J Zalevsky, M S Thoma, O Déry, R D Mullins, and N W Bunnett. 2000. "beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2." *The Journal of cell biology* 148(6): 1267–81. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Deshayes, Frédérique, and Clara Nahmias. 2005. "Angiotensin receptors: a new role in cancer?" *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16(7): 293–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061390> (May 11, 2013).
- DeWire, Scott M, and Jonathan D Violin. 2011a. "Biased ligands for better cardiovascular drugs: dissecting G-protein-coupled receptor pharmacology." *Circulation research* 109(2): 205–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737816> (March 4, 2013).
- Drake, Matthew T, Sudha K Shenoy, and Robert J Lefkowitz. 2006. "Trafficking of G protein-coupled receptors." *Circulation research* 99(6): 570–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973913> (March 3, 2013).
- Egami, Kimiyasu, Toyooki Murohara, Toshifumi Shimada, Ken-ichiro Sasaki, Satoshi Shintani, Takeshi Sugaya, Masahiro Ishii, Teiji Akagi, Hisao Ikeda, Toyojiro Matsuishi, and Tsutomu Imaizumi. 2003. "Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth." 112(1): 67–75.
- Ferguson R K, Turini G A, Brunner HR, Gavras H, McKinstry D N. 1977. "A specific orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme in man." *Lancet* 1: 775–778.
- Fleming, Ingrid, Karin Kohlstedt, and Rudi Busse. 2006. "The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling." *Current opinion in nephrology and hypertension* 15(1): 8–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340660>.
- Forse, R a. 2000. "Biology of heterotrimeric G-protein signaling." *Critical care medicine* 28(4 Suppl): N53–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807316>.
- Fujita, Mamoru, Izumi Hayashi, Shohei Yamashina, Akiyoshi Fukamizu, Moritoshi Itoman, and Masataka Majima. 2005. "Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth." *Carcinogenesis* 26(2): 271–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637093> (May 11, 2013).

- Fujita, Mamoru, Izumi Hayashi, Shohei Yamashina, Moritoshi Itoman, and Masataka Majima. 2002. "Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis." *Biochemical and biophysical research communications* 294(2): 441–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051731>.
- Gasparo, M D E, K J Catt, T Inagami, and J W Wright. 2000. "International Union of Pharmacology . XXIII . The." 52(3): 415–472.
- George, Amee J, Walter G Thomas, and Ross D Hannan. 2010. "The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks." *Nature reviews. Cancer* 10(11): 745–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20966920> (February 27, 2013).
- Godin, C M, and S S G Ferguson. 2012. "Biased agonism of the angiotensin II type 1 receptor." *Mini reviews in medicinal chemistry* 12(9): 812–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681254>.
- Greco, S, a Muscella, M G Elia, P Salvatore, C Storelli, a Mazzotta, C Manca, and S Marsigliante. 2003. "Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells." *Journal of cellular physiology* 196(2): 370–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12811831> (May 11, 2013).
- Hanahan, D, and J Folkman. 1996. "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* 86(3): 353–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718>.
- Hargrave, P A, H Mcdowell, Donna R Curtis, Janet K Wang, Elizabeth Juszczak, Shao-ling Fong, J K Mohana Rao, and P Argos. 1983. "The Structure of Bovine Rhodopsin *." (October 1982): 235–244.
- Herr, D, M Rodewald, H M Fraser, G Hack, R Konrad, R Kreienberg, and C Wulff. 2008. "Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer." *Gynecologic oncology* 109(3): 418–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395779> (May 11, 2013).

- Holloway, Alice C, Hongwei Qian, Luisa Pipolo, James Ziogas, Shin-ichiro Miura, Sadashiva Karnik, Bridget R Southwell, Michael J Lew, and Walter G Thomas. 2002. "Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors." *Molecular pharmacology* 61(4): 768–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901215>.
- Hu, Shanshan, Di Wang, Jingjing Wu, Juan Jin, Wei Wei, and Wuyi Sun. 2013. "Involvement of β -arrestins in cancer progression." *Molecular biology reports* 40(2): 1065–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076527> (February 28, 2013).
- Huang, Wei, Yun-Lin Wu, Jie Zhong, Feng-Xiang Jiang, Xiang-Long Tian, and Li-Fen Yu. 2008. "Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts." *Digestive diseases and sciences* 53(5): 1206–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934850> (May 12, 2013).
- Hunyady, László, and Kevin J Catt. 2006. "Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 20(5): 953–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141358> (April 1, 2013).
- Ignatova, E G, M M Belcheva, L M Bohn, M C Neuman, and C J Coscia. 1999. "Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19(1): 56–63. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2504521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Inwang, E R, J R Puddefoot, C L Brown, a W Goode, S Marsigliante, M M Ho, J G Payne, and G P Vinson. 1997. "Angiotensin II type 1 receptor expression in human breast tissues." *British journal of cancer* 75(9): 1279–83. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2228240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jarpe, Matthew B, Cindy Knall, Fiona M Mitchell, Anne Mette Buhl, Emir Duzic, and Gary L Johnson. 1998. "Agonist toward Neuropeptide and Chemokine Receptors" 273(5): 3097–3104.

- Kenakin, Terry. 2001. "Inverse , protean , and ligand-selective agonism : matters." *the FASEB Journal*
- Kenakin, Terry. 2007a. "Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors." *Trends in pharmacological sciences* 28(8): 407–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629960> (February 27, 2013).
- Kenakin, Terry, 2007a. "Functional Selectivity through Protean and Biased Agonism : Who Steers the Ship ?" 72(6): 1393–1401.
- Kim, Jihee, Seungkirl Ahn, Keshava Rajagopal, and Robert J Lefkowitz. 2009. "Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase Czeta pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor." *The Journal of biological chemistry* 284(18): 11953–62. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2673264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 30, 2013).
- Lee, Mi-Hye, Hesham M El-Shewy, Deirdre K Luttrell, and Louis M Luttrell. 2008. "Role of beta-arrestin-mediated desensitization and signaling in the control of angiotensin AT1a receptor-stimulated transcription." *The Journal of biological chemistry* 283(4): 2088–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006496> (May 8, 2013).
- Lefkowitz, Robert J. 2004. "Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors." *Trends in pharmacological sciences* 25(8): 413–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15276710> (April 2, 2013).
- Lefkowitz, Robert J, and Sudha K Shenoy. 2005. "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." *Science (New York, N.Y.)* 308(5721): 512–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845844> (March 4, 2013).
- Lever, a F, D J Hole, C R Gillis, I R McCallum, G T McInnes, P L MacKinnon, P a Meredith, L S Murray, J L Reid, and J W Robertson. 1998. "Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer?" *Lancet* 352(9123): 179–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683206>.

- Lohsesb, Martin J, Sabine Andexingers, Julie Pitcher, Susan Trukawinskig, Juan Codinan, Jean-pierre Faurell, Marc G Caron, and Robert J Lefkowitzg. 1992. "Receptor-specific Desensitization with Purified Proteins." 8558–8564.
- Luttrell, L M, F L Roudabush, E W Choy, W E Miller, M E Field, K L Pierce, and R J Lefkowitz. 2001. "Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(5): 2449–54. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=30158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Luttrell, Louis M, and Robert J Lefkowitz. 2002. "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." *Journal of cell science* 115(Pt 3): 455–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861753>.
- Luttrell, Louis M, Francine L Roudabush, Eric W Choy, William E Miller, Michael E Field, Kristen L Pierce, and Robert J Lefkowitz. 2001. "Activation and targeting of extracellular signal- regulated kinases by β_1 -arrestin scaffolds." 98(5): 2449–2454.
- Luttrell, L. M, Ferguson S. S. G., Daaka Y., Miller W. E., Maudsley S., Della Rocca G. J., Lin F. T., Kawakatsu H., Owada K., Luttrell D. K., Caron M. G., Lefkowitz R. J. 1999. "-Arrestin-Dependent Formation of 2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes." *Science* 283(5402): 655–661. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.283.5402.655> (February 27, 2013).
- Massaro, Catherine M, Jan Pielage, and Graeme W Davis. 2009. "Molecular mechanisms that enhance synapse stability despite persistent disruption of the spectrin/ankyrin/microtubule cytoskeleton." *The Journal of cell biology* 187(1): 101–17. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762090&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 5, 2013).
- Maudsley, S, S a Patel, S-S Park, L M Luttrell, and B Martin. 2012. "Functional signaling biases in G protein-coupled receptors: Game Theory and receptor dynamics." *Mini reviews in medicinal chemistry* 12(9): 831–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681251>.

- Maudsley, Stuart, Bronwen Martin, and Louis M Luttrell. 2005. "The Origins of Diversity and Specificity in G Protein-Coupled Receptor Signaling." 314(2): 485–494.
- McDonald, P. H. 2000. "beta -Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3." *Science* 290(5496): 1574–1577. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5496.1574> (March 27, 2013).
- Nature. 2012. "Nature outlook Breast Cancer." *Nature* 485(7400): S49–S51.
- Nobles, Kelly N, Kunhong Xiao, Seungkirl Ahn, Arun K Shukla, Christopher M Lam, Sudarshan Rajagopal, Ryan T Strachan, Teng-Yi Huang, Erin a Bressler, Makoto R Hara, Sudha K Shenoy, Steven P Gygi, and Robert J Lefkowitz. 2011. "Distinct phosphorylation sites on the β (2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin." *Science signaling* 4(185): ra51. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3415961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 5, 2013).
- Ohashi, Hirokazu, Hitoshi Takagi, Hideyasu Oh, Kiyoshi Suzuma, Izumi Suzuma, Noriko Miyamoto, Akiyoshi Uemura, Daisuke Watanabe, Tomoaki Murakami, Takeshi Sugaya, Akiyoshi Fukamizu, and Yoshihito Honda. 2004. "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity." *Circulation research* 94(6): 785–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963002> (March 6, 2013).
- Otake, Andréia Hanada, Ana Lucia Mattar, Helano Carioca Freitas, Camila Maria Longo Machado, Suely Nonogaki, Clarice Kazue Fujihara, Roberto Zatz, and Roger Chammas. 2010. "Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 66(1): 79–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19771429> (March 30, 2013).
- Paepe, Boel De, Valerie L R M Verstraeten, Christian R De Potter, Luc A M-I Vakaet, and Gillian R Bullock. 2001. "Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma." 247–254.

- Paul, Martin, A L I Poyan Mehr, and Reinhold Kreutz. 2006. "Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems." 747–803.
- Pippig, S, S Andexinger, K Daniel, M Puzicha, M G Caron, R J Lefkowitz, and M J Lohse. 1993. "Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors." *The Journal of biological chemistry* 268(5): 3201–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381421>.
- Rajagopal, Keshava, Erin J Whalen, Jonathan D Violin, Jonathan a Stiber, Paul B Rosenberg, Richard T Premont, Thomas M Coffman, Howard a Rockman, and Robert J Lefkowitz. 2006. "Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(44): 16284–9. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1637574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rajagopal, Sudarshan, Keshava Rajagopal, and Robert J Lefkowitz. 2010. "Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors." *Nature reviews. Drug discovery* 9(5): 373–86. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2902265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 5, 2013).
- Rask-Andersen, Mathias, Markus Sällman Almén, and Helgi B Schiöth. 2011. "Trends in the exploitation of novel drug targets." *Nature reviews. Drug discovery* 10(8): 579–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804595> (February 27, 2013).
- Reiter, Eric, and Robert J Lefkowitz. 2006. "GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17(4): 159–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595179> (March 15, 2013).
- Reudelhuber, Timothy L. 2005. "The continuing saga of the AT2 receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous." *Hypertension* 46(6): 1261–2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286568> (May 8, 2013).

- Rhodes, Daniel R, Bushra Ateeq, Qi Cao, Scott A Tomlins, Rohit Mehra, and Bharathi Laxman. 2009. "AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan , an AGTR1 antagonist." 106(25).
- Rodrigues-Ferreira, Sylvie, Mohamed Abdelkarim, Patricia Dillenburg-Pilla, Anny-Claude Luissint, Anne di-Tommaso, Frédérique Deshayes, Carmen Lucia S Pontes, Angie Molina, Nicolas Cagnard, Franck Letourneur, Marina Morel, Rosana I Reis, Dulce E Casarini, Benoit Terris, Pierre-Olivier Couraud, Claudio M Costa-Neto, Mélanie Di Benedetto, and Clara Nahmias. 2012. "Angiotensin II facilitates breast cancer cell migration and metastasis." *PloS one* 7(4): e35667. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3334979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 27, 2013).
- Santos, Robson a S, Anderson J Ferreira, Thiago Verano-Braga, and Michael Bader. 2013. "Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system." *The Journal of endocrinology* 216(2): R1–R17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092879> (March 15, 2013).
- Santos, Robson A S, Ana C Simoes, Christine Maric, Denise M R Silva, Raquel Pillar Machado, Insa De Buhr, Silvia Heringer-walther, Sergio Veloso B Pinheiro, Myriam Teresa Lopes, Michael Bader, Elizabeth P Mendes, Virgina Soares Lemos, Maria Jose Campagnole-santos, Heinz-peter Schultheiss, Robert Speth, and Thomas Walther. 2003. "G protein-coupled receptor Mas."
- Seta, Koichi, Masakatsu Nanamori, J Gregory Modrall, Richard R Neubig, and Junichi Sadoshima. 2002. "AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs." *The Journal of biological chemistry* 277(11): 9268–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777928> (March 30, 2013).
- Sprang, Stephen R, and Jackson Chief Elk. 2012. "Cell signaling. Structural origins of receptor bias." *Science (New York, N.Y.)* 335(6072): 1055–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383838> (March 30, 2013).
- Tahmasebi, M, S Barker, J R Puddefoot, and G P Vinson. 2006. "Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast." 67–74.

- Tohgo, Akira, Eric W Choy, Diane Gesty-Palmer, Kristen L Pierce, Stephane Laporte, Robert H Oakley, Marc G Caron, Robert J Lefkowitz, and Louis M Luttrell. 2003. "The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation." *The Journal of biological chemistry* 278(8): 6258–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473660> (March 5, 2013).
- Tohgo, Akira, Kristen L Pierce, Eric W Choy, Robert J Lefkowitz, and Louis M Luttrell. 2002. "beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation." *The Journal of biological chemistry* 277(11): 9429–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777902> (March 6, 2013).
- Uemura, Hiroji, Hitoshi Ishiguro, and Noboru Nakaigawa. 2003. "Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: A possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: A possibili." 1139–1147.
- Venkatakrishnan, a J, Xavier Deupi, Guillaume Lebon, Christopher G Tate, Gebhard F Schertler, and M Madan Babu. 2013. "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors." *Nature* 494(7436): 185–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23407534> (February 27, 2013).
- Violin, Jonathan D, Scott M DeWire, Dennis Yamashita, David H Rominger, Lisa Nguyen, Kevin Schiller, Erin J Whalen, Maxine Gowen, and Michael W Lark. 2010. "Selectively engaging β -arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 335(3): 572–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801892> (March 30, 2013).
- Vögler, O, B Nolte, M Voss, M Schmidt, K H Jakobs, and C J van Koppen. 1999. "Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin." *The Journal of biological chemistry* 274(18): 12333–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212203>.

- Volpert, Olga V, William F Ward, Mark W Lingen, Louis Chesler, Dennis B Solt, Mark D Johnson, Agostino Molteni, Peter J Polverini, and Noël P Bouck. "Captopril Inhibits Angiogenesis and Slows the Growth of Experimental Tumors in Rats." 1: 671–679.
- Wei, Huijun, Seungkirl Ahn, Sudha K Shenoy, Sadashiva S Karnik, László Hunyady, Louis M Luttrell, and Robert J Lefkowitz. 2003. "Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19): 10782–7. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=196880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wong P C, Barnes T B, Chiu A T, Christ D D, Duncia J V, Herblin W. f. Timmermans PBMWM. 1991. "Losartan (DuP 753), an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist." *Cardiovasc Drug Rev* 9: 317–339.
- Wysocki, Piotr J, Eliza P Kwiatkowska, Urszula Kazimierczak, Wiktoria Suchorska, Dariusz W Kowalczyk, and Andrzej Mackiewicz. 2006. "Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes growth of immunogenic tumors in mice." *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12(13): 4095–102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818710> (May 12, 2013).
- Xiao, Kunhong, Jinpeng Sun, Jihee Kim, Sudarshan Rajagopal, Bo Zhai, Judit Villén, Wilhelm Haas, Jeffrey J Kovacs, Arun K Shukla, Makoto R Hara, Marylens Hernandez, Alexander Lachmann, Shan Zhao, Yuan Lin, Yishan Cheng, Kensaku Mizuno, Avi Ma'ayan, Steven P Gygi, and Robert J Lefkowitz. 2010. "Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(34): 15299–304. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2930550&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 30, 2013).

- Yasumatsu, Ryuji, Torahiko Nakashima, Muneyuki Masuda, Aya Ito, Yuichiro Kuratomi, Takashi Nakagawa, and Shizuo Komune. 2004. "Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Journal of cancer research and clinical oncology* 130(10): 567–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15449186> (May 12, 2013).
- Zimmerman, Brandon, Alexandre Beautrait, Benjamin Aguila, Ricardo Charles, Emanuel Escher, Audrey Claing, Michel Bouvier, and Stéphane a Laporte. 2012a. "Differential β -arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs." *Science signaling* 5(221): ra33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534132> (March 4, 2013)

Anexos

1. Mapa completo das membranas usadas para o ensaio de análise do Perfil de fosforilação de quinases, incluindo posição dos *spots* de Referência (*Reference spot*) e controle Negativo (*PBS (Negative Control)*)

Membrana A.

A-A1, A1	<i>Reference spot</i>
A-A3, A4	p38 α T180/Y182
A-A5,A6	ERK1/2 T202/Y204, T185/Y187
A-A7,A8	JNK pan T183/Y185, T221/Y223
A-A9,A10	GSK-3 α/β S21/S9
A-B3, B4	EGF R Y1086
A-B5,B6	MSK1/2 S376/S360
A-B7,B8	AMPK α 1 T174
A-B9,B10	Akt S473
A-C1,C2	TOR S2448
A-C3,C4	CREB S133
A-C5,C6	HSP27 S78/S82
A-C7,C8	AMPK α 2 T172
A-C9-C10	β -Catenin ____
A-D1,D2	Src Y419
A-D3,D4	Lyn Y397
A-D5,D6	Lck Y394
A-D7,D8	STAT2 Y689
A-D9,D10	STAT5a Y694
A-E1,E2	Fyn Y420
A-E3,E4	Yes Y426
A-E5,E6	Fgr Y412
A-E7,E8	STAT6 Y641
A-E9,E10	STAT5b Y699
A-F1,F2	Hck Y411
A-F3,F4	Chk-2 T68
A-F5,F6	FAK Y397
A-F7,F8	PDGF R β Y751
A-F9,F10	STAT5a/b Y694/Y699
A-G1,G2	<i>Reference spot</i>
A-G3,G4	PRAS40 T246
A-G9,G10	<i>PBS (Negative Control)</i>

Membrana B.

B-A13,A14	p53 S392
B-B11,B12	Akt T308
B-A17, A18	<i>Reference spot</i>
B-B13,B14	p53 S46
B-C13,C14	p53 S15
B-C15-C16	c-Jun S63
B-D11,D12	p70 S6 Kinase T421/S424
B-D13,D14	RSK1/2/3 S380/S386/S377
B-D15,D16	eNOS S1177
B-E11,E12	STAT3 Y705
B-E15,E16	PLC- γ 1 Y783
B-F11,F12	STAT3 S727
B-F13,F14	WNK1 T60
B-F15,F16	PYK2 Y402
B-G11,G12	HSP60
B-G17,G18	<i>PBS (Negative Control)</i>

Lista de abreviações referente as quinases analisadas:

Akt - Protein Kinase B (PKB)

AMPK α 1 - AMP-activated protein kinase 1

AMPK α 2 - AMP-activated protein kinase 2

Chk-2 - Serine/threonine-protein kinase Chk2/ CHK2 checkpoint homolog

c-Jun - jun proto-oncogene

CREB- cAMP responsive element binding protein

EGFR - Epidermal growth factor receptor

eNOS - Nitric oxide synthase, endothelial

ERK1/2 - Extracellular regulated MAP kinase 1 e 2

FAK- Focal adhesion kinase 1

GSK - Glycogen synthase kinase

Hck - Hemopoietic cell kinase

HSP27 - Heat shock protein 27

HSP60 - Heat shock protein 60

JNK - c-Jun N-terminal kinase

Lck - lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

Lyn - Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog

MSK1/2 - Ribosomal protein S6 kinase alpha 5/4

p38 α - Mitogen-activated protein kinase 14 isoform 1

p53 - Cellular tumor antigen p53

p70 S6 Kinase - Ribosomal protein S6 kinase

PDGF - Platelet-derived growth factor

PYK2 - Protein tyrosine kinase 2 beta

RSK1/2/3 - Ribosomal s6 kinase

Src - v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)

STAT2 - Signal transducer and activator of transcription 2

STAT3 - Signal transducer and activator of transcription 3

STAT5a/b - Signal transducer and activator of transcription 5a/b

TOR - Target of rapamycin

WNK1 - WNK lysine deficient protein kinase 1

Yes - Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog

2. Lista de abreviações referente a figura 8.

ADRB2 – *Adrenergic, beta-2-, receptor, surfasse*

ARRB2 – *β-arrestina 2 / Arrestin, beta 2*

CALCR - *Calcitonin Receptor*

CASR - *Calcium-sensing receptor*

CCL4 - *Chemokine (C-C motif) ligand 4*

CRHR1 - *Corticotropin releasing hormone receptor 1*

CRHR2 - *Corticotropin releasing hormone receptor 2*

CYP19A1 - *Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1*

EGR1 - *Early growth response 1*

ELK1- *ELK1, member of ETS oncogene family*

FOS - *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*

GALR2 - *Galanin Receptor 2*

GCGR - *Glucagon receptor*

GRM2 - *Glutamate receptor, metabotropic 2*

IL1R1 - *Interleukin 1 receptor, type I*

IL1R2 - *Interleukin 1 receptor, type II*

JUNB - *Jun B proto-oncogene*

LHCGR - *Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*

p70 S6 Kinase - *Ribosomal protein S6 kinase*

PIK3CG - *Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide*

PRKCA - *Protein kinase C, alpha*

RGS2 - *Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa*

RHO - *Rhodopsin*

RPLP0: *Ribosomal protein, large, P0*

S1PR3 - *Sphingosine-1-phosphate receptor 3*

SERPINE1- *Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1*

TNF - *Tumor necrosis factor*

TSHR - *Thyroid stimulating hormone receptor*

UCP1 - *Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)*