CAROLINE ANTUNES LINO

CONTRIBUIÇÃO DA SINALIZAÇÃO DEPENDENTE DE BETA-ARRESTINAS, VIA RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II DO TIPO 1, NA HIPERTROFIA CARDIOMIOCÍTICA INDUZIDA POR T3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo 2018 **Caroline Antunes Lino**

Contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas, via receptor de angiotensina II do tipo 1, na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Ciência Morfofuncionais

Orientadora: Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves

Versão Original

São Paulo 2018

Nome: LINO, Caroline Antunes

Título: Contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas, via receptor de angiotensina II do tipo 1, na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

> Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

| Prof. Dr. (a) | | _ |
|---------------|------|---|
| Instituição | | _ |
| Julgamento | | |
| | | |
| Prof. Dr. (a) | | _ |
| Instituição | | _ |
| Julgamento | | _ |
| | | |
| Prof. Dr. (a) | | _ |
| Instituição | | _ |
| Julgamento | | |
| | | |
| Prof. Dr. (a) | | |
| Instituição | | _ |
| Julgamento | | _ |
| | | |
| Prof. Dr. (a) | | _ |
| Instituição | | _ |
| Julgamento | | |



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.028/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 030/12/CEUA, datado de 04.06.12 e por solicitação da Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto Chaves, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna Caroline Antunes Lino ao Projeto de Pesquisa "Papel do sistema renina- angiotensina na hipertrofia cardíaca e/ou renal induzida pelos hormônios tiroideanos", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de abril de 2013.

La Xmisi

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima Coordenador da CEUA ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, por ter feito parte de mais uma etapa da minha formação acadêmica e por ter dado todo o suporte necessário, científico e emocional, para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Gabriela Placoná Diniz por estar sempre disponível e por me lembrar, nos momentos difíceis, o que há de melhor em mim.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu desenvolvimento científico, profissional e pessoal. Agradecimento especial ao apoio técnico de Marina Reingruber Fevereiro.

Ao professor Dr. Cláudio Miguel C. Neto (FMRP/USP) por permitir a realização dos experimentos de BRET em seu laboratório e por se dispor a discutir e sugerir alternativas de experimentos relacionados ao projeto. Estendo meus agradecimentos aos membros do seu laboratório que não mediram esforços em me auxiliar nos experimentos lá realizados. Agradecimento especial à Dra. Larissa Bortoli, à doutoranda Sarah Capelupe Simões e ao apoio técnico de Lúcia H. Sakagute.

À professora Dra. Rita de Cássia A. T. Passaglia (FMRP/USP) que, durante minha estadia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, disponibilizou seu laboratório para a realização das culturas primárias de cardiomiócitos. Agradecimento especial à aluna Camila Z. Zanotto pela atenção e auxílio durante a execução desses ensaios.

Ao professor Dr. José Eduardo Krieger e à Dra. Ayumi A. Miyakawa (Incor/HCFMUSP) por terem disponibilizado o plasmídeo do AT1-GFP para os ensaios de internalização. Agradecimento especial a aluno João Ribeiro que realizou todos os procedimentos para obtenção do plasmídeo e me explicou como realizar cada etapa.

À professora Dra. Patrícia Chackur Brum por disponibilizar os anticorpos anti-p-p70S6K e p70S6K.

Aos professores, Dra. Claudimara F. P. Lotfi (Depto. Anatomia ICB/USP) e Dr. Rui G. Jaeger (Depto. Biologia Celular e do Desenvolvimento ICB/USP), e à pesquisadora Dra. Ayumi A. Miyakawa (Incor/HCFMUSP), membros da banca do meu exame de qualificação, os quais forneceram importantes sugestões e críticas para a conclusão deste trabalho.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – bolsa institucional - e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2013/16142-9).

Ao Departamento de Anatomia, ao Instituto de Ciências Biomédicas e à Universidade de São Paulo.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota". Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

LINO, Caroline Antunes. **Contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas via receptor de angiotensina II do tipo 1 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3.** 2018. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Níveis elevados de hormônios tireoidianos (HTs) são comumente associados à ativação do sistema renina angiotensina local e ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. O envolvimento do receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) nos efeitos hipertróficos dos HTs fora descrito previamente. No entanto, os mecanismos subjacentes a essa interação ainda são desconhecidos. O AT1R pertence à família dos receptores acoplados à proteína G e, portanto, promove a transdução de sinal por mecanismos dependentes e independentes de proteína G. Recentemente, a sinalização dependente de beta-arrestinas (independente de proteína G) tem sido descrita por contribuir com a resposta hipertrófica em diferentes modelos experimentais. Assim, no presente estudo investigou-se o envolvimento da sinalização dependente de beta-arrestinas nos efeitos hipertróficos dos HTs, mediados pelo AT1R, bem como a participação de ERK_{1/2} nesse Culturas primárias de cardiomiócitos foram estimuladas com processo. T3 (triiodotironina; 15nM) para indução da hipertrofia. O tratamento dos cardiomiócitos com T3 por tempos rápidos (5-30 min) resultou na ativação transiente de ERK_{1/2}, a qual foi parcialmente atenuada quando da administração de Losartan (1uM), antagonista do AT1R. A contribuição de ERK_{1/2} na hipertrofia dos cardiomiócitos foi verificada através do uso de PD98059 (20uM), inibidor de MEK_{1/2}, o qual preveniu a transcrição de marcadores hipertróficos. Ensaios de imunoprecipitação revelaram o aumento da interação entre AT1R e beta-arrestina 2 sob estímulo do T3, sugerindo o recrutamento de beta-arrestina 2 e, possível, internalização do AT1R. Através de ensaios de imunofluorescência e fracionamento subcelular, foi demonstrado que o T3 estimula a translocação do AT1R, amentando sua expressão no núcleo dos cardiomiócitos. Além disso, tanto a ativação de ERK_{1/2} quanto a hipertrofia cardiomiocítica mostraram-se sensíveis à inibição da endocitose, a qual foi avaliada através de Concanavalina A (0,5ug/ml). Ensaios de silenciamento gênico por RNA de interferência foram eficientes em demonstrar o envolvimento de beta-arrestina 2 na ativação de ERK_{1/2} e na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3. Desta forma, os resultados evidenciam o envolvimento da sinalização dependente de beta-arrestina 2 na ativação de ERK_{1/2}, através do AT1R, a qual contribui com a hipertrofia cardiomiocítica promovida pelo T3.

Palavras-Chave: Hipertrofia Cardíaca. Hormônios Tireoidianos. GPCR. Receptor de Angiotensina II do tipo I. Beta-arrestinas. Internalização de Receptores.

ABSTRACT

LINO, Caroline Antunes. **Contribution of beta-arrestin signaling mediated by angiotensin II receptor type 1 in cardiomyocyte hypertrophy induced by T3.** 2018. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Elevated levels of thyroid hormones (THs) are commonly associated with activation of the local renin angiotensin system and the development of cardiac hypertrophy. The involvement of the angiotensin II receptor type 1 (AT1R) in the hypertrophic effects of the THs was previously described. However, the mechanisms underlying this interaction are still unknown. AT1R belongs to the G-protein coupled receptor family and promotes its signal transduction by G-protein dependent and independent mechanisms. Recently, beta-arrestin signaling (G-protein independent) has been described as contributing to the hypertrophic response in different experimental models. Thus, the present study investigated the involvement of beta-arrestin signaling in the hypertrophic effects of THs mediated by AT1R, as well as the participation of ERK_{1/2} in this process. Primary cardiomyocytes cultures were stimulated with T3 (triiodothyronine: 15nM) for the induction of hypertrophy. Cardiomyocytes acutely treated with T3 (5-30 min) resulted in transient activation of ERK_{1/2}, which was partially attenuated upon Losartan (1uM) administration, an AT1R antagonist. The contribution of ERK1/2 to cardiomyocyte hypertrophy was verified by using PD98059 (20uM), a MEK_{1/2} inhibitor, which prevented the transcription of hypertrophic markers. Immunoprecipitation assays revealed increased interaction between AT1R and beta-arrestin 2 under T3 stimulation, suggesting the recruitment of beta-arrestin 2 and, possibly, the internalization of AT1R. Through immunofluorescence and subcellular fractionation assays, T3 has been shown to stimulate AT1R translocation, enhancing its expression in the cardiomyocyte nucleus. In addition, both ERK_{1/2} activation and cardiomyocyte hypertrophy were sensitive to the inhibition of endocytosis, which was assessed by Concanavalin A (0.5ug/ml). Interfering RNA assays were efficient in demonstrating the involvement of beta-arrestin 2 in ERK_{1/2} activation and in T3-induced cardiomyocyte hypertrophy. Therefore, the results evidenced the involvement of beta-arrestin-2-dependent signaling in the activation of ERK_{1/2}, through the AT1R, which contributes to the cardiomyocyte hypertrophy promoted by T3.

Key Words: Cardiac hypertrophy. Thyroid Hormones. Angiotensin II Type 1 Receptor. GPCR. Beta-arrestins. Receptor Internalization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da sinalização mediada pelas principais MAPKs, ERK, JNK e p38. Os sinais hipertróficos (fatores de crescimento; estímulos biomecânicos) são intermediados pela ativação de receptores e canais iônicos, os quais recrutam *small GTPases* e outras quinases que fosforilam as MAP3Ks que, por sua vez, fosforilam as MAP2Ks e estas as MAPKs (Bueno e Molkentin, 2002).

Figura 2: Esquema representativo dos mecanismos de ação dos hormônios tireoidianos em células presentes no miocárdio. Os hormônios tireoidianos podem agir em seus receptores nucleares (TR α 1 e TR β 1) para regulação da transcrição gênica ou através de receptores presentes no citoplasma e da integrina $\alpha\nu\beta$ 3, localizada na membrana plasmática, os quais medeiam a modulação rápida de vias de sinalização associadas à síntese proteica; células endoteliais (EC); cardiomiócitos (CM); fibroblastos (FB); (Ojamaa, 2010)......25

Figura 4: Representação do papel das beta-arrestinas no mecanismo de dessensibilização, internalização e transporte intracelular de GPCRs. A fosforilação do receptor ativado pelas GRKs leva ao recrutamento de beta-arrestinas e interrupção da sinalização mediada por proteína G (1). As beta-arrestinas ancoram proteínas da maquinaria de endocitose dependente de clatrinas e promovem a internalização dos GPCRs (2). A interação do receptor/beta-arrestina é determinante no destino do receptor internalizado. Receptores de classe B, por apresentarem uma interação mais forte com as beta-arrestinas, são reciclados ou degradados mais tardiamente, quando comparados aos receptores de classe A (3). (Luttrell e Lefkowitz, 2002)..31

Figura 5: Modelo proposto para ativação de MAPK/ERK_{1/2} mediante sinalização dependente de beta-arrestinas. A interação das beta-arrestinas e GPCR ativado promove o recrutamento de proteínas sinalizadoras da via MAPK/ERK, as quais formam um complexo através de sua ligação com as beta-arrestinas e vesículas de endocitose. A sinalização das beta-arrestinas tem sido associada à ativação de alvos citoplasmáticos de ERK, que neste caso, não é translocada para o núcleo. (Luttrell e Lefkowitz, 2002).

Figura 6: Esquema ilustrativo do ensaio de BRET para análise da ativação de proteína G e do recrutamento de beta-arrestinas. Na situação (A), as células são transfectadas com o plasmídeo do receptor de interesse (AT1R) e das subunidades de proteína G (α , β e δ), sendo a subunidade α associada à enzima renilla luciferase (RlucII) e a subunidade γ associada à molécula fluorescente GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*). Durante o ensaio, as células transfectadas são incubadas com o substrato da RlucII e estimuladas com o agonista do receptor (AngII). Na inativação de proteína G, o sinal de BRET mantém-se alto, devido à proximidade das subunidades α -RlucII e γ -GFP. Porém, quando a proteína G é ativada o sinal de BRET diminui, devido à dissociação entre essas subunidades. Na situação (B), as células são transfectadas com o plasmídeo do receptor de interesse (AT1R), marcado com GFP, e com beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2 marcadas com o agonista do receptor (AngII). Em uma situação controle (sem estimulação), o sinal de BRET mantém-se baixo, devido à distância

Figura 7: Ativação de ERK_{1/2}, em cardiomiócitos estimulados com T3. Cardiomiócitos em cultura foram tratados com T3 (15nM) por tempos rápidos (5, 10, 15 e 30 min) e por 24h. (A) Imagem representativa e (B) quantificação da expressão proteica de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Thy204) e total avaliadas por Western Blotting (5'-30': n=6; 24h: n=4). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). *vs. C-30'......50

Figura 14: Efeito do T3 na transcrição e expressão proteica de beta-arrestinas em cultura primária de cardiomiócitos. (A) Análise dos níveis de mRNA que codificam beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos tratados com T3 (15uM) por 24h por RT-PCR em tempo real (n=5). (B) Análise da expressão proteica de beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos tratados com T3 (15uM) por 24h por 24h por 24h por Vestern Blotting (n=4). Os níveis de mRNA de GAPDH foram utilizados como controle interno nos ensaios de RT-PCR e a expressão de alfa-actinina foi utilizada como normalizador nos ensaios de Western Blotting. Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{-ΔΔCt}). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). * vs. controle; p<0,05; **vs. controle; p<0,01......60

Figura 16: Eficiência de transfecção dos ensaios de RNA de interferência. Imagem representativa da eficiência de transfecção de oligonucleotídeo fluorescente (BLOCK-It fluorescent oligo; Invitrogen) em cardiomiócitos. As células positivas (marcação vermelha) indicam a incorporação do oligonucleotídeo. As imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência (Axio Observer-A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha; aumento de 200X). ..62

Figura 19: Contribuição da beta-arrestina 1 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3. Cardiomiócitos foram transfectados com si β ARR1 (Oligo 3-50nM) por 48h e estimulados com T3 (15nM) por 24h. Os níveis de mRNA que codificam os marcadores hipertróficos, (A) ANF, BNP e α -actina esquelética e (B) α MHC, β MHC e Serca2a foram avaliados por RT-PCR em tempo real (n=6). A expressão de GAPDH foi utilizada como controle interno. Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}) e representados como média±SEM. Scr

Figura 24: Expressão nuclear e citoplasmática de AT1R em cardiomiócitos estimulados com T3. Imagem representativa da expressão proteica de AT1R avaliada por Western Blotting em frações nuclear e citoplasmática. Cardiomiócitos em cultura foram tratados com T3 (15nM) por 10 e 30 min, 1, 6 e 24h. A expressão de GAPDH e Histona foram utilizadas como controle da eficiência de fracionamento e como normalizadores das frações citoplasmática e nuclear, respectivamente.

Figura 25: Contribuição do mecanismo de endocitose na hipertrofia de cardiomiócitos estimulados com T3. Culturas primárias de cardiomiócitos foram pré-tratadas com Concanavalina A (ConA; 0,5ug/ml), por 1h, e estimuladas com T3 (15nM) por 24h. (A) Análise dos transcritos que codificam ANF, BNP e α -actina esquelética por RT-PCR em tempo real. A expressão de GAPDH foi utilizada como controle interno (n=3). (B) Análise da incorporação de leucina triciada (n=3). (C) Análise da área de superfície celular (n=3). Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como porcentagem ou como unidade arbitrária (ua). *vs. Controle; # vs. T3; p<0,05.

Figura 28: Ensaios de cinética da ativação de proteína G e recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 em células HEK293. As células foram transfectadas com os plasmídeos para AT1R e betaarrestina 1 ou beta-arrestina 2 ou com AT1R e as subunidades de proteína G. As células foram incubadas com coelenterazine e estimuladas com T3 (10 e 100nM; legenda nas cores vermelha e verde, respectivamente) e com AngII (100nM; legenda na cor azul). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os dados de cinética foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 20 min (n=3).

Figura 38: Cinética de ativação de proteína G em cardiomiócitos derivados de culturas primárias. Cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias foram transfectados com plasmídeos para AT1R e para as subunidades de proteína G. As células foram incubadas com coelenterazine e estimulados com AngII (100nM; legenda na cor preta), T3 (10 e 100nM; legenda nas cores vermelha e verde, respectivamente) e AngII+T3 (100nM; 10nM; legenda na cor azul). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os dados de cinética foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 15 min (n=4).....90

Figura 39: Concentração-resposta de proteína G em cardiomiócitos derivados de culturas primárias. Cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias foram transfectados com foram com plasmídeos para AT1R e para as subunidades de proteína G. As células foram incubadas com coelenterazine e estimulados com AngII (legenda na cor preta) e com T3 (legenda na cor vermelha). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os ensaios de concentração-resposta foram realizados durante 5 min (n=3)......91

Figura 42: Modelo proposto do mecanismo de ativação de MAPK/ERK através da sinalização dependente de beta-arrestinas na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3 via AT1R......109

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados nos ensaios de RT-PCR em tempo real | .40 |
|---|-----|
| Tabela 2: Anticorpos utilizados nos ensaios de fluorescência | .41 |
| Tabela 3: Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting | .42 |
| Tabela 4. Relação dos plasmídeos utilizados nos ensaios de BRET | .45 |

| 1 | INTRODUÇÃO | . 20 |
|---|---|------|
| | 1.1 Hipertrofia cardíaca | 20 |
| | 1.2 Hipertrofia cardíaca e a sinalização MAPK/ERK | 22 |
| | 1.3 Hormônios tireoidianos e seus mecanismos de ação | 23 |
| | 1.4 Hormônios tireoidianos e hipertrofia cardíaca | 25 |
| | 1.5 Sistema renina angiotensina | 28 |
| | 1.6 Sinalização dependente e independente de proteína G | 29 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | . 34 |
| 3 | HIPÓTESE | . 35 |
| 4 | OBJETIVOS | . 35 |
| | 4.1 Objetivo geral | 35 |
| | 4.1 Objetivos específicos | 35 |
| 5 | METODOLOGIA | . 36 |
| | 5.1 Cultura primária de cardiomiócitos | 36 |
| | 5.2 RNA de interferência | 37 |
| | 5.3 Área de superfície celular | 38 |
| | 5.4 Incorporação de [H ³]-Leucina | 38 |
| | 5.5 RT-PCR em tempo real | 39 |
| | 5.6 Microscopia de fluorescência | 40 |
| | 5.7 Western Blotting | 41 |
| | 5.8 Fracionamento subcelular (núcleo/citoplasma) | 43 |
| | 5.9 Linhagem de células HEK293 | 43 |
| | 5.10 Cardiomiócitos humanos derivados de iPS | 44 |

SUMÁRIO

| | 5.11 Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) | 44 |
|---|---|------------|
| | 5.12 Interpretação dos resultados de BRET | 46 |
| | 5.13 Imunoprecipitação | 47 |
| | 5.14 Binding de AnglI | 48 |
| | 5.15 Análise estatística | 49 |
| 6 | RESULTADOS | 49 |
| | 6.1 Contribuição do AT1R na ativação de ERK _{1/2} promovida pelo T3 | 49 |
| | 6.2 Efeito do T3 sobre a ativação de MEK _{1/2} e contribuição de ERK _{1/2} na hipertrofia cardiomiocítica | 52 |
| | 6.3 Contribuição da sinalização dependente de proteína G na ativação de ERK _{1/2} em cardiomiócitos estimulados com T3 | 55 |
| | 6.4 Sinalização citoplasmática de ERK _{1/2} em cardiomiócitos estimulados com T3 | 56 |
| | 6.5 Efeito do T3 sobre a expressão gênica e proteica de beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos | 59 |
| | 6.6 Padronização dos ensaios de silenciamento por RNA de interferência | 61 |
| | 6.7 Contribuição da beta-arrestina 1 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3 | 65 |
| | 6.8 Contribuição da beta-arrestina 2 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3 | 66 |
| | 6.9 Contribuição das beta-arrestinas na ativação de ERK _{1/2} em cardiomiócitos estimulados com T3 | ; 68 |
| | 6.10 Transfecção dos cardiomiócitos com plasmídeo AT1R-GFP | 70 |
| | 6.11 Efeito do T3 sobre a internalização do receptor de angiotensina II do tipo 1 | 71 |
| | 6.12 Contribuição do mecanismo de endocitose dependente de clatrinas na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3 | 74 |
| | 6.13 Efeito do T3 na interação entre AT1R e beta-arrestinas em cultura primária de cardiomiócitos | 76 |
| | 6.14 Efeito do T3 na ativação de proteína G e no recrutamento de beta-arrestina 2 em célu HEK293 | ılas 78 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca consiste no aumento do músculo cardíaco ou miocárdio. Trata-se de uma resposta adaptativa do coração à demanda sistêmica ou a estímulos neuro-humorais na tentativa de manter a perfusão dos órgãos periféricos através do bombeamento de sangue na circulação. No entanto, a hipertrofia ventricular consiste em um fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca e arritmias (Levy *et al.*, 1990), sendo o a prevenção ou atenuação da resposta hipertrófica considerados benéficos.

Embora questionado na literatura, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada como fisiológica ou patológica, sendo diferenciadas por seus mecanismos moleculares, fenótipo e prognóstico (Dorn, 2007; Haque e Wang, 2017; Nakamura e Sadoshima, 2018). Exercício físico de resistência, gestação (Eghbali *et al.*, 2005) e o desenvolvimento cardíaco pós-natal são exemplos de hipertrofia fisiológica que se caracterizam pela manutenção da função sistólica (ejeção de sangue) e por sua natureza reversível. Em contrapartida, a hipertrofia patológica pode ser desencadeada por estímulos neuro-humorais, sobrecarga de pressão ou volume, sendo acompanhada por eventos cardiovasculares adversos, como insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita (Hill e Olson, 2008; Gibb e Hill, 2018).

A hipertrofia do músculo cardíaco está diretamente relacionada à hipertrofia das células musculares cardíacas, as quais contribuem com apenas um terço do conteúdo celular do miocárdio, mas ocupam cerca de três quartos do seu volume total. As alterações geométricas dos cardiomiócitos definem as mudanças na arquitetura do miocárdio ventricular (diâmetro ventricular interno/espessura da parede ventricular) que, por último, determinam as consequências funcionais da hipertrofia (Hill e Olson, 2008).

Assim, o crescimento do coração pode ser excêntrico, caracterizado pelo aumento proporcional entre câmara e parede ventriculares, devido à disposição dos sarcômeros (unidade celular contrátil) em série e crescimento longitudinal dos cardiomiócitos; ou concêntrico, caracterizado pelo espessamento da parede ventricular, devido à disposição dos sarcômeros em paralelo e crescimento lateral dos cardiomiócitos. A hipertrofia patológica geralmente apresenta uma morfologia concêntrica, que progride para a dilatação exacerbada da câmara ventricular (cardiomiopatia dilatada), morte dos cardiomiócitos e fibrose intersticial (Gibb e Hill, 2018).

Nos cardiomiócitos, os estímulos hipertróficos geralmente exercem seus efeitos através de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), receptores tirosina quinase ou por mecanoreceptores. Os aspectos moleculares da sinalização decorrente dos estímulos biomecânicos ainda são desconhecidos, mas provavelmente envolvem a ativação de canais iônicos sensíveis ao estiramento, proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto. A ativação desses receptores leva à modulação de vias, tais como MAPK/ERK, calcineurina-NFAT, Akt/mTOR, as quais promovem o aumento da síntese proteica, rearranjo das unidades sarcoméricas, alterações metabólicas e contráteis que, em conjunto, caracterizam a hipertrofia.

O fenótipo da hipertrofia é determinado primordialmente pela natureza do estímulo hipertrófico e, consequentemente, na sinalização deflagrada pelos mesmos (Perrino *et al.*, 2006; Nakamura e Sadoshima, 2018). No entanto, sabemos que os mecanismos moleculares e bioquímicos que caracterizam os tipos de hipertrofia podem se sobrepor e, assim, as consequências funcionais do processo hipertrófico dependem de cada contexto, do tipo, intensidade e duração do insulto (Dorn, 2007; Nakamura e Sadoshima, 2018).

1.2 Hipertrofia cardíaca e a sinalização MAPK/ERK

As respostas celulares são mediadas por um complexo, mas coordenado, circuito de vias de sinalização. Essas vias controlam processos essenciais, tais como transcrição gênica, tradução de proteínas, reorganização do citoesqueleto, endocitose e proliferação. O crescimento e a sobrevivência dos cardiomiócitos podem ser regulados por ligantes extracelulares, fatores de crescimento e por citocinas que se ligam a receptores presentes na membrana plasmática e ativam vias de sinalização.

Diversas vias já foram descritas por intermediar a resposta hipertrófica, dentre as quais destacamos as principais vias ativadas por cálcio, como calcineurina/NFAT e cálcio/calmodulina quinase, vias desencadeadas por fatores neuro-humorais, como a via Akt/mTOR, e vias ativadas por estímulos mecânicos, como as *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs). Ainda, a ativação das MAPKs pode ser desencadeada por receptores acoplados à proteína G (angiotensina II, endotelina, catecolaminas), por receptores tirosina quinase (fatores de crescimento semelhantes à insulina) ou por mecanoreceptores. Esta sinalização é iniciada pelas *small GTPases*, as quais promovem a ativação das *MAPK kinases kinases* (MAP3Ks) e estas das *MAPK kinases* (MAP2Ks). Por fim, as MAP2Ks ativam as MAPKs que apresentam uma grande variedade de alvos citosólicos e nucleares, que permite a regulação de importantes aspectos da fisiologia celular. As principais MAPKs são as *extracellularly responsive kinases* (ERK1/2), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), p38, ERK5, ERK3/4 e ERK8 (Sugden e Clerk, 1998).

As proteínas ERK₁ e ERK₂ apresentam cerca 84% de similaridade e compartilham as mesmas vias de sinalização. Por este motivo, são comumente descritas como ERK_{1/2} (Mutlak e Kehat, 2015). Diversos estudos têm reportado a importante contribuição dessa via e de ERK_{1/2} na hipertrofia cardíaca. Animais transgênicos com superexpressão de MEK_{1/2} desenvolvem uma hipertrofia cardíaca compensada, com menor propensão à injúria isquêmica. Além do seu envolvimento no processo hipertrófico, alguns estudos também evidenciam um efeito protetor mediado por ERK_{1/2} (Bueno *et al.*, 2000).



Figura 1: Esquema da sinalização mediada pelas principais MAPKs, ERK, JNK e p38. Os sinais hipertróficos (fatores de crescimento; estímulos biomecânicos) são intermediados pela ativação de receptores e canais iônicos, os quais recrutam *small GTPases* e outras quinases que fosforilam as MAP3Ks que, por sua vez, fosforilam as MAP2Ks e estas as MAPKs (Bueno e Molkentin, 2002).

1.3 Hormônios tireoidianos e seus mecanismos de ação

Os hormônios tireoidianos (HTs) são sintetizados pela glândula tireoide por meio da iodação da tireoglobulina. A L-tiroxina ou T4 corresponde à principal iodotironina secretada na circulação (>80%), sendo convertida à 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3) mediante reação de monodesiodação. Essa reação é catalisada pelas desiodases (D1 e D2), enzimas localizadas em diferentes tecidos (fígado, rim coração), que proporcionam a síntese extratireoidiana do T3.

O T3 consiste no hormônio com maior afinidade pelos receptores nucleares, comparado ao T4, e por esse motivo é considerado o hormônio biologicamente ativo.

Os hormônios tireoidianos não são lipossolúveis e, portanto, devem ser conduzidos ao citoplasma por meio de transportadores localizados na membrana plasmática. Os transportadores da família monocarboxilato dos tipos 8 e 10 (MCT8 e MCT10) são os que apresentam maior afinidade pelas iodotironinas (Razvi *et al.*, 2018).

Classicamente, os HTs promovem seus efeitos intracelulares mediante interação com receptores nucleares, os *thyroid hormone receptors* (TRs), os quais agem constitutivamente como repressores da maquinaria transcricional. Os TRs são codificados por dois genes distintos, TR α e TR β , os quais dão origem a diferentes isoformas: TR α 1, 2 e 3 e TR β 1, 2 e 3 (Zhang e Lazar, 2000). No núcleo, esses receptores são encontrados na forma de heterodímeros, associados aos receptores de ácido retinóico, em sequências específicas do DNA, os *T3 response elements* (TREs) (Zhang e Lazar, 2000; Davis *et al.*, 2008). A ligação do T3 ao receptor culmina no recrutamento de co-ativadores ou co-repressores que modulam a transcrição gênica, atuando como fatores de transcrição dependentes do ligante. A ação clássica dos HTs tem sido descrita como genômica, por mediar ações relacionadas à transcrição.

Além dos efeitos genômicos, os HTs também exercem seus efeitos por mecanismos que independem da formação do complexo intranuclear receptor/ligante e, portanto, independem de transcrição gênica. Esses efeitos são observados rapidamente (de segundos a poucas horas) e são mediados por canais iônicos e por receptores localizados na membrana plasmática, no citoplasma ou, ainda, em organelas celulares como a mitocôndria (Selmi e Samuels, 1991; Lin *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2008). Esses receptores extranucleares podem apresentar homologia com os receptores nucleares de HTs, como TR β 1 (Kalyanaraman *et al.*, 2014), ou nenhuma homologia, como é o caso da integrina $\alpha v\beta$ 3, a qual apresenta um domínio de ligação aos HTs (Bergh *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2016).

Disfunções ou doenças da glândula tireóide levam ao desenvolvimento de síndromes quase sempre associadas a manifestações cardiovasculares. Os vasos e o coração são órgãos extremamente responsivos aos níveis séricos de hormônios tireoidianos, neste sentido pequenas alterações nas concentrações hormonais, inclusive subclínicas, podem acarretar complicações cardiovasculares.



Figura 2: Esquema representativo dos mecanismos de ação dos hormônios tireoidianos em células presentes no miocárdio. Os hormônios tireoidianos podem agir em seus receptores nucleares (TR α 1 e TR β 1) para regulação da transcrição gênica ou através de receptores presentes no citoplasma e da integrina $\alpha\nu\beta$ 3, localizada na membrana plasmática, os quais medeiam a modulação rápida de vias de sinalização associadas à síntese proteica; células endoteliais (EC); cardiomiócitos (CM); fibroblastos (FB); (Ojamaa, 2010).

1.4 Hormônios tireoidianos e hipertrofia cardíaca

Um dos estímulos hormonais associados ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca consiste nos elevados níveis de hormônios tireoidianos. A relação entre hormônios tireoidianos e coração é crítica desde o desenvolvimento cardíaco pós-natal, onde os níveis de T3 e T4 aumentam drasticamente após o nascimento e estimulam a transcrição de genes cardíacos, que contribuem para o aumento da massa e do desempenho cardíacos (Chattergoon *et al.*, 2012; Nakamura e Sadoshima, 2018). No adulto, os hormônios tireoidianos contribuem para a homeostasia do tecido cardíaco (Klein e Danzi, 2007; Cini *et al.*, 2009) e, neste sentido, doenças da glândula tireóide são acompanhadas de manifestações cardiovasculares (Klein e Ojamaa, 2001; Kahaly e Dillmann, 2005).

Os elevados níveis de hormônios tireoidianos, observados no hipertireoidismo, induzem a um estado cardiovascular hiperdinâmico caracterizado pelo aumento da pressão arterial sistêmica, diminuição da resistência vascular periférica, aumento do volume sanguíneo, elevação do débito cardíaco. Esses efeitos sistêmicos (indiretos), somados aos efeitos diretos dos hormônios tireoidianos na célula muscular cardíaca, resultam no desenvolvimento da hipertrofia (Dörr *et al.*, 2005).

A hipertrofia decorrente do hipertireoidismo tem sido definida por muitos autores como fisiológica. O hipertireoidismo de duração limitada resulta no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca concêntrica, no entanto com função sistólica preservada e ausência de remodelamento do tecido cardíaco (Hu *et al.*, 2005). Ainda, o crescimento dos cardiomiócitos é acompanhado da proliferação de outros tipos celulares, do sistema vascular por exemplo (angiogênese), que garante a manutenção da homeostase (Tomanek e Busch, 1998; Liu *et al.*, 2009). Além do aumento da síntese de proteínas, devido à maior eficiência no processo de tradução ribossomal, dados ainda não publicados do nosso grupo evidenciam a ativação de vias proteolíticas (sistema ubiquitina proteassoma), que garantem o controle de qualidade de proteínas, crítico para manutenção da função cardíaca (Depre *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). No entanto, apesar dos efeitos benéficos e cardioprotetores dos HTs (Tavares *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2018), casos de pacientes hipertireoideos com insuficiência cardíaca congestiva e cardiomiopatia dilatada já foram reportados (Boccalandro *et al.*, 2003; Siu *et al.*, 2007).

As ações diretas dos hormônios tireoidianos são mediadas por seus receptores nucleares, TRα e TRβ. Ambas as isoformas são expressas nos cardiomiócitos e medeiam a expressão de miofibrilas que compõem o filamento fino do aparato contrátil (α e β-MHC), reguladores da liberação/captação de cálcio no retículo sarcoplasmático (Ca²⁺ATPase e Fosfolambam), dos transportadores (Na⁺/K⁺-ATPase), trocadores (Na⁺/Ca²⁺) e canais iônicos (Kv) presentes na membrana plasmática (Klein e Ojamaa, 2001). O aumento na transcrição de genes relacionados ao aparato contrátil promovem o aumento do inotropismo (contratilidade cardíaca) e do cronotropismo (frequência cardíaca) cardíacos (Fazio *et al.*, 2004). Além das ações clássicas dos HTs em seus

receptores nucleares, a hipertrofia cardíaca também pode resultar da modulação de vias intracelulares iniciadas no citoplasma ou na membrana plasmática (Davis e Davis, 2002; Bergh *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2016). Uma importante via de sinalização associada a esse modelo é a da PI3K/Akt/mTOR, a qual pode ser ativada rapidamente por receptores TRα1 presentes no citoplasma (Kenessey e Ojamaa, 2006).

Crescentes evidências têm demonstrado que os HTs modulam outros sistemas, como o sistema adrenérgico e o sistema renina angiotensina, cujos componentes medeiam as ações hipertróficas dos hormônios tireoidianos. Estudos *in vivo* e *in vitro* evidenciam uma relação direta entre o estado tireóideo e os níveis plasmáticos e teciduais dos componentes do SRA (Vargas *et al.*, 2012). Assim, o hipertireoidismo experimental é acompanhado do aumento da atividade e do conteúdo de renina plasmático e cardíaco; e o aumento na expressão e atividade desses componentes estão relacionados, por sua vez, aos efeitos tróficos exercidos pelos hormônios tireoidianos (Kobori *et al.*, 1997; Kobori *et al.*, 1999). De maneira interessante, estudos do nosso grupo demonstraram que o bloqueio dos receptores de angiotensina II (AT1R e AT2R) reduz a hipertrofia cardíaca induzida pelos hormônios tireoidianos , assim como o crescimento de cardiomiócitos em cultura (Diniz *et al.*, 2009; Takano *et al.*, 2013). Entretanto, os mecanismos relacionados com a interação desses dois sistemas ainda são desconhecidos.

| Compound | Hyperthyroidism | Hypothyroidism |
|-------------------------------|---|--|
| Plasma | | |
| Angiotensinogen | ↑ (Dzau & Herrmann 1982, Marchant et al. 1993); ↓ (Jiménez et al. 1982) | ↓ (Bouhnik <i>et al.</i> 1981, Jiménez <i>et al.</i> 1982, Katz 2003) |
| Renin | ↑ (Hauger-Klevene & Levin 1976, Jiménez et al. 1982, Santos & Ferreira 2007) | ↑ (Jiménez et al. 1984); ↓ (Hauger-Klevene & Levin 1976, Jiménez et al. 1982) |
| Angiotensin-converting enzyme | ↑ (Phillips et al. 1993) | ↓ (Montiel et al. 1987, Jiménez et al. 1990) |
| Angiotensin II | † (Marchant et al. 1993, Garcia del Río et al. 1997, Kobori et al. 1997a,b) | ↓ (Marchant <i>et al.</i> 1993, Kobori <i>et al.</i> 1997 <i>a,b</i>) |
| New RAS components | - | - |
| Heart | | |
| Renin | ↑ (Kobori <i>et al.</i> 1997 <i>a,b</i>) | - |
| Angiotensin II | ↑ (Kobori et al. 1997a,b, 1999, Diniz et al. 2007) | = (Carneiro-Ramos et al. 2007) |
| AT ₁ R | \rightarrow (Carneiro-Ramos <i>et al.</i> 2010); \downarrow (Marchant <i>et al.</i> 1993) | = (Marchant <i>et al.</i> 1993); ↑ (Carneiro-Ramos <i>et al.</i> 2007) |
| AT ₂ R | ↑ (Marchant et al. 1993, Carneiro-Ramos et al. 2010) | ↑ (Marchant et al. 1993, Carneiro-Ramos et al. 2007) |
| Kidney | | |
| Renin | ↑ (Bouhnik et al. 1981, Kobori et al. 1997a,b, Klein & Ojamaa 2001) | ↓ (Kobori <i>et al.</i> 1997 <i>a,b</i>) |
| Angiotensin II | ↑ (Klein & Ójamaa 2001) | - |
| AT ₁ R | - | ↓ (Chen <i>et al.</i> 2005) |
| AT ₂ R | - | ↑ (Chen et al. 2005) |
| Vessels | | |
| Renin | - | - |
| Angiotensin II | - | - |
| AT ₁ R | ↓ (Fukuyama <i>et al.</i> 2003) | - |
| AT ₂ R | ↑ (Barreto-Chaves et al. 2010) | - |

Figura 3: Tabela dos principais trabalhos associando a modulação do sistema reninaangiotensina sistêmico e local (coração, rim e vasos) às doenças da glândula tireóide, hipertireoidismo e hipotireoidismo (Vargas *et al.*, 2012).

1.5 Sistema renina angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) consiste em um complexo sistema hormonal intensamente investigado na literatura devido à sua importante função na regulação da pressão arterial sistêmica e no balanço hidroeletrolítico. Tradicionalmente, o SRA consiste em um sistema endócrino envolvido com a síntese de angiotensina II (AngII), peptídeo biologicamente ativo, que corresponde ao produto de reações que ocorrem na circulação.

O angiotensinogênio, uma α-glicoproteína sintetizada nas células hepáticas, corresponde ao substrato primário desse sistema. O angiotensinogênio é clivado na circulação pela renina, enzima sintetizada pelas células justaglomerulares do rim, dando origem a um decapeptídeo, a angiotensina I, que pode ser convertida em AngII, um octapeptídeo. Essa conversão se dá por intermédio da enzima conversora de

angiotensina (ECA), sintetizada, predominantemente, pelas células endoteliais do sistema vascular pulmonar.

A AngII exerce seus efeitos através de receptores de membrana que apresentam uma estrutura de sete domínios transmembranares, o receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R) e do tipo 2 (AT2R), que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G, GPCRs (*G-protein coupled receptors*). O AT1R é responsável por mediar os principais efeitos fisiológicos atribuídos à AngII. Em contrapartida o aumento de sua atividade pode resultar no desenvolvimento de diversas condições patológicas, tais como hipertensão, hipertrofia cardíaca, remodelamento vascular, aneurisma e aterosclerose. Desta forma, inibidores farmacológicos do AT1R têm sido intensamente utilizados na terapia cardiovascular.

Apesar da importante função sistêmica do SRA, sua complexidade está relacionada à existência de subsistemas que, potencialmente, promovem a biossíntese local de AngII. O SRA local exerce ações autócrinas (Sadoshima *et al.*, 1993), parácrinas (Lyu *et al.*, 2015) ou, ainda, intrácrinas (Kumar *et al.*, 2012), que independem dos componentes do SRA sistêmico. Sugere-se que esses subsistemas estejam relacionados com a regulação fina da homeostasia tecidual (Baker *et al.*, 2004), sendo identificado em diversos sistemas orgânicos e no coração (Dzau, 1988; Danser, 1996).

1.6 Sinalização dependente e independente de proteína G

Os GPCRs regulam diversas funções celulares. A via de transdução clássica dos GPCRs é mediada pela ativação de proteína G, formação de segundos mensageiros e ativação de efetores *downstream* na cascata de sinalização. No entanto, além da sinalização dependente de proteína G, um outro tipo de sinalização, dependente de beta-arrestinas, tem sido descrito recentemente.

A ativação dos GPCRs envolve mudanças estéricas no receptor, ou seja, na conformação da molécula, as quais promovem a ativação de proteína G. A ativação dessa proteína heterotrimérica resulta na dissociação de suas subunidades constituintes, G_{α} e $G_{\beta\gamma}$ e consequente ativação de enzimas, como fosfolipase C (PLC),

que agem sobre o fosfatidil inositol bifosfato e promovem a formação de diacilglicerol e inositol trifosfato, os quais agem como segundo mensageiro. O inositol trifosfato, por meio de receptores específicos no retículo sarcoplasmático, promove o aumento de cálcio citoplasmático, favorecendo a ativação de proteínas cálcio-dependentes.

Os GPCRs apresentam dois mecanismos de regulação da sinalização, que são: a dessensibilização e a internalização dos receptores (Attramadal *et al.*, 1992; Krupnick e Benovic, 1998). O processo de dessensibilização compreende a fosforilação do receptor por proteínas citoplasmáticas, as *G protein-coupled receptor kinases* (GRKs). As GRKs reconhecem mudanças na estrutura do receptor e fosforilam os resíduos presentes no terceiro *loop* citoplasmático ou na cauda C-terminal dos GPCRs (Ferguson *et al.*, 1995). Além das GRKs, outras proteínas citoplasmáticas também podem intermediar a fosforilação dos receptores ativados como a proteína quinase A (PKA) e a PKC (Dewire *et al.*, 2007). Ao reconhecerem o sítio fosforilado, proteínas denominadas beta-arrestinas (βARRs) são recrutadas e promovem a internalização do receptor.

A família das arrestinas consiste em 4 membros. As arrestinas visuais (arrestinas 1 e 4), expressas exclusivamente na retina, e as arrestinas não-visuais (arrestinas 2 e 3 ou beta-arrestinas 1 e 2, respectivamente), as quais são ubiquamente expressas. Inicialmente, as beta-arrestinas foram descritas como "reguladores negativos" da sinalização mediada por GPCRs (do inglês *arrestin* significa parada; interrupção). As beta-arrestinas são proteínas adaptadoras e interagem com proteínas da via de endocitose dependente de clatrinas, como as subunidades β do complexo AP2 *(clathrin adaptor protein)*, que interagem com depressões revestidas de clatrina, presentes na membrana plasmática, e permitem a formação de vesículas de endocitose que englobam o receptor ativado (Goodman *et al.*, 1996).



Figura 4: Representação do papel das beta-arrestinas no mecanismo de dessensibilização, internalização e transporte intracelular de GPCRs. A fosforilação do receptor ativado pelas GRKs leva ao recrutamento de beta-arrestinas e interrupção da sinalização mediada por proteína G (1). As beta-arrestinas ancoram proteínas da maquinaria de endocitose dependente de clatrinas e promovem a internalização dos GPCRs (2). A interação do receptor/beta-arrestina é determinante no destino do receptor internalizado. Receptores de classe B, por apresentarem uma interação mais forte com as beta-arrestinas, são reciclados ou degradados mais tardiamente, quando comparados aos receptores de classe A (3). (Luttrell e Lefkowitz, 2002).

Convencionalmente, a internalização de receptores está relacionada com a interrupção da sinalização mediada por proteína G, uma vez que esses receptores se tornam indisponíveis aos seus ligantes na membrana plasmática. Todavia, recentes estudos têm demonstrado que as beta-arrestinas recrutam proteínas sinalizadoras que são ativadas pelo receptor contido nas vesículas de endocitose. Desta forma, as beta-arrestina medeiam uma segunda sinalização, a sinalização independente de proteína G ou dependente de beta-arrestinas.

As beta-arrestinas interagem com uma grande diversidade de proteínas sinalizadoras, tais como ERK, JNK, p38, AKT, PI3K e RhoA (Luttrell *et al.*, 2001; Dewire *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007). Essas proteínas, quando ativadas por beta-arrestinas, apresentam efeitos intracelulares distintos da sinalização mediada por proteína G. A exemplo, o receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), por intermediar a maioria dos efeitos deletérios da angiotensina II no sistema cardiovascular é o principal alvo dos inibidores farmacológicos disponíveis. Em contrapartida, estudos com análogos de AngII tendenciosos (TRV120023) que, neste caso, favorecem a sinalização mediada por beta-arrestinas e inibem as sinalização dependente de proteína G, reportam a melhora de parâmetros hemodinâmicos e biomecânicos em camundongos submetidos à injúria cardíaca (Kim *et al.*, 2012), indicando efeitos benéficos dessa sinalização no tecido cardíaco. Ainda, outros trabalhos têm investigado a contribuição das beta-arrestinas em diferentes condições fisiológicas e patológicas. Morisco e col. demonstraram que a hipertrofia cardiomiocítica induzida por isoproterenol é mediada pela ativação da Akt dependente de beta-arrestinas (Morisco *et al.*, 2008).

E interessante ressaltar que a sinalização mediada por beta-arrestinas depende da afinidade entre esta e o receptor, sendo possível distinguir dois tipos. Os receptores de classe A que apresentam baixa afinidade pelas beta-arrestinas e, portanto, são reciclados rapidamente à membrana plasmática; e os receptores de Classe B, que permanecem associados às beta-arrestinas em vesículas de endocitose, favorecendo à transdução de sinal (Dewire *et al.*, 2007).

Assim, tanto mecanismos dependentes como independentes de proteína G deflagram a ativação de vias de sinalização específicas, diretamente envolvidas com a hipertrofia do cardiomiócito, sob diferentes condições experimentais.



Figura 5: Modelo proposto para ativação de MAPK/ERK_{1/2} mediante sinalização dependente de beta-arrestinas. A interação das beta-arrestinas e GPCR ativado promove o recrutamento de proteínas sinalizadoras da via MAPK/ERK, as quais formam um complexo através de sua ligação com as beta-arrestinas e vesículas de endocitose. A sinalização das beta-arrestinas tem sido associada à ativação de alvos citoplasmáticos de ERK, que neste caso, não é translocada para o núcleo. (Luttrell e Lefkowitz, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A contribuição do sistema renina-angiotensina nos efeitos hipertróficos dos HTs tem sido reportada por diferentes grupos. De forma interessante, o bloqueio do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), de características diferentes dos receptores específicos de HTs, previne a ativação de vias relacionadas ao crescimento celular e a hipertrofia promovidas pelos HTs, indicando a existência de uma interação de extrema relevância para o sistema cardiovascular ainda desconhecida.

O AT1R pertence à família dos receptores acoplados à proteína G, os quais geram sinais intracelulares através de mecanismos dependentes e independentes de proteína G. A sinalização independente de proteína G é mediada pelas beta-arrestinas após a dessensibilização e internalização dos GPCRs ativados. As beta-arrestinas ancoram proteínas sinalizadoras, como componentes da via das MAPKs, e favorecem a transdução de sinal em vesículas de endocitose no citoplasma. A sinalização dependente de beta-arrestinas tem sido reportada por promover efeitos benéficos ao coração e diversos estudos têm reportado o envolvimento dessa sinalização na hipertrofia cardíaca.

Considerando a importância dos GPCRs no sistema cardiovascular e a atual aposta no desenvolvimento de agonistas tendenciosos da sinalização dependente de beta-arrestinas, acreditamos ser relevante investigar a contribuição dessa sinalização na hipertrofia cardiomiocítica induzida pelo T3 mediada pelo AT1R.
3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que a sinalização dependente de betaarrestinas contribui com o efeito hipertrófico dos hormônios tireoidianos, mediado pelo receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), através da ativação de ERK_{1/2}.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo consiste em investigar a contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas na ativação de ERK_{1/2}, mediada pelo AT1R, na hipertrofia cardiomiocítica promovida por T3.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do T3 sobre a ativação de ERK_{1/2} e sua contribuição com a hipertrofia cardiomiocítica;
- 2. Avaliar o envolvimento do AT1R na ativação de ERK_{1/2} promovida por T3;
- Avaliar a contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas na ativação de ERK_{1/2} e hipertrofia cardiomiocítica induzidas por T3;
- 4. Avaliar o efeito do T3 sobre a internalização do AT1R;
- Avaliar a contribuição do mecanismo de endocitose na ativação de ERK_{1/2} e hipertrofia cardiomiocítica induzidas por T3.

5 METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP (Certificado 030/12/CEUA; Decl.CEUA 028/2013), a qual se encontra de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA www.cobea.org.br).

5.1 Cultura primária de cardiomiócitos

As culturas primárias de cardiomiócitos foram obtidas segundo protocolo descrito previamente por Barreto-Chaves e col., com algumas modificações (Barreto-Chaves et al., 2000). Ratos neonatos (1-3 dias) da linhagem Wistar (10-12/cultura), provenientes do Biotério Central do ICB/USP, foram levados ao fluxo laminar para assepsia com álcool 70° e eutanásia por decapitação. A excisão do coração foi realizada por meio de uma incisão torácica, seguido da retirada dos átrios e dos grandes vasos contidos na base do coração. Os ventrículos foram cortados em pequenos pedacos e submetidos a sucessivas digestões enzimáticas com uma solução tampão de ADS (NaCl 116mM, Hepes 20mM, NaH₂PO₄ H₂O 1mM, D-glicose 5,5mM, KCI 5,4mM, MgSO₄ 0,4mM) contendo colagenase do tipo 2 (Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, EUA) e pancreatina (GIBCO, New York, EUA). As digestões foram realizadas a 37°C por 30 min, sendo necessários cerca de 6 ciclos para a completa digestão dos ventrículos. As células musculares cardíacas foram separadas dos demais tipos celulares presentes no miocárdio por gradiente de densidade (Percoll; Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suíça). Devido à alta citotoxicidade do Percoll, as células foram lavadas em Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) para retirada dos resquícios. Os cardiomiócitos foram contados em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi estimada por Trypan Blue (Amresco, Ohio, EUA). As células foram plaqueadas de acordo com a necessidade de cada experimento e mantidas em DMEM suplementado com 5% de soro de bezerro neonato (NCS), 10% de soro de cavalo (HS)

(Invitrogen, Califórnia, EUA) e 10% de antibióticos (penetre, GIBCO, Massachusetts, EUA), em estufa (5% de CO₂ a 37°C). Após 72h da extração, as células foram privadas de soro, ou seja, mantidas em DMEM com apenas 0,5% de NCS *overnight*, e em seguida estimuladas.

Para análise dos efeitos tróficos dos HTs, os cardiomiócitos foram estimulados com T3 (Sigma-Adrich, Massachusetts, EUA) a 15nM por 24h (avaliação da hipertrofia cardiomiocítica) ou por tempos rápidos (avaliação de vias hipertróficas). A concentração de T3 utilizada foi previamente estabelecida por promover o aumento de marcadores hipertróficos (ANF, BNP e α -actina esquelética) e a ativação de vias pró-hipertróficas (Diniz *et al.*, 2009).

5.2 RNA de interferência

A participação da sinalização dependente de beta-arrestinas na ativação de ERK_{1/2} e na hipertrofia cardiomiocítica foi avaliada mediante silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) de beta-arrestina 1 e beta-arrestina 2. Os procedimentos relacionados aos ensaios de silenciamento foram realizados em meio sem antibiótico. Assim, cardiomiócitos foram plaqueados em poços revestidos com gelatina 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), e mantidos em meio com soro e sem antibiótico. As células foram privadas de soro por 4h e, em seguida, transfectadas de acordo com as recomendações do fabricante do reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Califórnia, EUA). As células foram incubadas com o meio de transfecção (50nM do oligonucleotídeo e 6ul de Lipofectamine/poço – placa de 6 poços/volume final de 1 ml) por 6h. Após o período de transfecção, as células foram lavadas em PBS e incubadas com meio puro. Após 24h da transfecção, as células foram estimuladas com T3 (15nM) por 24h para indução da hipertrofia ou por 10min para ativação de ERK_{1/2}. Para controle dos efeitos intrínsecos ao processo de transfecção, o grupo de células controle foi transfectado com um oligonucleotídeo inespecífico, scramble RNAi (Scr), cuja sequência não apresenta homologia com nenhum gene conhecido (Stealth RNAi

Negative Control Duplex; Invitrogen, Califórnia, EUA). A eficiência de transfecção foi avaliada através dos níveis de mRNA e da expressão proteica de beta-arrestina 1 e 2.

5.3 Área de superfície celular

A área de superfície celular foi utilizada como um dos métodos de avaliação da hipertrofia cardiomiocítica. Após tratamento dos cardiomiócitos com T3 (15nM) por 24h, as células foram lavadas com PBS e analisadas ao microscópio óptico convencional (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Cerca de 25 imagens de cada grupo experimental foi foram registradas para a quantificação da área de 50 cardiomiócitos por grupo. A mediada da área foi realizada através do programa Axio Vision Documentation (Zeiss, Oberkochen, Alemanha - aumento de 200X).

5.4 Incorporação de [H³]-Leucina

O ensaio de incorporação de leucina triciada foi utilizado como método de avaliação da síntese proteica pelos cardiomiócitos. As culturas primárias de cardiomiócitos foram mantidas em meio de privação (apenas DMEM) *overnight* e estimuladas com T3 (15 nM) por 24h. Seis horas antes do término do tratamento, um novo meio de tratamento contendo 5 uCi/ml de L-[4,5-³H] Leucina (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) foi adicionado para avaliar a incorporação de leucina triciada (L-[4,5-³H]) para síntese de novas proteínas pelas células. Ao final do tratamento, as células foram lavadas com PBS e lisadas com 500 ul de TCA a 10%. O lisado celular foi coletado, centrifugado (14.000 g, 4°C, 10 min) e o *pellet* foi ressuspendido em 500 ul de TCA a 10%. Após nova centrifugação, o *pellet* final foi dissolvido em 500 ul de NaOH 0,2N e as amostras foram incubadas a 60°C por 30 min. Em um tubo apropriado, 400 ul da amostra foram acrescentadas a 3,6 ml do líquido de cintilação (PerkinElmer, Massachusetts, EUA) para análise da radioatividade contida nas amostras. A incorporação de L-[4,5-³H] é diretamente proporcional à radioatividade

da amostra, analisada no aparelho Liquid Scintillator Analyzer TRI-CARB 2100TR (Packard, Detroit, EUA).

5.5 RT-PCR em tempo real

Os ensaios de RT-PCR em tempo real foram realizados para análise dos níveis de mRNA no extrato de células tratadas com T3. O RNA total foi extraído de acordo com as especificações do fabricante do reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), sendo a qualidade da extração avaliada através da razão entre as absorbâncias obtidas em λ =260nm e λ =280nm. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria (Gen5 Data Analysis Software, BioTek, Vermont, EUA). A integridade do RNA extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (1%) e mediante a análise das subunidades de RNA ribossomal (18S e 28S) sob luz UV.

A reação de transcrição reversa para a síntese da fita complementar ao mRNA (cDNA) foi realizada a partir de 1 ug de RNA total. A reação foi realizada segundo as especificações do fabricante da enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Califórnia, EUA) em termociclador (PTC 200 Termocycler, MJ Research, Massachusetts, EUA).

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas segundo as recomendações do fabricante do reagente Platinum SYBR Green qPCR UPSer Mix-UDG (Invitrogen, Califórnia, EUA). Os níveis de mRNA foram determinados através do cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ tratado} - \Delta Ct \text{ controle}) e \Delta Ct = (Ct gene interesse - Ct controle interno), no qual o valor do Ct ($ *Cycle threshold*) representa a quantidade de ciclos necessária para a detecção de determinada fluorescência. O Ct, por sua vez, é determinado pelo*Threshold*, valor acima do*background/baseline*. Os níveis de GAPDH foram utilizados como controle interno.

| Genes de | Sequência 1 | Sequência 2 |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|
| interesse | | |
| ANF | 5'-AGTGCGGTGTCCAACACAG-3' | 5'-CTTCATCGGTCTGCTCGCT-3' |
| BNP | 5'-GCTGTCTCTGAGCCATTTCC-3' | 5'-CAGAACAATCCACGATGCAG-3' |
| α-actina | 5'-CCTGCCACACGCCATCAT-3' | 5'-GCTCGGTGAGGATTTTCATCA G-3' |
| α-ΜΗϹ | 5'-ACAGAGTGCTTCGTGCCTGAT-3' | 5'-CGAATTTCGGAGGGTTCTGC-3' |
| β-МНС | 5'-AGCGAGGCTCCACCCCACAT-3' | 5'-CAAGGTGCCCTTGCCTGGGG-3' |
| Serca2a | 5'-CGTTGTTTTGCTCGAGTTGA-3' | 5'-GTCGTTCACACCATCACCAG-3 |
| β-arrestina 1 | 5'-ACCTGGATGTCTTGGGTCTG-3' | 5'-GCCCACGCTTCTTGATGAGTC 3' |
| β-arrestina 2 | 5'-CCACGTCACCAACAATTCTG -3' | 5'-AGCTGAGCCACAGGACACTT -3' |
| GRK2 | 5'-GACACAGGCAAGATGTACGC-3' | 5'-ACGAGGGAAAGCATGATCCG-3' |
| GRK5 | 5'-TGGCACTCAATGAAAAGCAG-3' | 5'-ACAAGGCTCGTTCTTCCTCA-3' |
| GRK6 | 5'-CACGGGTAGTGTGTCCATCC-3' | 5'-CCACACTGCTCACCTTTGTC-3' |
| GAPDH | 5'-TGGTGGACCTCATGGCCTAC-3' | 5'-CAGCAACTGAGGGCCTCTCT-3' |

| Tabela 1: Sequencia dos primers utilizados nos ensalos de RI-PCR em tempo re | o real |
|--|--------|
|--|--------|

5.6 Microscopia de fluorescência

Os ensaios de microscopia de fluorescência foram realizados para análise da internalização do AT1R. Após a estimulação dos cardiomiócitos com T3, as células foram rapidamente lavadas com PBS gelado, fixadas com paraformaldeído a 4% (TA por 10 min) e permeabilizadas com NP40 0,1% (37°C por 10 min). Em seguida, as células foram bloqueadas com albumina sérica bovina (1%, 37°C por 1h) e incubadas com anticorpo primário *overnight*. A relação dos anticorpos utilizados está descrita na Tabela 2. Após a incubação com anticorpo primário, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário ligado à molécula fluorescente (TA por 1h). Em seguida as células foram incubadas com DAPI (20 min), para marcação do núcleo, e observadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

| Anticorpos | Fabricante | Referência |
|-------------------------------|--------------------------|-------------|
| Anti-AT1R | Santa Cruz Biotechnology | #sc-1173 |
| Anti-AT1R | Sigma-Aldrich | #SAB3500209 |
| Anti-Tropomiosina Sarcomérica | Sigma-Aldrich | #T-9283 |
| Anti-DAPI | Molecular Probes | #D1306 |

Tabela 2: Anticorpos utilizados nos ensaios de fluorescência

5.7 Western Blotting

Os ensaios de Western Blotting foram realizados para análise da expressão proteica dos cardiomiócitos estimulados com T3. A extração de proteína total foi realizada usando um tampão de extração contendo inibidores de proteases e fosfatases (KCL 90mM, Hepes 10mM, MgCl²⁺ 3mM, EDTA 5mM, glicerol 1%, DTT 1mM, SDS 0,04%, Aprotinina 20mM, Pepstatina 20mM, Leupepstatina 20mM, PMSF 40uM, Ortovanadato 100mM, NaF 10mM e Piruvato 30mM). Após a lise das células e centrifugação (14.000 rpm, 15 min, 4 °C), o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C para posterior análise. A concentração proteica das amostras foi determinada segundo método descrito por Bradford, em espectrofotômetro, e calculada segundo a equação da reta (Bradford, 1976). O volume correspondente a 30ug de proteína foi incubado com um tampão redutor contendo β-Mercaptoetanol e aquecido (100°C por 5 min). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (140 V por 1h) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Califórnia, EUA) (20 V por 1h). As membranas foram coradas com solução Ponceau para análise da homogeneidade e, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário overnight (4°C). As informações pertinentes a cada anticorpo estão descritas na Tabela 3. Após lavagem com TBST (Tris 50mM, NaCl 150mM e Tween-20 0,2% - pH 7,5), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (temperatura ambiente por 1h). Após lavagem com TBST, as membranas foram incubadas com uma solução para a reação de quimioluminescência (ECL, Thermo Scientific, Illinois, EUA) e a análise da banda correspondente à proteína de

interesse foi realizada através de um transiluminador (UVItec Limited, Cambridge, Reino Unido). Os valores foram expressos como unidade arbitrária.

| Anticorpos | Fabricante | Referência |
|--|---------------------------|------------|
| Anti-AT1R | Santa Cruz Biotechnology | #sc-1173 |
| Anti-ERK₁ total | Santa Cruz Biotechnology | #sc-93 |
| Anti-pERK _{1/2} (Thy204) | Santa Cruz Biotechnology | #sc-7383 |
| Anti-ERK _{1/2} total | Cell Signaling Technology | #9102 |
| Anti-pERK _{1/2} (Thr202/Thy204) | Cell Signaling Technology | #9101 |
| Anti-pERK _{1/2} (Thr188) | Badrilla | #A010-40AP |
| Anti-MEK _{1/2} total | Cell Signaling Technology | #4694 |
| Anti-pMEK _{1/2} (Ser217/221) | Cell Signaling Technology | #9121 |
| Anti-p-p70S6K | Cell Signaling Technology | #9205 |
| Anti-p70S6K | Cell Signaling Technology | #9202 |
| Anti-pPKCδ/θ | Cell Signaling Technology | #9376 |
| Anti-β-arrestina 1 | Abcam | #ab32099 |
| Anti-β-arrestina 2 | Abcam | #31294 |
| Anti-Histona H2A | Santa Cruz Biotechnology | #8648 |
| Anti-a-actinina | Santa Cruz Biotechnology | #sc-15335 |
| Anti-GAPDH | Santa Cruz Biotechnology | #sc-32233 |

Tabela 3: Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting

5.8 Fracionamento subcelular (núcleo/citoplasma)

Os ensaios de fracionamento foram realizados para a análise da expressão de AT1R no núcleo e no citoplasma de cardiomiócitos estimulados com T3. Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em tripsina-EDTA (Cultilab, Campinas, Brasil). Em seguida, as células foram centrifugadas (1000 g, 4°C, 5 min), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 100ul de tampão RIPA contendo inibidores de protease e fosfatase. A ruptura da membrana plasmática foi realizada através da agitação das amostras por 15s (vortex), seguido do descanso em gelo nos 45s restantes a cada min. Esse procedimento foi repetido durante 10 min e, então, as amostras foram centrifugadas para coleta do sobrenadante (fração citoplasmática). Posteriormente, 40ul de um tampão específico para núcleo (RIPA, SDS, Doasse) foi adicionado ao pellet para ressuspensão. Para o rompimento do envelope nuclear, as amostras foram agitadas por 15s (vortex) e mantido em gelo nos 45s restantes a cada min. Esse procedimento foi repetido durante 40 min, seguido de centrifugação para a coleta do sobrenadante (fração nuclear). Para os ensaios de fracionamento núcleo/citoplasma, a expressão de GAPDH foi utilizada como marcador citoplasmático e a expressão de Histona H2A como marcador nuclear.

5.9 Linhagem de células HEK293

A linhagem de células HEK293, do inglês *Human Embryonic Kidney Cells*, foi utilizada como modelo experimental nos ensaios de BRET, no intuito de verificar a existência de um efeito direto do T3 sobre a ativação do AT1R. As células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), em estufa umidificada, com 5% de CO2 a 37°C. Todos os procedimentos relacionados aos ensaios de BRET foram realizados de acordo com a metodologia descrita a seguir, com exceção do método de transfecção utilizado. As células HEK293 foram transfectadas com Polietilenoimina (PEI; 25 kDa linear; Polysciences, Pennsylvania, EUA) de acordo com protocolo previamente estabelecido (Santos *et al.*, 2015).

5.10 Cardiomiócitos humanos derivados de iPS

Os cardiomiócitos humanos derivados de iPS foram adquiridos através da empresa PluriCell Biotech (São Paulo; Brasil). As células foram fornecidas nas condições experimentais desejadas. Para os ensaios de BRET, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços com uma confluência de 70% e mantidas em meio de manutenção fornecido pela empresa. As células foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO2, a 37°C.

5.11 Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)

Os ensaios de BRET foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Cláudio Miguel Costa-Neto do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, no intuito de avaliar o efeito do T3 sobre ativação de proteína G e sobre o recrutamento de beta-arrestina 1 e beta-arrestina 2, via AT1R.

Para a realização dos ensaios de BRET foram utilizadas as células HEK293, cardiomiócitos humanos derivados de iPS e cardiomiócitos provenientes de culturas primárias. As células foram plaqueados em placas de 96 poços, brancas e opacas (PerkinElmer; Massachusetts; EUA), e transfectadas com os plasmídeos para os ensaios de ativação de proteína G e recrutamento de beta-arrestinas 1 e 2, conforme demonstrado na Tabela 4.

As células HEK293 foram transfectadas com Polietilenimina (PEI), de acordo com protocolo previamente estabelecido (Santos *et al.*, 2015), enquanto os cardiomiócitos humanos foram transfectados com TransFectin Lipid Reagent (Bio-Rad, Califórnia, EUA) e os cardiomiócitos obtidos de culturas primárias foram transfectados com Lipofectamine 2000. Os procedimentos de transfecção foram realizados de acordo com as recomendações de cada fabricante. Após 48 horas da transfecção, as células foram lavadas com PBS e devidamente estimuladas.

Para os ensaios de cinética, as células foram estimuladas com AngII (100nM) e T3 (10nM e 100nM), seguido da adição de 5ug do substrato da enzima renilla luciferase

(Rluc), coelenterazine-400A ou coelenterazine-H (Biotium, Hayward, CA, EUA). A leitura das amostras foi realizada após 2, 5, 10, 15 e 20 minutos de estimulação. Nos ensaios de concentração-resposta, as células foram estimuladas com AngII e T3 em diferentes concentrações e a leitura das amostras foi realizada após 5 min de estimulação, para análise da ativação de proteína G, e após 15 min, para análise do recrutamento de beta-arrestina 1 e 2.

Os sinais de BRET foram detectados em leitor de microplaca (Victor[™] X Light Luminescence, PerkinElmer, MA, EUA). Os dados correspondem à razão da energia emitida pelo aceptor GFP (515±15nm) pela energia emitida pelo doador RlucII (410 ± 40 nm).

| Plasmídeos | Ativação Gαq | Recrutamento beta- arrestina 1 | Recrutamento beta- arrestina 2 |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| AT1 | + | - | - |
| AT1-EGFP | - | + | + |
| Beta-arrestina 1-RlucII | - | + | - |
| Beta-arrestina 2-RlucII | - | - | + |
| Gαq-Rlucll | + | - | - |
| Gβ | + | - | - |
| Gγ-GFP | + | - | - |

Tabela 4. Relação dos plasmídeos utilizados nos ensaios de BRET

5.12 Interpretação dos resultados de BRET

O BRET consiste em uma técnica utilizada para a análise da interação entre proteínas, baseada na transferência de energia entre duas moléculas (doadora e aceptora) de acordo com a proximidade destas. Para a análise da interação entre duas proteínas de interesse (X e Y), deve-se marcar uma das proteínas com uma molécula luminescente (X-Rluc) e a outra com uma molécula fluorescente (Y-GFP). Na presença do substrato (*coelenterazine*) da molécula luminescente (enzima *renilla luciferase*) a proteína X-Rluc irá emitir uma determinada energia que, dependendo da proximidade com a proteína Y-GFP, será capaz de excitar a molécula fluorescente (GFP; *Green Fluorescent Protein*) que, por sua vez, emitirá um sinal (sinal de BRET) a ser detectado pelo aparelho.

No presente estudo, para análise da ativação de proteína G, avaliamos a separação entre as proteínas G α e o dímero G $\beta\gamma$, os quais constituem a proteína G. Para tal, conforme demonstrado na Tabela 4, as células foram transfectadas com os plasmídeos G α -RlucII (luminescente), G β e G γ -GFP (fluorescente). Desta forma, na ausência do agonista, em que o AT1R se encontra em estado inativo, o sinal de BRET mantém-se elevado, devido à proximidade entre as subunidades G α e G γ . Em contrapartida, na presença do agonista, o AT1R é ativado e, consequentemente, ocorre a dissociação das subunidades G α e G $\beta\gamma$, resultando na queda no sinal do BRET (Figura 6A).

Para análise do recrutamento da beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2, as células foram transfectadas com os plasmídeos para beta-arrestina 1-RlucII ou beta-arrestina 2-RlucII (luminescente) e AT1-EGFP (fluorescente). Neste caso, quando o receptor AT1 está inativo, o sinal de BRET mantém-se baixo, devido à distância entre as duas proteínas. No entanto, quando o receptor é ativado, o sinal de BRET aumenta devido à aproximação entre elas (Figura 6B).



Figura 6: Esquema ilustrativo do ensaio de BRET para análise da ativação de proteína G e do recrutamento de beta-arrestinas. Na situação (A), as células são transfectadas com o plasmídeo do receptor de interesse (AT1R) e das subunidades de proteína G (α , β e δ), sendo a subunidade α associada à enzima renilla luciferase (RlucII) e a subunidade γ associada à molécula fluorescente GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*). Durante o ensaio, as células transfectadas são incubadas com o substrato da RlucII e estimuladas com o agonista do receptor (AngII). Na inativação de proteína G, o sinal de BRET mantém-se alto, devido à proximidade das subunidades α -RlucII e γ -GFP. Porém, quando a proteína G é ativada o sinal de BRET diminui, devido à dissociação entre essas subunidades. Na situação (B), as células são transfectadas com o plasmídeo do receptor de interesse (AT1R), marcado com GFP, e com beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2 marcadas com o agonista do receptor (AngII). Em uma situação controle (sem estimulação), o sinal de BRET mantém-se baixo, devido à distância entre o receptor-GFP e a beta-arrestina-RlucII. No caso do recrutamento da beta-arrestina para próximo do receptor, o sinal de BRET mantém.

5.13 Imunoprecipitação

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados para análise da interação entre o receptor de angiotensina II do tipo 1 e as isoformas de beta-arrestinas. Para os ensaios de imunoprecipitação do receptor AT1R foram utilizados 500 ug de proteína total dos cardiomiócitos controle e dos estimulados com T3 por 10 minutos. Inicialmente, o volume final da amostra foi corrigido para 1ml, utilizando-se PBS, e 20 ul de *beads*, proteína A/G PLUS-agarose (Santa Cruz Biotechnology; sc-2003) foram adicionados à amostra, sendo esta incubada por 1 hora em agitação lenta a 4°C. Em

seguida, o volume correspondente a 1 ug do anticorpo primário anti-AT1R (Santa Cruz Biotechnology) foi adicionado à amostra e incubado *overnight* em agitação lenta a 4°C. No dia seguinte, 40 ul de proteína A/G PLUS-agarose foram adicionados à amostra e incubados por 3 horas em agitação lenta a 4°C. Após este procedimento, as amostras contendo o anticorpo primário ligado às *beads* foram centrifugadas (1000 g por 5 minutos a 4°C). Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspendido em 1 ml de PBS gelado e incubado por 5 minutos em agitação lenta. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Este procedimento de lavagem foi repetido três vezes. Após a etapa de lavagem, foram adicionados 50 ul de tampão Laemmli e, em seguida, as amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos. Em seguida, realizamos o protocolo padrão de Western Blotting para AT1R, beta-arrestina 1 e beta-arrestina 2, utilizando-se 25 ul da amostra para cada blot.

5.14 *Binding* de Angll

Para os ensaios de *binding* para AngII, células HEK293 foram plaqueadas na densidade de 3x10⁵ células/poço em placas de 24 poços, previamente revestidas com solução de poli-L-lisina (0,1 mg/ml; diluído em PBS). As células foram mantidas em DMEM suplementado, em estufa umidificada com 5% de CO2, a 37°C. No dia seguinte, as células foram lavadas em tampão de lavagem gelado (25 mM Tris-HCl pH7,4; 10 mM NaCl; 5mM MgCl2; 0,1% albumina sérica bovina). Os experimentos de *binding* foram realizados em tampão de *binding* gelado (25 mM Tris-HCl pH7,4; 5 mM MgCl2; 0,1% albumina sérica bovina; 100 ug/ml bacitracina (Sigma) e iniciado com a adição do ligante marcado/quente (³H-AngII) na presença de diferentes concentrações do ligante frio (AngII) em um volume final de reação de 525 ul. Após a adição do ligante quente (diluído em tampão de *binding*), as placas foram lavadas por, no mínimo, 16 horas a 4°C. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem gelado, sendo adicionado 200 ul do tampão de lise (48% uréia; 2% Nonidet P-40; preparado em ácido acético 3M) em cada poço. Após a transferência do lisado

para tubos de cintilação, foram adicionados 3 ml de líquido de cintilação em cada tubo para subsequente contagem de radioativo (Packard Cobra II Gamma Counter). Os resultados foram normalizados e representados como porcentagem da ligação máxima da AngII radioativa.

5.15 Análise estatística

Os dados foram representados como média±erro padrão (SEM). A análise de variância multifatorial *One-Way* ANOVA foi utilizada como teste estatístico para comparação entre as médias de três ou mais grupos experimentais, seguido do pósteste de Tukey. O *Student t-test* foi utilizado para comparação entre dois grupos. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes. O valor de "n" corresponde à quantidade de culturas de cardiomiócitos independentes utilizadas em cada experimento. A análise estatística e os gráficos foram realizados no programa Prism 6 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Contribuição do AT1R na ativação de ERK_{1/2} promovida pelo T3

No intuito de avaliar o efeito do T3 sobre a ativação de ERK_{1/2}, cardiomiócitos foram estimulados com T3 (15nM) por tempos rápidos (5-30 min) e por 24h para análise da fosforilação de ERK_{1/2} em seus resíduos clássicos, Thr202/Thyr204 (TEY) (Figura 7). O aumento na fosforilação de ERK_{1/2} (TEY) pôde ser verificado aos 5 min de tratamento com T3. Verificamos que a ativação de ERK_{1/2} consiste em uma ativação transiente, visto que os valores do grupo T3 tenderam a diminuir conforme o tempo de tratamento. Desta forma, as células tratadas por tempos mais prolongados alcançaram valores semelhantes, ou até mesmo menores, que o grupo controle (C-30').



Figura 7: Ativação de ERK_{1/2}, em cardiomiócitos estimulados com T3. Cardiomiócitos em cultura foram tratados com T3 (15nM) por tempos rápidos (5, 10, 15 e 30 min) e por 24h. (A) Imagem representativa e (B) quantificação da expressão proteica de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Thy204) e total avaliadas por Western Blotting (5'-30': n=6; 24h: n=4). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). *vs. C-30'.

No intuito de avaliar a contribuição do AT1R na ativação de ERK_{1/2} promovida por T3, cardiomiócitos foram submetidos ao pré-tratamento com um antagonista do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), Losartan (1uM), por 1h e estimuladas com T3 (15nM) por 10 min (Figura 8). A concentração e o tempo de pré-tratamento com Losartan foram determinados previamente (Diniz *et al.*, 2009). O tempo escolhido para a estimulação dos cardiomiócitos com T3 foi de 10 min. Embora no gráfico acima a

diferença estatística em relação ao controle não seja significante, o aumento da fosforilação da ERK_{1/2} é ainda considerável (Figura 7B).

Conforme esperado, o grupo de células estimulado com T3 apresentou um aumento significante da fosforilação de ERK_{1/2} quando comparado ao controle, sendo a inibição do AT1R com Losartan capaz de prevenir tal aumento. Esses resultados evidenciam, portanto, que a ativação ERK_{1/2} promovida pelo T3 é, parcialmente, mediada pelo AT1R.



Figura 8: Contribuição do AT1R na ativação de ERK_{1/2} promovida pelo T3. Cardiomiócitos foram estimulados com T3 (15nM) por 10 min na presença ou ausência de Losartan (1uM - LOS), antagonista do AT1R. Os grupos LOS e LOS+T3 foram pré-tratados por 1h (n=5). Análise da expressão de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Tyr204) e total por Western Blotting. Os dados foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). **vs. Controle; p<0,01; #vs. T3; p<0,05.

6.2 Efeito do T3 sobre a ativação de MEK_{1/2} e contribuição de ERK_{1/2} na hipertrofia cardiomiocítica

Tendo demonstrado o efeito do T3 sobre a ativação de ERK_{1/2} e o envolvimento do AT1R nesse processo, a participação de ERK_{1/2} na hipertrofia cardiomiocítica foi avaliada. Uma das principais quinases responsáveis pela fosforilação e consequente ativação de ERK_{1/2} é a *MAPK/ERK kinase* ou MEK_{1/2}, (Bueno *et al.*, 2000; Muslin, 2008; Lorenz, Schmitt, Vidal, *et al.*, 2009). Assim, a contribuição de ERK_{1/2} na hipertrofia foi avaliada através de um inibidor específico para MEK_{1/2}, PD98059.



Figura 9: Contribuição de MEK_{1/2} na ativação de ERK_{1/2} promovida por T3. (A) Cardiomiócitos em cultura foram tratados com T3 (15nM) por tempos rápidos (5, 10, 15 e 30 min) e por 24h para análise da expressão proteica de MEK fosforilada (Ser217/221) e total por Western Blotting

(n=3). (B) Imagem representativa da curva dose-resposta de PD98059 para inibição de ERK_{1/2}. Cardiomiócitos foram pré-tratados com PD98059 por 1h, em diferentes concentrações (20x10⁻⁶, 20x10⁻⁷, 20x10⁻⁸, 20x10⁻⁹ M), e estimulados com T3 por 10 min para análise da expressão de ERK1/2 fosforilada e total por Western Blotting. Os valores foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). * vs. Controle; p<0,05.

Inicialmente, no intuito de verificar o efeito do T3 sobre a ativação de MEK_{1/2}, cardiomiócitos foram estimulados com T3 por tempos rápidos (5-30 min) e por 24h (Figura 9A). O grupo de células estimulado com T3 apresentou um aumento significante da fosforilação de MEK_{1/2} aos 5 min de tratamento, exibindo um padrão de fosforilação semelhante ao observado para ERK_{1/2} (Figura 7). O grupo de células estimulado com T3 nos demais tempos de tratamento não apresentaram valores diferentes em relação aos respectivos controles.

Tendo sido verificada a ativação de MEK_{1/2}, uma curva concentração-resposta de PD98059 foi realizada para a análise da inibição de ERK_{1/2}. Cardiomiócitos foram prétratados com PD98059 por 1h, em diferentes concentrações (20x10⁻⁶, 20x10⁻⁷, 20x10⁻⁸, 20x10⁻⁹ M), seguido do tratamento com T3 (15nM) por 10 min para análise da ativação de ERK_{1/2} por Western Blotting. De acordo com a imagem representativa a seguir (Figura 9B), as concentrações de 20x10⁻⁶M e 20x10⁻⁷M foram as mais efetivas na inibição de ERK_{1/2}, sendo padronizada a concentração de 20uM para os demais ensaios.

A contribuição de ERK_{1/2} na resposta hipertrófica foi avaliada através da análise dos transcritos que codificam genes cardíacos fetais, tais como ANF, BNP e α -actina esquelética (Figura 10A). Para tal, cardiomiócitos foram pré-tratados com PD98059 (20uM) por 1h e estimulados com T3 por 24h. Conforme esperado, o tratamento com T3 aumentou de maneira significante os níveis de mRNA de ANF, BNP e α -actina esquelética, indicando a ocorrência da reprogramação gênica, característica do processo hipertrófico. ANF e BNP são peptídeos natriuréticos sintetizados, primordialmente, pelas células atriais em situações de insultou ou estresse cardíacos. São moléculas de características anti-hipertróficas, cujos níveis séricos são utilizados para a análise da progressão da doença cardíaca. A α -actina esquelética, por sua vez,

consiste em uma proteína sarcomérica expressa, predominantemente, no período fetal. São duas as isoforma de actina, a cardíaca e a esquelética. Após o nascimento, a expressão de α -actina cardíaca aumenta, enquanto a de α -actina esquelética diminui, sendo reexpressa apenas quando o coração é submetido a um estímulo hipertrófico.



Figura 10: Contribuição de ERK_{1/2} na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3. Cardiomiócitos foram pré-tratados com PD98059 (20uM) por 1h e estimulados com T3 (15nM) por 24h. (A) Análise dos níveis de mRNA de ANF, BNP e α -actina esquelética por RT-PCR em tempo real. (B) Área de superfície celular. Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}). Os valores foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua) ou como porcentagem. * vs. controle; #vs. T3; p<0,05; ***vs. Controle; ###vs. T3; p<0,001.

As células tratadas com o inibidor de ERK_{1/2} (PD+T3) preveniu de maneira significante o aumento dos marcadores hipertróficos promovidos pelo T3. Ainda, a análise da área de superfície celular (Figura 10B) evidenciou o aumento esperado para

o grupo T3 em relação ao controle, enquanto que o grupo PD+T3 não apresentou tal aumento, corroborando com os resultados do PCR. Em conjunto, os resultados evidenciam que o T3 promove a ativação de MEK_{1/2} e que a ativação ERK_{1/2} contribui com a hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3.

6.3 Contribuição da sinalização dependente de proteína G na ativação de ERK_{1/2} em cardiomiócitos estimulados com T3

As PKCs (*Protein Kinase C*) pertencem a uma família de serina-treonina quinases e são consideradas as principais efetoras na sinalização mediada por Gq/11. As PKCs podem ser classificadas como convencionais (cPKCs), as quais são ativadas por cálcio, diacilglicerol (DAG) e fosfatidilserina (PS) (α , $\beta_{1/2}$, γ); como novas PKCs (nPKCs), ativadas por DAG e PS (δ , ϵ , η , θ); e como PKCs atípicas (aPKCs), sensíveis apenas à PS (ζ , λ , y, μ).

Assim, considerando o efeito dos hormônios tireoidianos sobre os níveis intracelulares de cálcio (Dillmann, 2010), a ativação de PKCδ/θ, uma isoforma independente de cálcio, foi avaliada em cardiomiócitos estimulados com T3, bem como o efeito da inibição de PKC sobre a ativação de ERK_{1/2}. Cardiomiócitos foram estimulados com T3 por tempos rápidos (5-30 min) e a ativação de PKCδ/θ foi avaliada através de sua fosforilação no resíduo Ser643/676 por Western Blotting (Figura 11A).

De maneira interessante, a modulação na expressão de PKCδ/θ fosforilada não foi verificada em nenhum dos tempos avaliados, sugerindo a ausência da formação de DAG e PS e, portanto, inativação de proteína Gq/11.

A contribuição de PKC na ativação de ERK_{1/2} foi avaliada através do inibidor de PKC (Ro 31-8425), utilizado em duas concentrações (10nM e 100nM). Cardiomiócitos foram tratados com Ro 31-8425 por 1h, seguido da estimulação com T3 por 10 min para análise da fosforilação de ERK_{1/2} (TEY) por Western Blotting. Conforme demonstrado na imagem representativa (Figura 11B), a inibição de PKC não foi capaz de atenuar ou prevenir a ativação de ERK_{1/2} promovida pelo T3, sugerindo que sinalização

dependente de proteína G não está envolvida com ativação observada no modelo estudado.



Figura 11: Envolvimento de PKC na ativação de ERK_{1/2} promovida por T3. (A) Cardiomiócitos foram estimulados com T3 por tempos rápidos (5-30 min) para análise de PKC δ/θ fosforilada (Ser643/676) por Western Blotting. A expressão de GAPDH foi utilizada como normalizador. (B) Cardiomiócitos foram pré-tratados com Ro 31-8425, inibidor de PKC (10nM e 100nM) por 1h, seguido da estimulação com T3 por 10 min. A expressão de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Tyr204) e total foram avaliadas por Western Blotting.

6.4 Sinalização citoplasmática de ERK_{1/2} em cardiomiócitos estimulados com T3

Recentemente foi demonstrado que a translocação nuclear de ERK_{1/2} requer a sua autofosforilação na Thr188 (Lorenz, Schmitt, Schmitteckert, *et al.*, 2009). Para que ocorra a autofosforilação de ERK_{1/2} é necessária sua interação com o dímero βγ da proteína G. Desta forma, a fosforilação na Thr188 indica a ativação de proteína G e a sinalização citoplasmática de ERK_{1/2}.

No intuito de avaliar, indiretamente, a ativação de proteína G em reposta ao tratamento com T3, cardiomiócitos foram estimulados com por tempos rápidos (5-30 min) para análise da expressão de ERK_{1/2} fosforilada (Thr188) e total por Western Blotting (Figura 12).

De acordo com a imagem representativa a seguir (Figura 12A) e a quantificação dos dados (Figura 12B) nenhuma alteração no padrão de fosforilação de ERK_{1/2} na Thr188 pôde ser verificada nas células tratadas com T3, o que sugere a inativação de proteína G. Em contrapartida, os mesmos extratos proteicos quando submetidos à marcação para ERK_{1/2} fosforilada em seus resíduos clássicos (Thr202/Tyr204) apresentou o aumento esperado conforme descrito previamente (Figura 7).



Figura 12: Sinalização citoplasmática de $ERK_{1/2}$ em cardiomiócitos estimulados com T3. (A) Cardiomiócitos foram estimulados com T3 por tempos rápidos (5-30 min) para análise de $ERK_{1/2}$ fosforilada (Thr188 e Thr202/Tyr204) e total por Western Blotting (n=4). Os dados foram representados como média±SEM.

Sabe-se que a ERK_{1/2} promove a fosforilação tanto de alvos citoplasmáticos quanto nucleares. Considerando o resultado descrito anteriormente (Figura 12), sugerindo a sinalização citoplasmática de ERK_{1/2}, avaliamos a ativação da proteína p70S6K. As S6Ks pertencem a uma família de serina/treonina quinases, as quais se encontram envolvidas com o aumento da síntese proteica. A p70S6K, especificamente, consiste em uma isoforma essencialmente citoplasmática que, quando fosforilada por

ERK_{1/2} ou Akt, aumenta a atividade ribossomal (Balasubramanian e Kuppuswamy, 2003). Assim, cardiomiócitos foram estimulados com T3 por tempos rápidos (5-30 min) e a expressão das frações fosforilada e total de p70S6K foram avaliadas por Western Blotting. De acordo com a imagem representativa a seguir (Figura 13A) e a quantificação dos dados (Figura 13B), verificamos uma tendência de aumento na expressão de p70S6K fosforilada, mas que não é estatisticamente significante. Desta forma, o aumento do número experimental torna-se necessário para confirmação do efeito do T3 sobre a ativação dessa proteína.



Figura 13: Efeito do T3 na ativação de p70S6K em cultura primária de cardiomiócitos. Cardiomiócitos foram estimulados com T3 por tempos rápidos (5-30 min). (A) Imagem representativa e (B) quantificação da análise de p70S6K fosforilada e total por Western Blotting (n=4). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua).

6.5 Efeito do T3 sobre a expressão gênica e proteica de beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos

Os efeitos dos HTs sobre a expressão e função das beta-arrestinas nas células musculares cardíacas ainda são desconhecidos. Assim, no intuito de compreender o envolvimento da sinalização dependente de beta-arrestinas na hipertrofia cardiomiocítica, o efeito do T3 na expressão proteica e nos níveis de mRNA das isoformas de beta-arrestina 1 e 2 foi avaliado.

Cardiomiócitos foram tratados com T3 por 24h e os níveis de mRNA que codificam as beta-arrestinas 1 e 2 foram avaliados por RT-PCR em tempo real (Figura 14A) e a expressão proteica por Western Blotting (Figura 14B). O grupo de células estimulado com T3 apresentou um aumento significante dos níveis de mRNA para beta-arrestina 1 sendo este aumento também verificado para a beta-arrestina 2. Já a expressão proteica de beta-arrestina 1 nas células estimuladas com T3 apresentou uma diminuição de, aproximadamente, 20% comparada às células controle, enquanto que a expressão de beta-arrestina 2 aumentou 27%. Além das beta-arrestinas, outras proteínas relacionadas à regulação da sinalização mediada pelos GPCRs também foram avaliadas.

As *G protein-coupled receptor kinases* (GRKs) são proteínas citoplasmáticas envolvidas com a dessensitização dos GPCRs através da fosforilação da porção C-terminal e de outros sítios dos receptores ativados. Ao contrário da grande variedade de GPCRs, a família das GRKs compreende sete membros, dos quais quatro isoformas são expressas ubiquamente em mamíferos (2, 3, 5 e 6) (Premont e Gainetdinov, 2007). O padrão de fosforilação mediado pelas GRKs têm sido reportando por determinar a conformação adquirida pelas beta-arrestinas e, consequentemente, o destino do receptor ativado (Pitcher *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2005). Sendo assim, o efeito do T3 na regulação transcricional das GRKs 2, 5 e 6 foi avaliado (Figura 15C).



Figura 14: Efeito do T3 na transcrição e expressão proteica de beta-arrestinas em cultura primária de cardiomiócitos. (A) Análise dos níveis de mRNA que codificam beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos tratados com T3 (15uM) por 24h por RT-PCR em tempo real (n=5). (B) Análise da expressão proteica de beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos tratados com T3 (15uM) por 24h por 24h por Vestern Blotting (n=4). Os níveis de mRNA de GAPDH foram utilizados como controle interno nos ensaios de RT-PCR e a expressão de alfa-actinina foi utilizada como normalizador nos ensaios de Western Blotting. Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{-ΔΔCt}). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). * vs. controle; p<0,05; **vs. controle; p<0,01.



Figura 15: Efeito do T3 na transcrição das GRKs em cultura primária de cardiomiócitos. Análise dos níveis de mRNA que codificam as GRK2, GRK5 e GRK6 em cardiomiócitos tratados com T3 (15uM) por 24h por RT-PCR em tempo real (n=3). Os níveis de mRNA de GAPDH foram utilizados como controle interno. Os dados do PCR foram calculados segundo a equação ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). * vs. controle; p<0,05; **vs. controle; p<0,01.

Cardiomiócitos tratados com T3 por 24h apresentaram aumento significante dos níveis de mRNA para as todas as isoformas de GRKs avaliadas. Ainda, verificamos que o aumento das GRKs 5 e 6 é mais expressivo quando comparado ao aumento da GRK2. Porém, o significado funcional dessa regulação não foi avaliado, sendo necessária a análise da expressão proteica dessas isoformas e sua relação com o AT1R.

6.6 Padronização dos ensaios de silenciamento por RNA de interferência

Visando realizar ensaios de silenciamento gênico por RNA de interferência para beta-arrestina 1 e 2 em cultura primária de cardiomiócitos, experimentos foram realizados para a análise da eficiência de transfecção através da incorporação de um oligonucleotídeo fluorescente (BLOCK-iT fluorescente oligo, Invitrogen), cuja sequência não apresenta homologia com nenhum gene conhecido. Após seis horas de transfecção com o oligonucleotídeos fluorescente, as células foram avaliadas por microscopia de fluorescência. Assim, células com marcação na cor vermelha indicam a incorporação do oligonucleotídeo.

Conforme pode ser observado na imagem representativa a seguir (Figura 16), a maioria das células avaliadas apresentaram-se positivas para o oligonucleotídeo, indicando a eficiência do protocolo de transfecção com RNA de interferência. Desta forma, ensaios de padronização para o silenciamento específico de beta-arrestina 1 e 2 foram realizados.



Figura 16: Eficiência de transfecção dos ensaios de RNA de interferência. Imagem representativa da eficiência de transfecção de oligonucleotídeo fluorescente (BLOCK-It fluorescent oligo; Invitrogen) em cardiomiócitos. As células positivas (marcação vermelha) indicam a incorporação do oligonucleotídeo. As imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência (Axio Observer-A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha; aumento de 200X).

De acordo com as recomendações do fabricante do oligonucleotídeo utilizado, três sequências foram testadas para o silenciamento de beta-arrestina 1. Ainda, foram realizados testes para padronização da concentração (50, 70 e 100nM) e do tempo de silenciamento (48 e 72h). A análise da eficiência de silenciamento foi realizada através de ensaios de RT-PCR em tempo real e por Western Blotting.

Dentre as 3 sequências de oligonucleotídeo avaliadas, a mais eficaz na diminuição da expressão de beta-arrestina 1 foi a de número 3 (Figura 17A). Essa diminuição pôde ser observada nas três concentrações avaliadas nos grupos de células transfectadas por 48h. Já nas células transfectadas por 72h, a reexpressão de beta-

arrestina 1 pôde ser observada para todas as sequências. Assim, a sequência escolhida para o silenciamento de beta-arrestina 1 foi a de número 3, a ser utilizada na concentração de 50nM por 48h de silenciamento.

Em seguida, os níveis de mRNA de beta-arrestina 1 foram avaliados por RT-PCR em tempo real nas células transfectadas nas condições previamente estabelecidas. As células transfectadas apresentaram uma redução em torno de 60% do mRNA para beta-arrestina 1 em relação ao controle (Scr) (Figura 17B).



Figura 17: Eficiência de silenciamento da beta-arrestina 1 por RNA de interferência. Cardiomiócitos foram transfectados com três sequências de oligonucleotídeo para o silenciamento de beta-arrestina 1 (Oligo 1, Oligo 2 e Oligo 3), utilizando a concentração de 50, 70 e 100nM por 48h e 72h. A eficiência de transfecção foi avaliada através da expressão proteica de beta-arrestina 1 por Western Blotting (A). Os níveis de mRNA de beta-arrestina 1 foram avaliados por RT-PCR em tempo real em cardiomiócitos transfectados com o Oligo3 (50nM) por 48h (n=4). Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{-ΔΔCt}) e representados como média±SEM. Scr (Scramble), oligonucleotídeo não específico, utilizado como controle interno nos ensaios de silenciamento. ****vs. Scr; p<0,0001.

Da mesma, a padronização do silenciamento de beta-arrestina 2 também foi realizada utilizando-se as mesmas condições da beta-arrestina 1, ou seja, foram testadas três sequências de oligonucleotídeos, em três diferentes concentrações (50, 70 e 100nM) por 48 e 72h. A imagem representativa a seguir (Figura 18A) corresponde ao resultado dos ensaios de Western Blotting para análise da eficiência de silenciamento das três sequências de oligonucleotídeos testadas (Oligo 1 Oligo 2 e Oligo 3), utilizados na concentração de 50nM por 48h de silenciamento. A partir desta análise, o oligonucleotídeo que se mostrou mais eficiente na diminuição da expressão de beta-arrestina 2 foi a sequência de número 2 (Oligo 2 – seta), sendo utilizada nos ensaios subsequentes.

Cardiomiócitos foram transfectados nas condições previamente estabelecidas e os transcritos de beta-arrestina 2 foram avaliados por RT-PCR em tempo real. Conforme pode ser observado na Figura 18B, a transfecção dos cardiomiócitos reduziu os níveis de mRNA que codificam beta-arrestina 2 em torno de 70%. Desta forma, as mesmas condições foram utilizadas nos demais ensaios de silenciamento.



Figura 18: Eficiência de silenciamento da beta-arrestina 2 por RNA de interferência. Cardiomiócitos foram transfectados com três sequências de oligonucleotídeo para o silenciamento de beta-arrestina 2 (Oligo 1, Oligo 2 e Oligo 3), utilizando a concentração de 50nM por 48h. A eficiência de transfecção foi avaliada através da expressão proteica beta-arrestina 2 por Western Blotting (A). Níveis de mRNA de beta-arrestina 2, avaliada por RT-PCR real time, em cardiomiócitos transfectados com Oligo2 (50nM) por 48h (n=3). Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{-ΔΔCt}) e representados como média±SEM. Scr

(Scramble), oligonucleotídeo não específico, utilizado como controle interno nos ensaios de silenciamento. ***vs. Scr; p<0,001.

6.7 Contribuição da beta-arrestina 1 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

Após a padronização das condições de silenciamento, ensaios foram realizados para a avaliar a contribuição de beta-arrestina 1 na hipertrofia dos cardiomiócitos tratados com T3. Os cardiomiócitos foram transfectados e estimulados com T3 por 24h para análise dos marcadores de hipertrofia por RT-PCR em tempo real (Figura 19A).



Figura 19: Contribuição da beta-arrestina 1 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3. Cardiomiócitos foram transfectados com si β ARR1 (Oligo 3-50nM) por 48h e estimulados com T3 (15nM) por 24h. Os níveis de mRNA que codificam os marcadores hipertróficos, (A) ANF, BNP e α -actina esquelética e (B) α MHC, β MHC e Serca2a foram avaliados por RT-PCR em tempo real (n=6). A expressão de GAPDH foi utilizada como controle interno. Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}) e representados como média±SEM. Scr

(Scramble), oligonucleotídeo não específico, utilizado como controle interno nos ensaios de silenciamento. *vs. Scr; p<0,05.

De acordo com o esperado, o aumento da transcrição de ANF, BNP e α-actina esquelética foi detectado nas células do grupo Scr+T3. Apesar do aumento expressivo de BNP, este não foi considerado estatisticamente diferente em relação ao controle (Scr). Já no grupo de células silenciadas para beta-arrestina 1 (siβARR1+T3), a atenuação desses marcadores hipertróficos não foi verificada.

Assim, para nos certificar da ausência de participação da beta-arrestina 1 na hipertrofia cardiomiocítica, outros marcadores moleculares foram avaliados. Conforme esperado, o T3 aumentou de maneira significativa a transcrição de αMHC e diminuiu a transcrição de βMHC, uma característica peculiar da hipertrofia cardíaca promovida pelos HTs, que favorece o aumento da relação entre miosina de contração rápida (αMHC) e de contração lenta (βMHC). Além das miosinas, o T3 também aumentou a transcrição Serca2a em relação ao controle (diferença não significante). O aumento da expressão de Serca2a, uma bomba de cálcio localizada no retículo sarcoplasmático da célula muscular cardíaca, promove o aumento da captação de cálcio do citoplasma, diminuindo o tempo de contração e aumentando o tempo de relaxamento. Da mesma forma que os dados representados na Figura 19A, o silenciamento de beta-arrestina 1 foi indiferente ao aumento dos marcadores promovido pelo T3 (Figura 13B). Assim, os resultados obtidos evidenciam que a beta-arrestina 1 não está envolvida com o processo hipertrófico induzido por T3.

6.8 Contribuição da beta-arrestina 2 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

Sabe-se que as isoformas de beta-arrestina apresentam um alto grau de homologia entre si e que ambas podem interagir com o AT1R. No entanto, apesar das semelhanças, diversos estudos têm demonstrado diferenças significativas quanto ao padrão de expressão, especificidade por GPCRs e efeitos funcionais entre as isoformas (O'neal *et al.*, 2009). Apesar da beta-arrestina 1 não contribuir para a hipertrofia



cardiomiocítica induzida por T3, o envolvimento da beta-arrestina 2 nesse processo foi avaliada.

Α.

Figura 20: Contribuição de beta-arrestina 2 na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3. Cardiomiócitos foram transfectados com si β ARR2 (Oligo 2 – 50nM) por 48h e estimulados com T3 (15nM) por 24h. (A) Os níveis de mRNA que codificam os marcadores hipertróficos, ANF, BNP, α -actina esquelética foram avaliados por RT-PCR em tempo real. A expressão de GAPDH foi utilizada como controle interno (n=3). (B) Análise da área de superfície celular (n=2). Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}). Os valores foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua) ou como porcentagem. Scr (Scramble), oligonucleotídeo não específico, utilizado como controle interno nos ensaios de silenciamento. *vs. Scr; p<0,05; #vs. Scr+T3; p<0,05.

A contribuição de beta-arrestina 2 foi avaliada através da análise dos marcadores moleculares em ensaios de RT-PCR em tempo real (Figura 20A) e da área de superfície celular (Figura 20B). Cardiomiócitos foram silenciados para beta-arrestina 2 e

estimulados com T3 por 24h. O grupo de células estimulado com T3 (Scr+T3) apresentou aumento dos marcadores hipertróficos, diferença estatisticamente significante para ANF e α-actina esquelética. Diferentemente do observado para beta-arrestina 1, o silenciamento da beta-arrestina 2 atenuou o aumento dos marcadores hipertróficos no grupo siβARR2+T3. Ainda, a diminuição na expressão de beta-arrestina 2 foi capaz de prevenir o aumento da área de superfície observado nas células estimuladas com T3. Os resultados do silenciamento e da área de superfície celular evidenciam, portanto, a contribuição da beta-arrestina 2 na hipertrofia cardiomiocítica promovida pelo T3.

6.9 Contribuição das beta-arrestinas na ativação de ERK_{1/2} em cardiomiócitos estimulados com T3

Conforme descrito anteriormente, MAPK/ERK_{1/2} pode ser ativada por mecanismos dependentes e independentes de proteína G, sendo uma das vias de sinalização melhor caracterizadas por interagir com as beta-arrestinas. Estudos têm evidenciado a existência de um mecanismo de regulação recíproca entre as isoformas de beta-arrestina quanto à transdução de sinal, ou seja, enquanto uma isoforma promove a ativação de determinada via a outra promove sua inibição (Smith e Rajagopal, 2016). Neste sentido, considerando a participação do AT1R na ativação de ERK_{1/2}, a contribuição de cada uma das isoformas de beta-arrestina na ativação de ERK_{1/2} foi avaliada, separadamente.

Cardiomiócitos foram transfectados para o silenciamento de beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2, nas condições estabelecidas previamente, e estimuladas com T3 (15nM) por 10 min para análise da ativação de ERK_{1/2} por Western Blotting. De acordo com os dados representados na Figura 21, o silenciamento de beta-arrestina 1 não interferiu na fosforilação de ERK_{1/2} promovida pelo T3, enquanto que o silenciamento de beta-arrestina 2 resultou na prevenção da ativação desta quinase, indicando apenas o envolvimento da sinalização dependente de beta-arrestina 2 na ativação de ERK_{1/2}.



Figura 21: Contribuição das beta-arrestinas 1 e 2 na ativação de ERK_{1/2} promovida pelo T3. Cardiomiócitos foram transfectados com RNA de interferência para silenciamento de beta-arrestina 1 (A) ou beta-arrestina 2 (B) e estimulados com T3 (15nM) por 10 min para análise de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Tyr204) e total por Western Blotting (n=3). Os valores foram representados como média±SEM e expressos como unidade arbitrária (ua). **vs. C (Controle); p<0,01; ###vs. T3; p<0,001.

6.10 Transfecção dos cardiomiócitos com plasmídeo AT1R-GFP

Sabe-se que os receptores que pertencem à família dos GPCRs são dessensitizados e internalizados após a estimulação com o agonista. As beta-arrestinas exercem um papel fundamental na internalização desses receptores ao interagir com proteínas da via de endocitose dependente de clatrinas. No sentido de avaliar o efeito do T3 sobre a internalização do AT1R, cardiomiócitos em cultura foram transfectados com um plasmídeo do receptor AT1 marcado com GFP (*Green Fluorescent Protein*). Para tal procedimento, 1ug de DNA foi transfectado com Lipofectamine 2000, de acordo com o protocolo utilizado para RNA de interferência. Apesar de ter sido possível verificar algumas células positivas para AT1-GFP (marcação em azul – setas), a eficiência de transfecção foi muito baixa.



Figura 22: Imunofluorescência de cardiomiócitos transfectados com AT1R-GFP. As células foram transfectadas com 1ug de plasmídeo contendo AT1 marcado com GFP por 24 horas. As setas indicam as células transfectadas. A fluorescência foi detectada em preto e branco e, em seguida, a cor azul foi adicionada. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência (Objetiva de 20X).

Inicialmente, a proposta do presente estudo era de realizar as análises do processo de internalização do AT1R por microscopia confocal. No entanto, para isso seria necessário que os cardiomiócitos fossem plaqueados em lâminas/superfície de vidro. Assim, considerando que os cardiomiócitos não aderem no vidro sem um substrato, foram realizados uma série de testes com substratos comumente utilizados neste tipo de cultura (gelatina, fibronectina, laminina). No entanto, nenhuma das condições se mostrou eficaz quanto à aderência dos cardiomiócitos em vidro tornando
este tipo de análise inviável. Assim, ensaios de imunofluorescência e de fracionamento subcelular foram realizados como metodologias alternativas para avaliar a internalização do AT1R sob efeito do T3.

6.11 Efeito do T3 sobre a internalização do receptor de angiotensina II do tipo 1

Cardiomiócitos foram estimulados com T3 (15nM) por 10 e 20 min seguido do protocolo de imunocitoquímica e análise das imagens por microscopia de fluorescência (Figura 23). Nas células controle, a marcação do AT1R (vermelho) se mostrou difusa no citoplasma, com poucas marcações pontuais. Já as células estimuladas com T3 por 10 min também apresentaram uma marcação citoplasmática, mas com muitas estruturas puntiformes, as quais são sugestivas da formação de vesículas de endocitose. É interessante mencionar que a presença dessas estruturas no grupo de células controle deve estar relacionada à ativação constitutiva de tal receptor. Aos 20 min de tratamento, de maneira interessante, a marcação do AT1R foi observada no núcleo dos cardiomiócitos estimulados com T3, colocalizando com DAPI.



Figura 23: Efeito do T3 sobre a internalização do receptor de angiotensina II do tipo 1 em cardiomiócitos. Microscopia de fluorescência em cardiomiócitos estimulados com T3 (15nM) por 10 e 20 min e imuno-marcados para tropomiosina sarcomérica (verde) e AT1R (vermelho). O núcleo dos cardiomiócitos foi marcado com DAPI. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência (Objetiva de 20X).

No sentido de confirmar a ação do T3 sobre a translocação nuclear do AT1R ou o aumento de sua expressão no núcleo, foram realizados ensaios de fracionamento subcelular para análise diferencial da expressão proteica do AT1R no núcleo e no citoplasma dos cardiomiócitos estimulados com T3 (Figura 24).

A eficiência do protocolo de fracionamento foi avaliada através da análise da expressão de GAPDH, proteína citoplasmática, e de histona, proteína nuclear. Vimos que o protocolo utilizado foi eficiente em separar as frações núcleo/citoplasma, uma vez que não foram observados indícios de GAPDH na fração nuclear e de histona na fração citoplasmática. Os resultados dos ensaios de fracionamento evidenciam o aumento da expressão de AT1R na fração nuclear dos cardiomiócitos estimulados com T3. O aumento de AT1R pode ser claramente observado a partir de 10 min de estimulação, sendo mantido até o tempo avaliado de 1h.

De acordo com o esperado, os resultados obtidos a partir dos ensaios de fracionamento celular corroboram com os dados de microscopia de fluorescência, que indicam o aumento da expressão nuclear de AT1R sob estímulo do T3.



Figura 24: Expressão nuclear e citoplasmática de AT1R em cardiomiócitos estimulados com T3. Imagem representativa da expressão proteica de AT1R avaliada por Western Blotting em frações nuclear e citoplasmática. Cardiomiócitos em cultura foram tratados com T3 (15nM) por 10 e 30 min, 1, 6 e 24h. A expressão de GAPDH e Histona foram utilizadas como controle da eficiência de fracionamento e como normalizadores das frações citoplasmática e nuclear, respectivamente.

6.12 Contribuição do mecanismo de endocitose dependente de clatrinas na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

Tendo em vista o envolvimento do mecanismo de endocitose dependente de clatrinas na sinalização mediada por beta-arrestinas, a contribuição desse mecanismo na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3 foi avaliada. Assim, cardiomiócitos foram tratados com um inibidor de endocitose comumente utilizado na literatura, a Concanavalina A (ConA) (Luttrell *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001).

A ConA consiste em uma lectina que inibe o arranjo das vesículas de endocitose, bem como a movimentação das proteínas nas estruturas revestidas por clatrina. Cardiomiócitos foram pré-tratados por 1h com ConA (0,5ug/ml), seguido do tratamento com T3 (15nM) por 24h. A concentração de ConA (0,5ug/ml) foi baseada em trabalhos prévios da literatura (Morisco *et al.*, 2008). A hipertrofia dos cardiomiócitos foi avaliada mediante análise dos marcadores moleculares por RT-PCR em tempo real, incorporação de leucina triciada e área da superfície celular (Figura 25A, B e C, respectivamente).

O grupo de cardiomiócitos estimulados com T3 se mostrou sensível ao tratamento com ConA, visto que o aumento da transcrição dos genes relacionados com a hipertrofia foi atenuado quando esse inibidor foi utilizado. Da mesma forma, a incorporação de leucina triciada e a área de superfície celular foram atenuadas nas células tratadas com T3 na presença de ConA. Em conjunto, os resultados evidenciam a contribuição do mecanismo de endocitose na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3.



Figura 25: Contribuição do mecanismo de endocitose na hipertrofia de cardiomiócitos estimulados com T3. Culturas primárias de cardiomiócitos foram pré-tratadas com Concanavalina A (ConA; 0,5ug/ml), por 1h, e estimuladas com T3 (15nM) por 24h. (A) Análise dos transcritos que codificam ANF, BNP e α -actina esquelética por RT-PCR em tempo real. A expressão de GAPDH foi utilizada como controle interno (n=3). (B) Análise da incorporação de leucina triciada (n=3). (C) Análise da área de superfície celular (n=3). Os dados do PCR foram calculados segundo a equação (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como porcentagem ou como unidade arbitrária (ua). *vs. Controle; # vs. T3; p<0,05.

Uma vez demonstrado o efeito do T3 sobre a internalização do AT1R e a contribuição do mecanismo de endocitose na hipertrofia cardiomiocítica, a participação da endocitose na ativação de ERK_{1/2} também foi avaliada. Cardiomiócitos em cultura foram pré-tratados com ConA (0,5ug/ml) por 1h e estimulados com T3 por 10 min (Figura 26). O tratamento dos cardiomiócitos com ConA resultou na inibição da

fosforilação de ERK_{1/2} comparado ao grupo T3, sugerindo que o processo de endocitose interfere na ativação de ERK_{1/2} nas células musculares cardíacas.



Figura 26: Contribuição do mecanismo de endocitose na ativação de ERK_{1/2} em cardiomiócitos estimulados com T3. Culturas primárias de cardiomiócitos foram pré-tratadas com Concanavalina A (ConA; 0,5ug/ml) por 1h e estimuladas com T3 (15nM) por 10 min. (A) Imagem representativa e (B) quantificação da expressão de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Tyr204) e total por Western Blotting (n=5). Os valores são representados como média±SEM e expressos como porcentagem ou como unidade arbitrária (ua).

6.13 Efeito do T3 na interação entre AT1R e beta-arrestinas em cultura primária de cardiomiócitos

Dado os resultados evidenciando a translocação nuclear do AT1R sob efeito do T3, além do envolvimento do mecanismo de endocitose na ativação de ERK_{1/2} e

hipertrofia, ensaios de imunoprecipitação foram realizados para a análise da interação entre AT1R e beta-arrestinas. Cardiomiócitos foram estimulados com T3 por 10 min, seguido da extração proteica, imunoprecipitação do AT1R e ensaios de Western Blotting para análise do AT1R, beta-arrestina 1 e beta-arrestina 2 na fração imunoprecipitada.

Conforme pode ser observado a seguir (Figura 27), a estimulação dos cardiomiócitos com T3 promoveu aumento significante da interação entre AT1R e betaarrestina 2, indicando o recrutamento desta isoforma quando da estimulação com T3, sugerindo a ativação da sinalização dependente de beta-arrestina 2 via AT1R. Em relação à beta-arrestina1, os resultados não evidenciaram sua interação com AT1R.



Figura 27: Interação do AT1R e beta-arrestina em cardiomiócitos estimulados com T3. Culturas primárias de cardiomiócitos foram estimuladas com T3 (15nM) por 10 min. Ensaios de imunoprecipitação para o AT1R através de proteína A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology) foram realizados, seguido da análise da expressão do receptor AT1, beta-arrestina 1 e beta-arrestina 2 por Western Blotting na fração imunoprecipitada (n=3). Os dados foram representados como média±SEM e expressos como porcentagem em relação controle. A expressão de ambas as isoformas de beta-arrestina foi corrigida pela expressão do AT1R. *vs. Controle; p<0,05.

6.14 Efeito do T3 na ativação de proteína G e no recrutamento de beta-arrestina 2 em células HEK293

Considerando a participação do AT1R na hipertrofia cardiomiocítica induzida pelo T3 e, portanto, a possível deflagração da sinalização dependente de proteína G decorrente dessa ativação, ensaios de BRET para análise da ativação de proteína G e do recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 foram avaliados em células HEK293. Por não expressarem constitutivamente os receptores do sistema renina angiotensina, como o AT1R, as células HEK293 consistem em um excelente modelo experimental para o estudo da dinâmica desses receptores frente a diversos estímulos.

Os experimentos relacionados à ativação de proteína G foram realizados em células HEK293 com superexpressão de AT1R e das subunidades de proteína G (α , β e γ). As células foram estimuladas em duas concentrações de T3 (10nM e 100nM), e com uma concentração de AngII (100nM), utilizada como controle positivo. Os ensaios cinéticos foram realizados durante 20 min, sendo analisados os tempos de 5, 10, 15 e 20 min (Figura 28). Conforme esperado, as células estimuladas com AngII apresentaram uma queda no sinal de BRET, indicando a dissociação das subunidades de proteína G (α e $\beta\gamma$) e, portanto, a ativação de proteína G. No entanto, nenhuma variação no sinal de BRET nas células tratadas com T3.

Para análise do recrutamento de beta-arrestinas, as células HEK293 foram transfectadas com AT1R e beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2 (isoformas avaliadas em experimentos independentes). As células foram estimuladas com T3 (10nM e 100nM) e com AngII (100nM). Os ensaios de cinética paras as beta-arrestinas foram realizados nas mesmas condições utilizadas para proteína G. O aumento no sinal do BRET, indicando a aproximação entre AT1R e beta-arrestinas, pôde ser verificado nas células estimuladas com AngII. Em contrapartida, não observamos o efeito T3 sobre o recrutamento das beta-arrestinas.



Figura 28: Ensaios de cinética da ativação de proteína G e recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 em células HEK293. As células foram transfectadas com os plasmídeos para AT1R e beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2 ou com AT1R e as subunidades de proteína G. As células foram incubadas com coelenterazine e estimuladas com T3 (10 e 100nM; legenda nas cores vermelha e verde, respectivamente) e com AngII (100nM; legenda na cor azul). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os dados de cinética foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 20 min (n=3).

Além dos ensaios de cinética, também foram realizados ensaios de concentração-resposta na tentativa de verificar efeito do T3 em concentrações superiores à normalmente utilizada para indução da hipertrofia em cardiomiócitos (15nM) (Figura 29).

Da mesma forma que o observado nos ensaios de cinética, nenhum efeito do T3, nas diferentes concentrações testadas (10⁻⁶ a 10⁻¹² M), foi verificado quanto à ativação de proteína G e ao recrutamento das beta-arrestinas. Entretanto, a resposta positiva para AngII evidencia que o sistema requerido para a observação desses eventos intracelulares estava apropriado, ou seja, as proporções entre as subunidades de

proteína G, a relação entre receptor/proteína G e receptor/beta-arrestina estavam adequadas.

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de BRET em células HEK293 sugerem que o T3 não promove a ativação direta do receptor AT1. Assim, é possível supor que o mecanismo através do qual os hormônios tireoidianos promovem seus efeitos através do AT1R envolvem outras estruturas/proteínas que não foram consideradas nesses experimentos.



Figura 29: Ensaios de concentração-resposta de proteína G e recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 em células HEK293. As células foram transfectadas com os plasmídeos AT1R e subunidades da proteína G. As células foram incubadas com coelenterazine e estimuladas com AngII (10⁻⁵ a 10⁻¹⁰M - legenda na cor azul) e com T3 (10⁻⁵ a 10⁻¹⁰M - legenda na cor vermelha). A AngII foi utilizada como controle positivo. Para os ensaios de concentração-resposta as células foram estimuladas por 15 min (ativação de proteína G) e por 5 min (recrutamento de beta-arrestinas) (n=3).

6.15 Efeito do T3 na ativação de proteína G e recrutamento de beta-arrestina 2 em células HEK293 co-transfectadas com receptores AT2, MAS e β2-adrenérgico

Convencionalmente, os GPCRs são expressos primariamente na forma de monômeros. Porém, estudos têm reportado a formação dímeros ou, até mesmo, de oligômeros entre GPCRs em situações tanto fisiológicas quanto patológicas. A interação física entre diferentes receptores interfere na sinalização mediada pelos mesmos e, consequentemente, na resposta celular. Assim, a heterodimerização entre receptores consiste em um mecanismo que permite ampliar a resposta aos estímulos externos.

Considerando os resultados anteriores de BRET, sugerindo que o mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos sobre o AT1R não dependente apenas de sua expressão, a possibilidade da interação do AT1R com outros GPCRs foi avaliada. Assim, células HEK293 foram transfectadas com o AT1R e com receptores relacionados ao sistema cardiovascular que já foram reportados por dimerizar com o AT1R, tais como o receptor de angiotensina II do tipo 2 (AT2R), o receptor MAS (receptor de angiotensina 1-7) ou o receptor β2-adrenérgico (β2AR). Os ensaios de BRET foram realizados tanto para a análise da ativação de proteína G (Figura 30) quanto do recrutamento de beta-arrestina 2 (Figura 31). Para esses experimentos, apenas ensaios de cinética foram realizados.

Conforme pode ser observado na Figura 30, a co-expressão do AT1R com AT2R não interferiu na ativação de proteína G frente a estimulação com AngII. No entanto, a co-expressão de AT1R/MAS promoveu o aumento da ativação constitutiva/basal da sinalização dependente de proteína G mediada pelo AT1R e diminuição do recrutamento de beta-arrestina 2. Já a co-expressão de AT1R/beta2-adrenérgico atenuou a ativação de proteína G promovida pela AngII. Novamente, nenhuma resposta nas células estimuladas com T3 foi observada, mesmo na presença desses outros receptores.



Figura 30: Ativação de proteína G em células HEK293 co-transfectadas com o receptor AT1R e AT2R ou MAS ou beta2AR. As células foram transfectadas com plasmídeos para AT1R e as subunidades de proteína G, além dos demais GPCRs (AT2R ou MAS ou beta2adrenérgico). As células foram incubadas com coelenterazine e estimuladas com T3 (10 e 100nM; legenda nas cores vermelho e verde, respectivamente) e com AngII (100nM; legenda na cor azul). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os dados de cinética foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 20 min (n=4).



Figura 31: Recrutamento de beta-arrestina 2 em células HEK293 co-transfectadas com o receptor AT1R e AT2R ou MAS ou beta2AR. Células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos para AT1R e beta-arrestina 2, além dos demais GPCRs (AT2R ou MAS ou beta2-adrenérgico). As células foram incubadas com coelenterazine e estimuladas com T3 (10 e 100nM; legenda nas cores vermelho e verde, respectivamente) e com AngII (100nM; legenda na cor azul). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os dados de cinética foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 20 min (n=3).

6.16 Efeito do T3 sobre a ligação de Angll no receptor AT1R em células HEK293

Os ensaios de *binding* para AngII foram realizados em células HEK293 na tentativa de verificar se o T3 poderia interferir na ligação da AngII ao AT1R. Para tal, as células foram estimuladas com T3 em diferentes concentrações (10⁻⁵ a 10⁻¹² M) ou com AngII (10⁻⁶ a 10⁻¹² M) não marcada (fria), utilizada como controle positivo, por 20 min. Após este período, as células foram incubadas com ³H-AngII (marcada com trício – quente) para a realização do *binding*.

Conforme pode ser observado na Figura 32, não verificamos efeito do T3 sobre a ligação da AngII no AT1R, visto que as células estimuladas com T3 apresentaram ligação máxima com ³H-AngII em todas as concentrações testadas. Ao contrário, no ensaio utilizado como controle, a diminuição da ligação com ³H-AngII (quente) é observada conforme aumenta a concentração de AngII (fria).

Este resultado indica, portanto, que diferentemente do que já foi reportado para outras estruturas não homólogas aos receptores de hormônios tireoidianos, como a integrina alfavbeta3, que o T3 não exerce um efeito direto sobre o AT1R capaz de interferir na ligação desse receptor com seu agonista, AngII.



Figura 32: *Binding* de AngII em células HEK293 estimuladas com T3. Células HEK293 foram transfectadas com o AT1R e estimuladas com T3 (10^{-12} a 10^{-5} M – legenda na cor vermelha) ou com AngII (fria) (10^{-12} a 10^{-5} M – legenda na cor preta) por 20 min. Em seguida, as células foram

incubadas com ³H-AngII (quente). Os experimentos com T3 foram realizados em paralelo com células estimuladas com AngII, utilizadas como controle positivo (n=4).

6.17 Efeito do T3 sobre a ativação de ERK_{1/2} e Akt em cardiomiócitos H9c2

Baseado nos resultados obtidos dos ensaios de BRET com células HEK293 e considerando as dificuldades concernentes à transfecção dos cardiomiócitos provenientes de culturas primárias, foram realizados testes com a linhagem de cardiomiócitos H9c2 para verificar se estas responderiam aos HTs e se poderiam ser utilizadas como modelo nos ensaios de BRET. Os cardiomiócitos da linhagem H9c2 são células provenientes do ventrículo de ratos que têm sido utilizadas como modelo diversos estudos relacionados à hipertrofia cardíaca. Assim, células H9c2 foram estimuladas com T3 por 5, 10 e 15 minutos na presença e ausência de Losartan (LOS).



Figura 33: Ativação de ERK e Akt em células H9c2 estimuladas com T3. Células H9c2 foram pré-tratadas com Losartan (1uM Los) por 1h e estimuladas com T3 (15nM) por 5, 10 e 15 min

Α.

para análise da expressão de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Tyr204) e total (A) e de Akt fosforilada (Thr308) e total (B). A expressão de alfa actinina foi utilizada como normalizador.

Diferentemente do observado em cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias (Figura 7), as células H9c2 não apresentaram aumento da fosforilação de ERK_{1/2} (Figura 33A) nos tempos avaliados. Além disso, o AT1R parece não contribuir com a ativação basal ou constitutiva de ERK_{1/2}, ao contrário do que fora verificado para as culturas primárias (Figura 8). No intuito de nos certificarmos da ausência de resposta das células H9c2 frente ao estímulo com T3, também avaliamos a ativação de Akt (Thr308). Conforme pode ser observado na imagem representativa (Figura 33B), não foi possível verificar a ativação de Akt nas células estimuladas com T3.

Concluímos, portanto, que a linhagem de células H9c2, embora citada na literatura por apresentar características semelhantes às dos cardiomiócitos obtidos de culturas primárias, não correspondem a um bom modelo para o estudo dos efeitos hipertróficos do T3.

6.18 Efeito do T3 sobre o recrutamento de beta-arrestina 1 e beta-arrestina 2 em cardiomiócitos humanos derivados de iPS

Dada a ausência de resposta das células H9c2 ao T3, foram realizados testes com cardiomiócitos humanos derivados de iPS (*induced Pluripotent Stem Cells*) com o intuito de serem utilizadas ns ensaios de BRET. Do mesmo modo, para nos certificar de que os efeitos do T3, observados nos cardiomiócitos provenientes de cultura primária, seriam reproduzidos nos cardiomiócitos derivados de iPS (cardiomiócitos^{iPS}), ensaios de Western Blotting foram realizados para a análise da ativação de ERK_{1/2}. Cardiomiócitos^{iPS} foram plaqueados em diferentes confluências, 100%, 70% e 50%, e estimulados com T3 (15nM) por 5, 30 min e por 24h. Conforme pode ser observado na imagem representativa (Figura 34), os cardiomiócitos^{iPS} apresentaram ativação de ERK_{1/2} aos 5 e 30 min de estimulação com T3, reproduzindo a resposta obtida em

culturas primárias. Às 24 horas, em contrapartida, essa sinalização se encontra desativada.



Figura 34: Ativação de ERK_{1/2} em cardiomiócitos humanos derivados de iPS. Cardiomiócitos^{iPS} foram plaqueados com 50, 70 e 100% de confluência e estimuladas com T3 (15nM) por 5, 30 min e por 24h para análise de ERK_{1/2} fosforilada (Thr202/Tyr204) por Western Blotting.

Uma vez confirmado o efeito do T3 sobre os cardiomiócitos^{iPS}, realizamos testes da eficiência de transfecção e citotoxicidade dos reagentes de transfecção, Lipofectamine 2000 (utilizado nos ensaios de silenciamento gênico por RNA de interferência; Invitrogen) e TransFectin (Bio-Rad).

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, sendo testadas duas concentrações de DNA (plasmídeo contendo GFP), 0,5 e 1ug. As células foram transfectadas por 48h e analisadas por microscopia de fluorescência. Conforme pode ser observado nas imagens a seguir (Figura 35), o reagente TransFectin apresentou maior eficiência de transfecção comparado à Lipofectamine 2000. Não foram verificadas diferenças significantes entre as concentrações de 0,5 e 1ug de DNA. É importante ressaltar que uma maior quantidade de células mortas pôde ser observada nas células expostas à TransFectin comparada à Lipofectamine 2000. Mesmo assim, devido à maior eficiência, o reagente TransFectin foi o escolhido para ser utilizado nos experimentos de BRET com cardiomiócitos^{iPS}.



Teste de eficiência de transfecção e citotoxicidade DNA 48h

Figura 35 Eficiência de transfecção e citotoxicidade em cardiomiócitos humanos derivados de iPS. As células foram transfectadas com plasmídeo contendo GFP em duas concentrações, 0,5 e 1ug de DNA, utilizando dois reagentes de transfecção, Lipofectamine 2000 e TransFectin. A análise das células foi realizada por microscopia de fluorescência (aumento de 100X).

Após estabelecer as condições de transfecção nos cardiomiócitos^{iPS}, os ensaios de BRET para análise do recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 foram realizados. Entretanto, apesar de termos utilizado células musculares capazes de responder aos HTs (Figura 34), o efeito do T3 sobre o recrutamento de beta-arrestina 1 e 2, tanto nos ensaios de cinética (Figura 36) quanto nos ensaios de concentração-resposta (Figura 37), não foi observado. Já nos grupos estimulados com com AngII, a resposta esperada foi observada, indicando a eficiência do protocolos de transfecção e do BRET.



Figura 36: Cinética do recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos humanos derivados de iPS. As células foram utilizadas na confluência de 70% e transfectadas com plasmídeos para AT1R e beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2. As células foram incubadas com coelenterazine e estimuladas com AngII (100nM – legenda na cor azul) e com T3 (10 e 100nM - legenda nas cores vermelha e verde). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os dados de cinética foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 15 min (n=3).



Figura 37: Concentração-resposta do recrutamento de beta-arrestina 1 e 2 em cardiomiócitos humanos derivados de iPS. As células foram utilizadas na confluência de 70% e transfectadas com os plasmídeos para AT1R e beta-arrestina 1 ou beta-arrestina 2. As células foram incubadas com coelenterazine e estimuladas com T3 (10⁻⁵ a 10⁻¹⁰M - legenda na cor azul) e com AngII (10⁻⁵ a 10⁻¹⁰M - legenda na cor vermelha). Para os ensaios de concentração-resposta as células foram estimuladas por 15 minutos (n=3).

6.19 Efeito do T3 na ativação de proteína G em cardiomiócitos obtidos de cultura primária

A ativação de proteína $G_{\alpha q}$ foi avaliada através de ensaios de BRET em cultura primária de cardiomiócitos. Cardiomiócitos foram transfectados com AT1R e com as subunidades de proteína Gq (α , β e γ), de acordo com protocolo previamente estabelecido. A fim de nos certificar da eficiência de transfecção, um grupo de células estimulado com AngII (100nM) foi utilizado como controle positivo.



Figura 38: Cinética de ativação de proteína G em cardiomiócitos derivados de culturas primárias. Cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias foram transfectados com plasmídeos para AT1R e para as subunidades de proteína G. As células foram incubadas com coelenterazine e estimulados com AngII (100nM; legenda na cor preta), T3 (10 e 100nM; legenda nas cores vermelha e verde, respectivamente) e AngII+T3 (100nM; 10nM; legenda na cor azul). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os dados de cinética foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 15 min (n=4).

De acordo com o esperado, os cardiomiócitos estimulados com Angll apresentaram uma rápida queda no sinal do BRET aos 2 min de estimulação, sendo o baixo sinal mantido durante os 15 min do experimento (Figura 38). Essa queda no sinal de BRET corresponde à dissociação do complexo $G_{\alpha q}$ -RlucII/ $G_{\gamma 1}$ -GFP10 e indica a ativação da proteína $G_{\alpha q}$. Assim, através dos experimentos com AnglI podemos concluir que os cardiomiócitos foram devidamente transfectados e expressavam todo o sistema necessário para ativação de proteína $G_{q/11}$ via AT1R. No entanto, ao contrário da estimulação com AngII, nas duas concentrações de T3 analisadas (10 e 100nM) não observamos variação no sinal de BRET.

Além dos tratamentos em separado, com a intenção de avaliar o possível efeito tendencioso do T3 sobre a ativação de proteína G, também avaliamos células estimuladas com um tratamento combinado de AngII+T3. Esse efeito tendencioso pode ser interpretado como a capacidade do T3 de enviesar a sinalização promovida por AngII, seja favorecendo ou prejudicando a sinalização dependente de proteína G. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento de AngII+T3 não diferiu daquele obtido para AngII, indicando que o T3 não modula o efeito da AngII na ativação do AT1R em cardiomiócitos.

Além dos ensaios de cinética, também realizamos uma curva de concentraçãoresposta em cardiomiócitos estimulados por 5 min, tempo de ativação máxima de proteína G para AngII (Figura 39). De forma semelhante, a ativação de proteína G pôde ser verificada apenas nos cardiomiócitos estimulados com AngII, através da queda do sinal de BRET nas concentrações em torno de 10⁻⁸ M. Nas células estimuladas com T3, no entanto, nenhum sinal foi observado.





Figura 39: Concentração-resposta de proteína G em cardiomiócitos derivados de culturas primárias. Cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias foram transfectados com foram com plasmídeos para AT1R e para as subunidades de proteína G. As células foram incubadas com coelenterazine e estimulados com AngII (legenda na cor preta) e com T3 (legenda na cor

vermelha). A AnglI foi utilizada como controle positivo. Os ensaios de concentração-resposta foram realizados durante 5 min (n=3).

6.20 Efeito do T3 no recrutamento de beta-arrestina 2 em cardiomiócitos obtidos de cultura primária

No intuito de avaliar a sinalização dependente de beta-arrestinas mediada pela ativação do AT1R, cardiomiócitos foram transfectados com plasmídeos contendo AT1R fusionado com GFP e com plasmídeos contendo a beta-arrestina 2 fusionada à enzima Renilla luciferase. Os cardiomiócitos foram estimulados com AngII (100nM), T3 (100nM e 1uM) e em tratamento combinado (AngII+T3) (Figura 40).

Conforme esperado, o grupo de células estimulado com AngII apresentou rápido aumento do sinal de BRET a partir dos 2 min de estimulação, sendo este aumento mantido até o término do experimento. Em contrapartida, o grupo de células estimulado com T3, em ambas as concentrações (100nM e 1uM), não apresentou modulação do sinal de BRET. O grupo de células exposto ao tratamento combinado, AngII+T3, apresentou um aumento do sinal, no entanto, com um padrão semelhante ao obtido para os cardiomiócitos estimulados apenas com AngII.



Figura 40: Cinética do recrutamento de beta-arrestina 2 em cardiomiócitos. Cardiomiócitos obtidos de culturas primárias foram estimulados com AngII (100nM; legenda na cor preta) e T3 (100nM e 1uM; legenda nas cores vermelha e verde, respectivamente) e AngII+T3 (100nM;

10nM; legenda na cor azul). A AnglI foi utilizada como controle positivo. Os dados foram analisados nos tempos de 2, 5, 10 e 15 min (n=4).

Já nos ensaios de concentração-resposta, um pequeno aumento do sinal de BRET pôde ser detectado nas células estimuladas com T3, nas concentrações mais altas (1uM e 10uM). No entanto, não sabemos se a diferença observada é funcionalmente relevante.

Recrutamento de **B**ARR2/AT₁R - 15 min

Figura 41: Concentração-resposta do recrutamento de beta-arrestina 2 em cardiomiócitos. Cardiomiócitos foram estimulados com AngII (legenda na cor preta) e com T3 (legenda na cor vermelha). A AngII foi utilizada como controle positivo. Os ensaios de concentração-resposta foram realizados durante 15 min (n=3).

7 DISCUSSÃO

7.1 Ativação de MAPK/ERK_{1/2} na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

No presente estudo demonstramos que a ativação de ERK_{1/2} é mediada pela ativação do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), o qual apresenta características distintas dos receptores específicos dos hormônios tireoidianos (HTs). Sabemos que os HTs exercem suas ações através de receptores nucleares (ações genômicas) ou, ainda, de receptores extranucleares (não-genômicas) (Davis *et al.*, 2016). Neste sentido, Bergh e col. demonstraram que a ativação de ERK_{1/2} pode ser desencadeada pela ligação do T4 à integrina alfavbeta3 de células endoteliais (Bergh *et al.*, 2005) e estudos com o receptor específico de HT na membrana plasmática, p30 TRα, também reportaram a ativação dessa sinalização (Kalyanaraman *et al.*, 2014).

O envolvimento dos componentes do sistema renina angiotensina e, mais especificamente, do AT1R, nos efeitos cardíacos do T3 já foram descritos previamente. Estudos *in vivo* demonstraram que a inibição do AT1R, através da administração de Losartan, em animais hipertireoideos previne o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Hu *et al.*, 2003; Diniz *et al.*, 2007; Carneiro-Ramos *et al.*, 2010; Takano *et al.*, 2018). Além disso, através de um abordagem *in vitro*, Diniz e col. demonstraram a participação do AT1R na ativação da via AKT/GSK3β/mTOR e no desenvolvimento da hipertrofia do cardiomiócito (Diniz *et al.*, 2009). Entretanto, os mecanismos relacionados à interação entre HTs e AT1R permanecem desconhecidos.

Considerando que a ativação das vias ERK_{1/2} e Akt/mTOR são mediadas pelo AT1R, hipotetizamos que os mecanismos clássicos de transdução de sinal desse receptor também seriam ativados sob efeito dos HTs, ou seja, que a sinalização dependente e independente de proteína G estariam ativadas. Assim, através de diferentes abordagens avaliamos a contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas na ativação de ERK_{1/2}.

A análise de segundos mensageiros, tais como trifosfato de inositol, diacilglicerol (DAG), cálcio e ativação de PKC, é frequentemente utilizada como indicadora da ativação de proteína G. Como consequência do aumento de DAG e cálcio

citoplasmáticos, isoformas de PKC são ativadas. No presente estudo, verificamos que o tratamento dos cardiomiócitos com T3 não leva ao aumento da fosforilação de PKC δ/θ , que consiste em uma isoforma independente de cálcio, mas sensível ao DAG e à fosfatidilserina. Esses resultados sugerem, portanto, que os HTs não promovem a ativação de proteína G em cardiomiócitos. De maneira surpreendente, verificamos também que a ativação de ERK_{1/2} não depende de PKC.

Apesar das evidências, não é possível afirmar que a sinalização dependente de proteína se encontra inativada em nosso modelo. Isto, porque os HTs exercem uma ação repressora sobre a atividade de PKC (Rybin e Steinberg, 1996). Neste sentido, Wang e col. demonstraram que o aumento de PKC induzido por AngII pode ser facilmente revertido quando da administração de T3 (Wang *et al.*, 2006). Assim, não sabemos se a ausência de resposta ao inibidor de PKC é decorrente da ação repressora dos HTs ou da inativação de proteína G.

Verificamos que o T3 promove uma ativação rápida de ERK_{1/2} e que essa ativação se caracteriza como transiente. Além disso, verificamos que a beta-arrestina 2 contribui com a ativação de ERK_{1/2} e que essa sinalização é sensível ao mecanismo de endocitose. Com relação ao perfil de ativação de ERK_{1/2}, Ahn e col. demonstraram que a ativação dependente de proteína G apresenta uma perfil transiente, cuja ativação máxima ocorre em menos de 2 min, e resulta na translocação nuclear de ERK_{1/2} para regulação da atividade transcricional (Ahn, Shenoy, *et al.*, 2004). Em contrapartida, a sinalização mediada por beta-arrestinas é sustentada por mais tempo (ativação máxima entre 5-10 min), e localizada, primordialmente, no citoplasma (Tohgo *et al.*, 2002). Essas diferenças quanto ao perfil de ativação das sinalizações dependente e independente de proteína G têm sido confirmadas em diversos modelos experimentais. Em nosso estudo, apesar de termos verificado a contribuição de beta-arrestina 2 na ativação de ERK_{1/2}, o perfil de ativação desta sinalização condiz com a sinalização mediada por proteína G, por ser transiente.

A compartimentalização consiste em uma das principais diferenças reportadas entre as sinalizações dependente e independente de proteína G. Enquanto a ativação de proteína G resulta na translocação nuclear de ERK_{1/2}, a sinalização mediada por beta-arrestinas geralmente restringe sua localização no citoplasma, favorecendo a ativação de substratos citosólicos como p70S6K, p90RSK e proteínas do citoesqueleto.

Em 2009, um novo sítio de fosforilação de ERK_{1/2} na Thr188 foi descrito por mediar a translocação de ERK_{1/2} para núcleo, culminando na ativação de fatores de transcrição envolvidos com a resposta hipertrófica patológica (Lorenz, Schmitt, Schmitteckert, *et al.*, 2009). A autofosforilação de ERK_{1/2} na Thr188 requer a formação de um complexo que envolve o dímero $\beta\gamma$, após ativação de proteína G (Lorenz, Schmitt, Schmitteckert, *et al.*, 2009; Ruppert *et al.*, 2013). Nossos resultados demonstram que o T3 não promove a fosforilação de ERK_{1/2} na Thr188. Considerando que este sinal é essencial para o acúmulo de ERK_{1/2} no núcleo, acreditamos que em nosso modelo a sinalização de ERK_{1/2} seja predominantemente citoplasmática. Indo ao encontro dos nosso resultados, Ruppert e col. demonstraram recentemente que a fosforilação de ERK_{1/2} na Thr188 pode ser regulada pelas beta-arrestinas, uma vez que a superexpressão de beta-arrestina 2 previne a interação da subunidade G $\beta\gamma$ com ERK_{1/2}, impedindo sua autofosforilação (Ruppert *et al.*, 2013). No intuito de avaliar a sinalização citoplasmática de ERK_{1/2} em nosso modelo, avaliamos a ativação da proteína p70S6K. No entanto, não verificamos a ativação desta proteína.

Contrariamente à sinalização citoplasmática das beta-arrestinas, há evidências de que as essas proteínas também podem mediar o transporte nuclear de ERK_{1/2} (Kobayashi *et al.*, 2005). Neste sentido, Piu e col. demonstraram o papel crítico da interação entre ERK_{1/2} e beta-arrestinas no aumento da atividade transcricional de alguns receptores nucleares, como RAR e RXR (Piu *et al.*, 2006).

No presente estudo demonstramos a contribuição de ERK_{1/2} na resposta hipertrófica mediada pelo T3. A via da ERK_{1/2} está relacionada com diversos processos biológicos, dentre os quais a hipertrofia cardíaca. Neste sentido, a ativação exacerbada de ERK_{1/2} resulta no desenvolvimento de síndromes com significativas manifestações cardíacas (Lorenz, Schmitt, Vidal, *et al.*, 2009) e o uso de inibidores farmacológicos de MEK_{1/2}, dominantes negativos para Raf-1 e MEK, e o uso de oligonucleotídeos anti-ERK_{1/2} atestam a importante contribuição dessa sinalização no processo hipertrófico (Muslin, 2008; Lorenz, Schmitt, Vidal, *et al.*, 2009).

7.2 Participação do AT1R nos efeitos do T3 em cardiomiócitos

Uma das hipóteses sugeridas para o efeito dos hormônios tireoidianos (HTs) nos receptores de angiotensina é a secreção de AngII pelas cardiomiócitos sob efeito do T3. Para que essa hipótese corrobore nossos resultados, é necessário que o mecanismo proposto ocorra rapidamente, considerando que a ativação de ERK_{1/2} ocorre em menos de 5 min da estimulação com os HTs.

Diniz e col. demonstraram um aumento rápido na expressão de AngII no extrato proteico de cardiomiócitos (Diniz *et al.*, 2009) e aumento de AngII no meio de cultura de cardiomiócitos estimulados com T3 por 24h (dados não publicados). Esses resultados encontram-se de acordo com a hipótese proposta, no entanto, não justificam os efeitos rápidos do T3 sobre a ativação das vias intracelulares. Sadoshima e col., entretanto, demonstraram que as células musculares cardíacas apresentam estoques intracelulares de AngII, os quais podem ser secretados rapidamente para o meio extracelular sob estiramento mecânico (Sadoshima *et al.*, 1993).

Sabe-se que o AT1R consiste em um mecanoreceptor podendo ser ativado independentemente da sua interação com a AngII (Zou *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2016). O crescimento hipertrófico induzido por estímulos biomecânicos tem se destacado por desempenhar um papel significante em patologias cardíacas. Porém, pouco se sabe a respeito de como esses estímulos são sentidos e traduzidos em sinais intracelulares. Evidências recentes têm sugerido um papel não-estrutural das proteínas do citoesqueleto na mecanotransdução ou, mais especificamente, na mecanotransmissão, onde as estruturas do citoesqueleto servem como condutores da sinalização (Lyon *et al.*, 2015). Isto, porque essas proteínas estruturais apresentam domínios (PDZ, SH3, LIM) que favorecem a interação entre as proteínas sinalizadoras (Ehler, 2016). A exemplo, o domínio FHL1, presente no sarcômero dos cardiomiócitos, foi descrito por mediar a resposta hipertrófica através da ativação da via MAPK/ERK, frente à sobrecarga de pressão e superexpressão de Gq (Hong *et al.*, 2016).

Elevados níveis de HTs classicamente melhoram o desempenho cardíaco, na medida em que promovem o aumento da frequência e da força de contração (Dahl et

al., 2008). No entanto, não sabemos se os efeitos inotrópicos (força de contração) e cronotrópicos (frequência de contração) promovidos pelos HTs consistem em um estímulo mecânico capaz de ativar o AT1R *in vitro* ou, ainda, de promover a liberação de AngII para o meio extracelular. Em contrapartida, uma importante constatação dos nossos experimentos é que a estimulação da linhagem de cardiomiócitos H9c2, que não apresenta propriedades contráteis, não reproduz os efeitos do T3 sobre a ativação de ERK_{1/2} e Akt, observados em culturas primárias de cardiomiócitos. Este dado sugere a participação do citoesqueleto ou de mecanismos contráteis nas ações mediadas pelo T3.

Recentemente, Tóth e col. evidenciaram um mecanismo de ativação heteróloga mediado por beta-arrestinas (Tóth *et al.*, 2018). Nesse estudo foi demonstrado que o aumento de PKC decorrente da estimulação do receptor α-adrenérgico, promove o recrutamento e a sinalização dependente de beta-arrestina 2 através do AT1R. Essa constatação é de extrema relevância para o nosso estudo, uma vez que propõe uma sinalização dependente de beta-arrestinas que envolve a interação entre receptores. Isto nos permite sugerir que os efeitos intracelulares dos HTs, como aumento de cálcio ou outro segundo mensageiro, poderiam induzir o recrutamento e sinalização mediada por beta-arrestinas via AT1R. No entanto, para que essa hipótese se aplique aos nossos resultados é necessário verificar se o uso de um antagonista do AT1R, como Losartan, inibe a ativação heteróloga proposta por Tóth e col., visto que os efeitos do T3 são prevenidos quando o AT1R é bloqueado com Losartan.

Diversos trabalhos na literatura têm evidenciado a existência de uma interação entre integrinas e receptores acoplados à proteína G (Teoh *et al.*, 2012). As integrinas têm sido reportadas por intermediar a organização de complexos supramoleculares relacionados à formação de microdomínios de lipídeos especializados, os *lipid rafts* (Leitinger e Hogg, 2002). Além disso, foi demonstrado que P2Y₂R, um GPCR, têm um domínio RGD em sua estrutura que lhe permite interagir com as integrinas (Erb *et al.*, 2001). Não é do nosso conhecimento a presença do domínio RGD na estrutura do AT1R, no entanto, uma das hipóteses especuladas é que a integrina αvβ3 possa intermediar os efeitos do T3 sobre o AT1R.

7.3 Regulação da expressão de beta-arrestinas e GRKs em cardiomiócitos estimulados com T3

No presente estudo, caracterizamos o efeito do T3 sobre a modulação da transcrição e expressão das isoformas de beta-arrestinas, assim como das GRKs, em cardiomiócitos. Verificamos que o tratamento com T3 aumenta a transcrição de ambas as isoformas de beta-arrestinas, no entanto, apenas a expressão proteica de beta-arrestina 2 encontra-se aumentada.

Na literatura, pouco se sabe a respeito da regulação dos hormônios tireoidianos (HTs) sobre a expressão e função das beta-arrestinas. Sabe-se que as arrestinas visuais possuem uma região responsiva ao ácido retinóico (Li *et al.*, 2002), cujo receptor pode heterodimerizar com os receptores nucleares de HTs e, recentemente, um estudo sobre a diferenciação de astrócitos mostrou que os HTs aumentam a expressão de beta-arrestina 1 e, consequentemente, promovem a internalização dos receptores β 2-adrenérgicos (Das *et al.*, 2016).

O receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R) pertence à classe B dos receptores acoplados à proteína G, podendo se ligar às duas isoformas de betaarrestina com igual afinidade (Oakley *et al.*, 2000). No entanto, análises de proteômica evidenciam uma maior rede de interações entre a beta-arrestina 2 e proteínas sinalizadoras após a estimulação do AT1R, quando comparado à beta-arrestina 1 (Xiao *et al.*, 2007). No mesmo sentido, a internalização do AT1R é mais prejudicada quando da ausência da beta-arrestina 2 (Ahn *et al.*, 2003).

No sistema cardiovascular, a beta-arrestina 2 exerce um efeito protetor sobre o miocárdio ao modular positivamente o lusitropismo e inotropismo cardíaco, enquanto os efeitos da beta-arrestina 1 já foram descritos por se contraporem aos efeitos benéficos da beta-arrestina 2, podendo agir, inclusive, como dominante negativo desta última (Ahn *et al.*, 2003). Estudos com células HEK293 demonstraram a diminuição da fosforilação de ERK_{1/2} após o silenciamento da beta-arrestina 2 e, ao contrário do esperado, o silenciamento de beta-arrestina 1 resultou no aumento da fosforilação de ERK_{1/2} (Ahn, Wei, *et al.*, 2004). Além disso, animais duplamente *knockouts* para as beta-arrestinas são incompatíveis com a vida, enquanto que a ausência de uma ou

outra isoforma são viáveis. Em conjunto, esses estudos sugerem a existência de um mecanismo de regulação recíproca entre as beta-arrestinas, onde a diminuição na expressão de uma isoforma pode levar ao aumento da outra. No caso do AT1R, esse mecanismo deve ser levado em consideração, visto que este pode interagir com ambas as isoformas (Oakley *et al.*, 2000).

No intuito de caracterizar a sinalização das beta-arrestinas em nosso modelo, a expressão gênica das GRKs 2, 5 e 6 foram avaliadas em cardiomiócitos estimulados com T3, levando em consideração a existência de uma atividade coordenada entre as isoformas de GRKs. No presente estudo, vimos que os HTs aumentam a transcrição de todas as GRKs avaliadas, sendo a modulação das GRKs 5 e 6 mais expressiva quando comparada à GRK2. Neste sentido, Kim e col. mostraram que a dessensitização do receptores, recrutamento de beta-arrestina e internalização são, inicialmente, mediados pelas GRKs 2 e 3, enquanto que as GRKs 5 e 6 permitem a ativação de ERK_{1/2} (Kim *et al.*, 2005).

Estudos sugerem a hipótese do *"bar code"*, segundo a qual o padrão de fosforilação dos GPCRs promovido pelas GRKs determina a isoforma de beta-arrestina a ser recrutada, bem como a conformação ativa adquirida pelo receptor e, em consequência, determina os efetores *downstream* (Kim *et al.*, 2005). Neste sentido, em cardiomiócitos isolados, a fosforilação do AT1R promovida pela GRK6 foi descrita por mediar o recrutamento de beta-arrestina 2, enquanto que a fosforilação promovida pela GRK2 recruta beta-arrestina 1 (Rajagopal *et al.*, 2006). Os detalhes relativos à preferência das GRKs por determinados sítios de fosforilação nos GPCRs ainda não foram elucidados, entretanto, levando-se em consideração as inúmeras possibilidades de fosforilação nas porções C-terminal e central dos receptores 7TMRs, também podemos supor inúmeras possibilidades de sinalização (Cahill *et al.*, 2017).

7.4 Contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

Em nosso estudo avaliamos a contribuição da sinalização independente de proteína G, através do silenciamento das beta-arrestinas 1 ou 2 por RNA de interferência, na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3. Demonstramos que apenas o silenciamento de beta-arrestina 2 é capaz de prevenir a hipertrofia dos cardiomiócitos estimulados com T3.

Estudos sobre o AT1R na insuficiência cardíaca sugerem que a sinalização clássica mediada por proteína G resulta em efeitos deletérios ao coração, como remodelamento, inflamação e desordens metabólicas. Neste sentido, a maioria das terapias disponíveis para as doenças cardíacas consiste na inibição desse receptor. A sinalização mediada por beta-arrestinas, em contrapartida, têm sido reportada por mediar efeitos benéficos ao miocárdio (Noma *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2009), como o aumento da contratilidade, reorganização do citoesqueleto e ativação de vias antiapoptóticas (Ahn *et al.*, 2009). No entanto, o papel fisiológico e patológico dessas proteínas ainda não foi devidamente esclarecido e estudos recentes contestam o efeito cardioprotetor comumente reportado.

Paralelamente aos trabalhos de grande repercussão que evidenciam o efeito anti-hipertrófico das beta-arrestinas através do uso agonistas tendenciosos de AngII (Monasky *et al.*, 2013) e agonistas endógenos (Ang 1-7/AT1R) (Galandrin *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2017), crescentes evidências sugerem o envolvimento das beta-arrestinas no crescimento dos cardiomiócitos (Lou *et al.*, 2016). Assim, animais transgênicos incapazes de ativar proteína G desenvolvem hipertrofia cardíaca exacerbada com menor área de fibrose e apoptose quando estimulados com AngII (Zhai *et al.*, 2005). Da mesma forma, a ativação mecânica dos receptores de apelina e de angiotensina II do tipo 1 leva ao desenvolvimento da hipertrofia por mecanismos mediados por beta-arrestinas (Rakesh *et al.*, 2010; Scimia *et al.*, 2012).

Recentemente, as beta-arrestinas foram descritas por mediar a transativação de EGFR e resposta hipertrófica em função de diferentes GPCRs (Maudsley *et al.*, 2000; Esposito *et al.*, 2011; Tilley, 2011), inclusive do AT1R (Zhai *et al.*, 2006).

7.5 Contribuição do mecanismo de endocitose dependente de clatrinas na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3

Nossos resultados evidenciam que a inibição do mecanismo de endocitose através de Concanavalina A previne a hipertrofia dos cardiomiócitos estimulados com T3, além de inibir a ativação de ERK_{1/2}.

A endocitose dependente de clatrinas e mediada por cavéolas consistem nas principais vias relacionadas à endocitose dos GPCRs (Guo *et al.*, 2015). No contexto da dessensitização, a endocitose dependente de clatrinas consiste em um mecanismo de regulação negativa da sinalização dependente de proteína G, uma vez que resulta na indisponibilidade do receptor aos seus agonistas (Sorkin e Von Zastrow, 2009). No entanto, sabemos que o processo de internalização não implica necessariamente no término da sinalização e que as beta-arrestinas ao promoverem a endocitose dos GPCRs ativados favorecem a sinalização em vesículas de endocitose.

A via de endocitose dependente de clatrinas é essencial para a manutenção da função cardíaca e estudos têm evidenciado sua importante contribuição no desenvolvimento da hipertrofia (Morisco *et al.*, 2008; He *et al.*, 2016). Neste sentido, Morisco e col. demonstraram que a sinalização hipertrófica decorrente da estimulação do receptor β 1-adrenérgico com isoproterenol é dependente do mecanismo de endocitose. Ainda, oi demonstrado no mesmo estudo que a Concanavalina A inibe a ativação de Akt e a hipertrofia mediada pelos receptores α -adrenérgicos (Morisco *et al.*, 2008).

RabGTPase consiste em uma proteína relacionada à internalização de proteínas e controla o acoplamento e fusão das vesículas de endocitose em compartimentos celulares. Estudos demonstraram que o aumento da expressão de RabGTPase é suficiente para desencadear o processo hipertrófico (Wu *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado que a internalização da integrina β3 está diretamente relacionada à ativação de vias hipertróficas, tais como S6K, MEK/ERK e PI3K/mTOR (Balasubramanian e Kuppuswamy, 2003).

É importante ressaltar que os resultados obtidos no presente estudo devem ser interpretados com cautela, uma vez que a Concanavalina A, assim como outros inibidores de endocitose (sucrose e dominantes negativos para dinamina) não são específicos para a via de endocitose dependente de clatrinas e interferem na sinalização de vários GPCRs (Guo *et al.*, 2015).

7.6 Internalização e translocação nuclear de AT1R sob efeito do T3

No presente estudo demonstramos o aumento da expressão de AT1R no núcleo de cardiomiócitos estimulados com T3 através de ensaios de microscopia de fluorescência e fracionamento subcelular. Evidências da presença de sítios nucleares da AngII datam do início da década de 70 (Robertson e Khairallah, 1971). Esses estudos, realizados em extratos nucleares, evidenciaram a presença dos três principais receptores de AngII no núcleo, sendo a maioria receptores do tipo 1 (Li e Zhuo, 2008; Gwathmey *et al.*, 2012). De maneira surpreendente, a densidade dos receptores nucleares de angiotensina no córtex renal é duas vezes maior comparado à da membrana plasmática; e em hepatócitos, essa diferença é ainda mais expressiva, cerca de 20 vezes maior (Booz *et al.*, 1992; Pendergrass *et al.*, 2006).

Parece não haver um consenso na literatura quanto à natureza ou origem dos receptores nucleares, se oriundos da membrana plasmática ou se expressos constitutivamente na membrana nuclear (Gwathmey *et al.*, 2012). Segundo Hunyady e col., a internalização e translocação nuclear do AT1R pode ser detectada em imagens de microscopia confocal cerca de 5 e 30 min após estimulação com AngII, respectivamente (Hunyady *et al.*, 2000). Acredita-se que a presença desses receptores no núcleo esteja relacionada com a regulação da transcrição (Li e Zhuo, 2008; Tadevosyan *et al.*, 2012).

A presença de diferentes componentes do sistema renina angiotensina, como Agt, renina, pró-renina, receptor de pró-renina, ECA e ECA2 já foi reportado em compartimentos nucleares, o que sugere a existência de um SRA intrácrino e formação intracelular de AngII (Alzayadneh e Chappell, 2015). Em 2010, Tadevosyan e col. descreveram uma sinalização intracelular mediada pelo AT1R, cuja ativação resulta na mobilização de IP3, cálcio e formação de ROS (Tadevosyan *et al.*, 2010). Em 2017, o

mesmo grupo descreveu a contribuição dessa sinalização intracelular na proliferação de fibroblastos cardíacos, assim como na síntese e secreção de colágeno (Tadevosyan *et al.*, 2017). Considerando o aumento da expressão nuclear de AT1R em modelos de insuficiência cardíaca, acredita-se que o SRA intracelular apresente significativa relevância fisiopatológica.

Estudos desenvolvidos por Baker e col. evidenciaram que a superexpressão de AnglI intracelular em cardiomiócitos e em camundongos promove o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca exacerbada. Ainda, a ineficiência do tratamento com Losartan na prevenção desses efeitos intracelulares da AnglI, indicaram o envolvimento de receptores intracelulares (Baker *et al.*, 2004).

Ao formar complexos altamente estáveis com os GPCRs, as beta-arrestinas exercem um efeito inibitório sobre a translocação nuclear de proteínas sinalizadoras (Ahn, Shenoy, *et al.*, 2004; Aplin *et al.*, 2007). No entanto, evidências indicam que a sinalização dependente de beta-arrestinas iniciada no citoplasma também pode se estender para o núcleo (Neuhaus *et al.*, 2006). Em 2005, Kang e col. demonstraram a primeira evidência da translocação nuclear de beta-arrestinas (Kang *et al.*, 2005). No núcleo, ao interagir com promotores específicos, as beta-arrestinas recrutam histonas e modulam a transcrição gênica. Assim, dadas as evidências da presença nuclear de beta-arrestinas, acreditamos que estas possam estar envolvidas com a translocação nuclear do AT1R observada em nosso estudo.

No presente estudo também verificamos, através de ensaios de imunoprecipitação, uma maior interação do AT1R com a beta-arrestina 2. Esse resultado corrobora com a hipótese da beta-arrestina 2 intermediar a translocação do AT1R para o núcleo dos cardiomiócitos estimulados com T3.

7.7 Ensaios de BRET para análise da ativação de proteína G e recrutamento de beta-arrestinas em cardiomiócitos estimulados com T3

Já é bem descrito na literatura que as alterações nos níveis de hormônios tireoidianos (HTs) são acompanhadas da modulação do sistema renina angiotensina (SRA) sistêmico e local. Kobori e col. (Kobori *et al.*, 1997; Kobori *et al.*, 1999) demonstraram a importante contribuição do SRA cardíaco no processo hipertrófico mediado pelos HTs e, posteriormente, nosso grupo evidenciou a contribuição do AT1R nesse processo (Hu *et al.*, 2003; Diniz *et al.*, 2007; 2009). No entanto, os mecanismos relacionados aos efeitos dos HTs no AT1R são desconhecidos, ou seja, não sabemos se a ação do T3 sobre esse receptor consiste em uma ação direta ou se intermediada por outra estrutura; se resulta na sinalização clássica do AT1R, mediada por proteína G e por beta-arrestinas; se depende da ação autócrina de angiotensina II; ou se envolve a ativação do AT1R como um mecanoreceptor.

No intuito de compreender os mecanismos relacionados à "ativação" do AT1R em função do tratamento com T3, avaliamos a ativação de proteína G e o recrutamento de beta-arrestinas 1 e 2 através dos ensaios de BRET. Embora diferentes isoformas de proteína G_α sejam expressas no tecido cardíaco, apenas G_{α12/13} e G_{αq/11} encontram-se associadas às ações intracelulares mediadas pelo AT1R (Tilley, 2011). Desta forma, os ensaios de BRET foram realizados usando apenas proteína G_{αq}.

A fim de verificar a existência de uma ação direta dos HTs sobre a ativação do AT1R, assim como o reportado para a integrina αvβ3 (Bergh *et al.*, 2005), os ensaios de BRET foram realizados inicialmente em células HEK293. Os resultados obtidos revelaram a ausência do efeito do T3 sobre a ativação de proteína G e sobre o recrutamento de beta-arrestinas. Neste sentido, duas interpretações foram propostas: a primeira é que o T3 não interage diretamente com o AT1R, sendo necessária a presença de outras estruturas para que essa interação ocorra (heterodimerização ou ativação heteróloga do AT1R); e a segunda é que o T3 não modula a sinalização dependente ou independente de proteína G via AT1R.

De acordo com estudos recentes, os receptores acoplados à proteína G podem forma homo e heterodímeros, o que amplia sua função intracelular (Abdalla *et al.*, 2000). Neste sentido, estudos têm reportado a formação de dímeros associados ao AT1R, tais como AT1R/AT2R (Abdalla *et al.*, 2001), AT1R/MAS (Kostenis *et al.*, 2005), AT1R/receptor de endotelina B, AT1R/receptor de bradicinina B2 (Abdalla *et al.*, 2000), AT1R/receptores β -adrenérgicos (Barki-Harrington *et al.*, 2003). Barki-Harrington e col. evidenciaram um efeito de inibição cruzada entre os receptores AT1R e beta2adrenérgico, onde o bloqueio de determinado receptor interfere na resposta do outro. Assim, ensaios de BRET foram realizados em células HEK293 expressando o AT1R e outros receptores com os quais este poderia dimerizar, AT2, MAS e β 2-adrenérgico. Contudo, também não observamos variação do sinal de BRET em função do T3. Apesar de não termos verificado o envolvimento desses receptores, a possiblidade de interação do AT1R com outros receptores, tais como a integrina $\alpha v\beta$ 3, p30TR α , ainda precisam ser investigados.

Dada a ausência de efeito do T3 nas células HEK293, testamos a possiblidade de usar células com características mais próximas às culturas primárias de cardiomiócitos, mas que fossem fáceis de transfectar. Assim, testamos a linhagem de células H9c2 e os cardiomiócitos humanos derivados de iPS. De maneira inesperada, as células H9c2 não responderam ao tratamento T3 quanto à fosforilação de ERK_{1/2}. Assim, os ensaios de BRET foram realizados apenas com os cardiomiócitos^{iPS}. Como essas células também não responderam ao T3, decidimos realizar os ensaios de BRET com cultura primária de cardiomiócitos, apesar das dificuldades relacionadas à transfecção das culturas primárias com plasmídeos. O grupo de células estimulado com AngII apresentaram a resposta esperada, garantindo que as células foram devidamente transfectadas. Cogitamos a possibilidade de não termos verificado o efeito dos HTs devido à ausência de estímulo mecânico, uma vez que os ensaios de BRET foram realizados com células em suspensão.

Conforme mencionado anteriormente, Sadoshima e col. mostraram evidências de que o estiramento mecânico pode levar à liberação de AngII para o meio extracelular em cardiomiócitos (Sadoshima *et al.*, 1993). Além disso, outros trabalhos demonstram
que o AT1R consiste em um mecanoreceptor (Zou *et al.*, 2004) e que o estiramento mecânico é capaz de ativar a sinalização independente de proteína G (Rakesh *et al.*, 2010). Diversos trabalhos mostram que a carga mecânica gerada a partir do mecanismo de excitação-contração é suficiente para induzir a reexpressão de genes fetais cardíacos, bem como ao aumento de proteínas sarcoméricas (Qi *et al.*, 1997; Eble *et al.*, 1998). Em ensaios com cultura primária de cardiomiócitos foi demonstrado que o aumento da contratilidade está diretamente relacionado com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Eble *et al.*, 1998). Apesar dos efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos exercidos pelos HTs sobre as células musculares cardíacas (Segal *et al.*, 1996; Dillmann, 2002), não há evidências na literatura de que o aumento da contratilidade promova à ativação do AT1R.

No intuito de verificar o envolvimento de estímulos contráteis (biomecânicos) secundários ao tratamento com T3 na ativação do AT1R, experimentos de BRET foram realizados com cardiomiócitos em aderidos (dados não incluídos). No entanto, esses resultados não foram diferentes dos obtidos para as células em suspensão. Assim, considerando os resultados obtidos dos experimentos de BRET concluímos que o mecanismo através do qual o T3 promove seus efeitos no AT1R difere do mecanismo da AngII. Assim, considerando que este ainda é desconhecido, os ensaios de BRET tornaram-se ineficientes para o estudo dos efeitos do T3, mesmo nos cardiomiócitos obtidos de cultura primária. Acreditamos que o efeito do T3 também não pode ser verificado nos experimentos com culturas primárias, devido à desproporção entre as proteínas envolvidas.

8 CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo avaliar a contribuição da sinalização dependente de beta-arrestinas na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3 e mediada pelo AT1R.

- Concluímos que o T3 promove a ativação transiente de ERK_{1/2}, a qual é parcialmente mediada pelo AT1R, e que esta ativação contribui com a hipertrofia cardiomiocítica
- Através dos ensaios de silenciamento gênico por RNA de interferência concluímos que a sinalização dependente de beta-arrestina 2 encontra-se envolvida com a ativação de ERK_{1/2} e com a hipertrofia cardiomiocítica promovidas pelo T3.
- A partir dos ensaios realizados com Concanavalina A, concluímos que o mecanismo de endocitose contribui para a ativação de ERK_{1/2} e para a hipertrofia cardiomiocítica promovidas pelo T3.
- Considerando os resultados dos experimentos de fracionamento e microscopia de fluorescência, concluímos que o T3 aumenta a expressão nuclear de AT1R, sugerindo sua translocação a partir da membrana plasmática. Ainda, o aumento da interação entre beta-arrestina 2 e AT1R, verificado através dos ensaios de imunoprecipitação, sugere o envolvimento da beta-arrestina 2 nesse processo.
- Apesar dos resultados aparentemente negativos obtidos dos experimentos de BRET, concluímos que o mecanismo através do qual o T3 exerce seus efeitos sobre o AT1R difere do mecanismo da AngII, ou seja, não envolve uma interação direta. Além disso, concluímos que a heterodimerização entre AT1R e os receptores AT2R, MAS e beta2-adrenérgico não apresenta relação com as ações mediadas pelo T3. Os ensaios de *binding* para AngII atestam que o T3 não interfere na ligação da AngII no AT1R.

Contudo, baseado nos resultados obtidos, contemplamos duas principais possibilidades para essa interação. A primeira delas consiste na ação autócrina da AngII, baseada no trabalho de Sadoshima e col. (Sadoshima *et al.*, 1993) que evidencia a presença de estoques intracelulares de AngII em cardiomiócitos. A segunda possibilidade, baseada nos achados de Tóth e col. (Tóth *et al.*, 2018), é da ativação heteróloga do AT1R como resultado de ações intracelulares do T3 (Figura 42).



Figura 42: Modelo proposto do mecanismo de ativação de MAPK/ERK através da sinalização dependente de beta-arrestinas na hipertrofia cardiomiocítica induzida por T3 via AT1R.

REFERÊNCIAS¹

ABDALLA, S. et al. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. **J Biol Chem,** v. 276, n. 43, p. 39721-6, Oct 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11507095</u> >.

ABDALLA, S.; LOTHER, H.; QUITTERER, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. **Nature,** v. 407, n. 6800, p. 94-8, Sep 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993080</u> >.

AHN, S. et al. {beta}-Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. **J Biol Chem,** v. 284, n. 13, p. 8855-65, Mar 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19171933</u> >.

______. Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 100, n. 4, p. 1740-4, Feb 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582207</u> >.

_____. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. J Biol Chem, v. 279, n. 34, p. 35518-25, Aug 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15205453</u> >.

_____. Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. **J Biol Chem,** v. 279, n. 9, p. 7807-11, Feb 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711824</u> >.

ALZAYADNEH, E. M.; CHAPPELL, M. C. Nuclear expression of renin-angiotensin system components in NRK-52E renal epithelial cells. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst,** v. 16, n. 4, p. 1135-48, Dec 2015. ISSN 1752-8976. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961503</u> >.

APLIN, M. et al. Differential extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation by the angiotensin type 1 receptor supports distinct phenotypes of cardiac myocytes. **Basic Clin Pharmacol Toxicol,** v. 100, n. 5, p. 296-301, May 2007. ISSN 1742-7835. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448114</u> >.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

ATTRAMADAL, H. et al. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. **J Biol Chem,** v. 267, n. 25, p. 17882-90, Sep 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1517224</u> >.

BAKER, K. M. et al. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Regul Pept,** v. 120, n. 1-3, p. 5-13, Aug 2004. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177915</u> >.

BALASUBRAMANIAN, S.; KUPPUSWAMY, D. RGD-containing peptides activate S6K1 through beta3 integrin in adult cardiac muscle cells. **J Biol Chem,** v. 278, n. 43, p. 42214-24, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12909616</u> >.

BARKI-HARRINGTON, L.; LUTTRELL, L. M.; ROCKMAN, H. A. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. **Circulation**, v. 108, n. 13, p. 1611-8, Sep 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963634 >.

BARRETO-CHAVES, M. L.; HEIMANN, A.; KRIEGER, J. E. Stimulatory effect of dexamethasone on angiotensin-converting enzyme in neonatal rat cardiac myocytes. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 6, p. 661-4, Jun 2000. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10829094</u> >.

BERGH, J. J. et al. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 2864-71, Jul 2005. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802494</u> >.

BOCCALANDRO, C. et al. Severe reversible dilated cardiomyopathy and hyperthyroidism: case report and review of the literature. **Endocr Pract,** v. 9, n. 2, p. 140-6, 2003 Mar-Apr 2003. ISSN 1530-891X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917077</u> >.

BOOZ, G. W. et al. Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. **Endocrinology,** v. 130, n. 6, p. 3641-9, Jun 1992. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1597161</u> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051</u> >.

BUENO, O. F. et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. **EMBO J,** v. 19, n. 23, p. 6341-50, Dec 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101507</u> >.

BUENO, O. F.; MOLKENTIN, J. D. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. **Circ Res,** v. 91, n. 9, p. 776-81, Nov 2002. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411391</u> >.

CAHILL, T. J. et al. Distinct conformations of GPCR-β-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 114, n. 10, p. 2562-2567, 03 2017. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28223524</u> >.

CARNEIRO-RAMOS, M. S. et al. Blockage of angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation. **Basic Res Cardiol,** v. 105, n. 3, p. 325-35, May 2010. ISSN 1435-1803. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20155476</u> >.

CHATTERGOON, N. N. et al. Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation. **FASEB J,** v. 26, n. 1, p. 397-408, Jan 2012. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21974928</u> >.

CINI, G. et al. Thyroid hormones and the cardiovascular system: pathophysiology and interventions. **Biomed Pharmacother,** v. 63, n. 10, p. 742-53, Dec 2009. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917524</u> >.

DA SILVA, I. B. et al. Cardioprotective effect of thyroid hormone is mediated by AT2 receptor and involves nitric oxide production via Akt activation in mice. **Heart Vessels,** v. 33, n. 6, p. 671-681, Jun 2018. ISSN 1615-2573. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29218410</u> >.

DAHL, P.; DANZI, S.; KLEIN, I. Thyrotoxic cardiac disease. **Curr Heart Fail Rep,** v. 5, n. 3, p. 170-6, Sep 2008. ISSN 1546-9549. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752767</u> >.

DANSER, A. H. Local renin-angiotensin systems. **Mol Cell Biochem,** v. 157, n. 1-2, p. 211-6, 1996 Apr 12-26 1996. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8739248</u> >.

DAS, M.; GHOSH, M.; DAS, S. Thyroid Hormone-Induced Differentiation of Astrocytes is Associated with Transcriptional Upregulation of β -arrestin-1 and β -adrenergic Receptor-Mediated Endosomal Signaling. **Mol Neurobiol,** v. 53, n. 8, p. 5178-90, 10 2016. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26399643</u> >.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**, v. 12, n. 6, p. 459-66, Jun 2002. ISSN 1050-7256. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165107</u> >.

DAVIS, P. J.; GOGLIA, F.; LEONARD, J. L. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Nat Rev Endocrinol,** v. 12, n. 2, p. 111-21, Feb 2016. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26668118</u> >.

DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Front Neuroendocrinol**, v. 29, n. 2, p. 211-8, May 2008. ISSN 1095-6808. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17983645</u> >.

DEPRE, C. et al. Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. **Circulation,** v. 114, n. 17, p. 1821-8, Oct 2006. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043166</u> >.

DEWIRE, S. M. et al. Beta-arrestins and cell signaling. **Annu Rev Physiol**, v. 69, p. 483-510, 2007. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305471</u> >.

DILLMANN, W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. **Heart Fail Rev,** v. 15, n. 2, p. 125-32, Mar 2010. ISSN 1573-7322. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125327</u> >.

DILLMANN, W. H. Cellular action of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**, v. 12, n. 6, p. 447-52, Jun 2002. ISSN 1050-7256. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165105</u> >.

DINIZ, G. P.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. Angiotensin type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors mediate the increase in TGF-beta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Pflugers Arch**, v. 454, n. 1, p. 75-81, Apr 2007. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17206447</u> >.

______. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3beta/mTOR signaling pathway. **Basic Res Cardiol,** v. 104, n. 6, p. 653-67, Nov 2009. ISSN 1435-1803. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19588183</u> >.

DORN, G. W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 49, n. 5, p. 962-70, May 2007. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389260</u> >.

DZAU, V. J. Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects. **Am J Med,** v. 84, n. 3A, p. 22-7, Mar 1988. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3218653</u> >.

DÖRR, M. et al. The association of thyroid function with cardiac mass and left ventricular hypertrophy. J Clin Endocrinol Metab, v. 90, n. 2, p. 673-7, Feb 2005. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522926</u> >.

EBLE, D. M. et al. Contractile activity is required for sarcomeric assembly in phenylephrine-induced cardiac myocyte hypertrophy. **Am J Physiol**, v. 274, n. 5 Pt 1, p. C1226-37, May 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612209</u> >.

EGHBALI, M. et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. **Circ Res,** v. 96, n. 11, p. 1208-16, Jun 2005. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905459</u> >.

EHLER, E. Cardiac cytoarchitecture - why the "hardware" is important for heart function! **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 7 Pt B, p. 1857-63, Jul 2016. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26577135</u> >.

ERB, L. et al. An RGD sequence in the P2Y(2) receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. **J Cell Biol**, v. 153, n. 3, p. 491-501, Apr 2001. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331301</u> >.

ESPOSITO, G. et al. EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by β -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. **Basic Res Cardiol**, v. 106, n. 4, p. 577-89, Jun 2011. ISSN 1435-1803. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21369867</u> >.

FAZIO, S. et al. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. **Recent Prog Horm Res,** v. 59, p. 31-50, 2004. ISSN 0079-9963. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749496</u> >.

FERGUSON, S. S. et al. Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1. **J Biol Chem,** v. 270, n. 42, p. 24782-9, Oct 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559596</u> >.

GALANDRIN, S. et al. Cardioprotective Angiotensin-(1-7) Peptide Acts as a Natural-Biased Ligand at the Angiotensin II Type 1 Receptor. **Hypertension**, v. 68, n. 6, p. 1365-1374, 12 2016. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27698068</u> >.

GIBB, A. A.; HILL, B. G. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. **Circ Res,** v. 123, n. 1, p. 107-128, Jun 2018. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29929976</u> >.

GOODMAN, O. B. et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. **Nature,** v. 383, n. 6599, p. 447-50, Oct 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837779 >.

GUO, S. et al. Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, n. 10 Pt A, p. 2101-10, Oct 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26055893</u> >.

GWATHMEY, T. M. et al. Novel roles of nuclear angiotensin receptors and signaling mechanisms. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 302, n. 5, p. R518-30, Mar 2012. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170620</u> >.

HAQUE, Z. K.; WANG, D. Z. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling. **Cell Mol Life Sci,** v. 74, n. 6, p. 983-1000, Mar 2017. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27714411</u> >.

HE, L.; CHEN, L.; LI, L. The mechanosensitive APJ internalization via clathrin-mediated endocytosis: A new molecular mechanism of cardiac hypertrophy. **Med Hypotheses,** v. 90, p. 6-10, May 2016. ISSN 1532-2777. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27063076</u> >.

HILL, J. A.; OLSON, E. N. Cardiac plasticity. **N Engl J Med,** v. 358, n. 13, p. 1370-80, Mar 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367740</u> >.

HONG, K. et al. Mechanical activation of angiotensin II type 1 receptors causes actin remodelling and myogenic responsiveness in skeletal muscle arterioles. **J Physiol,** v. 594, n. 23, p. 7027-7047, 12 2016. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27531064</u> >.

HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 6, p. R1473-80, Dec 2003. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933361</u> >.

HU, L. W.; LIBERTI, E. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats. **Virchows Arch**, v. 446, n. 3, p. 265-9, Mar 2005. ISSN 0945-6317. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668802</u> >.

HUNYADY, L. et al. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. **Regul Pept,** v. 91, n. 1-3, p. 29-44, Jul 2000. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967200</u> >.

KAHALY, G. J.; DILLMANN, W. H. Thyroid hormone action in the heart. **Endocr Rev,** v. 26, n. 5, p. 704-28, Aug 2005. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632316</u> >.

KALYANARAMAN, H. et al. Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membranelocalized receptor. **Sci Signal,** v. 7, n. 326, p. ra48, May 2014. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24847117</u> >.

KANG, J. et al. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 833-47, Dec 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325578 >.

KENESSEY, A.; OJAMAA, K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. **J Biol Chem,** v. 281, n. 30, p. 20666-72, Jul 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16717100</u> >.

KIM, J. et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestinmediated angiotensin II receptor signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1442-7, Feb 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671181</u> >.

KIM, K. S. et al. β-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 303, n. 8, p. H1001-10, Oct 2012. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22886417</u> >.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. **Circulation,** v. 116, n. 15, p. 1725-35, Oct 2007. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923583</u> >.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **N Engl J Med,** v. 344, n. 7, p. 501-9, Feb 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172193</u> >. KOBAYASHI, H. et al. Beta-arrestin2 enhances beta2-adrenergic receptor-mediated nuclear translocation of ERK. **Cell Signal,** v. 17, n. 10, p. 1248-53, Oct 2005. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16038799</u> >.

KOBORI, H. et al. Local renin-angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. **J Endocrinol,** v. 160, n. 1, p. 43-7, Jan 1999. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9854175</u> >.

. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. **Am J Physiol,** v. 273, n. 2 Pt 2, p. H593-9, Aug 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9277473 >.

KOSTENIS, E. et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation,** v. 111, n. 14, p. 1806-13, Apr 2005. ISSN 1524-4539. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809376 >.

KRUPNICK, J. G.; BENOVIC, J. L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 289-319, 1998. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597157</u> >.

KUMAR, R. et al. The intracrine renin-angiotensin system. **Clin Sci (Lond),** v. 123, n. 5, p. 273-84, Sep 2012. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22590974</u> >.

LEITINGER, B.; HOGG, N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. **J Cell Sci,** v. 115, n. Pt 5, p. 963-72, Mar 2002. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870215</u> >.

LEVY, D. et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N Engl J Med,** v. 322, n. 22, p. 1561-6, May 1990. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2139921</u> >.

LI, A.; ZHU, X.; CRAFT, C. M. Retinoic acid upregulates cone arrestin expression in retinoblastoma cells through a Cis element in the distal promoter region. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** v. 43, n. 5, p. 1375-83, May 2002. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980849</u> >.

LI, N. et al. Activation of the cardiac proteasome promotes angiotension II-induced hypertrophy by down-regulation of ATRAP. **J Mol Cell Cardiol**, v. 79, p. 303-14, Feb 2015. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25526681</u> >.

LI, X. C.; ZHUO, J. L. Intracellular ANG II directly induces in vitro transcription of TGF-beta1, MCP-1, and NHE-3 mRNAs in isolated rat renal cortical nuclei via activation of nuclear AT1a receptors. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 294, n. 4, p. C1034-45, Apr 2008. ISSN 0363-6143. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256274 >.

LIN, H. Y. et al. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. **Am J Physiol**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. C1014-24, May 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329948 >.

LIU, Y. et al. Thyroid hormone analog 3,5-diiodothyropropionic acid promotes healthy vasculature in the adult myocardium independent of thyroid effects on cardiac function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 5, p. H1551-7, May 2009. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286941</u> >.

LORENZ, K. et al. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. **Nat Med,** v. 15, n. 1, p. 75-83, Jan 2009. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060905</u> >.

_____. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 41, n. 12, p. 2351-5, Dec 2009. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666137</u> >.

LOU, J. et al. Type III Transforming Growth Factor-β Receptor Drives Cardiac Hypertrophy Through β-Arrestin2-Dependent Activation of Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. **Hypertension**, v. 68, n. 3, p. 654-66, 09 2016. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27432858</u> >.

LUTTRELL, L. M. et al. G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. J Biol Chem, v. 272, n. 50, p. 31648-56, Dec 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395506 >.

LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of Gprotein-coupled receptor signals. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 3, p. 455-65, Feb 2002. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861753</u> >.

LUTTRELL, L. M. et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, n. 5, p. 2449-54, Feb 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226259 >.

LYON, R. C. et al. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. **Circ Res,** v. 116, n. 8, p. 1462-1476, Apr 2015. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25858069</u> >.

LYU, L. et al. A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin angiotensin system in cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 89, n. Pt B, p. 268-79, Dec 2015. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26497614</u> >.

MAUDSLEY, S. et al. The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. **J Biol Chem,** v. 275, n. 13, p. 9572-80, Mar 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734107</u> >.

MONASKY, M. M. et al. The β -arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 305, n. 6, p. H856-66, Sep 2013. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873795</u> >.

MORISCO, C. et al. Endocytosis machinery is required for beta1-adrenergic receptor-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes. **Cardiovasc Res,** v. 78, n. 1, p. 36-44, Apr 2008. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18194989</u> >.

MUSLIN, A. J. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Clin Sci (Lond),** v. 115, n. 7, p. 203-18, Oct 2008. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752467</u> >.

MUTLAK, M.; KEHAT, I. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. **Front Pharmacol,** v. 6, p. 149, 2015. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26257652</u> >.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nat Rev Cardiol,** v. 15, n. 7, p. 387-407, Jul 2018. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29674714</u> >.

NEUHAUS, E. M. et al. Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 15, p. 3047-56, Aug 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820410</u> >.

NOMA, T. et al. Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. J Clin Invest, v. 117, n. 9, p. 2445-58, Sep 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786238 >.

O'NEAL, P. et al. Experimental hyperthyroidism in rats increases the expression of the ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 and stimulates multiple proteolytic pathways in skeletal muscle. **J Cell Biochem,** v. 108, n. 4, p. 963-73, Nov 2009. ISSN 1097-4644. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19777444 >.

OAKLEY, R. H. et al. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. **J Biol Chem,** v. 275, n. 22, p. 17201-10, Jun 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10748214</u> >.

OJAMAA, K. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Vascul Pharmacol**, v. 52, n. 3-4, p. 113-9, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 1879-3649. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005976</u> >.

PENDERGRASS, K. D. et al. Differential expression of nuclear AT1 receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2. Lewis rat. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 290, n. 6, p. F1497-506, Jun 2006. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403834</u> >.

PERRINO, C. et al. Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. **J Clin Invest,** v. 116, n. 6, p. 1547-60, Jun 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741575</u> >.

PITCHER, J. A.; FREEDMAN, N. J.; LEFKOWITZ, R. J. G protein-coupled receptor kinases. Annu Rev Biochem, v. 67, p. 653-92, 1998. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759500</u> >.

PIU, F.; GAUTHIER, N. K.; WANG, F. Beta-arrestin 2 modulates the activity of nuclear receptor RAR beta2 through activation of ERK2 kinase. **Oncogene,** v. 25, n. 2, p. 218-29, Jan 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170358</u> >.

POWELL, S. R. et al. The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease.Prog Mol Biol TranslSci,v.109,p.295-346,2012.ISSN1878-0814.Disponívelem: <</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22727426>.

PREMONT, R. T.; GAINETDINOV, R. R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. **Annu Rev Physiol,** v. 69, p. 511-34, 2007. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305472</u> >.

QI, M. et al. Myosin heavy chain gene expression in neonatal rat heart cells: effects of [Ca2+]i and contractile activity. **Am J Physiol**, v. 273, n. 2 Pt 1, p. C394-403, Aug 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9277337</u> >.

RAJAGOPAL, K. et al. Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 103, n. 44, p. 16284-9, Oct 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060617</u> >.

RAKESH, K. et al. beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. **Sci Signal,** v. 3, n. 125, p. ra46, Jun 2010. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530803</u> >.

RAZVI, S. et al. Thyroid Hormones and Cardiovascular Function and Diseases. **J Am Coll Cardiol,** v. 71, n. 16, p. 1781-1796, Apr 2018. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29673469</u> >.

REN, X. R. et al. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestinmediated signaling of V2 vasopressin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 102, n. 5, p. 1448-53, Feb 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671180</u> >.

ROBERTSON, A. L.; KHAIRALLAH, P. A. Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. **Science,** v. 172, n. 3988, p. 1138-9, Jun 1971. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4324923</u> >.

ROSE, B. A.; FORCE, T.; WANG, Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. **Physiol Rev,** v. 90, n. 4, p. 1507-46, Oct 2010. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959622</u> >.

RUPPERT, C. et al. Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 18, p. 7440-5, Apr 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23589880</u> >.

RYBIN, V.; STEINBERG, S. F. Thyroid hormone represses protein kinase C isoform expression and activity in rat cardiac myocytes. **Circ Res,** v. 79, n. 3, p. 388-98, Sep 1996. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781472</u> >.

SADOSHIMA, J. et al. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. **Cell,** v. 75, n. 5, p. 977-84, Dec 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252633 >.

SANTOS, G. A. et al. Comparative analyses of downstream signal transduction targets modulated after activation of the AT1 receptor by two β -arrestin-biased agonists. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 131, 2015. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26191004</u> >.

SCIMIA, M. C. et al. APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 394-8, Aug 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22810587</u> >.

SEGAL, J. et al. Acute effect of thyroid hormone in the rat heart: role of calcium. J Endocrinol, v. 149, n.1,p.73-80,Apr1996.ISSN0022-0795.Disponívelem:<</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676057 >.

SELMI, S.; SAMUELS, H. H. Thyroid hormone receptor/and v-erbA. A single amino acid difference in the C-terminal region influences dominant negative activity and receptor dimer formation. **J Biol Chem,** v. 266, n. 18, p. 11589-93, Jun 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675637</u> >.

SIU, C. W. et al. Incidence, clinical characteristics and outcome of congestive heart failure as the initial presentation in patients with primary hyperthyroidism. **Heart,** v. 93, n. 4, p. 483-7, Apr 2007. ISSN 1468-201X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005710</u> >.

SMITH, J.; YU, R.; HINKLE, P. M. Activation of MAPK by TRH requires clathrin-dependent endocytosis and PKC but not receptor interaction with beta-arrestin or receptor endocytosis. **Mol Endocrinol,** v. 15, n. 9, p. 1539-48, Sep 2001. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518803</u> >.

SMITH, J. S.; RAJAGOPAL, S. The β -Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. **J Biol Chem,** v. 291, n. 17, p. 8969-77, Apr 2016. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984408</u> >.

SORKIN, A.; VON ZASTROW, M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 10, n. 9, p. 609-22, Sep 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19696798</u> >. SUGDEN, P. H.; CLERK, A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. **Circ Res,** v. 83, n. 4, p. 345-52, Aug 1998. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721691</u> >.

TADEVOSYAN, A. et al. Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. **J Biol Chem,** v. 285, n. 29, p. 22338-49, Jul 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463030</u> >.

_____. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. **J Physiol**, v. 590, n. 6, p. 1313-30, Mar 2012. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22183719</u> >.

______. Intracellular Angiotensin-II Interacts With Nuclear Angiotensin Receptors in Cardiac Fibroblasts and Regulates RNA Synthesis, Cell Proliferation, and Collagen Secretion. **J Am Heart Assoc**, v. 6, n. 4, Apr 2017. ISSN 2047-9980. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381466</u> >.

TAKANO, A. P.; DINIZ, G. P.; BARRETO-CHAVES, M. L. AMPK signaling pathway is rapidly activated by T3 and regulates the cardiomyocyte growth. **Mol Cell Endocrinol**, v. 376, n. 1-2, p. 43-50, Aug 2013. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748029</u> >.

TAKANO, A. P. C. et al. AT1 receptor blockage impairs NF-κB activation mediated by thyroid hormone in cardiomyocytes. **Pflugers Arch**, v. 470, n. 3, p. 549-558, Mar 2018. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29178049</u> >.

TAVARES, F. M. et al. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. **Cardiovasc Drugs Ther,** v. 27, n. 5, p. 393-402, Oct 2013. ISSN 1573-7241. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23807455</u> >.

TEIXEIRA, L. B. et al. Ang-(1-7) is an endogenous β-arrestin-biased agonist of the AT. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 11903, Sep 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28928410</u> >.

TEOH, C. M.; TAM, J. K.; TRAN, T. Integrin and GPCR Crosstalk in the Regulation of ASM Contraction Signaling in Asthma. **J Allergy (Cairo)**, v. 2012, p. 341282, 2012. ISSN 1687-9791. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056062</u> >.

TILLEY, D. G. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. **Circ Res,** v. 109, n. 2, p. 217-30, Jul 2011. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737817</u> >.

TOHGO, A. et al. beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibitsERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. J Biol Chem, v. 277, n. 11,p.9429-36,Mar2002.ISSN0021-9258.Disponívelem:<</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777902 >.

TOMANEK, R. J.; BUSCH, T. L. Coordinated capillary and myocardial growth in response to thyroxine treatment. **Anat Rec,** v. 251, n. 1, p. 44-9, May 1998. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605219</u> >.

TÓTH, A. D. et al. Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by β -arrestins. **J Biol Chem,** v. 293, n. 3, p. 876-892, Jan 2018. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29146594</u> >.

VARGAS, F. et al. The renin-angiotensin system in thyroid disorders and its role in cardiovascular and renal manifestations. **J Endocrinol,** v. 213, n. 1, p. 25-36, Apr 2012. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043064</u> >.

WANG, B.; OUYANG, J.; XIA, Z. Effects of triiodo-thyronine on angiotensin-induced cardiomyocyte hypertrophy: reversal of increased beta-myosin heavy chain gene expression. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 84, n. 8-9, p. 935-41, 2006 Aug-Sep 2006. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17111039</u> >.

WU, G. et al. Increased myocardial Rab GTPase expression: a consequence and cause of cardiomyopathy. **Circ Res,** v. 89, n. 12, p. 1130-7, Dec 2001. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739277</u> >.

XIAO, K. et al. Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 29, p. 12011-6, Jul 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620599</u> >.

ZHAI, P. et al. An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. **Circ Res,** v. 99, n. 5, p. 528-36, Sep 2006. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16902180</u> >.

_____. Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. J Clin Invest, v. 115, n. 11, p. 3045-56, Nov 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16276415</u> >.

ZHANG, J.; LAZAR, M. A. The mechanism of action of thyroid hormones. **Annu Rev Physiol**, v. 62, p. 439-66, 2000. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845098</u> >.

ZOU, Y. et al. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. **Nat Cell Biol,** v. 6, n. 6, p. 499-506, Jun 2004. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15146194</u> >.